

T.C.

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

GÜLHANE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

IN VITRO ALZHEİMER HASTALIK MODELİNDE NARİNGİN VE URSOLİK ASİDİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ecz. Emre KORKMAZ

Farmasötik Toksikoloji

Doktora Programı

Doktora Tezi

HAZİRAN 2025



SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

GÜLHANE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

IN VITRO ALZHEİMER HASTALIK MODELİNDE NARİNGİN VE URSOLİK ASİDİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ecz. Emre KORKMAZ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Merve GÜDÜL BACANLI

Farmasötik Toksikoloji

DOKTORA TEZİ

ANKARA

HAZİRAN 2025

BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

• Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,

• 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 çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

• Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,

• Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Emre KORKMAZ

26.06.2025

ÖZET

Alzheimer hastalığı (AH), günümüzde tedavi ve önleme yöntemlerinin yetersiz kaldığı, önemli bir halk sağlığı sorunu olarak öne çıkmaktadır. Son yıllarda, hastalığın patofizyolojisine yönelik yeni stratejiler geliştirilmesi amacıyla, fitokimyasal bileşiklerin nöroprotektif etkilerinin araştırılmasına artan bir ilgi mevcuttur. Bu kapsamda, turunçgillerde bulunan bir flavonoid olan naringin, antienflamatuvar, antiviral, antioksidan ve antihipertansif etkileriyle dikkat çekmektedir. Kardiyo- ve serebrovasküler hastalıkların tedavisindeki potansiyelinin yanı sıra, lipopolisakkarit (LPS) kaynaklı nöronal apoptozu azaltıcı etkisi gösterilmiş ve Alzheimer patolojisi üzerindeki olası etkileri de araştırılmaya başlanmıştır. Benzer şekilde, elma, fesleğen, çilek ve meyve kabuklarında bulunan doğal bir triterpenoid olan ursolik asit, antioksidan, antikanser ve antienflamatuvar özellikler taşımakta olup, nöroprotektif etkilerinin özellikle oksidatif stresin baskılanması ve pro-enflamatuvar sinyallerin inhibisyonu ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada, naringin ve ursolik asidin AH üzerindeki olası etkileri, insan nöroblastoma hücrelerinde (SH-SY5Y) difenilalanin (FF) ile oluşturulan bir *in vitro* AH modelinde değerlendirilmiştir. Öncelikle 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum bromür) (MTT) testi ile bu bileşiklerin sitotoksik etkileri ve model üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Ardından, belirlenen etkili konsantrasyonlarda, hücre içi reaktif oksijen türleri (ROT) düzeyleri ölçülerek antioksidan kapasiteleri incelenmiştir. DNA hasarı tek hücre jel elektroforez (Comet) analizi ile, apoptoz düzeyleri ise Annexin V-FITC/PI boyama yöntemiyle akım sitometrisi kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca, AH patofizyolojisine ilişkin biyogöstergeler olan amiloid prekürsör protein (APP), tau ve amiloid beta (Aβ) düzeyleri ile enflamatuvar yanıtı yansıtan kaspaz (C)1q, C3, C6, C9, interlökin (IL)-1α, IL-6, IL-10, dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)-β, tümör nekroz faktör (TNF)-α gibi biyogöstergeler kantitatif olarak analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular, naringinin düşük konsantrasyonlarda oksidatif stresi anlamlı düzeyde azaltarak Aβ, tau ve APP düzeylerinde düşüş sağladığını; ayrıca AChE aktivitesini inhibe ederek kolinerjik sistemin korunmasına katkıda bulunduğunu ve enflamatuvar yanıtı baskılayıcı etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Ursolik asit ise apoptoz ve genotoksisiteyi artırma potansiyeline sahip olmasına rağmen, AH modelinde Aβ, APP ve tau birikimini baskılamış, enflamatuvar sitokin ve kompleman protein düzeylerinde genel bir azalma eğilimi göstermiştir. Bu veriler hem naringin hem de ursolik asidin AH'ye karşı potansiyel etkili ajanlar olabileceğini düşündürmektedir. Ancak AH'de kullanım açısından bu bileşikler üzerine yapılacak ileri farmakodinamik ve toksikolojik çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP – 2023/059) ve TÜBİTAK (125S513) tarafından desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: nörodejeneratif, nöroprotektif, fitokimyasal, SH-SY5Y, difenilalanin, genotoksisite, apoptoz

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) has emerged as a major public health issue due to the current insufficiency of treatment and prevention strategies. In recent years, there has been growing interest in exploring the neuroprotective effects of phytochemical compounds to develop new strategies targeting the pathophysiology of the disease. Within this context, naringin, a flavonoid found in citrus fruits, has attracted attention for its anti-inflammatory, antiviral, antioxidant, and antihypertensive properties. In addition to its potential in the treatment of cardio- and cerebrovascular diseases, naringin has been shown to reduce lipopolysaccharide (LPS)-induced neuronal apoptosis, and its possible effects on Alzheimer's pathology have begun to be investigated. Similarly, ursolic acid, a natural triterpenoid found in apples, basil, strawberries, and fruit peels, exhibits antioxidant, anticancer, and anti-inflammatory properties. Its neuroprotective effects have been reported to be particularly associated with the suppression of oxidative stress and the inhibition of pro-inflammatory signals. In this study, the potential effects of naringin and ursolic acid on AD were evaluated using an *in vitro* AD model induced by diphenylalanine (FF) in human neuroblastoma cells (SH-SY5Y). Initially, the MTT assay was used to determine the cytotoxic effects of these compounds and their impact on the model. Subsequently, at the identified effective concentrations, intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were measured to assess antioxidant capacities. DNA damage was analyzed by the single-cell gel electrophoresis (Comet assay), and apoptosis levels were determined by Annexin V-FITC/PI staining using flow cytometry. Furthermore, quantitative analyses were conducted for AD-related biomarkers such as amyloid precursor protein (APP), tau, and amyloid beta (Aβ), as well as inflammation-related markers including caspases (C)1q, C3, C6, C9, interleukins (IL)-1α, IL-6, IL-10, transforming growth factor (TGF)-β, and tumor necrosis factor (TNF)-α.The findings demonstrated that naringin, at low concentrations, significantly reduced oxidative stress, decreased Aβ, tau, and APP levels, inhibited acetylcholinesterase (AChE) activity, contributing to the preservation of the cholinergic system, and exhibited anti-inflammatory effects. Although ursolic acid showed a potential to increase apoptosis and genotoxicity, it suppressed the accumulation of Aβ, APP, and tau in the AD model and showed a general tendency to reduce levels of inflammatory cytokines and complement proteins. These results suggest that both naringin and ursolic acid may be potentially effective agents against AD. However, further pharmacodynamic and toxicological studies are needed to support their therapeutic use in Alzheimer's disease.

This study was supported by the Scientific Research Projects Unit of the University of Health Sciences, Turkey (BAP – 2023/059), and by the Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TÜBİTAK, Project No: 125S513).

Keywords: neurodegenerative, neuroprotective, phytochemical, SH-SY5Y, diphenylalanine, genotoxicity, apoptosis

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım esnasında gerekli her türlü desteği sağlayan Gülhane Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Onur ERDEM'e,

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bana her aşamada yol gösteren, değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve beni yönlendiren, çalışmalarımın her aşamasını büyük bir titizlikle inceleyen, çalışma süresince beni motive eden ve destekleyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Merve GÜDÜL BACANLI'ya,

Doktora tezinin laboratuvar ve analiz çalışmalarının her aşamasında desteğini ve bilgisini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Hakan ERDOĞAN'a,

Doktora tezinin analiz çalışmalarının yapılmasında bana yardımcı olan ve yönlendiren Sayın Arş. Gör. Jülide SECERLİ'ye,

Tezin her aşamasında rahatsız ettiğim, danıştığım, destek aldığım ve beni yönlendiren sevgili dostlarım Sayın Biyomühendis Tuğba ÇAĞLAYAN'a ve Dr. Ecz. Can BABACANOĞLU'na,

Doktora tez yazım aşamasında gösterdikleri anlayış, teşvik ve katkılarından dolayı, çok değerli Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Başkan Yardımcısı Sayın Uzm. Ecz. Mesil AKSOY'a, çalışma arkadaşlarım Uzm. Dr. Fatma İŞLİ'ye, Dr. Elif Petek TÜRKTAŞ'a, Uzm. Ecz. Tuğçe ÇETİN'e, Ecz. Ömer Mert EYÜBOĞLU'na, Ecz. Şevval ÇELİKTEN'e ve Endüstri Mühendisi Esma KADI'ya,

Her zaman yanımda olan ve destekleyen kardeşlerim Dr. Ebru KORKMAZ'a, Uzm. Dr. M. Ahu ARIKAN'a ve Kimya Yük. Mühendisi Emrah KORKMAZ'a,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET ii
ABSTRACT iv
TEŞEKKÜR vi
İÇİNDEKİLER vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ xii
SİMGELER VE KISALTMALAR xv
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 5
2.1. Fitokimyasallar 5
2.1.1. Genel Yapıları 5
2.1.2. Biyolojik Etkileri 6
2.2. Naringin 9
2.2.1. Genel Özellikleri 9
2.2.2. Biyolojik Etkileri 10
2.2.2.1. Kansere Karşı Koruyucu Etkileri 10
2.2.2.2. Antienflamatuvar Etki 12
2.2.2.3. Antihiperlipidemik Etki 13
2.2.2.4. Renal Sistem Üzerine Etkileri 13
2.2.2.5. Solunum Sistemi Üzerine Koruyucu Etkileri 13
2.2.2.6. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Koruyucu Etkileri 14
2.2.2.7. Sinir Sistemi Üzerine Koruyucu Etkileri 15
2.3. Ursolik Asit 16
2.3.1. Genel Özellikleri 16
2.3.2. Biyolojik Etkileri 18
2.3.2.1. Kansere Karşı Koruyucu Etkileri 18
2.3.2.2. Antimikrobiyal Etki 19
2.3.2.3. Hepatoprotektif Etki 20
2.3.2.4. Antienflamatuvar Etki 21
2.3.2.5. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Koruyucu Etkileri 21
2.3.2.6. Antihiperlipidemik Etki 22
2.3.2.7. Sinir Sistemi Üzerine Koruyucu Etkileri 22
2.4. Difenilalanin 23
2.5. *In vitro* Alzheimer Hastalık Modelleri 24

2.5.1. 2 Boyutlu *In vitro* Alzheimer Hastalığı Modelleri 25
2.5.2. İndükleyici Ajanlarla Oluşturulan *In vitro* Alzheimer Hastalığı Modelleri..... 25
2.5.3. 3 Boyutlu *In vitro* Alzheimer Hastalığı Modelleri 30
2.5.4. Organoid Tabanlı Sistemler..... 31
2.5.5. Mikroakışkan Tabanlı *In vitro* Alzheimer Hastalığı Modelleri 32
2.6. Çalışmada Kullanılan Yöntemler 33
2.6.1. 3-(4,5-dimetil-tiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) Testi 33
2.6.2. Reaktif Oksijen Türleri Tayini..... 34
2.6.2.1. Dihidroklorofloresce in (DCFH-DA) Yöntemi 35
2.6.3. Tek Hücre Jel Elektroforez (Comet) Yöntemi..... 35
2.6.4. Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Analiz (ELISA) 36
3. GEREÇ ve YÖNTEM..... 38
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 38
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler..... 39
3.3. Hazırlanan Çözeltiler..... 40
3.3.1. Besiyeri Çözeltisi 40
3.3.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Alzheimer Hastalık Modellenmesinde Kullanılan Çözeltiler 40
3.3.3. Naringin Çözeltileri..... 41
3.3.4. Ursolik Asit Çözeltileri..... 41
3.3.5. 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) çözeltisi .. 41
3.3.6. 200 mM Disodyum Etilendiamin Tetraasetik Asit (Na_2EDTA) Çözeltisi..... 41
3.3.7. 10 N Sodyum Hidroksit (NaOH) Çözeltisi 41
3.3.8. Düşük Erime Noktalı Agar (LMA) Çözeltisi 41
3.3.9. Normal Erime Noktalı Agar (NMA) Çözeltisi..... 41
3.3.10. Elektroforez Tampon Çözeltisi..... 41
3.3.11. Etanol Çözeltisi (%50) 41
3.3.12. Etanol Çözeltisi (%75) 42
3.3.13. Etanol Çözeltisi (%95) 42
3.3.14. Etidiyum Bromür (EtBr) Çözeltisi 42
3.3.15. Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (PBS)..... 42
3.3.16. Stok Lizis Çözeltisi 42
3.3.17. Lizis Çözeltisi..... 42
3.3.18. 2,7-Diklorodihidrofloresein Diasetat (DCF-DA) Çözeltisi..... 42
3.3.19. Alzheimer Hastalığı ve Enflamasyon Biyogöstergelerindeki Değişikliklerin Belirlenmesi İçin Hazırlanan Çözeltiler..... 42

3.3.20. Apoptoz Bağlanma Tampon Çözeltisi 47
3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları 47
3.5. SH-SY5Y Hücrelerinde Alzheimer Hastalık Modelinin Oluşturulması 48
3.6. 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi 48
3.7. 2,7-Diklorodihidrofloresein Diasetat (DCF-DA) Yöntemi ile Reaktif Oksijen Türleri Tayini 50
3.8. Tek Hücre Jel Elektroforez (Comet) Yöntemi 51
3.9. Alzheimer Hastalığı ve Enflamasyon Biyogöstergelerindeki Değişiklerinin Belirlenmesi 52
3.9.1. Amiloid Beta (Aβ) Düzeylerinin Ölçümü 52
3.9.2. Asetilkolin Esteraz (AChE) Düzeylerinin Ölçümü 53
3.9.3. Tau Protein Düzeylerinin Ölçümü 53
3.9.4. Amiloid Prekürsör Protein (APP) Düzeylerinin Ölçümü 54
3.9.5. İnterlökin-1alfa (IL-1α) Düzeylerinin Ölçümü 54
3.9.6. İnterlökin-6 (IL-6) Düzeylerinin Ölçümü 55
3.9.7. İnterlökin-10 (IL-10) Düzeylerinin Ölçümü 56
3.9.8. Kaspaz 1q (C1q) Düzeylerinin Ölçümü 56
3.9.9. Kaspaz 3 (C3) Düzeylerinin Ölçümü 57
3.9.10. Kaspaz-6 (C6) Düzeylerinin Ölçümü 57
3.9.11. Kaspaz-9 (C9) Düzeylerinin Ölçümü 58
3.9.12. Tümör Büyüme Faktörü Beta (TGF-β) Düzeylerinin Ölçümü 59
3.9.13. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF-α) Ölçümü 59
3.10. Annexin V-FITC/PI Apoptoz Analizi 60
3.11. İstatistiksel Yöntem 60
4. BULGULAR 61
4.1. SH-SY5Y Hücrelerinde Alzheimer Hastalık Modelinin Oluşturulması 61
4.1.1. Sitotoksisite Değerlendirmesi 72
4.2. Reaktif Oksijen Türleri Oluşumunun Değerlendirilmesi 75
4.3. Genotoksik Etkilerin Değerlendirilmesi 77
4.4. Alzheimer Hastalığı Biyogöstergelerindeki Değişikliklerin Belirlenmesi 78
4.4.1. Amiloid Beta (Aβ) Düzeyleri 78
4.4.2. Asetilkolinesteraz (AChE) Düzeyleri 80
4.4.3. Tau Protein Düzeyleri 82
4.4.4. Amiloid Prekürsör Protein (APP) Düzeylerinin Ölçümü Bulguları 84
4.5. Enflamasyon Biyogöstergeleri Düzeylerindeki Değişimlerin Belirlenmesi 86
4.5.1. İnterlökin-1 Alfa (IL-1α) Düzeylerinin Ölçümü Bulguları 86

4.5.2. İnterlökin-6 (IL-6) Düzeylerinin Ölçümü Bulguları 88
4.5.3. İnterlökin-10 (IL-10) Düzeylerinin Ölçümü Bulguları 90
4.5.4. Kaspaz-1q (C1q) Düzeylerinin Ölçümü Bulguları 92
4.5.5. Kaspaz-3 (C3) Düzeylerinin Ölçümü Bulguları 94
4.5.6. Kaspaz-6 (C6) Düzeyleri 96
4.5.7. Kaspaz-9 (C9) Düzeyleri 98
4.5.8. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF-α) Düzeylerinin Ölçümü 100
4.5.9. Tümör Büyüme Faktörü Beta (TGF-β) Ölçümü 102
4.6. Apoptoz Üzerine Etkilerin Değerlendirilmesi 104
4.7. Naringin ve Ursolik Asidin Amiloid Plak Oluşumuna Olan Etkilerinin Değerlendirilmesi 107
5. TARTIŞMA 108
6. SONUÇ 122
KAYNAKLAR 123
ÖZGEÇMİŞ ..... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge 2.1. Reaktif oksijen türleri (ROT) analiz yöntemleri 35

Çizelge 3.1. Amiloid beta (Aβ) düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler 43

Çizelge 3.2. Asetilkolin esteraz (AChE) düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler .. 43

Çizelge 3.3. Tau protein düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler 43

Çizelge 3.4. Amiloid prekürsör protein (APP) düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler 44

Çizelge 3.5. İnterlökin (IL)-10 düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler 44

Çizelge 3.6. İnterlökin (IL)-6 düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler 44

Çizelge 3.7. İnterlökin (IL)-1α düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler 45

Çizelge 3.8. Kaspaz (C)1q düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler 45

Çizelge 3.9. Kaspaz (C)3 düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler 45

Çizelge 3.10. Kaspaz (C)6 düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler 46

Çizelge 3.11. Kaspaz (C)9 düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler 46

Çizelge 3.12. Tümör büyüme faktörü (TGF)-β düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler 46

Çizelge 3.13. Tümör nekroz faktör (TNF)-α düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler 47

Çizelge 4.1. SH-SY5Y hücrelerinde FF'nin 2-propanoldeki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra sitotoksik etkileri. 61

Çizelge 4.2. SH-SY5Y hücrelerinde FF'nin DMSO'daki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra sitotoksik etkileri. 62

Çizelge 4.3. SH-SY5Y hücrelerinde FF'nin etanoldeki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra sitotoksik etkileri. 63

Çizelge 4.4. SH-SY5Y hücrelerinde FF'nin HFIP'deki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra sitotoksik etkileri. 65

Çizelge 4.5. SH-SY5Y hücrelerinde FF'nin metanoldeki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra sitotoksik etkileri. 66

Çizelge 4.6. SH-SY5Y hücrelerinde FF'nin sudaki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra sitotoksik etkileri. 67

Çizelge 4.7. SH-SY5Y hücrelerinde naringin çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra sitotoksik etkileri. 72

Çizelge 4.8. Difenilalanin ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulmuş SH-SY5Y hücrelerinde naringin çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra sitotoksik etkileri. 73

Çizelge 4.9. SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asit çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra sitotoksik etkileri. 74

Çizelge 4.10. Difenilalanin ile Alzheimer Hastalığı modeli oluşturulmuş SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asit çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra sitotoksik etkileri 74

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 2.1. C6-C3-C6 ana çekirdeğinin ve flavonoidlerin alt sınıflarının kimyasal yapısı. 6

Şekil 2.2. Naringinin kimyasal yapısı. 9

Şekil 2.3. Ursolik asidin kimyasal yapısı. 17

Şekil 2.4. Difenilalaninin kimyasal yapısı 23

Şekil 2.5. *İn Vitro* Düzeyde Alzheimer Hastalık Modelleri..... 25

Şekil 4.1. SH-SY5Y hücrelerinde FF'nin 2-propanoldeki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra sitotoksik etkileri.* 62

Şekil 4.2. SH-SY5Y hücrelerinde FF'nin DMSO'daki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra sitotoksik etkileri.* 63

Şekil 4.3. SH-SY5Y hücrelerinde FF'nin etanoldeki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra sitotoksik etkileri.* 64

Şekil 4.4. SH-SY5Y hücrelerinde FF'nin HFIP'deki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra sitotoksik etkileri.* 65

Şekil 4.5. SH-SY5Y hücrelerinde FF'nin metanoldeki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra sitotoksik etkileri.* 66

Şekil 4.6. SH-SY5Y hücrelerinde FF'nin sudaki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra sitotoksik etkileri.* 67

Şekil 4.7. FF'nin a) 2-propanol, b) DMSO, c) etanol, d) HFIP, e) metanol, f) sudaki 250 µg/mL konsantrasyonlarındaki çözeltilerinde oluşan fibril yapıların SEM görüntüleri. 69

Şekil 4.8. a) Kontrol (DMEM), FF'nin b) 2-propanol, c) DMSO, d) etanol, e) HFIP, f) metanol, g) sudaki 250 µg/mL çözeltilerinin SH-SY5Y hücrelerinde amiloid plak oluşumu üzerine olan etkileri..... 70

Şekil 4.9. Farklı çözücülerde hazırlanmış 250 µg/mL konsantrasyondaki FF çözeltilerinin SH-SY5Y hücrelerinde AH biyogöstergeleri düzeylerine olan etkileri a) Asetilkolin esteraz (AChE), b) Amiloid Beta (Aβ), c) Amiloid Prekürsör Protein (APP), d) Tau protein, NK: Negatif Kontrol (DMEM). Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. 71

Şekil 4.10. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin 24 saatlik maruziyetten sonra hücre canlılığı üzerine etkileri.* 73

Şekil 4.11. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Yhücrelerinde ursolik asidin 24 saatlik maruziyetten sonra hücre canlılığı üzerine etkileri.* 75

Şekil 4.12. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin ROT üretimi üzerine etkileri.***..... 76

Şekil 4.13. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin ROT üretimi üzerine etkileri.*** 76

Şekil 4.14. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin DNA hasarı üzerine etkileri.*** 77

Şekil 4.15. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin DNA hasarı üzerine etkileri.*** 78

Şekil 4.16. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin amiloid beta (Aβ) düzeyleri üzerine etkileri.*** 79

Şekil 4.17. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin amiloid beta (Aβ) düzeyleri üzerine etkileri.***..... 80

Şekil 4.18. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin asetilkolin esteraz (AChE) düzeyleri üzerine etkileri.**..... 81

Şekil 4.19. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin asetilkolin esteraz (AChE) düzeyleri üzerine etkileri. ***..... 82

Şekil 4.20. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin tau protein düzeyleri üzerine etkileri. ***..... 83

Şekil 4.21. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin tau protein düzeyleri üzerine etkileri. ***. 84

Şekil 4.22. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin amiloid prekürsör protein (APP) düzeyleri üzerine etkileri. ***..... 85

Şekil 4.23. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin amiloid prekürsör protein (APP) düzeyleri üzerine etkileri. ***..... 86

Şekil 4.24. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin interlökin (IL)-1α düzeyleri üzerine etkileri. *** 87

Şekil 4.25. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin interlökin (IL)-1α düzeyleri üzerine etkileri. ***..... 88

Şekil 4.26. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin IL-6 düzeyleri üzerine etkileri. *** 89

Şekil 4.28. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin IL-10 düzeyleri üzerine etkileri. *** 91

Şekil 4.29. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin IL-10 düzeyleri üzerine etkileri. **..... 92

Şekil 4.30. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin kaspaz 1q (C1q) düzeyleri üzerine etkileri.**93

Şekil 4.31. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin kaspaz 1q (C1q) düzeyleri üzerine etkileri. *** 94

Şekil 4.32. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin kaspaz 3 (C3) düzeyleri üzerine etkileri. ***. 95

Şekil 4.33. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asit uygulamasının kaspaz 3 (C3) düzeyleri üzerine etkileri. *** 96

Şekil 4.34. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin kaspaz 6 (C6) düzeyleri üzerine etkileri. **... 97

Şekil 4.35. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin kaspaz 6 (C6) düzeyleri üzerine etkileri.** 98

Şekil 4.36. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin kaspaz 9 (C9) düzeyleri üzerine etkileri. ***. 99

Şekil 4.37. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin kaspaz 9 (C9) düzeyleri üzerine etkileri. *** 100

Şekil 4.38. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin TNF-α düzeyleri üzerine etkileri. *** 101

Şekil 4.39. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin tümör nekroz faktör (TNF)-α düzeyleri üzerine etkileri. ** 102

Şekil 4.40. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin tümör büyüme faktörü (TGF)-β düzeyleri üzerine etkileri. *** 103

Şekil 4.41. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin tümör büyüme faktörü (TGF)-β düzeyleri üzerine etkileri. *** 104

Şekil 4.42. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin apoptoz üzerine etkileri. 105

Şekil 4.43. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin apoptoz üzerine etkileri. 106

Şekil 4.44. SH-SY5Y hücrelerinin a) %1 DMSO, b) 250 µg/mL difenilalanin (FF), c) 250 µg/mL naringin, d) 1 µg/mL ursolik aside 24 saat maruziyet sonrası ışık mikroskobu altındaki görüntüleri. 107

SİMGELER VE KISALTMALAR

2B	İki Boyutlu
3B	Üç Boyutlu
3-NP	3-Nitropropiyonik Asit
A2780	İnsan Yumurtalık Kanseri Hücresi
A549	Akciğer Kanseri Hücresi
AChE	Asetilkolinesteraz
AGEs	İleri Glikasyon Son Ürünleri
AH	Alzheimer Hastalığı
Akt	Protein Kinaz B
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid Prekürsör Protein
AQP1	Aquaporin1
ASK1	Apoptozis Sinyalini Düzenleyen Kinaz 1
ASMC	Solunum Yolu Düz Kas Hücresi
Aβ	Amiloid Beta
BACE-1	B-Amiloid Sekretaz-1
Bax	Bcl-2 İle İlişkili X Proteini
Bcl-2	Anti-apoptotik Gen Bcl-2
C halkası	Piran Halkası
C1q	Kaspaz 1q
C3	Kaspaz 3
C6	Kaspaz 6
C9	Kaspaz 9
CCL2	Kemokin (C-C motifi) ligandı 2
CO_2	Karbondioksit
COL1A1	Tip I Kolajen Alfa 1 Zinciri
COL3A1	Tip III Kolajen Alfa 1 Zinciri
Comet	Tek Hücre Jel Elektroforez Analizi
CREB	Siklik Adenozin Monofosfat Yanıt Elementi Bağlayıcı Protein
CRKP	Karbapeneme Dirençli *Klebsiella Pneumoniae*
CXCL12	C-X-C motifi kemokin ligandı 12
CXCR4	C-X-C motif kemokin reseptörü 4
CYP7A1	Sitokrom P450 Ailesi 7 Alt Ailesi A Üyesi 1
DCF	Diklorofloresceın
DCF-DA	2,7-Diklorodihidrofloresein Diasetat
DCFH-DA	Dihidroklorofloresceın Diasetat
D-gal	D-Galaktoz
DKON	Diyabetik Kardiyak Otonom Nöropati
DMEM	Dulbecco’s Modification Eagles Medium
DMSO	Dimetil Sulfoksit
ECM	Hücre Dışı Matris
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ELISA	Enzimle İşaretlenmiş İmmünosorbent Yöntemi

ER	Östrojen Reseptör
ERK	Hücre Dışı Sinyal-Regüle Kinaz
EtBr	Etidiyum Bromür
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
FBS	Fetal Sığır Serum
FF	Difenilalanin
FGF15	Fibroblast büyüme faktörü 15
FMD	Flavonoid Modifiye Edilmiş İlaçlar
FXR	Farnesoid X reseptörü
GM3	Üç Şeker Birimi Taşıyan ve Tek Bir Sialik Asit İçeren Gangliozid
GPX4	Glutatyon Peroksidaz 4
GSH	Glutatyon
GSK	Glikojen Sentaz Kinaz
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
HCT116	Kolon Kanseri Tümör Hücre Hattı
HepG2	İnsan Karaciğer Kanseri Hücre Hattı
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hekzafloro-2-Propanol
HIF	Hipoksiyle İndüklenebilir Faktör
HIV-1	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü-1
IC50	İnhibitör Konsantrasyon
ICAM-1	Hücrelerarası Yapışma Molekülü-1
IL	İnterlökin
IRI	İskemi-Reperfüzyon Hasarı
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
iPSC	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
İRE1	İnozitol Gerektiren Enzim 1
İRR	Renal İskemi-Reperfüzyon Hasarı
JAK	Leptin-Janus Kinaz
JNK	Jun N-terminal Kinaz
KAT	Katalaz
KBB	Kan Beyin Bariyeri
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
L929	Fare Fibroblast Hücresi
LDH	Laktat Hidrogenaz
LMA	Düşük Erime Noktalı Agar
LNCaP	Lenf Nodu Kökenli Prostat Karsinomu Hücre Hattı
LOX-1	Lektin-Benzeri Okside Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörü-1
LPS	Lipopolisakkarit
M2	Alternatif Olarak Aktive Olmuş Makrofajlar
MAPK	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MARK	Mikrotübül Afinite Düzenleyici Kinaz
MCF-7	İnsan Meme Adenokarsinomu Hücresi
MDA-MB-231	Malondialdehit
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MMP	Mitokondriyal Membran Potansiyeli

Mn	Mangan
MPP^+	1-Metil-4-Fenilpiridinyum İon
MPTP	1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetrahidropiridin
mTOR	Memelilerde Rapamisin Hedefli Protein Kinaz
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-İl)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
MyD88	Myeloid Diferansiyasyon 88
N2A	Fare Nöroblastoma
Na2EDTA	Disodyum Etilendiamin Tetraasetik Asit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NAR	Naringin
NEU3	Nöroaminidaz-3
NFT	Nörofibriler Yumak
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
NKH	İnsan Serebral Neokortikal Nöronal Kök Hücre
NLRP3	NOD Benzeri Reseptör Proteini
NMA	Normal Erime Noktalı Agar
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
Nox	NADPH oksidaz
Nrf-2	Nükleer Faktör-Eritroid 2 ile İlgili Faktör 2
OKA	Okadaik Asit
p38	Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz Ailesi Üyesi
P-AMPK	Fosforile Amp Aktif Protein Kinaz
PARP	Poli (ADP-riboz) polimeraz
PBS	Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi
PC12	Sıçan Böbreküstü Bezi Tümör Hücresi
PC-3	İnsan Prostat Kanseri Hücresi
PH	Parkinson Hastalığı
PI	Propidyum İyodür
PI3K	Fosfatidilinozitol 3-Kinaz
p-JNK	Fosforile Jun N-Terminal Kinaz
PKC	Protein Kinaz C
PPAR	Peroksizom Prolifetör Aktifleştirilmiş Reseptör
PSEN	Presenilin
p-STAT3	Fosforillenmiş Sinyal Dönüştürücü Transkripsiyon Aktivatörü 3
PTX	Paklitaksel
qPCR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAGE	İleri Glikasyon Son Ürünleri Reseptörü
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SEM	Taramalı Elektron Mikroskop
SH-SY5Y	İnsan Nöroblastoma Hücresi
SK-N-SH	İnsan Nöroblastoma Hücresi
SK-OV-3	İnsan Over Karsinom Hücresi

SOD	Süperoksit Dismutaz
STAT3	Sinyal Dönüştürücü ve transkripsiyon Aktivatörü 3
STZ	Streptozotosin
SW1736	İnsan Anaplastik Tiroid Kanseri Hücresi
SW480	İnsan Kolorektal Kanser Hücresi
T24	İnsan Mesane Kanseri Hücresi
TAS2R	Tat Reseptörü, Tip 2 (Acı Reseptörü)
TBH	Travmatik Beyin Hasarı
TG	Trigliserid
TGF	Tümör Büyüme Faktörü
TLR4	Toll Benzeri Reseptör 4
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TPC-1	İnsan Papiller Tiroid Kanseri Hücresi
UA	Ursolik Asit
uPA	Urokinaz Tipi Plazminojen Aktivatörü
ÜK	Ülseratif Kolit
V79	Çin Hamsteri Fibroblast
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
Wnt	Meyve Sineği (Drosophila) Onko Geni
α-SMA	A-Düz Kas Aktini

1. GİRİŞ

1907'de ilk olarak Alois Alzheimer tarafından tanımlanan Alzheimer Hastalığı (AH) başlangıçta özellikle kısa süreli hafızayı etkileyen sonraları ise dil, ruh hali, hareket ve fizyolojik işlevleri de etkileyen bir bozukluk olarak ifade edilmiştir. AH'nin ilerlemesiyle birlikte hafıza bozukluğu, kelime anlama yeteneğinin kaybı, kas koordinasyonunu içeren karmaşık görevleri yerine getirememe (banyo, giyinme, yemek yeme gibi), tanıdık nesneleri kullanma becerilerinde azalma, normal aktiviteleri planlama ve yürütme becerisindeki kayıplar gibi günlük işleyişte önemli sorunlarla karşılaşılmaktadır [1]. AH'de gözlenen demansın şiddeti ve dolayısıyla başlangıcı, genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak bireyler ve toplumlar arasında farklılık göstermektedir. Nörodejeneratif hastalıklarla mücadelede çok yönlü terapötik stratejiler uygulanmasına rağmen, başarı sadece semptomatik tedavi ile sınırlıdır.

Motor ve bilişsel yeteneklerin insanlarda yaşla birlikte kötüleşmesinin oksidatif stres ve enflamasyonun kümülatif etkilerine karşı hassasiyetin artmış olması kaynaklı olduğu düşünülmektedir [2]. Alzheimer hastalarında beyin dokusunun oksidatif strese maruz kaldığına dair kanıtlar vardır [3]. Çalışmalar, oksidatif stresin hastalığın birincil belirtilerinden olduğunu göstermektedir [4].

Alzheimer Hastalığı (AH) patolojisi, β-amiloid öncü proteinlerin (APP) mutasyonu ve proteolitik enzimler için presenilin kodlayan genin duplikasyonu nedeniyle artmış nörofibriler yumaklar ve β-amiloid seviyesi ile karakterizedir [5]. Devam eden süreçte, kolinerjik aktivite eksikliği ve strese bağlı enflamasyonun takip ettiği plak oluşumu görülmektedir. Bu durum, AH'ye yol açan bilişsel bozulmaya ve β-Amiloid birikimi, immün hücre infiltrasyonunu aktive ederek enflamasyona neden olmaktadır. Bu reaksiyonlar, sadece hücre iletişimini engellemekle kalmayıp, aynı zamanda bilişsel bozulmaya ve nöronal hücre ölümüne de yol açmaktadır. AH hastalarının beyinlerindeki β-amiloid plakların birikmesi ile ilişkili enzimler butirilkolinesteraz (BChE), asetilkolinesteraz (AChE) ve β-amiloid sekretaz-1 (BACE-1)'dir. Presenilinler (PSEN I, PSEN II) ve amiloid prekürsör protein (APP) gibi genlerdeki mutasyonlar, AH'nin erken başlangıcında yer alan genetik faktörler iken; β-amiloid oluşumuna yol açan apolipoprotein E (APOE) geninin aşırı ekspresyonu, AH'nin gelişiminde en önde gelen genetik risk faktörü olarak kabul edilmektedir [6,7].

Mitokondrilerde, redoks aktif metaller, yüksek seviyelerde hidrojen peroksit (H_2O_2) üreten ve oksidatif hasara neden olan oksidatif tepki elemanları ile etkileşime girmektedir. Hastalığın erken evresinde β-amiloid ve tau protein birikimi bu hasarı telafi etmekte ve hasarın

etkisini azaltabilmektedir. Ancak hastalık ilerlediğinde antioksidan aktivite azalmakta ve bu da hastalarda yüksek oksidatif strese neden olan reaktif türlerin oluşumuna yol açmaktadır. Beyin hücrelerinde lökotrien sinyal inhibisyonu, nöroenflamasyon ve nörodejenerasyon inhibisyonu ile ilişkilidir ve lökotrien sinyalizasyon sistemini hedeflemek, AH'nin patolojisinin çeşitli yönlerine aracılık edeceği düşünülmektedir [8].

Mikrotübül yapımında ve stabilizasyonunda önemli bir rol oynayan tau proteini, uygun nöronal aktiviteyi destekler. Anormal tau proteini fosforilasyonu, AH'nin ilerlemesiyle ve ayrıca *in vitro* ve *in vivo* modellerinde üretildiğinde sitotoksisiteye neden olma yeteneği ile ilişkilendirilmiştir [9]. AH, protein veya organel hasarına yanıt olarak otofagosom üretim hızının parçalanma hızından daha yüksek olduğu otofajik stresle de ilişkilidir [10]. Ayrıca güçlü otofajik aktivite, hasarlı mitokondriyi ortadan kaldırabilir, böylece dolaylı olarak ROT üretimi miktarını ve enflamatuvar aktivasyonunu azaltabilir [11].

Dünya çapında giderek görülme sıklığı artan ve en önemli hastalıklardan biri olan AH'nin tedavisine yönelik halen çok az sayıda ilaç bulunmaktadır. Klinikte ağırlıklı olarak kullanılan mevcut ilaçlar takrin, donepezil, rivastigmin, galantamin, memantindir. Karmaşık, çok faktörlü bir hastalık olduğundan, AH'nin tedavisi için daha etkili ilaçların geliştirilmesine acil ihtiyaç vardır. Doğadan izole edilebilen çok sayıda molekül, yeni ilaçların keşfi için değerli bir kaynağı temsil etmektedir.

Uzun zamandır doğal bileşikler, çeşitli patolojik hastalıkların tedavisinde terapötik ajanlar olarak kullanılmaktadır. Fitokimyasallar, bitkiler tarafından sentezlenen ve nörodejeneratif ile nöropsikiyatrik hastalıklar da dahil olmak üzere birçok rahatsızlığın tedavisinde kullanılan veya kullanım potansiyeli taşıyan önemli biyoaktif bileşiklerdir. Başlıca fitokimyasal sınıfları arasında polifenoller (flavonoidler, tanenler), ligninler, lignanlar, terpenoidler, steroidler ve alkaloitler yer almaktadır. Son çalışmalar, bu bileşiklerin nöroprotektif ve nöroterapötik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen doğal bileşikler olan fitokimyasallar, AH'nin temel özelliklerinden biri olan oksidatif stres ve nöroenflamasyona karşı koruyucu etkiler göstermektedir. Yapılan araştırmalar, bu bileşiklerin sinir hücrelerini koruyarak hastalığın ilerleyişini yavaşlatabileceğini ortaya koymuştur [1].

Epidemiyolojik veriler ve klinik çalışmalar, genetik faktörler dikkate alındıktan sonra bile, 23 gelişmiş ülkede daha fazla flavonoid içeren beslenmenin demans görülme oranının daha düşük olmasıyla bağlantılı olduğunu göstermiştir [12]. Meyve, sebze ve şaraptan gelen

flavonoidler açısından zengin olan Akdeniz diyeti AH'nin ilk belirtilerinden olan hafif bilişsel bozukluğun ilerlemesini yavaşlattığı kanıtlanmıştır [13-16]. Bu nedenle, daha yüksek flavonoid alımı ile AH'nin daha düşük görülme oranı arasında net bir korelasyon bulunmaktadır.

Alzheimer hastalığı (AH)'nda terapötik etkileriyle öne çıkan biyoaktif bileşikler arasında kurkumin, apigenin, genistein, ginkgolitler, luteolin, melatonin, naringenin, piperin, kersetin, resveratrol, timokinon, S-allil sistein, okaliptol, silibinin, epigallokateşin galat, rutin, hesperidin, selastrol, protopanaksatriol, viniferin, baikalein, ligustilid, sinomenin ve honokiol bulunmaktadır. Bu bileşikler, antikolinesteraz ve anti-amiloidojenik aktiviteleri sayesinde AH'nin tedavisinde önemli bir yere sahiptir [5-8,17-23].

Turunçgillerden elde edilebilen en önemli flavonoidlerden biri naringindir. Güçlü antioksidan, antienflamatuvar, anti-apoptotik, anti-ülser, anti-osteoporoz ve antikanser özellikleri sayesinde büyük ilgi görmüştür [24]. Daha önce yapılan çalışmalar, naringin tedavisinin oksidatif hasarı azaltabileceğini ve beynin, *striatum*un ve hipokampusun iskemi-reperfüzyon kaynaklı histopatolojik değişimlerini en aza indirebileceğini göstermiştir [25]. Ayrıca, önceki araştırmalar, naringinin uzun süreli hafızayı güçlendirdiğini ve transgenik AH modeli oluşturulmuş farelerde nöroprotektif bir ajan olarak rol oynadığını ortaya koymuştur [26].

Geleneksel Çin Tıbbı'nda yer alan Fructus Mume, Gardeniae Fructus, Fructus Ligustri Lucidi, Hedyotis diffusa Willd gibi otlarda bulunan ursolik asidin farmakolojik etkileri gösterilmiştir. Bunlar arasında nöroproteksiyon, anti-kanser, anti-mikrobiyal, sedasyon, hepatoproteksiyon, antienflamasyon, anti-oksidan ve kan glukozunu düzenleme gibi etkiler bulunmaktadır. Bu özellikler, ursolik asidin kanser, bakteriyel enfeksiyon, *diabetes mellitus*, AH, immünolojik hastalıklar gibi çeşitli hastalıklar için potansiyel olarak koruyucu ve terapötik bir ajan olarak etki göstermesini sağlar [27-30].

Bu tez çalışmasının amacı, doğal bileşikler arasında yer alan naringin ve ursolik asidin AH'deki olası terapötik etkilerini hücresel ve moleküler düzeyde araştırmaktır. Bu doğrultuda, insan nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre kültüründe difenilalanin (FF) dipeptit yapısı kullanılarak *in vitro* AH modeli oluşturulmuştur. Bunun için FF'nin farklı çözücüler kullanılarak çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilerin SH-SY5Y hücre kültürlerindeki toksik etkileri ve amiloid plak oluşturma potansiyelleri değerlendirilmiştir. *In vitro* AH modelinin oluşturulmasının ardından naringin ve ursolik asit bileşiklerinin bu model üzerindeki etkileri çeşitli biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-

Difeniltetrazolyum bromür) (MTT) testi, hücre içi reaktif oksijen türleri (ROT) düzeyleri DCF-DA yöntemi, DNA hasarı tek hücre jel elektroforez (Comet) analizi ile belirlenmiştir. Ayrıca, apoptoz üzerine etkiler Annexin V/PI kiti kullanılarak akış sitometrisi yöntemi ile incelenmiştir. Bununla birlikte, bileşiklerin enflamasyon ve nörodejeneratif süreçler üzerindeki etkilerini değerlendirmek üzere biyogösterge düzeyleri enzimle işaretlenmiş immünosorbent yöntemi (ELISA) ile kantitatif olarak analiz edilmiştir. Bu amaçla pro-enflamatuvar sitokinler (tümör nekroz faktör (TNF)-α, interlökin (IL)-1α, IL-6), anti-enflamatuvar sitokinler (IL-10, TGF-β), kompleman sistemi bileşenleri (kaspaz (C)1q, C3, C6, C9), nörodejeneratif süreçle ilişkili proteinler (amiloid beta (Aβ), amiloid prekürsör proteini (APP), tau proteini) ve asetilkolinesteraz (AChE) enzim düzeyleri ölçülmüştür. Bu kapsamlı analizlerle, naringin ve ursolik asidin AH ile ilişkili oksidatif stres, enflamasyon, apoptoz ve nörodejenerasyon üzerindeki etkileri çok yönlü olarak incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

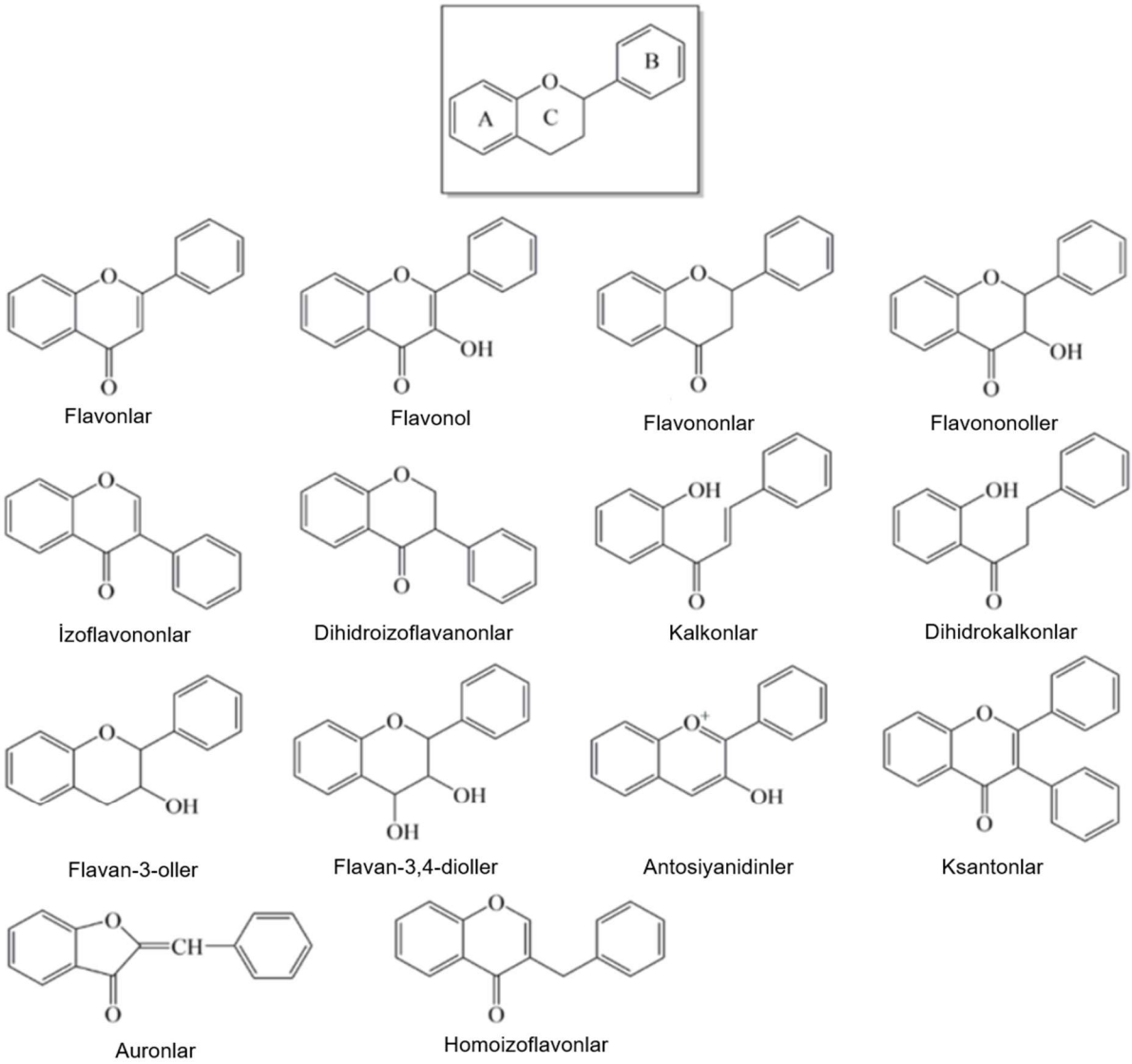
2.1. Fitokimyasallar

Son yıllarda, sentetik ilaçların uzun vadeli kullanımlarıyla ilişkili olası yan etkilerin artması ve bazı farmakolojik ajanların direnç geliştirme riski nedeniyle, bitkisel kaynaklı fitokimyasal bileşiklere olan ilgi önemli ölçüde artmıştır. Bu bileşiklerin çoğu, doğal olarak gıdalarda bulunmaları ve kimyasal senteze gerek olmadan doğrudan veya ekstrakte edilerek elde edilebilmeleri sayesinde hem ekonomik hem de sürdürülebilir bir kaynak olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca, fitokimyasalların antioksidan, antienflamatuvar ve nöroprotektif etkiler gibi çok yönlü biyolojik etkiler gösterebilmesi, bu bileşikleri özellikle nörodejeneratif hastalıklarda dikkat çeken adaylar hâline getirmiştir [31,32].

Fitokimyasalların önemli bir avantajı da etki mekanizmalarının moleküler düzeyde incelenebilir ve modellenebilir olmasıdır. Modern teknikler ile bu bileşiklerin enzim inhibisyonu, sinyal yolaklarını modüle etme veya gen ekspresyonunu düzenleme gibi etkileri aydınlatılabilmektedir. Ayrıca, bu bileşiklerin günlük diyetle alınabilir oluşu, toplum genelinde geniş çapta uygulanabilir profilaktik ve terapötik stratejiler geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Bitkisel kaynaklı bileşiklerin genellikle daha düşük toksisite profiline sahip olmaları da bu tercih eğilimini desteklemektedir [33,34].

2.1.1. Genel Yapıları

Flavonoidler, farklı pozisyonlarda fenolik veya polifenolik grupları taşıyan bir benzopiron halkası içeren ikincil metabolitlerdir [35]. Meyve ve sebzelere aroma ve renk sağlayan tıbbi bitkilerde ve besinlerde yaygın olarak bulunan önemli doğal polifenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler, oksijen içeren bir piran halkası (C halkası) ile bağlanan iki aromatik halkadan (A ve B halkaları) oluşan ortak bir ana çekirdek C6-C3-C6 yapısına sahiptir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. C6-C3-C6 ana çekirdeğinin ve flavonoidlerin alt sınıflarının kimyasal yapısı.

Merkezi C halkasındaki oksidasyon derecesine, C halkasındaki üç konumdaki ikameye ve A/B halkalarının hidroksilasyon modeline bağlı olarak flavonoidler birkaç ana kategoriyi içerir: flavonlar, flavonol, flavanonlar, flavanonoller, izoflavanonlar, dihidroizoflavanonlar, kalkonlar, dihidrokalkonlar, flavan-3-ollar, flavan-3,4-dioller, antosiyanidinler, ksantonlar, auronlar ve homoizoflavonlar [36].

2.1.2. Biyolojik Etkileri

Flavonoidlerin yapı iskeleleri ve yapısal çeşitliliği, antioksidan [37], antibakteriyel [38], antiviral [39], antinosiseptif [40], antikarsinojenik [41], antiülserojenik [42] ve antienflamatuvar [43] aktiviteler dahil olmak üzere çok çeşitli farmakolojik etkilere sahiptir.

Flavonoidler, dışarıdan alınan antioksidanlar olarak görev yapar ve dört mekanizma aracılığıyla doğrudan radikaller tarafından oksitlenerek daha az reaktif türlere dönüşür. Bu

mekanizmalar: nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesinin inhibisyonu, ksantin oksidaz aktivitesinin baskılanması, iyon kanalı yollarının modülasyonu ve diğer enzim sistemleriyle etkileşimdir [33,44]. Flavonoidlerin antioksidan potansiyeli, moleküler yapılarıyla ilişkilidir ve daha spesifik olarak -OH gruplarının konumu ve toplam sayısı, konjugasyon ve rezonans etkileri, termodinamik olarak tercih edilen antioksidan bölgeyi değiştiren çevresel faktörler ile her bir bileşiğe özgü antioksidan mekanizmayla doğrudan bağlantılıdır [45,46].

Emblica officinalis'te bulunan flavonoidlerin, antikanser, antioksidan, antienflamatuvar ve immünmodülatör etkiler gibi bazı farmakolojik aktiviteler gösterdiği belirtilmiştir [47]. Meyvelerde bulunan flavonoidlerin yemek borusu kanserine karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmektedir [48]. Metoksi-flavon bileşiğinin de kanser kemopreventif özellikler sergilediği belirtilmektedir [49]. Kakao polifenolleri, antienflamatuvar ve antioksidan aktivitelerinin yanı sıra antikanser etkilere de sahiptir [50]. *Litchi* meyvesinden elde edilen flavonoidler (epikateşin, proantosiyanidin B2 ve proantosiyanidin B4), meme kanserine karşı etkili bulunmuştur [51]. Soya izoflavonları prostat kanserine karşı aktiftir [52]. Çayda ve elma, soğan gibi flavonoid açısından zengin diğer gıdalarda bulunan flavonoidlerin akciğer kanseri riskini azalttığı gösterilmiştir [53].

Flavonoid modifiye edilmiş ilaçlar (FMD), akciğer kanseri hücre hattı (A549) ve fare fibroblast (L929) hücre hattı üzerinde çok daha güçlü etkilere sahiptir [54]. *Allium flavum* ve *Allium carinatum*, yabani ve yenilebilir soğan türleri olup flavonoidler, rutin, kuersetin 3-O-glikozit ve kaempferol-3-O-glikozit açısından zengindir. Bu bileşikler, bilinen antioksidan potansiyellerinin yanı sıra etkili antikanser ajanlardır. Doksorubisin ile birlikte kullanıldıklarında, insan karaciğer kanseri (HepG2) ve A549 hücre hatlarına karşı anjiyojenik faktörleri artış yönünde düzenledikleri gözlemlenmiştir [55].

Tıbbi bitkilerde bulunan doğal biyolojik aktif flavonoidlerin antiviral aktiviteye sahip olduğu çok sayıda çalışmada bildirilmiş olup, daha etkili olmaları amacıyla yoğunlaştırılmakta ve modifiye edilmektedir [56]. *Houttuynia cordata Thunb*, Doğu Asya'da bulunan bir bitki olup, influenza virüsü, *Herpes simpleks* virüs-1 ve insan immün yetmezlik virüsü-1 (HIV-1) gibi zarflı virüslere karşı *in vitro* ortamda umut vadeden antiviral etkilere sahiptir [57].

Patojen bakterilerde çoklu ilaç direncinin yayılmasının artması, birçok antibiyotiğin çeşitli bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde etkisiz hale gelmesine yol açmıştır [58]. Flavonoidler, insan bağışıklık sistemini güçlendirme yeteneğine sahiptir [33]. Bazı flavonoidler, mikroorganizmaların sitoplazmik zarlarına zarar vererek, enerji metabolizmasını

ve nükleik asit sentezini inhibe ederek hem bakteriyostatik (bakteri çoğalmasını durdurucu) hem de bakterisidal (bakteri öldürücü) ajanlar olarak etki gösterirler [59].

Bridelia, Phyllanthaceae familyasına ait bir bitki türüdür ve Asya ile Güney Afrika'da ağrı giderici bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Bu bitkinin özütü; kuersetin, gallokateşin-(4′-O-7)-epigallokateşin, mirisetin-3-glikozitleri ve izoflavon gibi flavonoidleri içerir. Bu flavonoidler, bitkinin antimalaryal, antibakteriyel ve antienflamatuvar etkilerinden sorumludur [60].

Antosiyanidin, tüberküloz ve ilaçlara dirençli *Mycobacterium tuberculosis* suşlarına karşı önemli bir rol oynamaktadır [61]. Çalışmalar, iki flavonoid olan hesperidin ve hesperetinin yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur [62]. *Cuscuta* bitkisinden elde edilen flavonoidlerin antiproliferatif, hepatoprotektif, anksiyolitik ve antimikrobiyal etkileri olduğu bildirilmiştir [59]. *Turbina corymbosa* ise doğal bir antimikrobiyal ajan ve tirozinaz inhibitörü kaynağıdır [63,64].

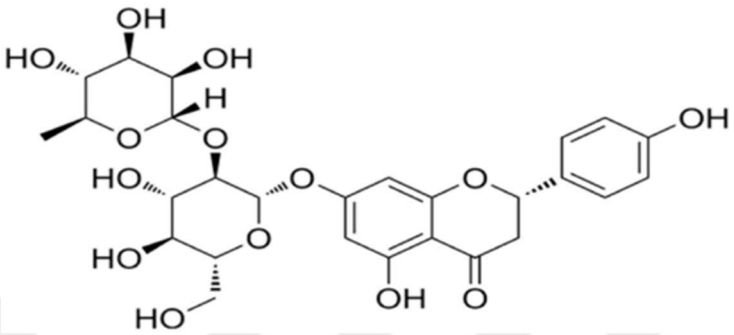
Polifenoller, AH gibi oksidatif stresle ilişkili dejeneratif hastalıkların gelişmesini engelleyen güçlü antioksidanlardır [65]. Nörolojik sistemi iyileştirme yeteneklerine çeşitli mekanizmalar aracılık etmektedir. Bunlar, nöronal ve glial sinyal yollarıyla etkileşimleri, nörotoksinlerin aracılık ettiği nöronal hasar, kayıp ve nöroenflamasyonda azalma, reaktif oksijen türleri (ROT) üretiminde azalma ve amiloid beta (Aβ) ve tau proteini gibi nöropatolojik belirteçlerin birikiminde azalma üzerine etkileridir [66]. Meyveler, stilben, antosiyaninler gibi polifenolik bileşikler içeren çeşitli doğal flavonoidler barındırır. Bu flavonoidlerin, nörodejeneratif hastalıklara karşı etkili olmasının yanı sıra, antimutajenik ve antimikrobiyal ajanlar olarak da etkili oldukları bildirilmiştir [67].

Benzer şekilde, flavonoid açısından zengin bir diğer bitki olan *Ginkgo biloba*, yaşa bağlı demans ve AH'nin tedavisinde kullanılabilir. BChE, insan kan plazmasında bulunan bir enzimdir. AH'de genellikle AChE ve BChE üzerinde etkili olan iki tür nörotoksik kolinesteraz inhibitörü kullanılır. Asetilkolin (ACh) seviyesinin artması, daha iyi nöron iletimine ve dolayısıyla daha iyi bilişsel işlevler sağlamaktadır [68]. Flavonoidler, BChE inhibitörleri olarak kapsamlı bir şekilde kullanılmıştır. Örneğin *Hypericum lydium* bitkisi, toplam flavonoid içeriği 4,97 ± 4,56 ile 156,44 ± 5,51 mg arasında değişen düzeylerde AChE ve BChE inhibisyonu göstermektedir [69].

2.2. Naringin

2.2.1. Genel Özellikleri

Flavonoidler içinde en önemli bileşiklerden biri olan naringin (4',5,7-trihidroksi flavon 7-ramnoglukozid) (Şekil 2.2) kimyasal açıdan, disakkarit neohesperidoz ve flavon naringeninden oluşan bir glikozittir [70].



Şekil 2.2. Naringinin kimyasal yapısı.

Birçok bitki türünde, özellikle narenciye türünde (*Citrus aurantiifolia* – tatlı limon, *Citrus paradisi* - greyfurt) doğal olarak bulunur. Greyfurt özünün daha fazla miktarda naringin içerdiği, bunu membranlı kabuğun, tohumların ve meyve suyunun takip ettiği rapor edilmiştir. Greyfurt çekirdeğinde naringin miktarı 200 µg/mL olup, greyfurt kabuğunda ise yaklaşık 2300 µg/mL bulunmaktadır. Çin greyfurtunun (*Citrus maxima*) yüksek miktarda naringin içeriği olduğu bilinmektedir [71].

Naringin, suda az çözünebilen bir bileşiktir. Yapısındaki hidrofilik şeker kalıntıları nedeniyle, polar organik çözücülerde (metanol > etanol > etil asetat) nonpolar organik çözücülere (petrol eteri > hekzan) göre daha yüksek çözünürlük gösterir. Naringinin büyük hidrofobik halka yapısı nedeniyle düşük çözünürlük ve düşük geçirgenlik özelliği, sınırlı bir biyoaktiflik derecesine sahip olmasına neden olur [72]. Naringinin doğal formunda gastrointestinal sistemden yetersiz absorpsiyonunun olduğu ve bağırsak mikrobiyomu tarafından salgılanan enzimler ile metabolizasyonun başladığı gösterilmiştir [73]. α-ramnozidaz ve β-glukozidaz enzimleri sayesinde metabolize edilerek absorbe edilebilen naringenine dönüştürülmekte ve bu süreç biyoyararlanımını da etkilemektedir [74]. Son çalışmalar, bu mikrobiyal metabolitlerin naringinin genel biyoaktivitesindeki önemli rolünü göstermiştir [75,76]. Naringinin serbest formunun, sıçanlar ve insanların plazmasında geçici olarak bulunabileceğini ancak naringenin glukuronidin ana metabolit olduğu belirtilmiştir [77,78].

2.2.2. Biyolojik Etkileri

Naringinin sağlık faydalarının çoğu, doğal flavonoidlerin ortak kimyasal yapısına ve her iki aromatik halkaya bağlı şeker birimleri ve hidroksil gruplarının etkisi ile oluşmaktadır. Bu yapılar, farklı fizikokimyasal ve fizyolojik özellikler sağlarken, sayısız işlevi yerine getirerek kendilerini diğerlerinden ayırt edebilirler [79]. Naringinin, geniş bir sinyal molekülü yelpazesi ile etkileşime girerek çeşitli sinyal yollarını modüle ettiği ve böylece çoklu biyolojik etkilere sahip olduğu belirtilmiştir. Bu etkiler arasında antioksidan, antienflamatuvar, antiapoptotik, antitümör ve antiviral özelliklerin yanı sıra metabolik sendrom, kemik rejenerasyonu, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalık ve genetik hasar üzerindeki etkiler sayılabilir [24,80-82].

Güçlü antioksidan, antienflamatuvar, antiapoptotik, anti-ülser, anti-osteoporoz ve antikanser özellikleri nedeniyle önem kazanmıştır [24]. Yapılmış olan çalışmalar, naringin tedavisinin oksidatif hasarı azaltabildiğini ve beyin, *striatum* ve hipokampusta iskemik reperfüzyonun neden olduğu histopatolojik değişiklikleri en aza indirebildiğini göstermiştir [25]. Ayrıca, uzun süreli hafızayı geliştirebildiğini ve transgenik AH farelerinde nöroprotektif bir ajan olarak hareket edebildiğini gösteren araştırmalar da bulunmaktadır [26].

2.2.2.1. Kansere Karşı Koruyucu Etkileri

Naringinin çeşitli hücresel sinyal kaskadlarının düzenlenmesi yoluyla, malign hücrelerin büyümesinin baskılanması, apoptozun indüklenmesi ve hücre döngüsünün durdurulması, oksidatif stres, enflamasyon ve anjiyogenezin modülasyonu gibi farklı mekanizmalar aracılığıyla çeşitli kanser türlerini inhibe ettiği gösterilmiştir [79].

Mesane kanseri üzerine *in vitro* bir çalışmada, naringin ile oluşturulan mononükleer palladyum (II) kompleksleri, TCC mesane karsinom hücre hatlarının canlılığını ve çoğalmasını azalttığını ve bu komplekslerin mesane kanseri hücrelerine karşı belirgin ve seçici sitotoksisite gösterdiğini ortaya koymuştur [83].

Aroui ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada, naringinin antitümör etkinliğini araştırmak için kanser modeli olarak glioblastoma seçilmiştir. Canlıda antitümör büyüme etkisi, öncelikle farklı dozlarda bileşiklerle (60, 120 ve 180 mg/kg) tedavi sonrası tümör hacminin ölçülmesiyle değerlendirilmiştir. Veriler, 120 mg naringin ile tedavinin, daha düşük konsantrasyonlardan daha etkili olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmanın *in vitro* sonuçları, naringinin (10, 20, 40 μM) 24 saatlik maruziyetten sonra konsantrasyona bağlı olarak U251 glioma hücrelerinin migrasyonunu ve invazyonunu bunula birlikte MMP-2 ve MMP-9 protein seviyelerini belirgin şekilde azalttığını göstermiştir [84].

Cilt kanserinden kaynaklanan ölümlerin başlıca nedeni olan melanomada naringin uygulanmasıyla, konsantrasyona bağlı olarak hücre proliferasyonunu durdurulduğu ve apoptozun teşvik edildiği, ayrıca hücre çoğalmasını ve büyümesinin baskılandığı tespit edilmiştir. Naringinin, c-Src/Akt sinyal yolunun baskılayarak, c-Src ve kanser hücre metabolizmasını kesintiye uğratarak ve hücre migrasyonu ve invazyonunda azalmaya yol açtığı belirtilmektedir [85].

Tiroid kanseri endokrin sistemin en sık görülen malign tümörüdür [86]. Bir *in vitro* çalışmada, SW1736 ve TPC-1 tiroid kanseri hücrelerinin naringin ile tedavisinin, hücre proliferasyonunu azalttığı ve PI3K/Akt yolunun baskılanmasıyla apoptozu tetiklediği gösterilmiştir [87].

Başka bir *in vitro* bir çalışmada, naringinin atorvastatin ile kombinasyon halinde PC-3 ve LNCaP prostat kanseri hücre hattı üzerindeki antikanser etkisi incelendiğinde atorvastatin ve naringinin kombine tedavisinin sinerjistik olarak apoptozu indüklediği, hücre büyümesini azalttığı, invazyonu ve göçü baskıladığı ve androjen reseptörünü, fosforillenmiş sinyal dönüştürücü - transkripsiyon aktivatörü 3 (p-STAT3), survivin, p-Akt ve Bcl-2 ekspresyon seviyelerini güçlü bir şekilde inhibe ettiği bulunmuştur. Bununla birlikte naringinin tek başına veya atorvastatin ile kombine olarak verilmesinin farelerde tümör büyümesini baskıladığı ve kombine tedavinin ise, her iki bileşiğin tek başına uygulanmasına kıyasla daha büyük bir inhibitör etki oluşturduğu gözlenmiştir [88].

Çocuklarda en sık görülen ekstrakraniyal tümör olan nöroblastoma tedavisinde, bitkisel kökenli bileşenlerinin kullanımına olan ilgi artmaktadır [89]. Naringin ile tedavinin, p38 ve JNK fosforilasyonunun baskılanması ile C3 ve C9'un aktivasyonu aracılığıyla rotenon ile muamele edilmiş SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattında hücre canlılığını azalttığı ve apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir [90].

Ayrıca naringinin meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını ve büyümesini baskıladığı aynı zamanda apoptozu arttırdığı tespit edilmiştir [91,92]. *In vivo* bir çalışmada naringin uygulamasının, MDA-MB-231 xenogreft farelerindeki tümör hacmini ve ağırlığını azalttığı saptanmıştır [93].

İnsan akciğer kanser hücreleriyle (A549) yapılan bir çalışmada, naringin ile tedavinin nöroaminidaz-3 (NEU3) enzimini inhibe ederek GM3 gangliozid birikimini teşvik ettiği ve hücre büyümesinde azalma ile birlikte hücre dışı sinyal-regüle kinaz/ Epidermal büyüme faktörü reseptörü (ERK/EGFR) sinyal yolağının baskılanmasına yol açtığı belirtilmiştir [94].

Elsawy ve ark. (2020) tarafından HepG2 hücre hattıyla yapılmış bir çalışmada ise naringin ve/veya metotreksat tedavisi, Bcl-2 ile ilişkili X proteini (Bax) aktivasyonu ve Bcl-2 protein ifadesinin düşürülmesi yoluyla, konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etkiler gösterdiği ve apoptozu tetiklediği gösterilmiştir [95].

2.2.2.2. Antienflamatuvar Etki

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, naringinin enflamatuvar yanıtları inhibe ederek ve bağırsak florası homeostazisini düzenleyerek, ülseratif kolit ve sepsisin neden olduğu bağırsak hasarını da içeren enflamatuvar bağırsak hastalıklarını önemli ölçüde iyileştirebileceği gösterilmiştir [96-98].

Akciğer hasarına bağlı enflamasyon durumunda, naringinin nükleer faktör kappa B (NF-κB) sinyallerini inhibe etmesi ve antienflamatuvar sitokinlerin (IL-6, TNF-α, IL-1β) seviyelerini azaltması yoluyla antienflamatuvar bir etki oluşturduğu tespit edilmiştir [99]. Aynı zamanda naringin tedavisinin p38 ve fosforile Jun N-terminal kinaz (p-JNK) proteinlerinin ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde azalttığı, mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) sinyal yolunu baskıladığı ve akciğer hücrelerinin apoptozunu bloke ettiği bildirilmektedir [100].

İstenmeyen etkileri en az düzeyde gösteren naringinin anti-fibrotik özelliklere sahip ve aynı zamanda karaciğer fibrozunun tedavisinde umut verici olduğu iddia edilmektedir. Naringin, IL-1β, IL-6, IL-12, TNF-α ve IFN-γ'yı inhibe ederek sistemik ve intrahepatik enflamasyonu önemli ölçüde azaltmakta ve böylece IL-1, TNF-α ve diğer enflamatuvar faktörler tarafından tetiklenen karaciğerdeki NF-κB, ERK ve p38'in fosforilasyonunu inhibe ederek MAPK sinyal yollarını baskılamaktadır [101].

Kronik cilt hastalıklarının enflamasyonu ilerleyen aşamalarda cilt fibrozisine dönüşebilmektedir. Naringin, kolajen üretimini azaltarak ve fibrozisle ilişkili gen seviyelerini düşürerek, cilt dokusunda fibrozise karşı koruyucu bir rol alabilmektedir [102]. Benzer şekilde, büyüme faktörlerinin (vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)-A, B, C ve VEGF-R3) ifadesini artırarak yara iyileşmesini hızlandırabilmektedir [103]. Ayrıca, hidrojellerinin topikal uygulaması ile NF-κB ve COX-2'yi inhibe ederek, derin dermal yaraların onarımını ve rejenerasyonunu artırmaktadır [104,105]. Naringin, güçlü antienflamatuvar ve antioksidan aktivitelere sahiptir; sadece enflamatuvar aracı (TNF-α) ve apoptoz (Bax) gen ifadesini düşürebilmekle kalmaz, aynı zamanda süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon (GSH) düzeylerini de artırabilir [106].

2.2.2.3. Antihiperlipidemik Etki

Naringinin lipit düşürücü etkisinin, fareler kullanılarak yapılan bir çalışmada yüksek yağlı diyetin neden olduğu alkolik olmayan karaciğer hasarını etkili bir şekilde azaltabildiği, vücut ağırlığını ve karaciğer lipit birikimini düşürdüğü gösterilmiştir [107].

Bağırsak bakteriyel florasının korunmasında, oksidatif stres ve enflamasyona karşı karaciğer direncinin arttırılmasında naringin uygulamasının yararlı etkileri bildirilmektedir. Yağlı karaciğer modeli kullanılan bir çalışmada, naringin CD36, asetil-CoA karboksilaz ve yağ asidi sentetazını düşürdüğü, peroksizom prolifetör aktifleştirilmiş reseptör (PPAR)-α'yı artırabildiği; böylece yağ asidi alımını ve yeni yağ üretimini azaltabildiği ve yağ asidi oksidasyonunu artırarak karaciğerdeki lipid metabolizma bozukluklarını iyileştirebildiği gösterilmiştir [108].

2.2.2.4. Renal Sistem Üzerine Etkileri

In vivo fare modelleri ve renal interstisyel fibrozun fibrotik hücre modellerinde, naringinin α-düz kas aktini (α-SMA), kolajen 1 (COL1A1), kolajen 3 (COL3A1), IL-1β, IL-6 ve TNF-α gen ifade seviyelerini önemli ölçüde baskıladığı, böylece böbrek enflamasyonunu ve fibrozunu azalttığı gösterilmiştir [109].

Ayrıca, yapılan çalışmalar naringinin, oksidatif stresi ve mitokondriyal disfonksiyonu bloke ederek sıçanlarda diyabetik nefropatiyi önleyebileceğini desteklemektedir [110]. *In vitro* sıçan mezanşimal hücrelerinin kullanıldığı bir çalışmada naringinin NLRP3 inflamazomlarını inhibe etmek, enflamatuvar faktörlerin ifadesini azaltmak ve antienflamatuvar etkileriyle diyabetik nefropatiyi iyileştirmek için NLRP3-kaspaz-1-IL-1β/IL-18 sinyal yolunu düzenlediği ortaya konmuştur [111].

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada naringinin renal iskemi-reperfüzyon hasarından (İRR) korumada faydalı olduğu tespit edilmiştir. Naringin, renal dokuda mikroRNA-10a, kaspaz-3 ve Bax'ı inhibe ederken, Bcl-2 ifadesini arttırdığı bildirilmiştir [112]. Fare renal İRR modellerinde, naringin uygulamasının renal İRR hasarı sonrasında SOD ve Nrf-2 ifadesini düzeltebildiği, antioksidan aktiviteyi artırabildiği ve böylece renal ve distal miyokard hasarına karşı net bir koruyucu rol oynayabildiği saptanmıştır [113].

2.2.2.5. Solunum Sistemi Üzerine Koruyucu Etkileri

Naringinin kronik obstrüktif akciğer hastalığının (KOAH) fare hayvan modellerinde Aquaporin1 (AQP1) ekspresyonunu arttırarak hava yolu enflamasyonunu ve akciğer geçirgenliğini azalttığı tespit edilmiştir [114].

Naringin, trakeal düz kasları gevşetmek için Ca^{+2} ile aktifleştirilen K^{+} kanallarını açarak, plazma membran hiperpolarizasyonuna aracılık ederek ve Ca^{+2} akışını azaltarak etki gösterebilmektedir. Bu sayede fare trakeal düz kasları gevşetmek için antiastmatik bir molekül olarak kullanılabileceği gösterilmiştir [115]. Aynı zamanda naringin, kültürlenmiş insan trakea epitel hücrelerinin çoğalmasını teşvik eden ve acı reseptörleri (TAS2R'ler) aktive eden, böylece solunum yolu düz kas hücrelerinin (ASMC'ler) gevşemesini başlatan, bitki kökenli, toksik olmayan bir moleküldür [116].

2.2.2.6. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Koruyucu Etkileri

Naringinin kolesterol ve trigliserid (TG) seviyelerini düşürdüğü, lipolizi teşvik ettiği ve yağ asidi β oksidasyonunu doz bağımlı bir şekilde düzenlediği gösterilmiştir [117-119]. Hiperkolesterolemili fareler ile yapılan bir çalışmada naringinin indüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS), Lektin-benzeri Okside Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörü-1 (LOX-1) ve NADPH oksidaz alt birimlerinin ifadesini inhibe ederek vasküler disfonksiyonu ve oksidatif stresi azalttığı bildirilmektedir. Bu süreç ayrıca ROT üretiminin azalmasını, nitrik oksit (NO) biyoyararlanımının artmasını ve sıçan aortik endotelyal fonksiyonunun iyileşmesini de içermektedir [120]. Ayrıca, çalışmalar, naringinin yararlı etkisinin ana mekanizmasının, bağırsak mikrobiyotası-karaciğer-kolesterol ekseni olduğunu ortaya koymuştur. Bu mekanizmanın, FXR/FGF15 yolunu inhibe ederek ve CYP7A1'i arttırarak kolesterolde safra asitlerinin sentezini uyardığı belirtilmektedir [121].

Diyabetik kardiyomiyopati, diyabetli kişilerde görülen birincil hastalıktır ve kalp yetmezliğine ve ölüme yol açan diyastolik disfonksiyon ile karakterizedir. Kan şekeri düzeyinin kontrolü bu bozukluğun düzeltilmesinde yeterli değildir. Naringinin Tip 2 diyabetli fareler üzerinde, ROT üretimindeki artışı sınırlayarak, kalpain aktivitesini, TNF-α ve IL-6 seviyelerini azaltarak ve NF-κB ekspresyonunu düşürerek kardiyomiyopati oluşumunu engellediği gösterilmiştir [122].

Diyabetik kardiyak otonom nöropati (DKON), diyabetle ilişkili en yaygın komplikasyonlardan biridir. Diyabet tablosu, P2Y14 aşırı eksprese edilir ve büyük miktarlarda enflamatuvar faktörlerin (IL-1β) salınmasını sebep olur. Bu durum, sinir hücreleri arasında aralık bağlantılarının oluşmasına neden olur ve DKON'u uyararak kalp hasarına yol açabilmektedir. Naringin, P2Y14 reseptörlerinin ve enflamatuvar faktörlerin ekspresyonunu azaltmış ve antioksidan GPX4/NRF2 yolunun işlevini geri kazandırmış böylece etkili bir şekilde DKON'ı belirtilerini hafiflettiği tespit edilmiştir [123].

İskemi-reperfüzyon hasarı, kardiyovasküler morbidite ve mortalite ile ilişkili önemli risk faktörlerinden biridir. PI3K/Akt yoluyla CXCL12/CXCR4 kemokin reseptör aktivasyonu, endotel progenitör hücre proliferasyonunu artırarak miyokardiyal iskemik-reperfüzyon hasarının tedavisinde etkili olduğu ortaya konmuştur [124]. Naringin, Akt'nin fosforilasyonunu önemli ölçüde arttırabilmekte, bu nedenle, PI3K/Akt yoluyla apoptoz, oksidatif stres ve otofaji inhibisyonunu teşvik ederek fare miyokardiyal iskemik-reperfüzyon etkilerini hafifletebilmektedir [125].

2.2.2.7. Sinir Sistemi Üzerine Koruyucu Etkileri

Nöroenflamasyon, esas olarak bağışıklık tepkisi ve beyin glial hücrelerinin (astroglia ve mikroglia) uzun süreli aktivasyonu tarafından tetiklenir. Bu süreç nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde kritik bir rol oynar [126,127].

Bir fitoöstrojen olarak naringin, az sayıda istenmeyen etkiye sahiptir ve östrojen benzeri biyolojik etkileri başlatmak için östrojen reseptörlerine (ER) bağlanabilir [128]. Uzun süreli östrojen tedavisine bir alternatif olarak, naringinin kullanımı, AH'ye karşı tedavi araştırmaları için değerli bir seçenektir. Naringin, güçlü bir demir şelatlayıcı (bağlayıcı) güce sahiptir ve bu özelliğin amiloid plak oluşumunu azaltabileceği düşünülmektedir [129]. *In vitro* bir çalışmada, naringinin ER β ifadesini uyardığı, PI3K/AKT sinyal yolunu aktive ettiği ve glikojen sentaz kinaz (GSK)-3β aktivitesini ve Tau proteininin fosforilasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir [130].

Naringinin renin-anjiyotensin sistemi aracılığıyla Aβ ile indüklenmiş hayvan modellerinde de terapötik faydalar sağladığı bildirilmektedir. Naringin, sadece Aβ ile indüklenen kolinerjik işlev bozukluğunu iyileştirmekle kalmaz, aynı zamanda Aβ ile indüklenen apoptozisi tersine çevirir, mitokondriyal kalsiyum uniporter seviyelerini yükseltir ve tüm beyin bölgelerinde hemeoksidaz-1 seviyesini azaltır. Böylece, farelerde Aβ ile indüklenen beyin bilişsel bozukluklarına ve mitokondriyal toksisiteye karşı etki gösterdiği ortaya konmuştur [131].

Çalışmalar, anksiyolitik ve antidepresan özellik gösteren naringinin depresyon tedavisinde kullanılabileceğini ifade etmektedir [132]. Depresyonla mücadelede ek olarak siklik adenozin monofosfat yanıt elementi bağlayıcı proteinin fosforilasyonu (CREB) sinyal yolunu aktive ederek yetişkinlerde nörojenezi sağlayabildiği düşünülmektedir [133].

Uyku yoksunluğu yaşayan hastaların mikroglialarında leptin-Janus kinaz (JAK)/STAT3 sinyal yolunun aktif hale geldiği bulunmuştur. Naringin, JAK/STAT3 sinyal yolunun fosforilasyonunu inhibe ederek mikroglial polarizasyonu ile M2 tipi makrofajların üretimini

destekler, böylece antienflamatuvar yanıtı, doku onarımı sürecini, ekstraselüler matris yeniden yapılanmasını ve nöroprotektif etkiler gösterilmesini teşvik etmektedir [96].

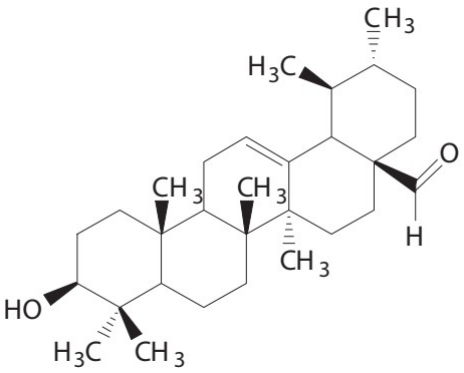
In vitro bir çalışmada, naringin, NF-κB1'i hedefleyerek ve HIF-1α/Akt/mTOR sinyal yolağını düzenleyerek, oksijen-glikoz yoksunluğu modelinde PC12 hücre hasarını önleyerek serebral IRI tedavisi için yeni bir seçenek sunmuştur [25]. Uzun süreli toplamserebral iskemi veya şiddetli iskemi serebral enfarkta yol açabilmektedir. Naringin, serebral enfarktüs yaşayan hayvan modellerinde fare hipokampal sinir hücrelerinin apoptozunu, TNF-α ve IL-6 gibi enflamatuvar faktörlerin salgılanmasını azaltabilmekte ayrıca p-Akt protein ekspresyonunu konsantrasyona bağlı şekilde artırarak nöronlarda PI3K/Akt yolunu aktive edebilmektedir. Nöronal apoptoz ve enflamasyonu inhibe etmesi serebral enfarkta karşı koruma sağlamaktadır [134].

Parkinson hastalığı (PH), beynin orta bölümündeki *substantia nigra*'da dopaminerjik nöronların dejeneratif ölümü ile başlayan ve *striatum*da dopamin seviyelerinin azalması ile devam eden, kronik bir nörodejeneratif hastalıktır. Bu hastalık, bradikinezi, istirahat tremoru, kas rijitliği ve postüral yürüyüş bozukluğu ile karakterizedir [135]. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde Nrf-2 merkezli sinyal yolu mekanizmasının, kritik bir farmakolojik hedef olabileceğine dair artan kanıtlar bulunmaktadır [136]. Rotenon ile indüklenmiş PH taşıyan hayvan modellerinde, naringin, Nrf-2 aracılı yolak üzerinden rotenonun neden olduğu toksisiteye karşı hayvanlarda nöroprotektif aktivite gösterebilmektedir [137]. Bu nedenle, naringinin gelecekte PH tedavi yönetimi için alternatif bir seçenek olabileceği düşünülmektedir.

2.3. Ursolik Asit

2.3.1. Genel Özellikleri

Ursolik asit (3β-hidroksi-urs-12-en-28-oik asit) (Şekil 2.3) terapötik potansiyele sahip pentasiklik triterpenoiddir [138].



Şekil 2.3. Ursolik asidin kimyasal yapısı.

Birçok bitki türünde doğal olarak bulunan ursolik asit Japon eriği (*Prunus mume*), burun yasemin (*Gardenia jasminoides*), parlak kurtbağrılar (*Ligustri lucidi*), gibi geleneksel Çin tıbbında çok kullanılan bitkilerin meyvelerinden elde edilmektedir [139-141]. Ayrıca ayı üzümü (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng), büyük kılzılcık (*Vaccinium macrocarpon*), biberiye (*Rosemarinus officinalis*), malta eriği (*Eriobotrya japonica*), süpürge çalısı (*Calluna vulgaris*), kutsal fesleğen (*Ocimum sanctum*) ve Java eriği (*Eugenia jambolana*) gibi doğal tıbbi bitkilerin yaprakları ve meyvelerinde yaygın olarak bulunur [142].

Pasif difüzyonun ursolik asidin taşınmasının ana mekanizması olduğu öne sürülmektedir [143]. Karaciğer, triterpen metabolizmasının ana organı olarak bulunmuş olup bu durum bileşiğin belirlenmiş hepatoprotektif etkileriyle de uyumlu kabul edilmektedir. Yüksek lipofilik özellikte olması triterpenoidlerin karaciğer metabolizmasına yatkınlığını arttırır. Farelerde yapılan bir çalışma, plazmadaki ursolik asit konsantrasyonunun sürekli azaldığına işaret ederken, karaciğerdeki konsantrasyonunun arttığı göstermiştir. Ursolik asidin farmakokinetik profili doku dağılımının geniş ve eliminasyonunun hızlı olduğunu göstermektedir. *In vivo* çalışmalarda kalp, karaciğer, böbrek, kolon, beyin, dalak, akciğer,mide ve testis dokularında tespit edilmiştir. Biyolojik etkilerinin plazma konsantrasyonu ile doğrudan ilişkili olmayabileceği düşünülmektedir [144-147]. Ursolik asit sitokrom P450 enzimleri ve P-glikoprotein substratları olduğu ve dolayısıyla biyotransformasyon ve aktif taşınma açısından biyoyararlanımının kısıtlanabileceği bildirilmiştir [148,149].

Ursolik asidin sulu ortamdaki düşük çözünürlüğü ve canlı organizmada yetersiz geçiş özellikleri, biyoyararlanımını ve terapotik uygulamasını önemli ölçüde etkiler [150]. Bununla birlikte, ursolik asidin yüksek lipofilik özelliği düşünüldüğünde hücrelerin fosfolipid çift katmanına gömülebileceği ancak hücre zarını geçemeyeceği hipotezi bile öne sürülmüştür [151]. Ursolik asidin kristal yapıda bulunması sudaki çözünürlük seviyesini yükseltir. Amorf

yapı ve azaltılmış parçacık boyutu, triterpenoid çözünürlüğünü ve çözünme hızını belirgin bir şekilde arttırmaktadır [149,152].

2.3.2. Biyolojik Etkileri

Ursolik asit ile yapılmış birçok çalışmada farklı biyolojik etkileri gösterilmiştir. Bunlar sinir sistemini koruyucu [150,153], antikanser [154-156], antimikrobiyal [157,158], antihiperlipidemik [159], hepatoprotektif [27], antienflamatuvar, antioksidan [160] ve antidiyabetik [30], kardiyovasküler sistemi koruyucu [161] etkilerini içerir. Bu özellikleri, ursolik asidin kanserde, bakteriyel enfeksiyonlarda, diyabette, AH'de, immünolojik hastalıklarda önleyici veya terapötik bir ajan olabileceğini göstermektedir.

2.3.2.1. Kansere Karşı Koruyucu Etkileri

Son yıllarda, ursolik asidin antikanser özelliği çok sayıda çalışmada farklı yolaklar üzerinden gösterilmiştir. Tedavide apoptoz ve otofaji indüksiyonuyla, hücre invazyonunu, enflamatuvar tepkiyi ve epitel-mezenşimal geçişi inhibe ederek, radyoterapi ve kemoterapiye karşı oluşan ilaç direncini tersine çevirerek, hücre döngüsünü durdurarak ya da bağışıklık fonksiyonunu düzenleyerek rol alabilmektedir [162-164].

Ursolik asidin antiproliferatif etkileri, insan mesane kanseri (T24) hücre hattında endoplazmik retikulum stresini indükleyebilme yeteneği göstermesi ile doğrulanmıştır. Mesane kanseri üzerine yapılan *in vitro* çalışmada ursolik asidin inozitol gerektiren Enzim 1 (İRE1) – Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü İlişkili Faktör 2 – ASK1 kompleksi oluşumunu sağlayarak, pro-apoptotik ASK1 - JNK sinyal yolağını aktive ettiği gösterilmiştir. Bu durumun hücrenin endoplazmik retikulum stresine yanıt verme sürecini düzenleyerek mesane kanseri hücrelerinde apoptoz süreçlerini başlattığını belirtilmektedir [165].

Birçok çalışmanın sonuçları, NF-κB'nin kolorektal kanser oluşumu ve metastazında önemli bir rol oynadığını öne sürmektedir. Kanser dokusunda aşırı ifadesi tümör gelişimi ile ilişkili bulunmuştur [166,167]. Nf-κB'nin apoptozu engelleme özelliği onkolojik hücre gelişimini desteklemektedir [168]. Bu bulgular, NF-κB aktivasyonunu engelleyen maddelerin kemoterapi direncini azaltacağına işaret etmektedir. Prasad ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada ursolik asidin doza bağımlı olarak NF-κB aktivasyonunu inhibe ettiği ve kolon kanseri tümör hücrelerinin (HCT116) koloni oluşturma yeteneğini doza bağımlı bir şekilde önemli ölçüde bastırdığı bulunmuştur. Sonuçlar, ursolik asidin kolorektal kanserde sağkalım (Bcl-2, survivin, Bcl-xL), proliferasyon (siklin D1) ve metastaz (MMP-9, VEGF, ICAM-1) proteinlerinin ekspresyonunu doza bağımlı bir şekilde inhibe ettiğini göstermiştir [169]. İnsan kolorektal kanser hücreleri (SW480) ile yapılan bir çalışmada 48 saat süre ile 0-40 μmol/L

derişim aralığında ursolik asit uygulamasının derişim artışıyla bbirlikte annexin V pozitif hücrelerin yüzdesinde artışa neden olduğu; anti-apoptotik proteinler Bcl-2, Bcl-xL ve survivinin ekspresyon düzeylerinde ise derişime bağlı bir azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Bu proteinlerin inhibe edilmesi ile SW480 hücre hatlarında çoklu ilaç direncinin de azaldığı tespit edilmiştir [170].

Göğüs kanserine ursolik asidin etkisinin değerlendirildiği *in vitro* çalışmalarda, ursolik asidin hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği [170]; MDA-MB-231 hücrelerinde fas reseptörü, kaspaz 3, PARP ve mitokondriyal yolak aracılığıyla apoptozu başlattığı [171]; c-JNK, Akt ve mTOR sinyal yolağını modüle ederek kanser hücrelerinin göçünü ve invazyonu baskıladığı [172]; MCF-7 hücrelerinde FoxM1 transkripsiyon faktörünün ifadesini inhibe ettiği [173] bildirilmiştir.

In vitro hepatoselüler karsinoma araştırmalarında, Lin ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, 4 µmol/L derişimde ursolik asit uygulamasının anjiyojenik faktörleri, VEGF, IL-8 ve urokinaz tipi plazminojen aktivatörünün (uPA) mRNA ifadesini belirgin bir şekilde baskıladığı rapor edilmiştir. Bu triterpenik asitlerin ayrıca, GSH düzeyini koruyarak oksidatif stresi etkili bir şekilde hafiflettiği, ROT ve NO üretimini azalttığı ve insan karaciğer kanser hücrelerinde (Hep3B, Huh7 ve HA22T) hücre invazyonunu ve migrasyonunu azalttığı bulunmuştur [174].

Song ve ark. (2012) over karsinomu hücreleri ile yaptıkları çalışmada, ursolik asidin SK-OV-3 ve A2780 over hücrelerinde yaklaşık olarak 50 ve 65 µM IC_{50} değerleri ile sitotoksik etki gösterdiğini tespit etmiştir [175].

2011 yılında Huang ve ark.'nın akciğer kanser hücre hatlarıyla yapmış olduğu çalışmada, 4-16 µmol/L derişim aralığındaki ursolik asit uygulamalarının DNA parçalanmasını artırarak ve Na^+-K^+-ATPaz aktivitesini azaltarak belirgin apoptotik etkilere neden olduğu gözlenmiştir. Bu triterpen, ayrıca fibronektin, ICAM-1, MMP-2 ve MMP-9 ifadesini etkili bir şekilde baskılamış, protein kinaz C (PKC) aktivitesini azaltmış ve akciğer kanseri hücrelerinde invazyon ve migrasyonu inhibe etmiştir. Bu bulgular, ursolik asidin akciğer kanseri için apoptozis oluşturarak veya metastazı yavaşlatarak güçlü bir antikanser ajan olabileceğini öne sürmektedir [176].

2.3.2.2. Antimikrobiyal Etki

Antibiyotiklerin kötüye kullanımının klinik tedavi sürecini ciddi şekilde zorlaştıran mikrobiyal ilaç direncine neden olduğu iyi bilinmektedir. Doğal biyoaktif bileşiklerin, çoklu ilaç direncini çözmek ve antibiyotiklerin istenmeyen etkilerini azaltmak için kullanışlı

alternatifler olabileceği düşünülmektedir. Son zamanlarda, ursolik asidin bakteriler, mantarlar, virüsler, parazitler ve diğer zararlı patojenler üzerindeki antimikrobiyal etkileri geniş kapsamlı bir şekilde gösterilmiştir.

Ursolik asidin birçok bakterinin, özellikle gram-pozitif türlerin, proliferasyonunu inhibe ettiği ve bunu hücre morfolojisini değiştirerek, bakteriyel hücrelerin otolizini artırarak ve hücresel peptidoglikan metabolizmasını düzenleyerek gerçekleştirdiği raporlanmıştır [177]. Karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* ATCC 43816 (CRKP) üzerindeki etkinliği, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri 0,8 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Daha açık bir ifadeyle, ursolik asit, CRKP'nın hücre zarı bütünlüğünü bozmuş, biyofilm oluşumuna karşı güçlü inhibisyon etkileri göstermiş ve biyofilm ile ilişkili gen ekspresyonunu etkileyerek, biyofilm içindeki CRKP hücrelerini etkisiz hale getirmiştir [157].

1996 yılında yapılan bir çalışmada, ursolik asidin HIV-1 proteazı inhibe ettiği ve HIV'in retroviral sürecini baskıladığı ve IC_{50} değerinin ise 1,0 μM olduğu tespit edilmiştir. Daha sonraki çalışmada, ursolik asit içeren bitkisel bir ilacın özütünün HIV'e karşı güçlü bir etki gösterdiği tekrar gösterilmiştir [178]. Ayrıca, ursolik asit içeren *Ligustrum lucidum* özütünün hepatit C virüsü 1b'nin (IC_{50} = 51,1 μg/mL) ve hepatit C virüsü 2a JFH1'in (IC_{50} = 11,9 μg/mL) replikasyonlarını güçlü bir şekilde inhibisyonunu destekleyen bir çalışma bulunmaktadır [179].

2.3.2.3. Hepatoprotektif Etki

Ursolik asidin hepatotoksik maddelere karşı iyi bir koruyucu aktivite gösterdiği bilinmektedir. Saraswat ve ark., *Eucalyptus tereticornis* özütünden izole edilen ursolik asidi sıçan hepatositlerinde etanol toksisitesine karşı test etmişler ve hepatosit canlılık kaybını %76'ya varan seviyede azaltabildiğini bulmuşlardır [180]. Benzer bir konu, Saravanan ve ark. tarafından çalışılmış, ursolik asidin dolaşım antioksidanları ve serum protein seviyelerini artırdığı, toplam bilirubin seviyesini ve lipit peroksidasyon belirteçlerini azalttığı rapor edilmiştir [181].

Shukla ve ark. tarafından parasetamol ve Martin-Aragón ve ark. tarafından karbon tetraklorür gibi diğer karaciğere toksik ajanlar ile çalışmalar yapılmıştır. Ursolik asidin her iki maddenin uygulandığı örneklerde hepatosit canlılığını arttırdığı ve belirteçlerinin serum seviyelerini düzelttiği ortaya konmuştur [182,183].

Wang ve ark., ursolik asit uygulaması ile karaciğer fibrozisli hastaların durumunu iyileştirmeyi hedeflemişlerdir. Farelerden izole edilen karaciğer stellat hücreleri kullanılarak yapılan çalışmada ursolik asidin apoptozise neden olarak fibrozisin kısmi iyileşmesini sağladığını göstermişlerdir [184].

C57BL/6 farelere 15 hafta süreyle yüksek miktarda yağlı bir diyet verilerek karaciğer yağlanması üzerine ursolik asidin etkilerinin incelendiği bir *in vivo* çalışmada, oral uygulama ile verilen ursolik asit (80 mg/kg) uygulamasının karaciğer ve plazma total kolesterol düzeylerini, trigliserit seviyelerini ve epididimal yağ hücre sayısını önemli ölçüde azalttığı, karaciğer yağlanmasını önemli düzeyde gerilettiği saptanmıştır. HepG2 hücre hattı ile yapılan çalışmada ise ursolik asit (20 μM), toplam kolesterol (%37,2) ve trigliserit (%50,4) içeriğini önemli ölçüde azaltmış ve fosforile AMP aktif protein kinaz (P-AMPK) protein ekspresyonunu artırmıştır [185].

2.3.2.4. Antienflamatuvar Etki

In vivo ve *in vitro* çalışmalar, ursolik asidin hem endojen hem de eksojen enflamatuvar uyarıcılara karşı etkili olduğunu ve olumlu antienflamatuvar etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Ursolik asidin, lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenerek nefrototoksisite oluşturulmuş farelerde 100 mg/kg i.g. uygulama ile böbrek tübüllerinde belirgin şekilde hasarı azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca böbrek fonksiyonları kreatinin, kan üre azotu düzeylerine ve makrofaj infiltrasyon miktarına bakılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar tübüller hücrelerin hasar düzeyindeki iyileşmeyi gösteren boyama testi ile uyumlu çıkmıştır. Aynı çalışmanın *in vitro* aşamasında makrofaj (RAW264.7) hücre hattında LPS, TLR4/MyD88 yolaklarını aktive ederek enflamasyon süreci başlatılmıştır. Ursolik asidin TLR4 ve MyD88 ifadesini baskılayarak enflamasyon faktörlerinin salınımını belirgin şekilde azalttığı tespit edilmiştir [186].

Ursolik asidin influenza virüsü tarafından tetiklenen pro-enflamatuvar yanıtlar ve oksidatif stres üzerindeki biyolojik etkilerini tespit etmeyi amaçlayan bir *in vitro* araştırmada influenza virüs enfeksiyonu indüksiyonundan 48 saat sonra enfekte A549 hücre hattında ursolik asit (20 μg/mL) uygulamasının azalmış hücre canlılığını ve artmış laktat hidrogenaz (LDH) düzeylerini tersine çevirdiği belirtilmektedir. Ayrıca, influenza enfeksiyonu TNF-α, IL-6, IL-1β ve IL-18 gibi faktörlerin mRNA seviyelerini ve protein miktarını önemli ölçüde yükseltmiş, buna karşılık ursolik asit ile tedavinin bu etkileri önemli ölçüde düşürmeyi başardığı gösterilmiştir [187].

2.3.2.5. Kardiyovasküler Sistem Üzerine Koruyucu Etkileri

Somova ve ark. tarafından yapılan çalışma, ursolik asit uygulamasının genetik olarak hipertansif sıçanların kalp atış hızını %32'ye varan düzeyde azaltabildiğini ortaya koymuştur [188].

Ursolik asidin aterosklerozun gelişiminde önemli bir rolü olan TNF-α'nın aşırı ekspresyonunu inhibe ederek ve makrofaj otofajisini artırarak ateroskleroz oluşumunu azalttığı belirtilmektedir [189]. Bu durum da bu bileşiğin kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde potansiyel olarak etkili bir bileşik olabileceğini göstermektedir [190].

2.3.2.6. Antihiperlipidemik Etki

Jia ve ark., hipertrigliseridemiyi düşürme açısından ursolik asidin etkilerini inceledikleri çalışmalarında, ursolik asit uygulanması qPCR tarafından gösterildiği gibi kültüre edilmiş hepatositlerde (HepG2) PPARα mRNA konsantrasyonunu dikkate değer şekilde artırmıştır. Aynı hücrelerde yapılan luciferaz ifade eden geni araştıran deney modelinde, ursolik asidin PPAR-α aktivitesini artıran bir faktör olduğu ortaya çıkmıştır. Doz bağımlı bir şekilde, ursolik asidin intraselüler trigliserit ve kolestrol birikimini HepG2 hücrelerinde önemli ölçüde azaltarak belirgin hipolipidemik etkilere sahip olduğu kanıtlanmıştır [191].

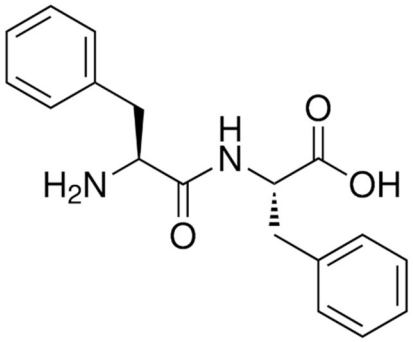
2.3.2.7. Sinir Sistemi Üzerine Koruyucu Etkileri

Rai ve ark. tarafından yapılan çalışmada 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) ile indüklenen PH olan farelerin, kontrol grubuna göre rotarod üzerinde kavrama ve asılı kalma sürelerinin önemli ölçüde azaldığı öne sürülmüştür. Bununla birlikte ursolik asit takviyesi yapılan MPTP ile indüklenmiş fareler ile sadece MPTP'ye maruz kalan fareler karşılaştırıldığında ise ursolik asit uygulananların rotarod üzerinde belirgin bir şekilde daha uzun süre kaldığı bildirilmektedir. Biyokimyasal testler ile MPTP uygulamasının etkisi incelendiğinde katalaz (KAT) aktivitesini ve GSH düzeyini önemli ölçüde azalttığı; NO ve malondialdehit (MDA) düzeylerini artırdığı tespit edilmiştir. Ursolik asit uygulanmış MPTP grubunda, MPTP grubuna kıyasla KAT aktivitesinde ve GSH düzeyinde artış, MDA ve NO düzeyinde ise önemli ölçüde azalma olduğu gösterilmiştir [192].

Bir travmatik beyin hasarından (TBH) sonra nöron işlev bozukluğu ve ölümü, bu durumla ilişkili çeşitli patolojik mekanizmalarla birlikte meydana gelir. TBH sonrası için yapılan araştırma bulguları artan uyarıcı amino asitler, kalsiyumun aşırı yükselmesi, oksidatif stres ve enflamatuvar yanıtı içermektedir [193,194]. Araştırma verileri, sinir sisteminde önemli bir rolü olan nükleer faktör-eritroid 2 ile ilgili faktör 2 (Nrf2)'nin reperfüzyon yaralanması, pulmoner fibrozis gibi çeşitli patolojik süreçlerde enflamasyonu ve oksidatif stresi sınırlayarak nöroprotektif etki oluşturduğunu göstermektedir [195-198]. Bu çalışmanın sonuçları ursolik asidin TBH modelinde antioksidan enzimlerin ekspresyonunu ve aktivitesini artırarak oksidatif stresi azalttığını göstermiştir. Tedavi mekanizmasının oksidatif strese karşı Nrf2 ve enflamasyonu azaltan proteinleri aktive edilmesi olduğu ortaya konulmuştur [199].

2.4. Difenilalanin

Difenilalanin (FF) (Şekil 2.4), doğal olarak Aβ proteininin çekirdek türevi olarak ortaya çıkan yaygın bir dipeptittir. FF, β-tabakası termodinamik katlanması yoluyla nanotüpler oluşturarak kendi kendine düzenlenme özelliğine sahiptir [200,201].



Şekil 2.4. Difenilalaninin kimyasal yapısı

Difenilalanin (FF), özellikle 1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol (HFIP) gibi organik çözücülerde yüksek çözünürlük özelliğine sahiptir. HFIP içinde çözünürken, su ile karıştırıldığında hızla nanotüp oluşturur. Bu özellik, FF'nin kendiliğinden düzenlenen yapılar oluşturma kapasitesini göstermektedir [202]. Yüksek mekanik dayanıklılığa sahip olup, biyolojik materyaller arasında en sert olanlardandır [203]. Bu nanotüpler, piezoelektrik özelliklere sahiptir ve bu özellikleri, biyomedikal uygulamalarda önemlidir [200]. FF çeşitli biyomedikal uygulamalarla ilgili piezoelektrik özelliklere sahip düzenli, biyouyumlu nanoyapılar oluşturma kapasitesine sahiptir [204]. FF nanotüplerinin X-ışını toz kırınımı desenlerinin, tekli kristal yapısı ile aynı olduğu tespit edilmiş bu gelişme kristal yapısının nanotüp özelliklerini anlaşılması açısından önemli olduğunu göstermiştir [205]. Elektrik alanların uygulanması FF nanotüplerinin düzenli agregasyonunu hızlandırdığını ifade etmiştir [202].

Çeşitli farklı etiyolojilere sahip amiloidal hastalıklar (AH, PH, amiyotrofik lateral skleroz, Huntington hastalığı, Creutzfeldt-Jakob hastalığı ve tip II diyabet) dahil olmak üzere, peptitler veya proteinler arasındaki kovalent olmayan etkileşimlerin agregasyona yol açmasıyla ilişkilidir. Çeşitli araştırmalar, bu agregatların oluşumunda hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler ve sterik etkileşimlerin kümülatif rolünü ortaya koymuştur [206-208]. Ayrıca, AH'nin erken başlangıcına yol açan Iowa, Arctic, Dutch gibi polipeptid ile çevrili bölgedeki çoğu ailevi mutasyon, FF bölgesine bitişik olarak yer almaktadır [209]. FF modüllerinin diğer

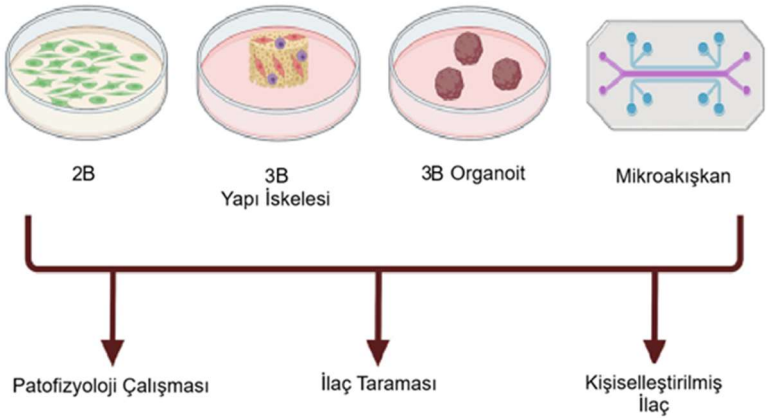
agregatif polipeptidler ile benzer fotolüminesans, mekanik dayanıklılık özelliklerine sahip olduğu çalışmalar ile ispatlanmıştır. Bu nedenle, FF'nin amiloid oluşturan proteinlerin çoğu özelliğine sahip olduğu gösterilmiş ve amiloid sistemler için model olarak kullanılabileceği düşünülmüştür [210].

2.5. *In vitro* Alzheimer Hastalık Modelleri

Beyin, benzersiz ve karmaşık mimarisi ve işlevi nedeniyle insan vücudundaki en karmaşık organlardan biridir. Beynin fizyolojik işlevindeki herhangi bir değişiklik veya hasar nöropatolojiye yol açar ve bu durum AH'nin patolojisini de açıklar. AH için yapılan klinik denemelerin çoğu, hastalığın yeterince anlaşılmamasından dolayı başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Bu nedenle, etkili tedaviler geliştirme amacıyla AH'nin patolojik, biyokimyasal ve davranışsal özelliklerini yeniden üretebilen daha iyi model sistemlerine ihtiyaç vardır. Etkili tedaviler geliştirilmesi amacıyla AH'nin patolojik, biyokimyasal ve davranışsal özelliklerini yeniden üretebilen daha iyi model sistemleri oluşturmak hedeflenmiştir. Modelin sağlamlığı, AH patofizyolojisinin özellikle amiloid plakların oluşumu, NFT'ler, mikroglianın nöroimmün tepkileri, kan beyin bariyeri (KBB) hasarı, hücre-hücre etkileşimleri, sinyal yolları, enfeksiyon ve nöronal ölüm bağlamında incelenmesine olanak sağlayacaktır. Aynı zamanda modellemeler üzerinde yapılan ilaç geliştirme çalışmaları daha hızlı ve güvenli ilerleme sağlamaktadır [211].

Alzheimer hastalarının beyninde meydana gelen değişiklikleri incelemek ve bu değişiklikler hakkında bilgi edinmek için kullanılan en yaygın deneysel araçlar *in vitro* iki boyutlu (2B) modeller, *in vitro* üç boyutlu (3B) modeller ve hayvan modelleridir. Bu modellemeler ile yapılan AH çalışmaları hastalığın tanı ve tedavisinde çok sayıda gelişme sağlamıştır. Hastalığı presemptomatik aşamada çözmek için, özellikle transgenik ve non-transgenik modellerin bir kombinasyonu olan hayvan tabanlı platformların, ilişkili patogenezi derinlemesine simüle etmede değerli bir araç olduğu kanıtlanmıştır. Yine de çalışmalarda kemirgenlerin kullanılması davranışsal değişikliklerin daha iyi anlaşılmasını sağlasa da AH patolojisinin tüm özelliklerini kopyalamadıkları için kliniğe aktarmada başarısız olmuştur. Bu nedenle ayrıntılı bölgesel ve hücre ile ilgili bilgi toplamak için birkaç *in vitro* AH modeli kullanılmaktadır. Bu *in vitro* çalışmalarda 2B ve 3B hücre kültürleri, mikroakışkan tabanlı platformlar ve organoidler dahil olmak üzere modeller için farklı sistemler kullanılmaktadır (Şekil 2.5). Özellikle 3B modeller için, AH patolojisini yakından taklit edebilen biyomalzeme

mühendisliği tabanlı sinir modelleri ve hasta kaynaklı hücrelerden oluşan organoidler vurgulanmaktadır [211].



Şekil 2.5. *İn Vitro* Düzeyde Alzheimer Hastalık Modelleri

2.5.1. 2 Boyutlu *In vitro* Alzheimer Hastalığı Modelleri

Alzheimer hastalığı (AH)nın etiyolojisi ve patolojisini incelemek için çeşitli *in vitro* yöntemler geliştirilmiştir. Bir donörden doku izole edilerek ve doku matris kaplı plakalarda kültüre edilerek geliştirilen organotipik kültür, hastalıkları incelemek için kullanılan ilk *in vitro* yaklaşım olarak kullanılmıştır. İlk merkezi sinir sistemi organotipik kültürü sıçan hipofizi kullanılarak geliştirilmiştir [212]. Daha sonra, sıçanların embriyonik omuriliği ve ganglionlarından alınan hücreler, hücresel farklılaşmayı ve elektrofizyolojik özellikleri incelemek için kolajen kaplı plakalarda kültüre edilmiştir [213,214]. Beyin mimarisini yakından temsil edebilen ön beyin, hipokampus, striatum vb. gibi beyinden farklı organotipik kültürler geliştirilmiştir [213]. Ancak, bu yaklaşımın 2B bir platformda geliştirilmesi ve sürdürülmesi oldukça zor olduğundan dolayı AH çalışmalarında uygulanabilecek hücre hatlarının aranmasının önünü açmıştır [215]. 2B hücre kültürü sistemi, AH'nin karmaşık patolojisini anlamak, kontrollü koşullar altında biyolojik süreçleri gözlemlemek için iyi kurulmuş ve basitleştirilmiş bir platformdur. 2B sistemler, hastalığın ilerleme sürecinin anlaşılmasında ve ilaç geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılır. Aynı zamanda AH'nin tedavisinde yeniden programlanarak transplante edilen hücreler de mevcuttur.

2.5.2. İndükleyici Ajanlarla Oluşturulan *In vitro* Alzheimer Hastalığı Modelleri

Kimyasallar ve çevresel ajanlar kullanılarak geliştirilen AH'nin *in vitro* modelleri hastalığın patofizyolojisini kavramada etkiliyken aynı zamanda ilaç geliştirme çalışmalarında da kullanılmaktadır. Bu nedenle kimyasal kaynaklı *in vitro* AH modelleri gelecekteki

araştırmalarda hayati rol oynamaya devam edeceği düşünülmektedir. Nöroblastoma ve diğer nöronal hücreler, kimyasallar ile AH modellemelerinde sıklıkla kullanılmaktadır.

Nöroblastoma hücreleri nöroblastoma embriyonik olgunlaşmamış nöronal hücrelerden izole edilir ve indükleneme sürecine kadar farklılaşmadan kalırlar [216]. Olgunlaşmamış kolinerjik nöronal hücreler farklılaşma sonucu olgun kolinerjik hücreler meydana gelmektedir [217]. AH, beynin hipokampüsünde AChE'nin artan aktivitesinin neden olduğu ACh tükenmesiyle karakterize edilmektedir [218]. Nöroblastoma hücrelerinin çalışmalarda kullanılması sonucu AH tedavisi için ilaç geliştirme çalışmaları mümkün olmuştur. Bu SH-SY5Y hücreleri, kullanılan ajanın türüne göre farklı nöronal hücre tiplerine dönüşebilmektedir. Örneğin retinoik asit, SH-SY5Y hücrelerini kolinerjik nöronlara farklılaştırır. Retinoik asit ve forbol esterlerinin kombine kullanımı, dopaminerjik nöronların oluşumuna neden olur [217]. Nöroblastoma hücre hatları AH'nin *in vitro* modelleri olarak yaygın olarak kullanılmasına rağmen oksidatif strese tolerans ve yüksek glikolize sahip olma gibi özellikler gösterirler; bu da deneysel sonuçları yanlış yorumlamaya yol açabilmektedir. Buna rağmen nöroblastoma hücrelerinin hücre kültürü çalışmalarındaki dayanıklılığı, erişebilirliği ve kolaylığı, AH'nin incelenmesi ve ilaç geliştirme çalışmalarında destekleyici bir yöntem olarak kullanılmasını sağlamaktadır.

Skopolamin, bilişsel bozulmaya neden olan bir muskarinik ACh reseptörü antagonisti olup bu etkisini oksidatif stresi artırarak, enfeksiyon oluşumunu tetikleyerek ve kolinerjik nörotransmisyonu engelleyerek göstermektedir. SH-SY5Y hücrelerinin 1 ila 3 mM konsantrasyondaki skopolamin ile 24 saat boyunca maruziyetinin hücre canlılığını azalttığı saptanmıştır. Farklı bir çalışmada ise skopolaminin sıçan PC12 hücrelerinde AChE aktivitesini artırdığı bulunmuştur [219]. Skopolamin maruziyeti, PI3K/Akt yolaklarını azaltarak GSK3β'yı aktive eder ve bu da tau'nun aşırı fosforilasyonunu artırarak sonuçta nöron hasarına/apoptozuna yol açmaktadır. Skopolaminin 3 mM dozda 2 saat boyunca IMR32 nöronal hücrelere ve C6 glioma hücrelerine uygulandığında, oksidatif strese neden olarak NFκB aracılı CREB/BDNF ve GFAP aktivitesi gibi sinyal yollarında değişikliklere yol açtığı da göstermiştir. Bu durum nöroenflamasyon, apoptoz, sinaptik işlev bozukluğu ve hafıza genlerinin kaybına neden olabilir [220].

Merkezi sinir sisteminde uyarıcı bir nörotransmitter olan glutamat, hayvan modellerinde, birincil beyin hücre kültürlerinde ve PC12 hücre hatlarında nörodejenerasyona neden olabilir. PC12 hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada, yüksek konsantrasyondaki

glutamatın, sistein alımını ve hücre içi indirgenmiş glutatyonu engellediği ve bunun ROT oluşumuna yol açarak hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir [221].

L-glutamat, proteinlerin yapısında bulunan ve sinir sisteminde önemli roller oynayan bir aminoasittir. Kimyasal olarak glutamik asidin L-izomeri olan L-glutamat, organizmalar için temel bir bileşendir. İnsan nöroblastoma (SH-SY5Y) hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda (0.1–10 mM) 12 saat boyunca uygulanan L-glutamatın eksitotoksisiteye yol açtığı bulunmuştur. NMDAR reseptörlerinin aşırı aktivasyonu, büyük miktarda Ca^{+2} ve NO girişine neden olarak glutamat eksitotoksisitesini tetiklemektedir. Bu durum, JNK sinyal yolunu aktive ederek C3 ve pro-apoptotik genleri harekete geçirir. Sonuç olarak apoptoz ve nöronal hücre ölümüne yol açmaktadır [222]. Glutamat eksitotoksitesinin çeşitli nörodejeneratif hastalıklar, retinal hastalıklar, hiperglisemi, diyabetik retinopati ve Tip 3 ve Tip 4 diyabet ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir [223]. Yüksek derişimlerde L-glutamat, sadece eksitotoksisiteye neden olmakla kalmaz, aynı zamanda sıçan birincil kültür nöronlarında tau proteini üzerinde de etkili olmaktadır [224]. L-glutamatın indüklediği eksitotoksisiteye MAPK, PI3K/Akt ve mTOR sinyal yollarının da dahil olduğu öne sürülmüştür [225]. Mikroglial hücrelerin de yüksek konsantrasyonda glutamat salgıladığı ve bunun glutamat taşıyıcılarını (GLAST1) azaltarak glutamat kaynaklı eksitotoksisiteye yol açtığı bulunmuştur [226].

Alzheimer hastalığı (AH) ve demansın ilk safhaları, vücutta doğal olarak bulunan ve çeşitli gıda ürünlerinde yer alan bir indirgen şeker olan D-galaktoz ile de indüklenebilmektedir. Ancak aşırı miktarda D-galaktoz, nöronal hücrelerde oksidatif stres, apoptoz ve enflamasyona yol açabilmektedir. Önceki çalışmalarda, D-galaktozun hem *in vivo* hem de *in vitro* AH modellerinde yaşlanmayı ve buna bağlı olarak nöronal hasarı indükleyebileceği rapor edilmiştir. Bu tür bir çalışmada, 300 mM D-galaktoza 48 saat boyunca maruz bırakılan SH-SY5Y hücrelerinde enflamasyon, apoptoz, oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyonun arttığı gözlemlenmiştir. D-galaktoz, doğal yaşlanma sürecini taklit etmek için kullanıldığından, bu sonuçlar yaşlanmanın nöronal hasara etkisini göstermektedir. Wang ve Rahimi gibi araştırmacıların çalışmalarında tavsiye ettiği gibi, retinoik asit ile farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerine 200 mM ile 400 mM D-galaktoz maruziyetinin, NADPH glutatyon redüktazı azaltarak yaşlanma ve oksidatif strese yol açabileceğini öne sürmektedir [227]. Yüksek miktarda D-galaktoz, peptitlerle reaksiyona girerek vücutta ileri glikasyon son ürünleri (AGEs) oluşturur. Bu ürünler, çeşitli hücrelerin zarlarında bulunan ileri glikasyon son ürünleri reseptörü (RAGE) ile etkileşir. RAGE, dendritik hücreler, nöronal hücreler, makrofajlar, lenfositler, glial hücreler, düz kas hücreleri ve endotelyal hücrelerde bulunur. RAGE'in, Nox4 üzerinde etkili

olarak oksidatif stres ve enflamasyona neden olduğu bulunmuştur [228]. D-galaktoz ile tedavi edilen astrositik CRT hücrelerinde ve sıçan birincil astrositlerinde NFκBp65 seviyesinin arttığı ve bunun sonucunda pro-enflamatuvar mediatörlerin arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, hücrelerde C3'ün artışı nedeniyle hücre canlılığı azalmış ve belirgin hücresel yaşlanma görülmüştür [229].

Genel anestezinin başlatılması ve sürdürülmesinde kullanılan sevofluranın bilişsel bozulma ve tau hiperfosforilasyonunu indükleyebileceği gösterilmiştir. *In vitro* çalışmalar, nöronal hücreler sevoflurana maruz bırakıldığında tau düzeylerinin arttığını ve tau'nun 202 ve 205. kalıntılarında fosforilasyonu indüklediğini göstermiştir [230]. Diğer çalışmalar, sevofluranın kaspaz-3 aktivitesini indükleyerek sitokrom C salınımına ve apoptoza neden olabileceğini bildirmiştir. Sevofluran, APP'nin işlenmesini değiştirebilir ve Aβ peptit parçalarının seviyelerini artırabilir, ayrıca fare beynindeki doku BACE-1 düzeylerini yükselterek hücresel hasara yol açabilmektedir [231]. Yaklaşık 10 mM sevofluran ile tedavi edilen SK-N-SH hücrelerinde, GSK3 beta proteininin yukarı düzenlendiği ve bunun Dinamin ile ilişkili protein 1'in (Drp1) ser616 kalıntılarında fosforilasyonunu hızlandırdığı, bunun da mitokondriyal hasara ve nihayetinde kaspaz-3 aktivasyonu yoluyla apoptoza yol açtığı gözlemlenmiştir [232,233]. Sevofluranın indüklediği nöronal toksisite, hücre kültürü ve hayvan çalışmalarında AH patogenezine dair kanıtlar arasında yer almıştır [234].

Formaldehit, boya, kumaş, egzoz gazı, medikal ürünler ve endüstriyel malzemeler gibi çeşitli ürünlerde bulunan yaygın bir çevresel ajandır. Canlı organizmalardaki metabolizmanın doğal bir yan ürünüdür. Formaldehite maruz kalındığında DNA/protein çapraz bağları oluşur ve bu da DNA hasarının temel mekanizmalarından birine sebep olmaktadır. Şaşırtıcı bir şekilde, bu çapraz bağlar tıbbi doz hesaplamalarında kullanılmaktadır. Formaldehit ayrıca, tiyol ve amino grupları ile etkileşime girerek protein polimerizasyonuna neden olan bir çapraz bağlayıcı ajan olarak işlev görmektedir. Ayrıca, formaldehit Aβ ile etkileşime girebilir ve bu da kalıcı olarak çapraz bağlı nörotoksik amiloid benzeri komplekslerin oluşumuna yol açabilmektedir. Formaldehitin SH-SY5Y ve sıçan hipokampüs hücreleri üzerindeki tau agregasyonuna etkileri araştırılmıştır. Araştırmacılar, çok düşük miktarlardaki formaldehitin (%0,01–0,1) amiloid benzeri tau kümelerinin üretimini sağlamak için yeterli olduğunu keşfetmişlerdir. Sonuç olarak, hem SH-SY5Y hem de hipokampüs hücreleri bu agregatlar nedeniyle apoptoza uğramaktadır [235]. Lu ve ark. tarafından yapılan bir çalışmaya göre, daha yüksek konsantrasyondaki formaldehit merkezi sinir sistemine zarar verebilir ve KBB geçebilir. Bu çalışmada, fare nöroblastoma (N2A) hücrelerini 24 saat boyunca 0,5 mM formaldehide maruz bırakmışlardır.

Formaldehit, GSK3 beta aktivasyonu yoluyla tau (p396) proteininin aşırı fosforilasyonunu tetiklemiş ve bu da nöronal hücre ölümüne yol açmıştır [236].

Çevresel bir toksin olarak doğada yüksek düzeylerde bulunan alüminyum klorür, vücuda oral yoldan girerek beyinde yüksek miktarlarda birikebilir. Beyinde nörotransmitter sentezini, aksonal taşımayı etkileyebilir aynı zamanda protein fosforilasyon ve defosforilasyon dengesini, protein bozunmasını ve genlerin ifade edilmesini bozabilir. Böylece enflamasyona, apoptotik aktiviteye ve Aβ birikimine neden olabilir. Alüminyum ayrıca mitokondriyal ve endoplazmik retikulum disfonksiyonuna yol açabilir ve bu da oksidatif strese ve sinir hücrelerinde apoptoza neden olabilir [237]. Ayrıca, alüminyum tau proteininin hiperfosforilasyonundan sorumlu olan Akt ve Wnt sinyal yollarını inhibe ederek GSK3 beta'yı aktive eder ve sinapsta toksisiteye yol açar [238-240].

Bir diğer toksik metallerin başında gelen Mangan (Mn) ise toprak ve suda bulunduğundan dolayı vücuda diyet yolu ile girerek beyinde apoptoza ve enflamasyona neden olur. Bu durum da nöronal dejenerasyona yol açarak AH'ye neden olabilir. Yüksek Mn konsantrasyonları, tau proteininin hiperfosforilasyonundan sorumlu MARK/ERK/GSK3 beta sinyallerini aktive edebilir [241]. Bir *in vitro* çalışma, N2A hücrelerinin canlılığının, 24 saat boyunca 50, 100, 200, 400, 800, 1.000 ve 1.200 μM konsantrasyonlarında Mn'ye maruz kaldığında kademeli olarak azaldığını bulmuştur. Mn ayrıca APP'nin işlenmesini inhibe etmiş ve Aβ agregasyonları üretmiştir. [242,243].

Kurşun, farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde Aβ birikimini indükleyebilir. Kurşuna yüksek düzeyde maruz kalma, APP gen ekspresyonunu artırabilir ve daha fazla APP proteini üretimiyle sonuçlanabilir, bu da Aβ seviyelerinin daha da artmasına yol açar. [176].

Streptozotosin (STZ), bir glukozamin-nitrozüre bileşiği olup antibiyotik olarak kullanılmaktadır. Çeşitli çalışmalarda STZ kullanılarak *in vitro* AH modeli geliştirilmiştir. STZ'nin, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gözlemlendiği üzere, GSK3 alfa/beta ve sekretaz aktivitesini modüle edebildiği gösterilmiştir [222]. Wang vd., insülinin APP'nin yüksek düzeyde ifade edilmesini modüle ederek betaA4 üretimini inhibe edebildiğini ve bunu α-sekretaz aktivitesini artırırken β-sekretaz aktivitesini azaltarak gerçekleştirdiğini bulmuşlardır [244]. STZ, insülinin etkisini inhibe ederek de β-sekretazı artırır ve α-sekretazı azaltır, bu da Aβ parçalarının artmasına yol açar [225]. STZ, hücre kültürlerinde ve hayvan AH modellerinde erken patofizyolojik değişiklikler yaratmak için kullanılabilir. Hayvanlara intraperitoneal ve intrasebroventriküler yollarla enjekte edilen STZ'nin, bilişsel davranışı azalttığı, Aβ

oligomerlerinin birikimini ve çökmesini artırdığı, toplam tau protein seviyesini yükselttiği ve fosforilasyon/toplam tau oranını değiştirdiği gözlenmiştir [245-248].

2.5.3. 3 Boyutlu *In vitro* Alzheimer Hastalığı Modelleri

2 boyutlu (2B) hücre kültürü, 1900'lerden beri farklı hastalık sistemlerini araştırmak için en çok kullanılan model olmuştur. Ancak bu sistem, esas olarak hastalıklı koşullardaki hücrelerin özelliklerini *in vitro* temsil etmede sınırlamaları da birlikte getirmiştir. Beyin, farklı tipteki nöronlar, glia ve astrositler gibi farklı hücreler ile çevresindeki hücre dışı matris (ECM) arasında etkileşime izin veren 3B bir mimari yapıdadır [249-251]. ECM, içinde bulunan hücrelerin işlevini düzenleyebilen oldukça dinamik ve karmaşık bir ağ oluşturur. Sadece mekanik güç ve bütünlük sağlamakla kalmaz, aynı zamanda sinyal alışverişini, tutunmayı, besin ve oksijen tedarikini düzenlemek için beynin sinir bölgesinde homeostazı korur. Ayrıca hücre iletişimi için bir difüzyon bariyeri görevi görür ve hücre göçünü engellerken, nöronal sağkalımı sağlar [250,251]. ECM'nin özelliklerini yakından taklit edebilen herhangi bir modelin fizyolojik ve patolojik beyinde yer alan çeşitli yolların açıklanmasında önemli bir rol oynayacağı öngörülmektedir [252]. 2B kültürlerin aksine, 3B modeller, hücresel heterojenlik, mekansal mimari, hücresel iletişim ve insan beynine özgü mekanik ve biyokimyasal özellikleri ele almanın yanı sıra ECM'yi taklit etmede daha büyük bir potansiyele sahiptir [253]. Ek olarak, 3B sistemler, morfoloji, hücre bağlanması, sinyal iletimi, çoğalma, uyaranlara yanıt, farklılaşma, işlev ve ilaç metabolizması gibi hücre özelliklerinde iyileştirmeler sağladıkları için, *in vitro* araştırmada çalışırken hücreleri *in vivo* olarak modelleyebilirler [254,255]. Bu durum, 3B kültür modellerinin AH gibi yavaş ilerleyen bir hastalıkta nöronal etkileşimleri, işlevleri ve sinyal yollarının incelemesini sağlar. Aynı zamanda ilaç geliştirme çalışmalarında *in vivo* hayvan çalışmalarındaki kısıtlamaların önüne geçmede büyük avantajları bulunmaktadır.

In vitro modeller, yalnızca nöral dejeneratif bozuklukların patofizyolojisini incelemekte değil, aynı zamanda etkili terapötikleri taramakta da önemli roller oynar. 3B yapıları taklit etmede, doğal doku yapısını ve mekanik özelliği sağlamak için benzersiz potansiyelleri nedeniyle, iskele tabanlı sistemler hastalık modellemesinde büyük umutlar vadetmektedir [256-259].

Koroleva ve ark., parçalanmayan ancak biyouyumlu fotoreaktif reçine Dental LT Clear (DClear) ile iki foton polimerizasyonu (2PP) yaparak doğrudan lazer yazma yöntemi ile üç boyutlu iskeleler üretmiştir [260]. Bu 3B mikro yapılandırılmış iskeleler üzerinde kültüre edilen pluripotent kök hücre (iPSC) türevi insan serebral neokortikal nöronal kök hücre (NKH)'leri,

120 gün boyunca 3B koşullarda katmana özgü kortikal uyarıcı nöronlara farklılaşma gösterdiği belirtilmektedir. Bu çalışma, 2B kültürlerin sınırlamalarıyla karşılaştırıldığında, AH gibi karmaşık patolojik koşullarda *in vitro* nöronal ağları incelemek için alternatif bir model olabilir.

Nöronal fizyoloji ve AH çalışmalarında önem kazanan bir diğer iskele türü, büyük miktarda su emen ve çözünmeden şişen, böylece üç boyutlu şekli korurken yumuşaklığı ve elastikiyeti koruyan hidrojellerdir. Hidrojel üretiminde hem kimyasal hem de radyasyon çapraz bağlayıcıları kullanır [261]. Kimyasal kökenli hidrojeller kovalent bağlarla bağlanırken, fiziksel hidrojeller iyonik etkileşimi, hidrojen bağlarını veya polimerik zincir dolanıklığını kullanır. Bu iskeleler esnek ve hidrofiliktir. Yumuşak dokulara benzer sınırlı mekanik özelliklere ve düşük arayüz gerilimine sahiptir ve aynı zamanda biyouyumludur. Hücre çoğalması, farklılaşması ve aksonel uzamada doğal ECM'ye benzer kimyasal, mekanik ve üç boyutlu bir mikro ortam sağlamaktadır [262-264]. Sentetik iskelelerle karşılaştırıldığında, *in vivo* hücre-ECM etkileşimlerini yakından taklit eden çözünür büyüme faktörleri, hormonlar ve diğer moleküllerle fizyolojik olarak daha ilgili bir mikroçevre sağladığı için sıklıkla *in vitro* 3B hücre/doku kültürü için kullanılmıştır [265]. Bu 3B iskeleler, uygun maliyetli, tekrarlanabilir, kullanımı kolay olup oksijen ve besin geçirgenliğine, elektrik iletkenliğine izin verirken anjiyogenezi destekleyebilir ve bağışıklık tepkilerini tetiklemezler. Ancak, birçok avantajına rağmen, bu iskelelerden hücrelerin izole edilmesi zorluk teşkil eder. Hücrelerin iskele üzerinde homojen dağılmaması ve görselleştirme zorlukları, bu modelleri kullanırken karşılaşılan sorunlardan bazılarıdır.

2.5.4. Organoid Tabanlı Sistemler

2 boyutlu (2B) hücre kültürlerin sınırlamaları, insan beyninin mimarisini ve işlevlerini taklit edebilen 3B hücre kültürü model sistemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır [266,267]. İskele tabanlı sistemlerin dışında, kök hücrelerden, kendi kendini organize eden 3B doku kültürleri olan organoidler, beyne morfolojik ve işlevsel benzerlikleri nedeniyle AH'yi modellemek için kullanılmıştır [268,269]. Serebral organoid oluşumu, Matrigel tarafından kolaylaştırılan iPSC'lerin ve embriyonik kök hücre (ESC)'lerin kendi kendini birleştirme yeteneğine dayanmaktadır [269,270]. Bu yapılar beynin farklı bölgelerine benzemektedir. Organoid modelleri son birkaç yılda büyük önem kazanmıştır. Birçok çalışma iPSC'lerden türetilen organoidleri kullanarak ön beyin, orta beyin, hipokampüs, retina ve koroid pleksus gibi beynin farklı bölgelerini modellemede başarılı olmuştur [271,272]. Serebral organoidler, uyarım türüne göre genel olarak yönlendirilmemiş ve yönlendirilmiş olarak iki sınıfa ayrılmıştır [273]. Yönlendirilmemiş organoidler, ECM'de büyütüldüğünde beynin birden fazla bölgesini

gösteren hücre kümeleri oluşturabilir [270,274]. Yönlendirilmemiş organoidlerin dezavantajı, hücrelerin bir kısmının rastgele farklı hücre tiplerine farklılaşması ve böylece hücre oranlarında bir dengesizliğe neden olmasıdır [274]. Yönlendirilmiş organoid oluşumunda, transkripsiyon faktörleri ve küçük moleküller veya büyüme faktörleri gibi iyi tanımlanmış eksojen faktörler, organoidleri oluşturmak için yönlendirilmiş hücre kümelerini indükler [275,276]. Bu organoidler, nöronlar, glial hücreler, astrositler ve oligodendrositler dahil olmak üzere farklı hücre tiplerinin heterojen bir popülasyonunu içerir ve gruplar arasındaki varyasyonlar azalır [274-277]. Choi ve ark., AH'yi modellemek için FAD mutasyonlarını (mutant PS1 ve APP) aşırı ifade eden insan NSC'lerinden yapılmış organoidleri kullanmışlardır [278]. Bu organoidler Aβ agregatlarını ve NFT'leri göstermiştir. β ve γ-sekretaz inhibitörlerinin uygulanması, bu organoidlerdeki Aβ ve hiperfosforile tau düğümlerinin seviyelerini azaltmıştır [257]. Başka bir çalışmada, FAD mutasyonu taşıyan hastalardan türetilen iPSC'lerden oluşan serebral organoidlerin, amiloid plaklar ve NFT'lerin gelişimini izleyen ilerleyici Aβ birikimini arttırdığını bulmuşlardır [279]. Sağlıklı ve AH bireylerinden elde edilen iPSC'lerden oluşturulan serebral organoidler karşılaştırılarak APOE4'ün AH hastalarından alınan serebral organoidlerde nörodejenerasyonun ve sinaptik kaybın arttığı gösterilmiştir [280,281].

2.5.5. Mikroakışkan Tabanlı *In vitro* Alzheimer Hastalığı Modelleri

Hayvan modelleri, *in vitro* 2B ve 3B hücre kültürü sistemleri, AH gibi nörodejeneratif hastalıklar hakkındaki bilgileri genişletmeye devam edecektir. Ancak, bu modeller AH'nin karmaşık patofizyolojisini tam olarak yeniden oluşturamamaktadır. Hayvan modellerinin en büyük dezavantajı, insanlar ve hayvanlar arasındaki hücresel ve moleküler düzeylerdeki farklılıklardır. Örneğin, insan ve hayvanların beyin hücreleri arasında gen ifadesi, morfoloji, hücre-hücre sinyalizasyonu ve bağışıklık tepkisi açısından farklılıklar vardır [282-284]. Hayvan modelleri hem yüksek bakım maliyeti nedeniyle pahalı olurken, hem de genetik mutasyonlar nedeniyle uzun çalışma süresine ihtiyaç duymaktadır. Bu bağlamda alternatif bir yaklaşım olarak, beyin hücreleri 2B plastik veya cam substratlar üzerinde kültürleme çalışmaları yapılmaktadır. 2B hücre kültürü platformları biyolojik süreçler hakkında değerli bilgiler sağlasa da 2B substratlar üzerinde kültürlenen hücrelerin 3B olarak kültürlenen hücrelerle karşılaştırıldığında farklı davranışlar gösterdiğine dair artan kanıtlar bulunmaktadır [285]. İskele tabanlı (örneğin, hidrojel, elektro-eğrilmiş nanofiberler) ve iskelesiz (örneğin, organoidler) 3B hücre kültürü platformları hücrelere daha iyi bir fizyolojik ortam sağlar. Ancak, 3B hücre kültürleri mikroakışkanlar ile karşılaştırıldığında maliyet ve zaman açısından verimli değildir. Özellikle, AH patolojisini görselleştirmek için beyin organoidlerinin aylarca

kültürlenmesi gerekmektedir [286]. Geleneksel *in vivo* hayvan modelleri ve *in vitro* 2B ve 3B hücre kültürü sistemlerinin sınırlamalarının üstesinden gelmek için mikroakışkan teknolojisi kullanılmaya başlanmıştır.

Mikroakışkan üretim tekniğinin doku mühendisliği tekniği ile entegre edilen çip-organ modeli, AH gibi nörodejeneratif hastalıkların hastalık mekanizmalarını anlamak ve ilaç geliştirmek için umut vadeden bir platformdur [287,289]. Mikroakışkan tabanlı *in vitro* hücre kültürü platformlarında hücresel mikroçevre oluşturulabilir, mekansal hücre desenlemesi yapılabilir. Biyokimyasal konsantrasyon gradyanı, yapay ECM'nin mekanik özellikleri, substratların topolojisi ve mekanik/elektriksel uyarılar ile bu modeller manipüle edilebilir [290]. Mikroakışkanlar sadece çok yönlü değil, aynı zamanda ekonomiktir çünkü bu platform, *in vitro* 2B ve 3B hücre kültürü platformlarıyla karşılaştırıldığında küçük hacimli hücre ve kültür ortamı gerektirir. Beyin dokusunu taklit eden mikroakışkan platforma "çip-beyin" adı verilir. Nörodejeneratif hastalıkları araştırmak ve beynin işlevsel bir birimini (örneğin, nörovasküler birim ve sinir devreleri) modellemek için çip-beyin konusundaki son eğilimler ve gelişmeler farklı çalışmalarda kapsamlı bir şekilde incelenmiştir [291-294].

Alzhimer hastalığı (AH) patogenezinde mikrobiyal enfeksiyonun da rolü büyüktür. Daha önce Aβ plak oluşumunun enfeksiyon tarafından indüklendiği bildirilmiştir [295-297]. Alzheimer hastalarının yetersiz bir bağışıklık sistemi vardır. Bu nedenle kronik nöroenflamasyona, antimikrobiyal Aβ peptid üretimine ve nörodejenerasyona neden olan mikrobiyal enfeksiyonlara karşı oldukça hassastırlar [297]. Virüsler, bakteriler, mantarlar ve parazitler dahil olmak üzere çeşitli patojenler AH ile ilişkilendirilmiştir. Bu patojenlerden en sık *herpes* virüslere ve periodontal bakterilere rastlanmıştır [297,298]. Patogenez ve AH nöropatolojisinin başlangıcı arasındaki bağlantıyı daha iyi anlayabilmek için mikroorganizmaların ve nöronal hücrelerin bölümlere ayrıldığı bir 3B mikroakışkan sistemlere odaklanılması gerektiği belirtilmektedir [211]. Gelecekteki çalışmalar, zamanında müdahale için uygun tanıyı mümkün kılabilecek AH biyogöstergelerini geliştirmek için 3B sistemlerine ihtiyaç duyulacağı öngörmektedir.

2.6. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

2.6.1. 3-(4,5-dimetil-tiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) Testi

MTT yöntemi, hücre canlılığını ve çoğalmasını değerlendirmek, ayrıca maddelerin sitotoksik etkilerini belirlemek için yaygın olarak kullanılan kolorimetrik bir *in vitro* testtir. İlk olarak Mosmann ve ark. tarafından geliştirilen bu yöntem, makrofaj aracılı sitotoksisitenin nicel

olarak ölçülmesinde başarılı bir şekilde uygulanmıştır [299]. Uygulaması oldukça pratik olan MTT yöntemi, solunum zinciri ve diğer hücre içi elektron taşıma sistemleri tarafından suda çözünmeyen menekşe renkli formazan kristallerine indirgenen tetrazolyum tuzlarını temel alır.

Sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan MTT, mitokondrilerin matriksinde yer alan ve Krebs döngüsünde rol oynayan süksinat dehidrogenaz enzimine özgü şekilde bağlanır. Canlı hücrelerde bulunan mitokondriyal enzimler, MTT'nin tetrazolyum halkasını açarak çözünmeyen mor renkli formazan kristallerinin oluşumunu sağlar. Bu kristaller, organik çözücülerde kolaylıkla çözünür ve elde edilen çözelti spektrofotometrik olarak 500-600 nm dalga boylarında ölçülerek absorbans değerleri belirlenir. Elde edilen absorbans değerleri, hücrelerin canlılık durumunu dolaylı olarak yansıtır ve yaşayan hücre sayısıyla doğrudan ilişkilidir.

Tetrazolyum tuzlarının yalnızca metabolik olarak aktif hücreler tarafından indirgenebilmesi, MTT yöntemini hücresel metabolik aktivitenin değerlendirilmesinde etkili bir araç haline getirmektedir. Ancak bu yöntem, hücre içi mitokondriyal aktiviteyi ölçebilmesine rağmen hücreler arası aktiviteleri doğrudan değerlendirme imkânı sunmamaktadır [300-302].

2.6.2. Reaktif Oksijen Türleri Tayini

Oksidatif stresi incelemeye çalışan birçok araştırma grubu bu çalışmayı çeşitli yöntemler kullanarak yapabilmektedirler. AH, daha önce de bahsedildiği üzere beyinde anormal protein birikimi (β-amiloid plakları ve tau düğümleri) ve sinir hücrelerinin dejenerasyonu ile karakterizedir. Bu süreçte oksidatif stresin önemli bir katkısı olduğu gösterilmiştir [8]. Oksidatif stres, hücrelerde yüksek miktarda ROT birikmesiyle ortaya çıkar ve bu nedenle AH patofizyolojisini kötüleştirebilir. ROT'un bu negatif etkisi; beyinde üç farklı yolakla meydana gelmektedir. Bu yolaklar:

1) Beyindeki mitokondrilerin ROT üretimini arttırıp, AH patofizyolojisine katkıda bulunması,
2) Beyindeki doymamış yağ asitlerinin oksidasyona uğrayarak, sinaptik fonksiyon kaybına neden olması, [303]
3) ROT'ların, AH'de önemli proteinlerin oksidasyonuna yol açarak bu proteinlerin agregasyona uğramasına teşvik etmesi şeklinde sıralanabilir [304].

Alzheimer hastalığı (AH)nda oksidatif stresin rolü göz önüne alındığında, yeni tedavi seçeneklerinin antioksidan özellik gösterip göstermediği araştırılmalıdır. Çünkü oksidatif stresin neden olduğu hücre ölümünü önleyerek nöroprotektif etki gösterebilir [305]. Ayrıca bazı

farmasötik ajanlar yan etki olarak oksidatif stres oluşturabilir. Bu nedenle ilaçların ROT üretip üretmediğinin test edilmesi, güvenli bir tedavi geliştirmek için gereklidir [306].

Alzheimer hastalığında farmasötiklerin oksidatif stres üzerindeki etkilerini belirlemek için farklı ROT tayin yöntemleri kullanılır. Bu yöntemler Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Reaktif oksijen türleri (ROT) analiz yöntemleri

Reaktif Oksijen Türü (ROT)	Tayin Metodu	Kullanılan Reaktifler	Mekanizma
H_2O_2	Spektrofotometrik, Fluorometrik	Dihidroklorofloresceın (DCFH-DA)	Hücresel ROT ölçümü
H_2O_2	Spektrofotometrik, Fluorometrik	Amplex Red	H_2O_2 seviyesi belirleme
($O_2^{-\bullet}$)	Fluorometrik, Kemilüminesans	Luminol Kemilüminesans	Sürekoksit anyonu ve diğer ROT tespiti

Sonuç olarak AH patogenezinde oksidatif stres önemli bir faktördür. İlaçların oksidatif süreçler üzerindeki etkilerini değerlendirmek, tedavi geliştirmede kritik bir adımdır. Bu nedenle, AH tedavisinde kullanılan farmasötiklerin ROT seviyelerine etkisi detaylı olarak analiz edilmektedir.

2.6.2.1. Dihidroklorofloresceın (DCFH-DA) Yöntemi

Dihidroklorofloresceın diasetat (DCFH-DA) yöntemi, hücresel ROT düzeylerini ölçmek için yaygın olarak kullanılan bir floresan probudur. Hücre içine alındıktan sonra esterazlar tarafından DCFH'ye dönüştürülür. ROT varlığında oksitlenerek yüksek floresans veren diklorofloresceın (DCF) formuna dönüşür [307]. Hücresel ROT düzeylerinin kantitatif olarak değerlendirilmesi için yaygın ve pratik bir yöntem olarak kabul edilir. Yöntem, hızlı ve kolay uygulama, hücre içindeki oksidatif stresi ölçme, yüksek hücresel permeabilite, farklı hücre tiplerinde kullanabilme, hassas ve duyarlılık özellikleri sayesinde sıkça başvurulan yöntemlerin başında gelir.

2.6.3. Tek Hücre Jel Elektroforez (Comet) Yöntemi

Ökaryotik hücrelerdeki DNA hasarını tespit etmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Tek hücre jel elektroforezi diğer bir ismi ile Comet yöntemi bu amaç için uygun bir yöntem olmakla beraber aynı zamanda hızlı, hassas, nispeten basit ve düşük maliyetli bir yöntemidir [308]. Comet yöntemi, sağladığı hassasiyet ve özgüllük sayesinde, DNA hasarı ve onarımı çalışmalarında, çevresel biyolojik ve insan popülasyonlarının incelenmesinde, moleküler epidemiyolojide, farmasötiklerin ve kimyasal maddelerin genotoksisite analizlerinde ve hastalık patolojilerinin daha iyi anlaşılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Comet yöntemi, her ne kadar bu ismi vermemiş olsalar da ilk kez 1984 yılında Ostling ve Johanson (1984) tarafından gösterilmiştir. Yöntem hücrelerin lizise uğratılmasının ardından nötr pH'da yapılan elektroforezden oluşan bir kombinasyondan meydana gelmektedir [309]. Singh ve ark. ise, bu yöntemin alkali versiyonunu geliştirmiştir [310]. Yöntemin orijinal versiyonu çift ipliklerin kırılmalarının tespiti için uygun görülmüştür. Bununla birlikte her iki araştırmacı grubu da iyonize radyasyon kullanmış olup (çoğunlukla tek iplikli kırılmaları indükleyen), doz yanıtları neredeyse eşit bulgulara sahiptir. Bu da hem nötr hem de alkali versiyonlar ile tek ve çift ipliklerdeki kırılmaların tespit edildiğini göstermiştir.

Yöntemde DNA kırılmalarının araştırılacağı hücreler izolasyon veya hücre kültür yöntemi ile hazırlanır. Mikroskop lamındaki agaroz jel içine yerleştirilen hücreler deterjan ve yüksek tuzla lizise uğratılır ve nükleer matrise bağlı süper kıvrımlı DNA halkalarını içeren nükleotitler oluşturulur. Yüksek pH'da veya nötr ortamda hücreler elektroforezde yürütülür ve ardından nötralizasyon işlemine tabi tutulur. Bu yapılar boyanarak floresan mikroskopu ile gözlenir. Oluşan görsellerde kuyruklu yıldızlara benzeyen yapılar oluşur. Son olarak manuel olarak veya bilgisayar programları yardımı ile DNA hasarının belirlenmesi sağlanır [311,312].

Alzheimer hastalığı (AH) gibi nörodejeneratif hastalıkların görülme sıklığı artmaya devam etmektedir. Bu hastalıkların oluşmasında meydana gelen DNA hasarlarının ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde, Comet analizinin, hızlı, düşük maliyetli ve hassas DNA hasarı tespit özellikleri çalışmalarda yaygın olarak kullanılmasını sağlamaktadır.

2.6.4. Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Analiz (ELISA)

Enzim bağlantı immünosorbent yöntemi (ELISA), biyolojik örneklerde antijen ve antikorların tespiti ve ölçümü için yaygın olarak kullanılan bir laboratuvar tekniğidir. Bu yöntem, antijen-antikor etkileşimlerini enzimler aracılığıyla saptayarak, çeşitli hastalıkların tanısında ve araştırmalarda önemli bir rol oynar.

ELISA'nın dört temel türü bulunmaktadır:

1.Doğrudan ELISA: Antijen, mikrotitre plakasının yüzeyine bağlanır ve enzimle işaretlenmiş birincil antikor kullanılarak tespit edilir. Bu yöntem hızlı ve basittir, ancak duyarlılığı diğer yöntemlere göre daha düşüktür.

2.Dolaylı ELISA: Antijen, plakanın yüzeyine bağlanır ve ardından birincil antikor eklenir. Daha sonra, enzimle işaretlenmiş ikincil bir antikor kullanılarak tespit işlemi gerçekleştirilir. Bu yöntem, sinyal amplifikasyonu sayesinde daha yüksek duyarlılık sunar.

3.Sandviç ELISA: Plakanın yüzeyine yakalama antikoru bağlanır, ardından numunedeki antijen eklenir ve bu antijen, ikinci bir enzimle işaretlenmiş antikorla tespit edilir. Bu yöntem, yüksek özgüllük ve duyarlılık sağlar.

4.Rekabetçi ELISA: Numunedeki antijen, sınırlı miktardaki antikor için enzimle işaretlenmiş antijenle rekabet eder. Bu yöntem, özellikle küçük moleküllerin veya düşük konsantrasyonlardaki antijenlerin tespiti için kullanılır.

Enzim bağlantı immünosorbent yöntemi (ELISA) testinin avantajları arasında yüksek hassasiyet ve özgüllük, hızlı sonuç alma, birden fazla numunenin aynı anda işlenebilmesi ve uygun maliyetli olması yer alır. Ayrıca, radyoaktif maddeler kullanılmadığı için güvenli ve çevre dostudur. Nörodejeneratif hastalıklarda, özellikle AH'de, ELISA testi, hastalığın erken teşhisi ve biyogöstergelrrin izlenmesi için kullanılır [313]. Özellikle kandaki belirli proteinlerin (örneğin, Aβ ve tau proteinleri) düzeylerinin ölçülmesi, hastalığın tanısı ve ilerleyişinin izlenmesinde kritik öneme sahiptir. [314] ELISA'nın yüksek hassasiyeti ve özgüllüğü, bu biyogöstergelerin doğru ve güvenilir bir şekilde tespit edilmesini sağlar.

Alzheimer Hastalığı (AH)'nda sinir hücrelerinde bazı protein ve sitokin moleküllerinde artış olduğu bilinmektedir. Aβ proteinlerinin beyin dokusunda birikmesi, AH patolojisinin en bilinen patolojik belirtisidir. Tau proteini ve fosforilasyonu ise nöronlar içerisinde yığınlar oluşturarak sinir hücrelerinin yapısını bozmaktadır. Diğer belirteç grubu olan pro-enflamatuvar sitokinlerin (IL-10, IL-6, IL-1α) AH'de düzeyleri yükselerek beyin içindeki enflamasyonu artırarak hastalığın ilerlemesine katkı sağlar. TNF-α ve TNF-β sitokin grubunun da AH'nin enflamasyon süreçlerinde önemli roller oynadıkları bilinmektedir. Kompleman sisteminin bileşenleri ise (C1q, C3, C6 ve C9) AH patogenezinde rol oynayan enflamasyon süreçlerini etkileyebilir. Son olarak AChE, AH'de ACh düzeylerinin düşürerek kognitif bozulmaya yol açar. APP ise anormal işlenmesi sonucu Aβ plaklarının birikmesine ve nörodejenerasyona neden olarak hastalığın ilerlemesine katkı sağlar. Tüm bu moleküllerin AH ile bağlantısı ELISA testleri ile belirlenmiş olup gerek tanıda gerekse yeni tedavilerin araştırılmasında bu testler kullanılmaya devam etmektedir [313].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1,1,1,3,3,3-Hekzafloro-2-Propanol	Sigma-Aldrich
2,7-Diklorodihidroflorosein diasetat (DCF-DA)	Aldrich Chemistry
2-Propanol	Sigma-Aldrich
3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür (MTT)	Sigma -Aldrich
Difenilalanin (FF)	Sigma-Aldrich
Dimetil sulfoksit (DMSO)	Isolab
Dulbecco's Modification Eagles Medium (DMEM)	VivaCell
Düşük erime noktalı agar (LMA)	Sigma-Aldrich
ELISA Kitleri (İnsan Aβ, IL-10, IL-6, IL-1α, C1q, C3, C6, C9, AChE, Tau Protein, APP, TNF-α, TNF-β)	SunRedBio
Etidiyum bromür (EtBr)	Sigma-Aldrich
Etil alkol (Etanol)	Isolab
Etilendiamin tetraasetik asit disodyum (Na_2EDTA)	Sigma-Aldrich
Fetal Sığır Serumu (FBS)	VivaCell
Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS)	VivaCell
Hidrojen peroksit (%30)	Sigma-Aldrich
Metil alkol (Metanol)	Sigma-Aldrich
Naringin	Sigma-Aldrich
N-Lauril sarkosinat sodyum tuzu	Sigma-Aldrich
Normal erime noktalı agar (NMA)	Sigma-Aldrich
PBS tabletleri	Biomatik
Penisilin/Streptomisin	VivaCell
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
Tripan mavisi	Biological Industries
Tripsin-EDTA	VivaCell
Tris-Base	ChemCruz
Triton X-100	Ambresco

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

24 ve 96 kuyucuklu plaklar	Costar
Buzdolabı (+4°C)	Bosch
Cam pastör pipet	Isolab
Comet bilgisayar yazılımı 4.0	Perceptive Instruments
Derin dondurucu (-20°°C)	Bosch
Derin dondurucu (-80°°C)	Haier Biomedical
Distile su cihazı	Purelab
Elektroforez	Cleaver Scientific
Elektroforez güç kaynağı	Cleaver Scientific nanoPac-300P
ELISA okuyucu	Biotek Instruments, Inc-EPOCH
Hassas terazi	Uni Bloc ATX224R
Hücre sayım cihazı	NanoEntek
Karbondioksit (CO_2) inkübatörü	Sanyo
Lam (26x76 mm)	Marienfeld
Lamel (24x60 mm)	Marienfeld
Laminar kabin	Bilser
Mikropipetler	Acura 825
Mikroskop	Leica
pH metre	InoLab pH7310
Sayım lamı (Neubauer Improved)	Mairenfled
Sekiz kanallı mikropipet (50-300 µl)	Isolab
Santrifüj cihazı	Nuve NF 1200R
Steril pipetler (5 ve 10 ml'lik)	Abdos
Steril santrifüj tüpleri	Fischerbrand
Su banyosu	Microtest WB-15
Ultrasonik banyo	Alex Machine
Vorteks	Velp Scientifica
Yatay hücre kültürü şişesi	SPL Life Sciences

3.3. Hazırlanan Çözeltiler

3.3.1. Besiyeri Çözeltisi

5 mL (%10) FBS ve 0,5 mL (%1) penisilin/streptomisin karışımı yüksek glikoz L-glutamin ve sodyum pirüvat içeren DMEM ile 50 mL'ye tamamlandı. 4°C'de saklandı. Kullanılan besi yerleri her çalışma için taze hazırlanmıştır.

3.3.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Alzheimer Hastalık Modellenmesinde Kullanılan Çözeltiler

2 mg FF, 2 mL 2-propanolde çözülerek 1000 µg/mL'lik stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiden hareketle FBS içermeyen besi yeri ile (yüksek glikoz, L-glutamin ve sodyum pirüvat içeren) seri seyreltme ile 500 µg/mL, 250 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL ve 1 µg/mL derişimdeki standart çözeltiler hazırlandı.

2 mg FF, 2 mL DMSO'da çözülerek 1000 µg/mL'lik stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiden hareketle FBS içermeyen besi yeri ile (yüksek glikoz, L-glutamin ve sodyum pirüvat içeren) seri seyreltme ile 500 µg/mL, 250 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL ve 1 µg/mL derişimdeki standart çözeltiler hazırlandı.

2 mg FF, 2 mL etanolde çözülerek 1000 µg/mL'lik stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiden hareketle FBS içermeyen besi yeri ile (yüksek glikoz, L-glutamin ve sodyum pirüvat içeren) seri seyreltme ile 500 µg/mL, 250 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL ve 1 µg/mL derişimdeki standart çözeltiler hazırlandı.

2 mg FF, 2 mL HFIP'de çözülerek 1000 µg/mL'lik stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiden hareketle FBS içermeyen besi yeri ile (yüksek glikoz, L-glutamin ve sodyum pirüvat içeren) seri seyreltme ile 500 µg/mL, 250 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL ve 1 µg/mL derişimdeki standart çözeltiler hazırlandı.

2 mg FF, 2 mL metanolde çözülerek 1000 µg/mL'lik stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiden hareketle FBS içermeyen besi yeri ile (yüksek glikoz, L-glutamin ve sodyum pirüvat içeren) seri seyreltme ile 500 µg/mL, 250 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL ve 1 µg/mL derişimdeki standart çözeltiler hazırlandı.

2 mg FF, 2 mL suda çözülerek 1000 µg/mL'lik stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiden hareketle FBS içermeyen besi yeri ile (yüksek glikoz, L-glutamin ve sodyum pirüvat içeren) seri seyreltme ile 500 µg/mL, 250 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL ve 1 µg/mL derişimdeki standart çözeltiler hazırlandı.

3.3.3. Naringin Çözeltileri

2 mg naringin, 20 µL DMSO ve 1980 µL su karışımında (%1 DMSO içerecek şekilde) çözülerek 1000 µg/mL naringin stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözelti besi yeri ile seyreltilerek 25, 50, 100, 200, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonda naringin çözeltilerinin hazırlanması sağlandı. Çözeltiler taze hazırlandı.

3.3.4. Ursolik Asit Çözeltileri

0,1 mg ursolik asit 100 µL DMSO ve 9900 µL su karışımında (%1 DMSO içerecek şekilde) çözülerek 10 µg/mL ursolik asit stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözelti besi yeri ile seyreltilerek 0,1, 0,25, 0,5, 1, 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonda ursolik asit çözeltilerinin hazırlanması sağlandı. Çözeltiler taze hazırlandı.

3.3.5. 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) çözeltisi

50 mg MTT, 10 mL PBS içerisinde çözüldü. Hazırlanan çözelti 0,22 µm membran filtreden süzülerek steril, ışık geçirmeyen bir tüpe aktarıldı. Hazırlanan MTT çözeltisi (5 mg/mL) 4°C'de saklandı. Uygulanacağı zaman, hazırlanan MTT çözeltisinden 2 mL alınarak 20 mL'ye besiyeri ile tamamlandı ve analizlerde kullanılmak üzere 0,5 mg/mL çözelti hazırlandı.

3.3.6. 200 mM Disodyum Etilendiamin Tetraasetik Asit (Na_2EDTA) Çözeltisi

29,78 g Na_2EDTA, 400 mL distile suda çözülerek pH 10'a ayarlandı. 4°C'de saklandı.

3.3.7. 10 N Sodyum Hidroksit (NaOH) Çözeltisi

40 g NaOH, 100 mL distile suda çözüldü. 4°C'de saklandı.

3.3.8. Düşük Erime Noktalı Agar (LMA) Çözeltisi

250 mg LMA mikrodalga fırın kullanılarak 25 mL PBS çözeltisi içerisinde çözüldü. Küçük hacimler halinde +4°C'de saklandı.

3.3.9. Normal Erime Noktalı Agar (NMA) Çözeltisi

1 g NMA mikrodalga fırın kullanılarak 100 mL distile su içerisinde çözüldü. +4°C'de saklandı.

3.3.10. Elektroforez Tampon Çözeltisi

1447,7 mL soğuk distile su, 7,5 mL 200 mM EDTA ve 44,8 mL 10 N NaOH çözeltisi karıştırılarak taze olarak hazırlandı.

3.3.11. Etanol Çözeltisi (%50)

Mutlak etanol (%99,8) çözeltisinden 250,5 mL alınarak çözelti hacmi distile suyla 500 mL'ye tamamlandı.

3.3.12. Etanol Çözeltisi (%75)

Mutlak etanol (%99,8) çözeltisinden 375,7 mL alınarak çözelti hacmi distile suyla 500 mL'ye tamamlandı.

3.3.13. Etanol Çözeltisi (%95)

Mutlak etanol (%99,8) çözeltisinden 475,9 mL alınarak çözelti hacmi distile suyla 500 mL'ye tamamlandı.

3.3.14. Etidiyum Bromür (EtBr) Çözeltisi

5 mg EtBr 25 mL distile suda çözülerek 200 µg/mL'lik EtBr çözeltisi hazırlandı. Boyama sırasında bu stok çözeltiden 1 mL alındı ve 10 mL'ye distile suyla tamamlanarak 20 µg/mL'lik EtBr çözeltisi hazırlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

3.3.15. Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (PBS)

İki adet PBS tablet, 200 mL distile suda çözüldü. +4°C'de saklandı.

3.3.16. Stok Lizis Çözeltisi

146,1 g NaCl, 37,2 g Na2EDTA ve 1,2 g Tris-base 500 ml distile suda çözülerek üzerine 10 g NaOH eklendi ve pH 10'a ayarlandı. Hazırlanan çözelti üzerine 10 g N-Lauril sarkosinat sodyum tuzu eklenerek distile su ile 890 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

3.3.17. Lizis Çözeltisi

178 mL stok lizis çözeltisi, 20 mL DMSO ve 2 mL Triton X-100 ile karıştırıldı. Çözelti deney günü taze hazırlandı ve deney sırasında soğuk çözelti kullanılabilmesi için +4°C'de saklandı.

3.3.18. 2,7-Diklorodihidrofloresein Diasetat (DCF-DA) Çözeltisi

24,36 mg H_2DCF-DA tartılarak 10 mL PBS'te çözüldü. Hazırlanan 5mM'lık stok çözelti küçük porsiyonlar halinde ışıktan etkilenmemesi için karanlıkta, -80°C'de saklandı. Çalışmanın yapılacağı gün 70 µL H_2DCF-DA stok çözeltisi ile 7 mL PBS ile seyreltilerek taze çalışma çözeltisi hazırlandı.

3.3.19. Alzheimer Hastalığı ve Enflamasyon Biyogöstergelerindeki Değişikliklerin Belirlenmesi İçin Hazırlanan Çözeltiler

Amiloid Beta (Aβ) ELISA test kitinde bulunan 0,5 mL standart çözelti Çizelge 3.1'de gösterildiği gibi seyreltilerek standart çözeltiler hazırlandı.

Çizelge 3.1. Amiloid beta (Aβ) düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

Derişim	Standart No	Seyreltme Yöntemi
120 ng/L	Standart no 5	120 µL orijinal standart çözelti+120 µL seyreltme çözeltisi
60 ng/L	Standart no 4	120 µL standart no 1 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
30 ng/L	Standart no 3	120 µL standart no 2 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
15 ng/L	Standart no 2	120 µL standart no 3 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
7.5 ng/L	Standart no 1	120 µL standart no 4 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi

Asetilkolin esteraz (AChE) ELISA test kitinde bulunan 0,5 mL standart çözelti Çizelge 3.2'de gösterildiği gibi seyreltilerek standart çözeltiler hazırlandı.

Çizelge 3.2. Asetilkolin esteraz (AChE) düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

Derişim	Standart No	Seyreltme Yöntemi
120 ng/mL	Standart no 5	120 µL orijinal standart çözelti+120 µL seyreltme çözeltisi
60 ng/mL	Standart no 4	120 µL standart no 1 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
30 ng/mL	Standart no 3	120 µL standart no 2 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
15 ng/mL	Standart no 2	120 µL standart no 3 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
7,5ng/mL	Standart no 1	120 µL standart no 4 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi

Tau protein ELISA test kitinde bulunan 0,5 mL standart çözelti Çizelge 3.3'te gösterildiği gibi seyreltilerek standart çözeltiler hazırlandı.

Çizelge 3.3. Tau protein düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

Derişim	Standart No	Seyreltme Yöntemi
800 ng/L	Standart no 5	120 µL orijinal standart çözelti+120 µL seyreltme çözeltisi
400 ng/L	Standart no 4	120 µL standart no 1 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
200 ng/L	Standart no 3	120 µL standart no 2 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
100 ng/L	Standart no 2	120 µL standart no 3 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
50 ng/L	Standart no 1	120 µL standart no 4 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi

Amiloid prekürsör protein (APP) ELISA test kitinde bulunan 0,5 mL standart çözelti Çizelge 3.4'te gösterildiği gibi seyreltilerek standart çözeltiler hazırlandı.

Çizelge 3.4. Amiloid prekürsör protein (APP) düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

Derişim	Standart No	Seyreltme Yöntemi
48 ng/mL	Standart no 5	120 µL orijinal standart çözelti+120 µL seyreltme çözeltisi
24 ng/mL	Standart no 4	120 µL standart no 1 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
12 ng/mL	Standart no 3	120 µL standart no 2 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
6 ng/mL	Standart no 2	120 µL standart no 3 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
3 ng/mL	Standart no 1	120 µL standart no 4 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi

İnterlökin (IL)-10 ELISA test kitinde bulunan 0,5 mL standart çözelti Çizelge 3.5'te gösterildiği gibi seyreltilerek standart çözeltiler hazırlandı.

Çizelge 3.5. İnterlökin (IL)-10 düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

Derişim	Standart No	Seyreltme Yöntemi
1600 pg/L	Standart no 5	120 µL orijinal standart çözelti+120 µL seyreltme çözeltisi
800 pg/L	Standart no 4	120 µL standart no 1 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
400 pg/L	Standart no 3	120 µL standart no 2 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
200 pg/L	Standart no 2	120 µL standart no 3 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
100 pg/L	Standart no 1	120 µL standart no 4 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi

İnterlökin (IL)-6 ELISA test kitinde bulunan 0,5 mL standart çözelti Çizelge 3.6'da gösterildiği gibi seyreltilerek standart çözeltiler hazırlandı.

Çizelge 3.6. İnterlökin (IL)-6 düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

Derişim	Standart No	Seyreltme Yöntemi
320 ng/L	Standart no 5	120 µL orijinal standart çözelti+120 µL seyreltme çözeltisi
160 ng/L	Standart no 4	120 µL standart no 1 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
80 ng/L	Standart no 3	120 µL standart no 2 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
40 ng/L	Standart no 2	120 µL standart no 3 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
20 ng/L	Standart no 1	120 µL standart no 4 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi

İnterlökin (IL)-1α ELISA test kitinde bulunan 0,5 mL standart çözelti Çizelge 3.7'de gösterildiği gibi seyreltilerek standart çözeltiler hazırlandı.

Çizelge 3.7. İnterlökin (IL)-1α düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

Derişim	Standart No	Seyreltme Yöntemi
16 ng/L	Standart no 5	120 µL orijinal standart çözelti+120 µL seyreltme çözeltisi
8 ng/L	Standart no 4	120 µL standart no 1 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
4 ng/L	Standart no 3	120 µL standart no 2 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
2 ng/L	Standart no 2	120 µL standart no 3 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
1 ng/L	Standart no 1	120 µL standart no 4 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi

Kaspaz (C)1q ELISA test kitinde bulunan 0,5 mL standart çözelti Çizelge 3.8'de gösterildiği gibi seyreltilerek standart çözeltiler hazırlandı.

Çizelge 3.8. Kaspaz (C)1q düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

Derişim	Standart No	Seyreltme Yöntemi
16 µg/mL	Standart no 5	120 µL orijinal standart çözelti+120 µL seyreltme çözeltisi
8 µg/mL	Standart no 4	120 µL standart no 1 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
4 µg/mL	Standart no 3	120 µL standart no 2 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
2 µg/mL	Standart no 2	120 µL standart no 3 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
1 µg/mL	Standart no 1	120 µL standart no 4 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi

Kaspaz (C)3 ELISA test kitinde bulunan 0,5 mL standart çözelti Çizelge 3.9'da gösterildiği gibi seyreltilerek standart çözeltiler hazırlandı.

Çizelge 3.9. Kaspaz (C)3 düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

Derişim	Standart No	Seyreltme Yöntemi
2800 µg/mL	Standart no 5	120 µL orijinal standart çözelti+120 µL seyreltme çözeltisi
1400 µg/mL	Standart no 4	120 µL standart no 1 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
700 µg/mL	Standart no 3	120 µL standart no 2 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
350 µg/mL	Standart no 2	120 µL standart no 3 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
175 µg/mL	Standart no 1	120 µL standart no 4 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi

Kaspaz (C)6 ELISA test kitinde bulunan 0,5 mL standart çözelti Çizelge 3.10'da gösterildiği gibi seyreltilerek standart çözeltiler hazırlandı.

Çizelge 3.10. Kaspaz (C)6 düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

Derişim	Standart No	Seyreltme Yöntemi
400 µg/mL	Standart no 5	120 µL orijinal standart çözelti+120 µL seyreltme çözeltisi
200 µg/mL	Standart no 4	120 µL standart no 1 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
100 µg/mL	Standart no 3	120 µL standart no 2 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
50 µg/mL	Standart no 2	120 µL standart no 3 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
25 µg/mL	Standart no 1	120 µL standart no 4 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi

Kaspaz (C)9 ELISA test kitinde bulunan 0,5 mL standart çözelti Çizelge 3.11'de gösterildiği gibi seyreltilerek standart çözeltiler hazırlandı.

Çizelge 3.11. Kaspaz (C)9 düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

Derişim	Standart No	Seyreltme Yöntemi
640 µg/mL	Standart no 5	120 µL orijinal standart çözelti+120 µL seyreltme çözeltisi
320 µg/mL	Standart no 4	120 µL standart no 1 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
160 µg/mL	Standart no 3	120 µL standart no 2 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
80 µg/mL	Standart no 2	120 µL standart no 3 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
40 µg/mL	Standart no 1	120 µL standart no 4 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi

Dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)-β ELISA test kitinde bulunan 0,5 mL standart çözelti Çizelge 3.12'de gösterildiği gibi seyreltilerek standart çözeltiler hazırlandı.

Çizelge 3.12. Dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)-β düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

Derişim	Standart No	Seyreltme Yöntemi
32 ng/mL	Standart no 5	120 µL orijinal standart çözelti+120 µL seyreltme çözeltisi
16 ng/mL	Standart no 4	120 µL standart no 1 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
8 ng/mL	Standart no 3	120 µL standart no 2 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
4 ng/mL	Standart no 2	120 µL standart no 3 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
2 ng/mL	Standart no 1	120 µL standart no 4 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi

Tümör nekroz faktör (TNF)-α ELISA test kitinde bulunan 0,5 mL standart çözelti Çizelge 3.13'te gösterildiği gibi seyreltilerek standart çözeltiler hazırlandı.

Çizelge 3.13. Tümör nekroz faktör (TNF)-α düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

Derişim	Standart No	Seyreltme Yöntemi
480 ng/L	Standart no 5	120 µL orijinal standart çözelti+120 µL seyreltme çözeltisi
240 ng/L	Standart no 4	120 µL standart no 1 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
120 ng/L	Standart no 3	120 µL standart no 2 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
60 ng/L	Standart no 2	120 µL standart no 3 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi
30 ng/L	Standart no 1	120 µL standart no 4 çözeltisi+120 µL seyreltme çözeltisi

3.3.20. Apoptoz Bağlanma Tampon Çözeltisi

20 mL apoptoz bağlanma tampon çözeltisi hazırlanması için 10X konsantrasyonda çözeltinden 2 mL alınıp üzerine 18 mL saf su eklenerek 1:10 oranında seyreltilerek hazırlandı. Kullanılmak üzere buz üzerinde muhafaza edildi.

3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

Nöroblastoma (SH-SY5Y) hücrelerinin AH modellenmesinde, sitotoksisite, ROT, genotoksisite ve ELISA kit çalışmalarında kullanılmak üzere çoğaltılması için -80ºC'de saklanan hücreler 37ºC'lik su banyosunda tamamen çözülene kadar bekletildi. Tüp içeriği konik tüplere aktarıldıktan sonra hücre süspansiyonu hacminin 3 misli oranında besiyeri ile karıştırıldı ve 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatan atılarak kalan hücreler 25 cm²'lik hücre kültürü şişesi için 7 mL, 75 cm²'lik hücre kültürü şişesi için 14 mL besi yeri ile karıştırılarak hücre ekim işlemi gerçekleştirildi. Hücrelerin çoğalma durumu kontrol edilerek 2 günde bir besi yeri değiştirildi. Hücreler ekim kaplarının yüzeyini %80 kapladığı zaman pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Bunun için hücre kültürü şişesi içindeki besi yeri aspire edilerek uzaklaştırıldı, 25 cm^2 hücre kültürü şişesinde çoğalan hücreler için 2 mL tripsin-EDTA, 75 cm^2 hücre kültürü içerisinde çoğaltılan hücreler için ise 4 mL tripsin-EDTA uygulanarak hücreler %5 CO_2 içeren inkübatörde 37°C'de 5 dakika bekletildi. Bu bekleme işleminden sonra hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadıkları faz-kontrast mikroskobu ile test edildi. Hücre kültür şişesine, ilave edilen tripsin-EDTA'nın 2 katı kadar besiyeri eklenerek karışım pipetlendi ve elde edilen hücre süspansiyonu bir falkon tüpe aktarıldı. Hücre süspansiyonu 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatan uzaklaştırıldı. Santrifüj işlemi sonucunda alta çöken hücreler (pellet) 10 mL besiyerinde süspande edilerek sayıldı. Sayım sonrasında hesaplanan hücre miktarına göre

besi yeri ile gerekli seyreltmeler yapılarak hücrelerin uygun hücre kültürü kaplarında çoğaltılması sağlandı.

3.5. SH-SY5Y Hücrelerinde Alzheimer Hastalık Modelinin Oluşturulması

SH-SY5Y hücre hatları, DMEM besiyeri (10% FBS ve 1% penisilin-streptomisin) ile yatay hücre kültürü şişelerine ekilerek 37 °C, %95 nem ve %5 CO_2'li ortamda 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler ışık mikroskobu altında incelenerek hücrelerin canlılığı ve doygunluğu kontrol edildi. Hücre miktarı yatay hücre kültürü şişesinin %80'inin kapladığı gözlendiğinde, hücrelerin tripsin-EDTA ile yatay hücre kültürü şişelerinden kaldırılması sağlandı. Işık mikroskobu altında, Neubauer sayım lamı kullanılarak tripan mavisi ile hücre sayımı yapıldı. 96 kuyucuklu plağa her bir kuyucukta 15000 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı ve plaklar inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

Hücrelerin çoğalmasını takiben plaklardaki besiyerleri vakum ile uzaklaştırıldı. FF dipeptidinin 2-propanol, DMSO, etanol, HFIP, metanol ve su çözücüleri kullanılarak çözeltileri hazırlandı. Hücrelerde amiloid plak oluşumu için gerekli derişimin belirlenmesi amacıyla en yüksek derişimdeki çözeltide %1 oranında çözücü içerecek şekilde besi yeri ile seyreltmeler yapılarak 1-500 µg/mL derişimdeki FF çözeltileri ile hücreler 24 saat süre ile maruz bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda MTT yöntemi ile hücre canlılıkları belirlendi. Her bir çözücü ile hazırlanan çözeltilerin IC_{50} değerleri belirlendi.

Hücrelerde amiloid plak oluşumunu gözlemlemek amacıyla ise 6 kuyucuklu plağa, her bir kuyucukta 1 mL (100000 hücre/kuyucuk) olacak şekilde ekim yapılarak 37°C, %95 nem ve %5 CO_2 içeren inkübatörde 1 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler, ışık mikroskobu altında incelenerek hücrelerin canlılığı ve doygunluğu kontrol edildi. Hücrelerin çoğalmasını takiben plaklardaki besiyerleri vakum ile uzaklaştırıldı. Hücreler 250 µg/mL derişimde FF çözeltilerine 24 saat süre ile maruz bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler, ışık mikroskobu altında incelenerek amiloid plak oluşumları incelendi ve hücre görüntüleri alındı.

3.6. 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi

3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi, FF'in plak oluşturmasında kullanılacak en uygun çözücünün seçimi, naringin ve ursolik asidin SH-SY5Y hücrelerine sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi ve FF ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerine naringin ve ursolik asidin etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

Hücre kültürü başlığında anlatıldığı gibi; 37°C, %95 nem ve %5 CO_2 içeren inkübatörde SH-SY5Y hücreleri inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından hücre kültürü şişeleri mikroskop altında incelenerek hücre canlılığı kontrol edildi. Ayrıca incelenen hücrelerin yatay hücre şişesi yüzeyinin %80'inini kapladığı görüldüğünde hücrelerin 96 kuyucuklu plakalara alınması işlemine başlandı.

Yatay hücre şişesi yüzeyinin %80'ini kaplayan hücreler, steril çalışma kabinine alındı. Hücre kültürü şişesinden besi yeri cam pastör pipet ve vakum kullanılarak dikkatlice uzaklaştırıldı. Hücreler, 2 mL PBS ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından PBS uzaklaştırılarak 25 cm^2'lik hücre kültürü şişelerine 2 mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Hücre kültürü şişeleri, 5 dakika süre ile inkübe edildi. Ardından yatay hücre şişelerine bekletilmeden 4 mL besiyeri eklendi.

Hücre kültürü şişelerinden toplanan hücre süspansiyonu, 25°C'de, 1000 devir/dakika ve beş dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj tüpünün üstündeki süpernatan hücre pelletine dokunmadan cam pastör pipet ve vakum ile uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 5 mL besi yeri eklendi ve pipetaj yapılarak homojenize edildi. Santrifüj tüpünde bulunan hücre süspansiyonundan bir ependorf tüpe 10 µL alındı ve üzerine 90 µL tripan mavisi çözeltisi eklendi (Dilüsyon faktörü:10). Ependorf tüpünden alınan hücre süspansiyonu-tripan mavisi karışımı Neubauer sayım lamına uygulandı. Işık mikroskobu altında, Neubauer sayım lamı kullanılarak hücreler sayıldı. Hücre sayımının doğru ve kesin bir şekilde yapılabilmesi için sayım işlemi 3 tekrarlı yapıldı ve aritmetik ortalama alındı. Canlı hücre sayısını hesaplamak amacıyla aşağıda verilen formül kullanıldı:

$$\text{mL'deki Canlı Hücre Sayısı} = (\text{Toplam Hücre Sayısı}/4) \times 10^4 \times 10$$

Canlı hücre sayısı hesaplandıktan sonra hücreler, 96 kuyucuklu plağa her bir kuyucukta 15000 hücre olacak şekilde olarak ekim yapmak amacıyla besi yeri ile seyreltildi. 37°C, %95 nem ve %5 CO_2 içeren inkübatörde 1 gün inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda kuyucuklarda bulunan besi yeri cam pastör pipet ve vakum ile uzaklaştırıldı. FF'nin AH modeli oluşturmak üzere kullanılacak çözeltisinin belirlenmesi amacıyla, SH-SY5Y hücrelerine FFn'in etanol, su, 2-propanol, HFIP, metanol ve DMSO çözücülerinde hazırlanan çözeltileri 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 ve 500 µg/mL derişimlerinde uygulandı. SH-SY5Y hücrelerinde naringin ve ursolik asidin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi ve FF ile AH modeli oluşturulmuş hücrelerde etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla ise hücreler naringinin 25, 50,

100, 250, 500 ve 1000 µg/mL derişimlerdeki; ursolik asidin ise 0,1, 0,25, 0,5, 1, 5 ve 10 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerine 24 saat süre ile maruz bırakıldı. FF ile AH modellenen hücrelerde naringin ve ursolik asidin etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla ilse her kuyucukta 15000 hücre içeren 96 kuyucuklu plaklardaki SH-SY5Y hücreleri 250 µg/mL derişimde FF'nin DMSO'daki çözeltisi uygulanmış ve 24 saat süre ile inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bu inkübasyon süresinin ardından bu çözeltiler uzaklaştırılmış ve hücreler naringin ve ursolik asidin belirlenen derişimdeki çözeltilerine 24 saat süre ile maruz bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda madde çözeltileri cam pastör pipet ve vakum yardımıyla atılarak her bir kuyucuğa 0,5 mg/mL konsantrasyonundaki MTT çözeltisinden 100 µL eklendi. Hücreler 37°C, %95 nem ve %5 CO_2 içeren inkübatörde 4 saat daha inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından MTT çözeltisi uzaklaştırılarak kuyucukların üzerine 100 µL DMSO çözeltisi oluşan formazan kristallerini çözmek amacıyla eklendi ve kuyucuklarda oluşan renk şiddeti 570 nm'de ölçüldü. Elde edilen absorbans değerlerinin kontrol absorbans değerine oranının 100 ile çarpılması sonucu her bir maddenin konsantrasyonu için % hücre canlılığı saptandı. % hücre canlılığı verilerinden hareketle her bir madde için inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değerleri bulundu.

3.7. 2,7-Diklorodihidrofloresein Diasetat (DCF-DA) Yöntemi ile Reaktif Oksijen Türleri Tayini

6 kuyucuklu plakalara hücre kültürü başlığı altında anlatıldığı şekilde her bir plakaya $1x10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapıldı. AH modeli oluşturulan hücrelerde hücreler bir gün boyunca 37 °C, %5 CO_2'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından AH modeli oluşturulacak hücrelere 250 µg/mL derişimde FF'nin DMSO içerisindeki çözeltisi eklendi ve hücreler bir gün süreyle daha inkübasyona bırakıldı. Daha sonrasında plaktaki besi yeri vakumla atıldı. 100 µL kör (PBS), negatif kontrol (%1 DMSO içeren besi yeri), pozitif kontrol (100 µM H_2O_2), naringin (25, 50, 100, 250 µg/mL) ve ursolik asit (0,1, 0,25, 0,5, 1 µg/mL) çözeltileri kuyucuklardaki hücrelere uygulandı. Plak 37°C, %5 CO_2'de bir saat inkübasyona bırakıldı. Bu aşamadan sonra H_2DCF-DA ışıktan etkilendiği için karanlıkta çalışıldı. Kör çözeltinin bulunduğu kuyucuk hariç diğer kuyucuklara boyanın çalışma çözeltisinden 100 µL eklendi. Plak 37°C, %5 CO_2'de bir saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda plak buz üzerine konuldu ve kuyucuklardaki PBS ve boya çözeltileri vakumla atıldı. Her bir kuyucuk 100 µL PBS ile yıkanarak tekrar 100 µL PBS ilave edildi. Kuyucukların absorbansları spektroflorometrik olarak (absorpsiyon:485 nm, emisyon: 520 nm) ölçüldü.

3.8. Tek Hücre Jel Elektroforez (Comet) Yöntemi

SH-SY5Y hücreleri hücre kültürü başlığında anlatıldığı gibi çoğaltıldı. AH modeli oluşturulacak gruplarda 6 kuyucuklu plakalara 100000 hücre/kuyucuk sayısında ekilen hücreler FF'nin DMSO'da hazırlanan 250 µg/mL derişimdeki çözeltisiyle 24 saat maruz bırakıldı. Hem AH modeli oluşturulan hücreler ve hem de AH modeli oluşturulmayan hücreler naringin ve ursolik asidin sitotoksisite çalışmalarında belirlenen, sitotoksik olmayan derişimlerine 3 saat süre ile maruz bırakıldı. Bu maruziyet için naringinin 25, 50, 100 ve 250 µg/mL; ursolik asidin 0,1, 0,25, 0,5 ve 1 µg/mL derişimdeki çözeltileri kullanıldı. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki madde çözeltileri atıldı, her bir kuyucuk 1 mL PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından hücreler 0,5 mL tripsin-EDTA çözeltisine maruz bırakıldı. Tripsinizasyon işleminin ardından tripsinin etkisini durdurmak amacıyla kuyucuklara besiyeri eklendi. Hücre süspansiyonları 1000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edildi, süpernatan atıldı. Hücre pelletinin PBS ile yıkanmasının ardından hücre süspansiyonlarından 50 µL alınarak mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı üzerlerine 100 µL %1'lik LMA (37°C ± 0,5°C'de eritilmiş) çözeltisi eklenerek karıştırıldı. Hazırlanan bu çözeltiler daha önceden %1'lik NMA çözeltisine daldırılarak hazırlanan agar ile kaplanmış lamların üzerine yayıldı ve lamel ile kapatıldı. +4°C'de 10 dakika kadar bekletilerek agarın katılaşması sağlandı. Lamlardaki agar katılaştıktan sonra lamellerinden ayrılarak şalelere yerleştirildi. Üzerine daha önceden hazırlanarak +4°C'de saklanan lizis çözeltisi dökülüp +4°C'de en az 1 saat boyunca bekletildi. Lizis işleminin ardından lamlar, şalelerde distile su ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından lamlar, agar yayılan kısımları üste gelecek şekilde elektroforez küvetine aralarında boşluk kalmayacak biçimde yerleştirildi ve tankın içi soğuk elektroforez çözeltisi ile dolduruldu. Lamlar, hiçbir akım uygulamadan karanlıkta 20 dakika boyunca elektroforez küvetinin içerisinde bekletildi. Daha sonra 25 V ve 300 mA akım uygulanarak 20 dakika elektroforez işlemi uygulandı. Elektroforez işleminin ardından lamlar şalelere geri yerleştirilerek tekrar distile su ile yıkanıp nötralizasyon işlemi için PBS içerisinde +4°C'de 10 dakika bekletildi. Nötralizasyon işleminin ardından lamlar şalelerde distile suyla son kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından lamlar üzerine sırasıyla hazırlanan %50'lik, %75'lik ve %95'lik etanol çözeltileri konularak ağzı kapalı bir şekilde 5'er dakika bekletildi. İşlemin sonunda lamlar şalelerden çıkarılarak kurumaları için 24 saat bekletildi. Floresan mikroskobunda ölçüm yapmak için 40 µL EtBr çözeltisi lamların üzerine eklenerek lamel ile kapatıldı. Her bir lamda en az 100 hücre, "Perceptive Instruments Comet Assay IV Analysis System" bilgisayar programı ile DNA hasar derecesi kuyruk momenti parametresi kullanılarak değerlendirildi.

3.9. Alzheimer Hastalığı ve Enflamasyon Biyogöstergelerindeki Değişiklerinin Belirlenmesi

Alzheimer hastalığı (AH) ve enflamasyon biyogöstergelerindeki değişikliklerin belirlenmesi amacıyla kullanılmak üzere daha önce hücre kültürü çalışmasında anlatıldığı üzere hücreler çoğaltıldı. Çoğaltılan hücreler 6 kuyucuklu plaklara $1x10^5$ hücre/plaka olacak şekilde ekildi. AH modeli oluşturulan ve oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin biyogöstergeler üzerine olan etkisinin değerlendirilmesi amacıyla 25, 50, 100 ve 250 µg/mL derişimde naringin ve ursolik asidin biyogöstergeler üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla ise 0,1, 0,25, 0,5 ve 1 µg/mL derişimde ursolik asit ile 24 saat süre ile muamele edilmiştir. Maruziyet süresinin sonunda Hücreler toplandı, proteaz inhibitörü takviyeli bir tamponla lize edildi ve süpernatanı toplamak için santrifüj edildi.

3.9.1. Amiloid Beta (Aβ) Düzeylerinin Ölçümü

Hazırlanan örnekler Aβ monoklonal antikoru ile önceden bağlanmış kuyucuklara eklendi. Kuyucuklarda hücre homojenatlarının inkübe edilmesinin ardından biotin ile birleşik antikor eklenerek Streptavidin-HRP'nin immün kompleksi ile bağlandı. Tekrar inkübe edilmesinin ardından bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak için yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı. Kromojen solüsyonlarının eklenmesi ile 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü ve standart regresyon grafiği ile karşılaştırılarak kantitatif olarak ölçüm yapıldı.

Standartlar için belirlenmiş kuyucuklara 50 µL standart çözeltiler ve 50 µL Streptavidin-HRP eklendi. Hazırlanan örnekler için belirlenen kuyucuklara 40'ar µL örneklerden, 10 µL Aβ-antikor ve 50 µL Streptavidin-HRP eklenerek sızdırmazlık membranı ile kapatıldı, yavaşça çalkalandı ve 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında sızdırmaz membran dikkatlice kaldırıldı. Hazırlanan yıkama çözeltisi ile kuyucuklar yıkandı ve yıkama çözeltisi uzaklaştırıldı. Tüm kuyucuklara kromojen A ve B solüsyonlarından 50'şer µL eklendi ve yavaşça çalkalandı. Daha sonra 37°C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra reaksiyon durdurucu solüsyon eklendi. Mavi renkteki kuyucuklar aniden sarı renge dönüştü. Reaksiyon durdurucu çözelti eklendikten hemen sonra kör olarak boş bırakılan kuyucuk "0" kabul edilerek 450 nm dalga boyunda kuyucuklardaki çözeltilerin absorbans değerleri ölçüldü. Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerlerine göre lineer regresyon eğrisi çizildi ve eğrinin denklemi hesaplandı. Hesaplanan denklemden hareketle örneklerdeki Aβ düzeyleri belirlendi.

3.9.2. Asetilkolin Esteraz (AChE) Düzeylerinin Ölçümü

Hazırlanan örnekler AChE monoklonal antikoru ile önceden bağlanmış kuyucuklara eklendi. Kuyucuklarda hücre homojenatlarının inkübe edilmesinin ardından biotin ile birleşik antikor eklenerek Streptavidin-HRP'nin immün kompleksi ile bağlandı. Tekrar inkübe edilmesinin ardından bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak için yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı. Kromojen solüsyonlarının eklenmesi ile 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü ve standart regresyon grafiği ile karşılaştırılarak kantitatif olarak ölçüm yapıldı.

Standartlar için belirlenmiş kuyucuklara 50 µL standart çözeltiler ve 50 µL Streptavidin-HRP eklendi. Hazırlanan örnekler için belirlenen kuyucuklara 40'ar µL örneklerden, 10 µL Aβ-antikor ve 50 µL Streptavidin-HRP eklenerek sızdırmazlık membranı ile kapatıldı, yavaşça çalkalandı ve 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında sızdırmaz membran dikkatlice kaldırıldı. Hazırlanan yıkama çözeltisi ile kuyucuklar yıkandı ve yıkama çözeltisi uzaklaştırıldı. Tüm kuyucuklara kromojen A ve B solüsyonlarından 50'şer µL eklendi ve yavaşça çalkalandı. Daha sonra 37°C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra reaksiyon durdurucu solüsyon eklendi. Mavi renkteki kuyucuklar aniden sarı renge dönüştü. Reaksiyon durdurucu çözelti eklendikten hemen sonra kör olarak boş bırakılan kuyucuk "0" kabul edilerek 450 nm dalga boyunda kuyucuklardaki çözeltilerin absorbans değerleri ölçüldü. Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerlerine göre lineer regresyon eğrisi çizildi ve eğrinin denklemi hesaplandı. Hesaplanan denklemden hareketle örneklerdeki AChE enzim düzeyleri belirlendi.

3.9.3. Tau Protein Düzeylerinin Ölçümü

Hazırlanan örnekler tau proteini monoklonal antikoru ile önceden bağlanmış kuyucuklara eklendi. Kuyucuklarda hücre homojenatlarının inkübe edilmesinin ardından biotin ile birleşik antikor eklenerek Streptavidin-HRP'nin immün kompleksi ile bağlandı. Tekrar inkübe edilmesinin ardından bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak için yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı. Kromojen solüsyonlarının eklenmesi ile 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü ve standart regresyon grafiği ile karşılaştırılarak kantitatif olarak ölçüm yapıldı.

Standartlar için belirlenmiş kuyucuklara 50 µL standart çözeltiler ve 50 µL Streptavidin-HRP eklendi. Hazırlanan örnekler için belirlenen kuyucuklara 40'ar µL örneklerden, 10 µL Aβ-antikor ve 50 µL Streptavidin-HRP eklenerek sızdırmazlık membranı ile kapatıldı, yavaşça çalkalandı ve 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında sızdırmaz membran dikkatlice kaldırıldı. Hazırlanan yıkama çözeltisi ile kuyucuklar yıkandı ve yıkama çözeltisi uzaklaştırıldı. Tüm kuyucuklara kromojen A ve B solüsyonlarından 50'şer µL eklendi ve

yavaşça çalkalandı. Daha sonra 37 °C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra reaksiyon durdurucu solüsyon eklendi. Mavi renkteki kuyucuklar aniden sarı renge dönüştü. Reaksiyon durdurucu çözelti eklendikten hemen sonra kör olarak boş bırakılan kuyucuk "0" kabul edilerek 450 nm dalga boyunda kuyucuklardaki çözeltilerin absorbans değerleri ölçüldü. Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerlerine göre lineer regresyon eğrisi çizildi ve eğrinin denklemi hesaplandı. Hesaplanan denklemden hareketle örneklerdeki Tau protein düzeyleri belirlendi.

3.9.4. Amiloid Prekürsör Protein (APP) Düzeylerinin Ölçümü

Hazırlanan örnekler APP monoklonal antikoru ile önceden bağlanmış kuyucuklara eklendi. Kuyucuklarda hücre homojenatlarının inkübe edilmesinin ardından biotin ile birleşik antikor eklenerek Streptavidin-HRP'nin immün kompleksi ile bağlandı. Tekrar inkübe edilmesinin ardından bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak için yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı. Kromojen solüsyonlarının eklenmesi ile 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü ve standart regresyon grafiği ile karşılaştırılarak kantitatif olarak ölçüm yapıldı.

Standartlar için belirlenmiş kuyucuklara 50 µL standart çözeltiler ve 50 µL Streptavidin-HRP eklendi. Hazırlanan örnekler için belirlenen kuyucuklara 40'ar µL örneklerden, 10 µL Aβ-antikor ve 50 µL Streptavidin-HRP eklenerek sızdırmazlık membranı ile kapatıldı, yavaşça çalkalandı ve 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında sızdırmaz membran dikkatlice kaldırıldı. Hazırlanan yıkama çözeltisi ile kuyucuklar yıkandı ve yıkama çözeltisi uzaklaştırıldı. Tüm kuyucuklara kromojen A ve B solüsyonlarından 50'şer µL eklendi ve yavaşça çalkalandı. Daha sonra 37°C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra reaksiyon durdurucu solüsyon eklendi. Mavi renkteki kuyucuklar aniden sarı renge dönüştü. Reaksiyon durdurucu çözelti eklendikten hemen sonra kör olarak boş bırakılan kuyucuk "0" kabul edilerek 450 nm dalga boyunda kuyucuklardaki çözeltilerin absorbans değerleri ölçüldü. Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerlerine göre lineer regresyon eğrisi çizildi ve eğrinin denklemi hesaplandı. Hesaplanan denklemden hareketle örneklerdeki APP düzeyleri belirlendi.

3.9.5. İnterlökin-1alfa (IL-1α) Düzeylerinin Ölçümü

Hazırlanan örnekler IL-1α monoklonal antikoru ile önceden bağlanmış kuyucuklara eklendi. Kuyucuklarda hücre homojenatlarının inkübe edilmesinin ardından biotin ile birleşik antikor eklenerek Streptavidin-HRP'nin immün kompleksi ile bağlandı. Tekrar inkübe edilmesinin ardından bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak için yıkama solüsyonu ile yıkama

yapıldı. Kromojen solüsyonlarının eklenmesi ile 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü ve standart regresyon grafiği ile karşılaştırılarak kantitatif olarak ölçüm yapıldı.

Standartlar için belirlenmiş kuyucuklara 50 µL standart çözeltiler ve 50 µL Streptavidin-HRP eklendi. Hazırlanan örnekler için belirlenen kuyucuklara 40'ar µL örneklerden, 10 µL Aβ-antikor ve 50 µL Streptavidin-HRP eklenerek sızdırmazlık membranı ile kapatıldı, yavaşça çalkalandı ve 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında sızdırmaz membran dikkatlice kaldırıldı. Hazırlanan yıkama çözeltisi ile kuyucuklar yıkandı ve yıkama çözeltisi uzaklaştırıldı. Tüm kuyucuklara kromojen A ve B solüsyonlarından 50'şer µL eklendi ve yavaşça çalkalandı. Daha sonra 37°C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra reaksiyon durdurucu solüsyon eklendi. Mavi renkteki kuyucuklar aniden sarı renge dönüştü. Reaksiyon durdurucu çözelti eklendikten hemen sonra kör olarak boş bırakılan kuyucuk "0" kabul edilerek 450 nm dalga boyunda kuyucuklardaki çözeltilerin absorbans değerleri ölçüldü. Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerlerine göre lineer regresyon eğrisi çizildi ve eğrinin denklemi hesaplandı. Hesaplanan denklemden hareketle örneklerdeki IL-1α düzeyleri belirlendi.

3.9.6. İnterlökin-6 (IL-6) Düzeylerinin Ölçümü

Hazırlanan örnekler IL-6 monoklonal antikoru ile önceden bağlanmış kuyucuklara eklendi. Kuyucuklarda hücre homojenatlarının inkübe edilmesinin ardından biotin ile birleşik antikor eklenerek Streptavidin-HRP'nin immün kompleksi ile bağlandı. Tekrar inkübe edilmesinin ardından bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak için yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı. Kromojen solüsyonlarının eklenmesi ile 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü ve standart regresyon grafiği ile karşılaştırılarak kantitatif olarak ölçüm yapıldı.

Standartlar için belirlenmiş kuyucuklara 50 µL standart çözeltiler ve 50 µL Streptavidin-HRP eklendi. Hazırlanan örnekler için belirlenen kuyucuklara 40'ar µL örneklerden, 10 µL Aβ-antikor ve 50 µL Streptavidin-HRP eklenerek sızdırmazlık membranı ile kapatıldı, yavaşça çalkalandı ve 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında sızdırmaz membran dikkatlice kaldırıldı. Hazırlanan yıkama çözeltisi ile kuyucuklar yıkandı ve yıkama çözeltisi uzaklaştırıldı. Tüm kuyucuklara kromojen A ve B solüsyonlarından 50'şer µL eklendi ve yavaşça çalkalandı. Daha sonra 37 °C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra reaksiyon durdurucu solüsyon eklendi. Mavi renkteki kuyucuklar aniden sarı renge dönüştü. Reaksiyon durdurucu çözelti eklendikten hemen sonra kör olarak boş bırakılan kuyucuk "0" kabul edilerek 450 nm dalga boyunda kuyucuklardaki çözeltilerin absorbans değerleri ölçüldü. Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerlerine göre lineer regresyon eğrisi çizildi ve

eğrinin denklemi hesaplandı. Hesaplanan denklemden hareketle örneklerdeki IL-6 düzeyleri belirlendi.

3.9.7. İnterlökin-10 (IL-10) Düzeylerinin Ölçümü

Hazırlanan örnekler IL-10 monoklonal antikoru ile önceden bağlanmış kuyucuklara eklendi. Kuyucuklarda hücre homojenatlarının inkübe edilmesinin ardından biotin ile birleşik antikor eklenerek Streptavidin-HRP'nin immün kompleksi ile bağlandı. Tekrar inkübe edilmesinin ardından bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak için yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı. Kromojen solüsyonlarının eklenmesi ile 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü ve standart regresyon grafiği ile karşılaştırılarak kantitatif olarak ölçüm yapıldı.

Standartlar için belirlenmiş kuyucuklara 50 µL standart çözeltiler ve 50 µL Streptavidin-HRP eklendi. Hazırlanan örnekler için belirlenen kuyucuklara 40'ar µL örneklerden, 10 µL Aβ-antikor ve 50 µL Streptavidin-HRP eklenerek sızdırmazlık membranı ile kapatıldı, yavaşça çalkalandı ve 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında sızdırmaz membran dikkatlice kaldırıldı. Hazırlanan yıkama çözeltisi ile kuyucuklar yıkandı ve yıkama çözeltisi uzaklaştırıldı. Tüm kuyucuklara kromojen A ve B solüsyonlarından 50'şer µL eklendi ve yavaşça çalkalandı. Daha sonra 37°C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra reaksiyon durdurucu solüsyon eklendi. Mavi renkteki kuyucuklar aniden sarı renge dönüştü. Reaksiyon durdurucu çözelti eklendikten hemen sonra kör olarak boş bırakılan kuyucuk "0" kabul edilerek 450 nm dalga boyunda kuyucuklardaki çözeltilerin absorbans değerleri ölçüldü. Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerlerine göre lineer regresyon eğrisi çizildi ve eğrinin denklemi hesaplandı. Hesaplanan denklemden hareketle örneklerdeki IL-10 düzeyleri belirlendi.

3.9.8. Kaspaz 1q (C1q) Düzeylerinin Ölçümü

Hazırlanan örnekler C1q monoklonal antikoru ile önceden bağlanmış kuyucuklara eklendi. Kuyucuklarda hücre homojenatlarının inkübe edilmesinin ardından biotin ile birleşik antikor eklenerek Streptavidin-HRP'nin immün kompleksi ile bağlandı. Tekrar inkübe edilmesinin ardından bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak için yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı. Kromojen solüsyonlarının eklenmesi ile 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü ve standart regresyon grafiği ile karşılaştırılarak kantitatif olarak ölçüm yapıldı.

Standartlar için belirlenmiş kuyucuklara 50 µL standart çözeltiler ve 50 µL Streptavidin-HRP eklendi. Hazırlanan örnekler için belirlenen kuyucuklara 40'ar µL örneklerden, 10 µL Aβ-antikor ve 50 µL Streptavidin-HRP eklenerek sızdırmazlık membranı ile kapatıldı, yavaşça çalkalandı ve 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında sızdırmaz membran

dikkatlice kaldırıldı. Hazırlanan yıkama çözeltisi ile kuyucuklar yıkandı ve yıkama çözeltisi uzaklaştırıldı. Tüm kuyucuklara kromojen A ve B solüsyonlarından 50'şer µL eklendi ve yavaşça çalkalandı. Daha sonra 37°C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra reaksiyon durdurucu solüsyon eklendi. Mavi renkteki kuyucuklar aniden sarı renge dönüştü. Reaksiyon durdurucu çözelti eklendikten hemen sonra kör olarak boş bırakılan kuyucuk "0" kabul edilerek 450 nm dalga boyunda kuyucuklardaki çözeltilerin absorbans değerleri ölçüldü. Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerlerine göre lineer regresyon eğrisi çizildi ve eğrinin denklemi hesaplandı. Hesaplanan denklemden hareketle örneklerdeki C1q düzeyleri belirlendi.

3.9.9. Kaspaz 3 (C3) Düzeylerinin Ölçümü

Hazırlanan örnekler C3 monoklonal antikoru ile önceden bağlanmış kuyucuklara eklendi. Kuyucuklarda hücre homojenatlarının inkübe edilmesinin ardından biotin ile birleşik antikor eklenerek Streptavidin-HRP'nin immün kompleksi ile bağlandı. Tekrar inkübe edilmesinin ardından bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak için yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı. Kromojen solüsyonlarının eklenmesi ile 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü ve standart regresyon grafiği ile karşılaştırılarak kantitatif olarak ölçüm yapıldı.

Standartlar için belirlenmiş kuyucuklara 50 µL standart çözeltiler ve 50 µL Streptavidin-HRP eklendi. Hazırlanan örnekler için belirlenen kuyucuklara 40'ar µL örneklerden, 10 µL Aβ-antikor ve 50 µL Streptavidin-HRP eklenerek sızdırmazlık membranı ile kapatıldı, yavaşça çalkalandı ve 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında sızdırmaz membran dikkatlice kaldırıldı. Hazırlanan yıkama çözeltisi ile kuyucuklar yıkandı ve yıkama çözeltisi uzaklaştırıldı. Tüm kuyucuklara kromojen A ve B solüsyonlarından 50'şer µL eklendi ve yavaşça çalkalandı. Daha sonra 37°C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra reaksiyon durdurucu solüsyon eklendi. Mavi renkteki kuyucuklar aniden sarı renge dönüştü. Reaksiyon durdurucu çözelti eklendikten hemen sonra kör olarak boş bırakılan kuyucuk "0" kabul edilerek 450 nm dalga boyunda kuyucuklardaki çözeltilerin absorbans değerleri ölçüldü. Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerlerine göre lineer regresyon eğrisi çizildi ve eğrinin denklemi hesaplandı. Hesaplanan denklemden hareketle örneklerdeki C3 düzeyleri belirlendi.

3.9.10. Kaspaz-6 (C6) Düzeylerinin Ölçümü

Hazırlanan örnekler C6 monoklonal antikoru ile önceden bağlanmış kuyucuklara eklendi. Kuyucuklarda hücre homojenatlarının inkübe edilmesinin ardından biotin ile birleşik antikor eklenerek Streptavidin-HRP'nin immün kompleksi ile bağlandı. Tekrar inkübe

edilmesinin ardından bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak için yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı. Kromojen solüsyonlarının eklenmesi ile 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü ve standart regresyon grafiği ile karşılaştırılarak kantitatif olarak ölçüm yapıldı.

Standartlar için belirlenmiş kuyucuklara 50 µL standart çözeltiler ve 50 µL Streptavidin-HRP eklendi. Hazırlanan örnekler için belirlenen kuyucuklara 40'ar µL örneklerden, 10 µL Aβ-antikor ve 50 µL Streptavidin-HRP eklenerek sızdırmazlık membranı ile kapatıldı, yavaşça çalkalandı ve 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında sızdırmaz membran dikkatlice kaldırıldı. Hazırlanan yıkama çözeltisi ile kuyucuklar yıkandı ve yıkama çözeltisi uzaklaştırıldı. Tüm kuyucuklara kromojen A ve B solüsyonlarından 50'şer µL eklendi ve yavaşça çalkalandı. Daha sonra 37°C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra reaksiyon durdurucu solüsyon eklendi. Mavi renkteki kuyucuklar aniden sarı renge dönüştü. Reaksiyon durdurucu çözelti eklendikten hemen sonra kör olarak boş bırakılan kuyucuk "0" kabul edilerek 450 nm dalga boyunda kuyucuklardaki çözeltilerin absorbans değerleri ölçüldü. Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerlerine göre lineer regresyon eğrisi çizildi ve eğrinin denklemi hesaplandı. Hesaplanan denklemden hareketle örneklerdeki C6 düzeyleri belirlendi.

3.9.11. Kaspaz-9 (C9) Düzeylerinin Ölçümü

Hazırlanan örnekler C9 monoklonal antikoru ile önceden bağlanmış kuyucuklara eklendi. Kuyucuklarda hücre homojenatlarının inkübe edilmesinin ardından biotin ile birleşik antikor eklenerek Streptavidin-HRP'nin immün kompleksi ile bağlandı. Tekrar inkübe edilmesinin ardından bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak için yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı. Kromojen solüsyonlarının eklenmesi ile 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü ve standart regresyon grafiği ile karşılaştırılarak kantitatif olarak ölçüm yapıldı.

Standartlar için belirlenmiş kuyucuklara 50 µL standart çözeltiler ve 50 µL Streptavidin-HRP eklendi. Hazırlanan örnekler için belirlenen kuyucuklara 40'ar µL örneklerden, 10 µL Aβ-antikor ve 50 µL Streptavidin-HRP eklenerek sızdırmazlık membranı ile kapatıldı, yavaşça çalkalandı ve 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında sızdırmaz membran dikkatlice kaldırıldı. Hazırlanan yıkama çözeltisi ile kuyucuklar yıkandı ve yıkama çözeltisi uzaklaştırıldı. Tüm kuyucuklara kromojen A ve B solüsyonlarından 50'şer µL eklendi ve yavaşça çalkalandı. Daha sonra 37°C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra reaksiyon durdurucu solüsyon eklendi. Mavi renkteki kuyucuklar aniden sarı renge dönüştü. Reaksiyon durdurucu çözelti eklendikten hemen sonra kör olarak boş bırakılan kuyucuk "0" kabul edilerek 450 nm dalga boyunda kuyucuklardaki çözeltilerin absorbans değerleri ölçüldü. Standart

konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerlerine göre lineer regresyon eğrisi çizildi ve eğrinin denklemi hesaplandı. Hesaplanan denklemden hareketle örneklerdeki C9 düzeyleri belirlendi.

3.9.12. Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta (TGF-β) Düzeylerinin Ölçümü

Hazırlanan örnekler TGF-β monoklonal antikoru ile önceden bağlanmış kuyucuklara eklendi. Kuyucuklarda hücre homojenatlarının inkübe edilmesinin ardından biotin ile birleşik antikor eklenerek Streptavidin-HRP'nin immün kompleksi ile bağlandı. Tekrar inkübe edilmesinin ardından bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak için yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı. Kromojen solüsyonlarının eklenmesi ile 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü ve standart regresyon grafiği ile karşılaştırılarak kantitatif olarak ölçüm yapıldı.

Standartlar için belirlenmiş kuyucuklara 50 µL standart çözeltiler ve 50 µL Streptavidin-HRP eklendi. Hazırlanan örnekler için belirlenen kuyucuklara 40'ar µL örneklerden, 10 µL Aβ-antikor ve 50 µL Streptavidin-HRP eklenerek sızdırmazlık membranı ile kapatıldı, yavaşça çalkalandı ve 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında sızdırmaz membran dikkatlice kaldırıldı. Hazırlanan yıkama çözeltisi ile kuyucuklar yıkandı ve yıkama çözeltisi uzaklaştırıldı. Tüm kuyucuklara kromojen A ve B solüsyonlarından 50'şer µL eklendi ve yavaşça çalkalandı. Daha sonra 37°C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra reaksiyon durdurucu solüsyon eklendi. Mavi renkteki kuyucuklar aniden sarı renge dönüştü. Reaksiyon durdurucu çözelti eklendikten hemen sonra kör olarak boş bırakılan kuyucuk "0" kabul edilerek 450 nm dalga boyunda kuyucuklardaki çözeltilerin absorbans değerleri ölçüldü. Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerlerine göre lineer regresyon eğrisi çizildi ve eğrinin denklemi hesaplandı. Hesaplanan denklemden hareketle örneklerdeki TGF-β düzeyleri belirlendi.

3.9.13. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF-α) Ölçümü

Hazırlanan örnekler TNF-α monoklonal antikoru ile önceden bağlanmış kuyucuklara eklendi. Kuyucuklarda hücre homojenatlarının inkübe edilmesinin ardından biotin ile birleşik antikor eklenerek Streptavidin-HRP'nin immün kompleksi ile bağlandı. Tekrar inkübe edilmesinin ardından bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak için yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı. Kromojen solüsyonlarının eklenmesi ile 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü ve standart regresyon grafiği ile karşılaştırılarak kantitatif olarak ölçüm yapıldı.

Standartlar için belirlenmiş kuyucuklara 50 µL standart çözeltiler ve 50 µL Streptavidin-HRP eklendi. Hazırlanan örnekler için belirlenen kuyucuklara 40'ar µL örneklerden, 10 µL Aβ-antikor ve 50 µL Streptavidin-HRP eklenerek sızdırmazlık membranı ile kapatıldı, yavaşça

çalkalandı ve 1 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında sızdırmaz membran dikkatlice kaldırıldı. Hazırlanan yıkama çözeltisi ile kuyucuklar yıkandı ve yıkama çözeltisi uzaklaştırıldı. Tüm kuyucuklara kromojen A ve B solüsyonlarından 50'şer µL eklendi ve yavaşça çalkalandı. Daha sonra 37 °C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra reaksiyon durdurucu solüsyon eklendi. Mavi renkteki kuyucuklar aniden sarı renge dönüştü. Reaksiyon durdurucu çözelti eklendikten hemen sonra kör olarak boş bırakılan kuyucuk "0" kabul edilerek 450 nm dalga boyunda kuyucuklardaki çözeltilerin absorbans değerleri ölçüldü. Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerlerine göre lineer regresyon eğrisi çizildi ve eğrinin denklemi hesaplandı. Hesaplanan denklemden hareketle örneklerdeki TNF-α düzeyleri belirlendi.

3.10. Annexin V-FITC/PI Apoptoz Analizi

Apoptoz çalışmasında kullanılmak üzere daha önce hücre kültürü çalışmasında anlatıldığı üzere hücreler çoğaltıldı. Çoğaltılan hücreler 6 kuyucuklu plakalara $1x10^5$ hücre/plaka olacak şekilde ekildi. AH modeli oluşturulan ve oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin apoptoz üzerine olan etkisinin değerlendirilmesi amacıyla 25 ve 250 µg/mL derişimde naringin ve ursolik asidin etkisinin değerlendirilmesi amacıyla ise 0,1 ve 1 µg/mL derişimde ursolik asit ile 24 saat süre ile muamele edilmiştir.

24 saatin sonunda hücreler ayrı ayrı tripsinlenip toplanarak +4°C'de bekletilen PBS ile yıkandı. Hücreler santrifüj edildikten sonra 5 mL'lik test tüplerine $2x10^5$ hücre/mL olacak şekilde 500 µL 1X Annexin V Bağlanma Tamponunda süspande edildi. Her bir tüpe 5 µL etiketlenmiş Annexin V eklendi. Daha sonra üzerlerine 10 µL propidyum iyodür (PI) çözeltisi eklendi. Hücreler vortekslendikten sonra 25°C'de 15 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından hücreler 1X Annexin V Bağlanma Tamponu ile yıkandı ve üzerlerine 400 µL 1X Annexin V Bağlanma Tamponu eklendi. Daha sonra hücreler akış sitometrisi cihazında apoptoz özellikleri bakımından değerlendirildi.

3.11. İstatistiksel Yöntem

İstatistiksel analiz için SPSS Version 23.0 Programı kullanıldı. Gruplar arası farkların önem kontrolleri, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak verildi. Post hoc analizi ise Tukey's HSD testi ile yapıldı. İstatistiksel anlamlılık değeri başlangıcı olarak $p<0,05$ kabul edildi. Her çalışma en az üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

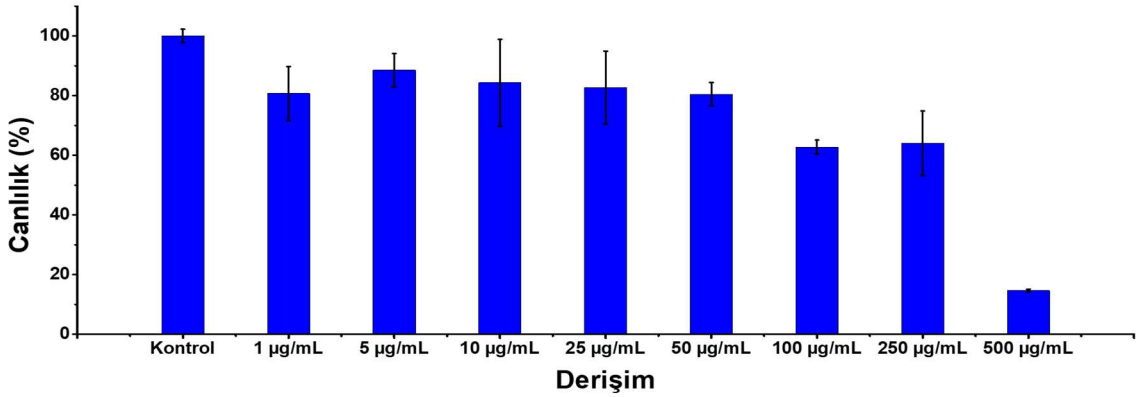
4.1. SH-SY5Y Hücrelerinde Alzheimer Hastalık Modelinin Oluşturulması

İnsan nöroblastoma hücrelerinde *in vitro* AH modelinin oluşturulması için kullanılacak FF dipeptit yapısı için uygun çözücü ve konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla ilk olarak farklı çözücülerde hazırlanan FF çözeltilerinin sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile incelenmiştir.

2-propanol kullanılarak hazırlanan 1-500 µg/mL derişimlerdeki FF çözeltilerinin SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik etkilerine dair bulgular Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde 1-100 µg/mL derişim aralığında önemli bir sitotoksik etkinin oluşmadığı ancak 100 µg/mL'den sonra hücreler üzerinde sitotoksik etkinin belirgin derecede arttığı gözlenmiştir. FF'nin 2-propanoldeki çözeltisinin SH-SY5Y hücreleri için IC_{50} değeri 270,09 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. FF'nin 2-propanoldeki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik etkileri.

Derişim (µg/mL)	Absorbans Değerleri (ortalama ± standart sapma)	Hücre Canlılığı (%)
Negatif Kontrol (DMEM (%1 2-propanol))	0,819 ± 0,018	100,00
1	0,661 ± 0,074	80,71
5	0,725 ± 0,046	88,52
10	0,691 ± 0,119	84,31
25	0,678 ± 0,099	82,72
50	0,659 ± 0,032	80,46
100	0,514 ± 0,019	62,76
250	0,524 ± 0,088	64,01
500	0,120 ± 0,004	14,62



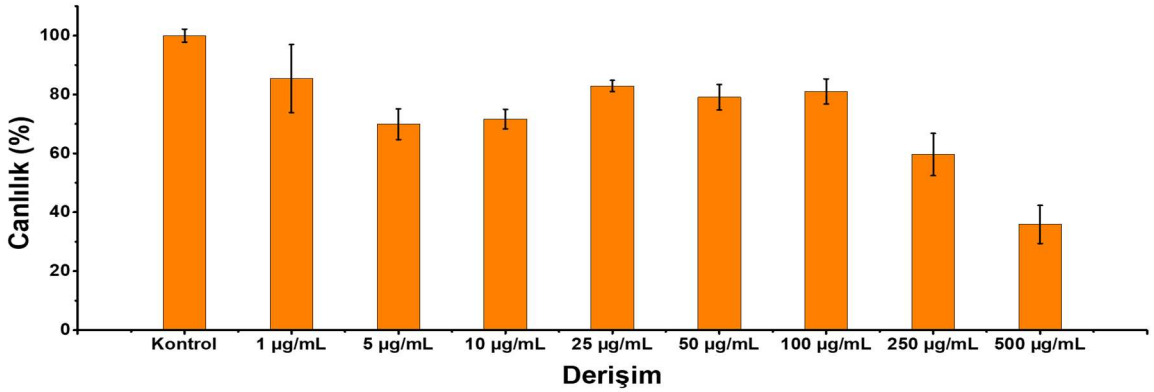
Şekil 4.1. FF'nin 2-propanoldeki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik etkileri.*

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak hesaplanmıştır.
Negatif kontrol olarak DMEM (%1 2-propanol) kullanılmıştır.

Dimetilsülfoksit (DMSO) kullanılarak hazırlanan 1-500 µg/mL derişimlerdeki FF çözeltilerinin SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik etkilerine dair bulgular Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2'de verilmiştir. 1-250 µg/mL derişim aralığında önemli bir sitotoksik etkinin oluşmadığı ancak 250 µg/mL'den sonra hücreler üzerinde sitotoksik etkinin belirgin derecede arttığı gözlenmiştir. FF'nin DMSO'daki çözeltisinin SH-SY5Y hücreleri için IC_{50} değeri 358,53 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. FF'nin DMSO'daki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik etkileri.

Derişim (µg/mL)	Absorbans Değerleri (ortalama ± standart sapma)	Hücre Canlılığı (%)
Negatif Kontrol (DMEM (%1 DMSO))	0,819 ± 0,018	100,00
1	0,700 ± 0,095	85,41
5	0,573 ± 0,043	69,93
10	0,587 ± 0,028	71,64
25	0,679 ± 0,016	82,88
50	0,648 ± 0,035	79,09
100	0,664 ± 0,035	81,04
250	0,489 ± 0,059	59,65
500	0,294 ± 0,053	35,90



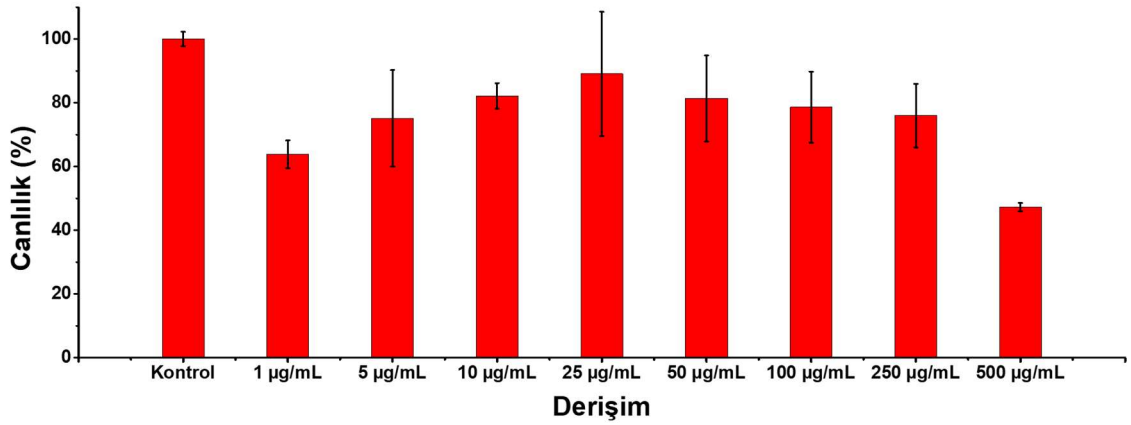
Şekil 4.2. FF'nin DMSO'daki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik etkileri.*

* Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak hesaplanmıştır.
Negatif kontrol olarak DMEM (%1 DMSO) kullanılmıştır.

Etanol kullanılarak hazırlanan 1-500 µg/mL derişimlerdeki FF çözeltilerinin SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik etkilerine dair bulgular Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3'te verilmiştir. 1-250 µg/mL derişim aralığında önemli bir sitotoksik etkinin oluşmadığı ancak 250 µg/mL'den sonra hücreler üzerinde sitotoksik etkinin belirgin derecede arttığı gözlenmiştir. FF'nin etanoldeki çözeltisinin SH-SY5Y hücreleri için IC_{50} değeri 479,81 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. FF'nin etanoldeki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik etkileri.

Derişim (µg/mL)	Absorbans Değerleri (ortalama ± standart sapma)	Hücre Canlılığı (%)
Negatif Kontrol (DMEM (%1 Etanol))	0,819 ± 0,018	100
1	0,523 ± 0,035	63,83
5	0,615 ± 0,123	75,12
10	0,673 ± 0,032	82,17
25	0,730 ± 0,159	89,07
50	0,666 ± 0,111	81,36
100	0,644 ± 0,091	78,63
250	0,622 ± 0,081	75,98
500	0,387 ± 0,010	47,25



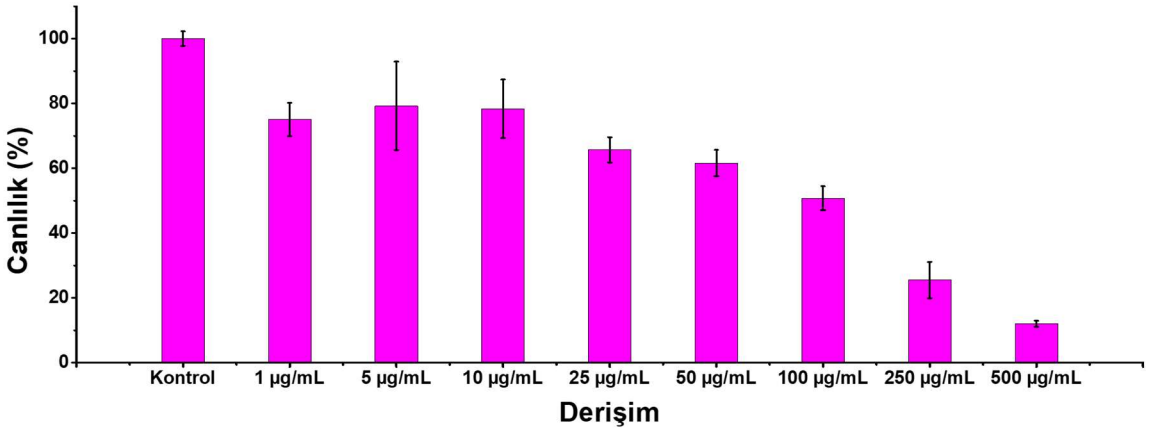
Şekil 4.3. FF'nin etanoldeki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik etkileri.*

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak hesaplanmıştır.
Negatif kontrol olarak DMEM (%1 etanol) kullanılmıştır.

1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol (HFIP) kullanılarak hazırlanan 1-500 µg/mL derişimlerdeki FF çözeltilerinin SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik etkilerine dair bulgular Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4'te verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, HFIP ile hazırlanan FF çözeltilerinin düşük derişimlerde dahi toksik etki gösterdiği gözlenmiştir. 1-10 µg/mL derişim aralığında SH-SY5Y hücre canlılığının %78'lere düştüğü; 25 µg/mL'nin üzerindeki derişimlerde ise çözeltilerin hücreler üzerinde çok toksik olduğu görülmüştür. FF'nin HFIP'deki çözeltisinin SH-SY5Y hücreleri için IC_{50} değeri ise 177,87 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. FF'nin HFIP'deki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik etkileri.

Derişim (µg/mL)	Absorbans Değerleri (ortalama ± standart sapma)	Hücre Canlılığı (%)
Negatif Kontrol (DMEM (%1 HFIP))	0,819 ± 0,018	100,00
1	0,615 ± 0,042	75,06
5	0,649 ± 0,111	79,24
10	0,642 ± 0,074	78,36
25	0,538 ± 0,032	65,72
50	0,505 ± 0,033	61,60
100	0,416 ± 0,030	50,76
250	0,209 ± 0,046	25,49
500	0,098 ± 0,007	12,00



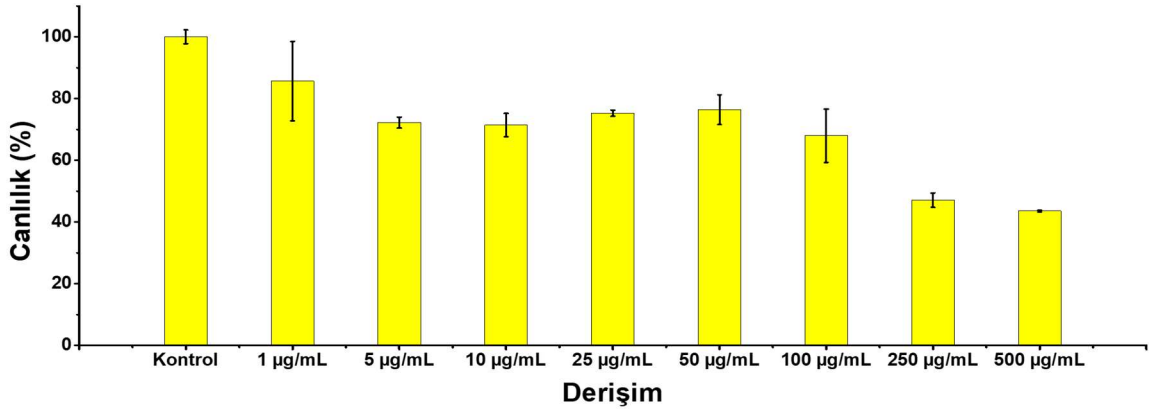
Şekil 4.4. FF'nin HFIP'deki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik etkileri.*

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak hesaplanmıştır.
Negatif kontrol olarak DMEM (%1 HFIP) kullanılmıştır.

Metanol kullanılarak hazırlanan 1-500 µg/mL derişimlerdeki FF çözeltilerinin SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik etkilerine dair bulgular Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5'te verilmiştir. 1-100 µg/mL derişim aralığında önemli bir sitotoksik etkinin oluşmadığı ancak 100 µg/mL'den sonra hücreler üzerinde belirgin sitotoksik etki oluşturduğu gözlenmiştir. FF'nin metanoldeki çözeltisinin SH-SY5Y hücreleri için IC_{50} değeri ise 230,72 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. FF'nin metanoldeki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik etkileri.

Derişim (µg/mL)	Absorbans Değerleri (ortalama ± standart sapma)	Hücre Canlılığı (%)
Negatif Kontrol (DMEM (%1 Metanol))	0,819 ± 0,018	100,00
1	0,702 ± 0,106	85,68
5	0,592 ± 0,015	72,22
10	0,585 ± 0,031	71,40
25	0,698 ± 0,155	85,16
50	0,626±0,040	76,40
100	0,557±0,071	67,95
250	0,385±0,019	47,04
500	0,357±0,002	43,56



Şekil 4.5. FF'nin metanoldeki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik etkileri.*

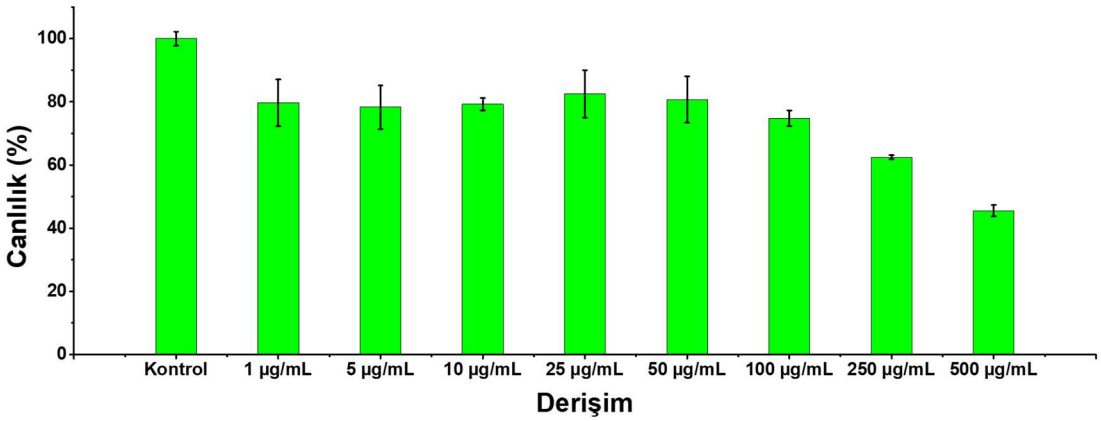
* Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak hesaplanmıştır.
Negatif kontrol olarak DMEM (%1 metanol) kullanılmıştır.

Su kullanılarak hazırlanan 1-500 µg/mL deirşimlerdeki FF çözeltilerinin SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik etkilerine dair bulgular Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6'da verilmiştir. 1-250 µg/mL derişim aralığında önemli bir sitotoksik etkinin oluşmadığı ancak 250 µg/mL'den sonra

hücreler üzerinde sitotoksik etkinin arttığı gözlenmiştir. FF'nin sudaki çözeltisinin SH-SY5Y hücreleri için IC_{50} değeri 464,60 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. FF'nin sudaki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik etkileri.

Derişim (µg/mL)	Absorbans Değerleri (ortalama ± standart sapma)	Hücre Canlılığı (%)
Negatif Kontrol (DMEM (%1 Su))	0,819 ± 0,018	100
1	0,653 ± 0,060	79,70
5	0,641 ± 0,056	78,27
10	0,649 ± 0,015	79,24
25	0,676 ± 0,061	82,54
50	0,661 ± 0,060	80,71
100	0,670 ± 0,103	81,81
250	0,566 ± 0,099	69,05
500	0,372 ± 0,014	45,51



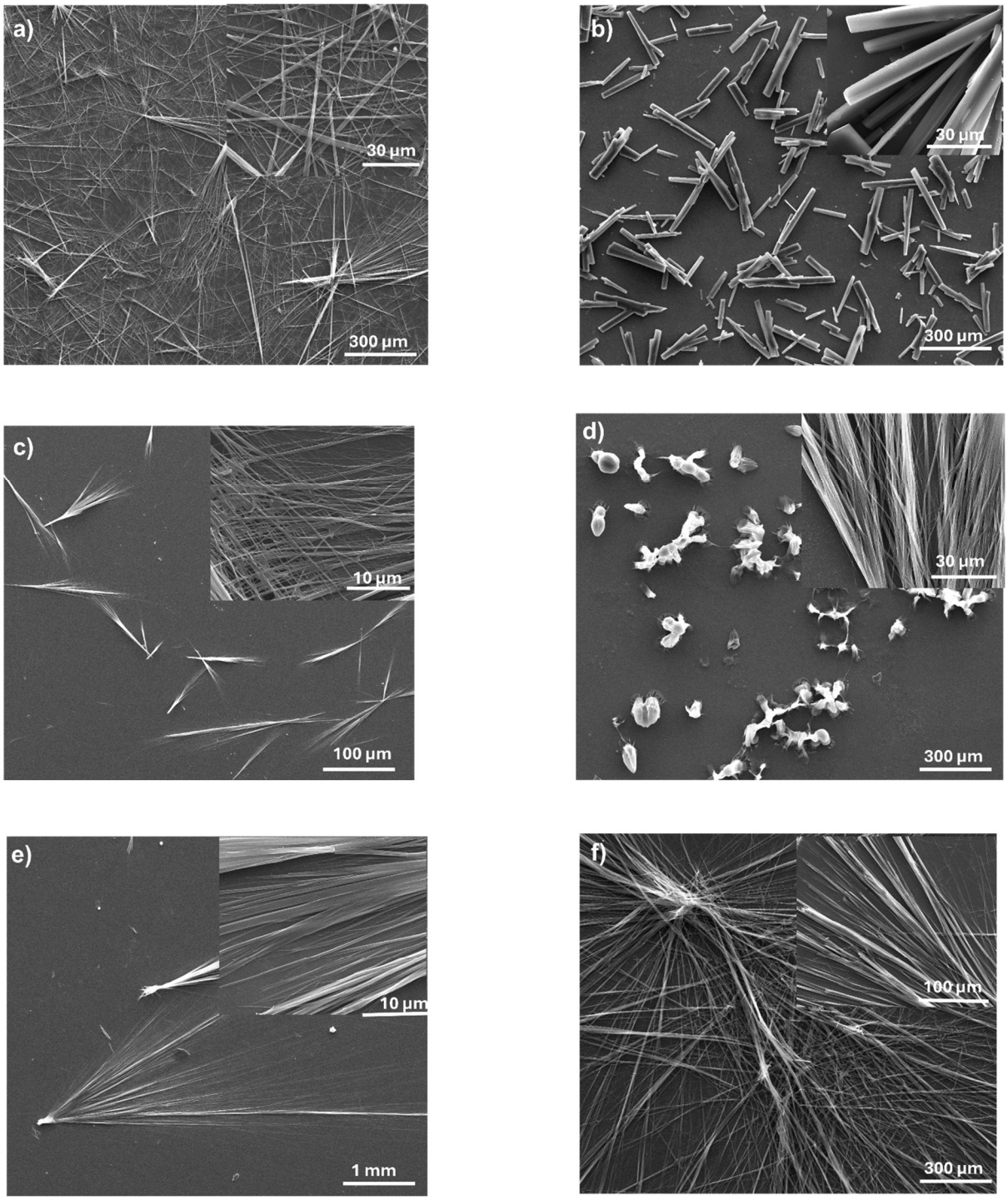
Şekil 4.6. FF'nin sudaki çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik etkileri.*

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak hesaplanmıştır.
Negatif kontrol olarak DMEM (%1 su) kullanılmıştır.

Tüm sitotoksisite sonuçları bir arada değerlendirildiğinde, çözücülerin fibril oluşturma kapasiteleri ve hücrelerde amiloid plak oluşturma kapasitelerinin değerlendirilmesi amacıyla

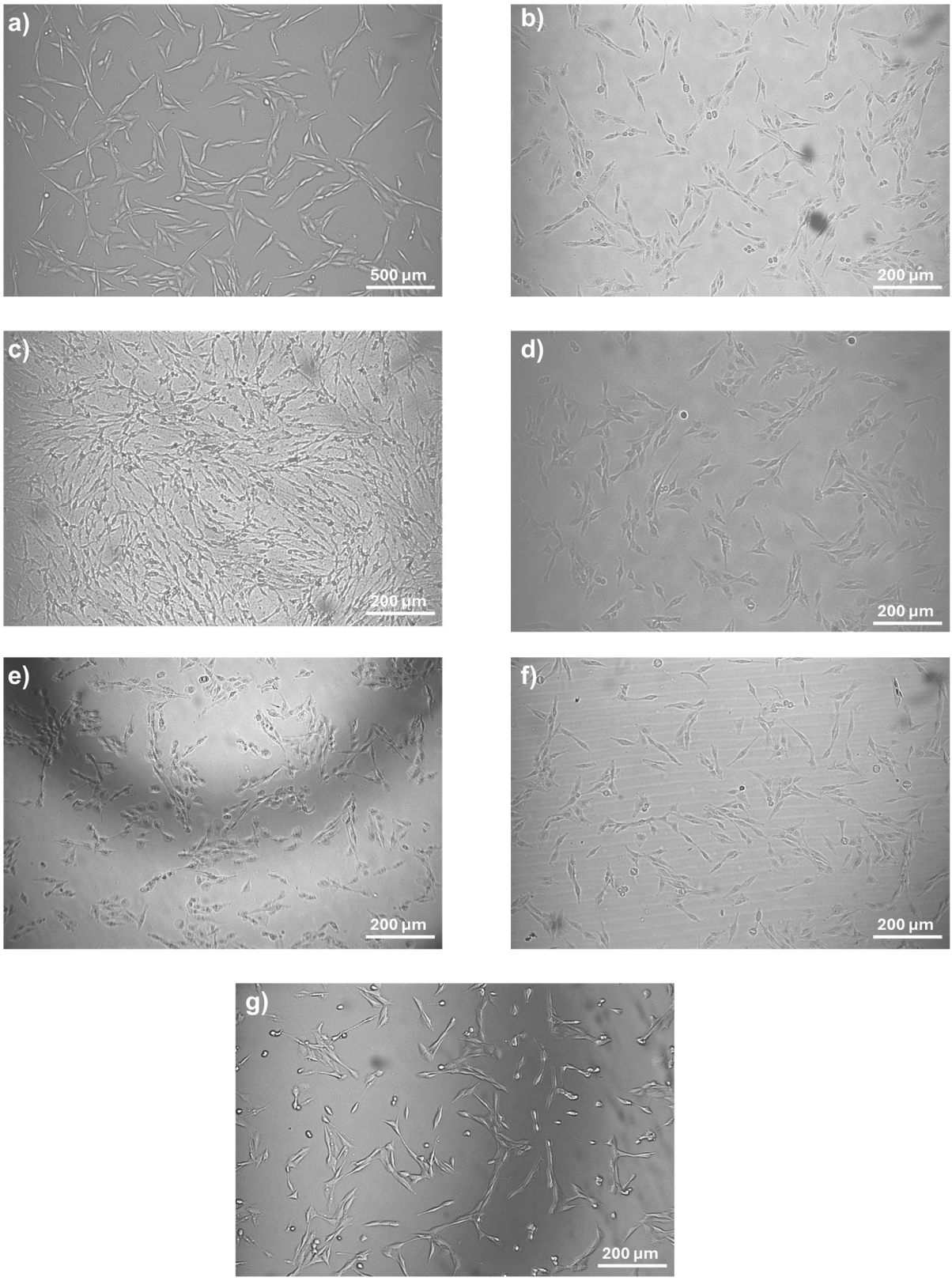
250 µg/mL derişimlerdeki FF dipeptit çözeltilerinin ileri analizler için kullanılmasına karar verilmiştir.

SH-SY5Y hücrelerinde AH modeli oluşturmak amacı ile kullanılacak uygun çözücünün belirlenmesi amacıyla 2-propanol, DMSO, etanol, HFIP, metanol, su çözücülerinde FF'nin son derişimi 250 µg/mL olacak şekilde çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilerin Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) altındaki görüntüleri incelenmiştir. Şekil 4.7 incelendiğinde, FF'nin farklı çözücülerde farklı şekillerde ve boyutlarda fibriller oluşturduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.7. FF'nin a) 2-propanol, b) DMSO, c) etanol, d) HFIP, e) metanol, f) sudaki 250 µg/mL konsantrasyonlarındaki çözeltilerinde oluşan fibril yapıların SEM görüntüleri.

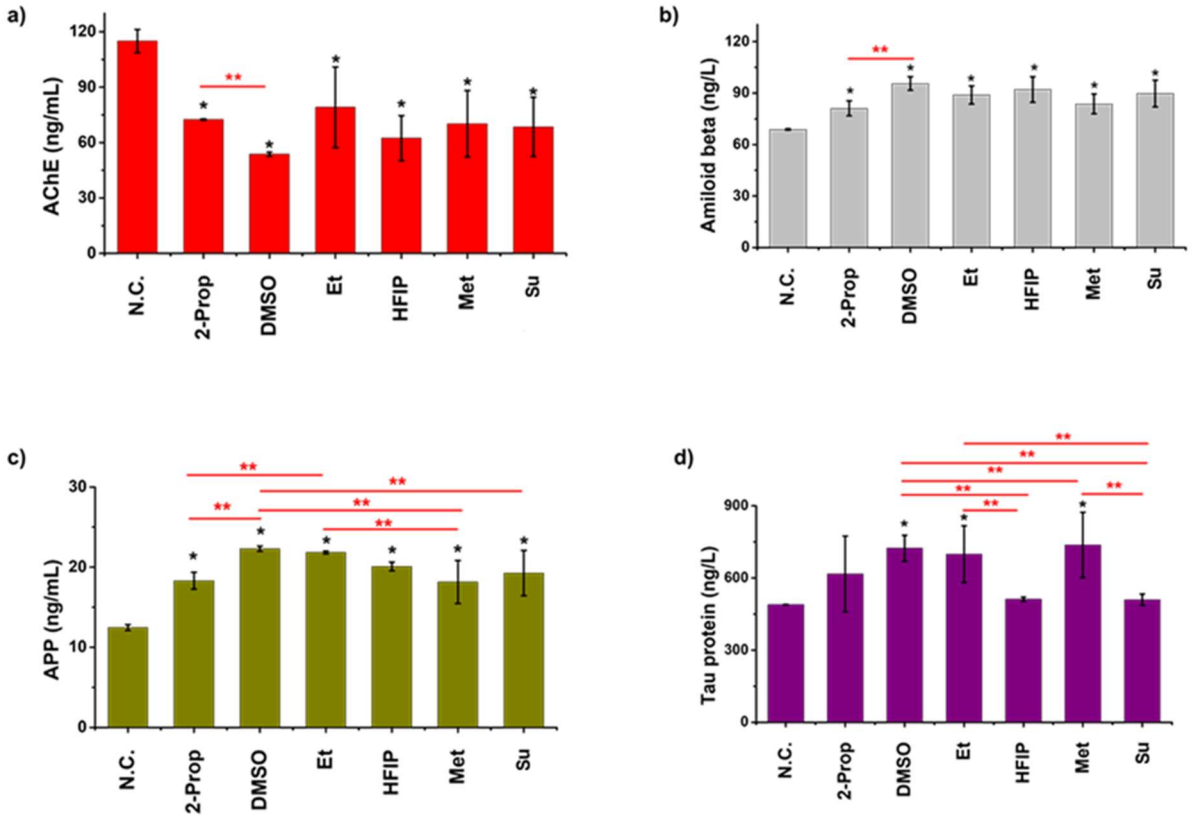
Çözücülerin SEM görüntülerinin incelenmesinin ardından aynı çözeltiler SH-SY5Y hücrelerine 24 saat süreyle uygulanmış ve ışık mikroskobu altında hücrelerde amiloid plak oluşumuna olan etkileri incelenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. a) Kontrol (DMEM), FF'nin b) 2-propanol, c) DMSO, d) etanol, e) HFIP, f) metanol, g) sudaki 250 µg/mL derişimdeki çözeltilerinin SH-SY5Y hücrelerinde amiloid plak oluşumu üzerine olan etkileri.

Şekil 4.8 incelendiğinde FF'nin DMSO ve HFIP çözeltilerinde oluşturduğu plakların hücre içine girerek hücrelerde biriktiği görülmüştür.

Mikroskop görüntülerinden elde edilen verileri doğrulamak ve çözücülerin *in vitro* AH modeli oluşturma üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla AChE, Tau Protein, APP ve Aβ gibi AH biyogöstergeleri düzeylerine olan etkilerinin değerlendirilmesine dair sonuçlar Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. Farklı çözücülerde hazırlanmış 250 µg/mL derişimdeki FF çözeltilerinin SH-SY5Y hücrelerinde AH biyogöstergeleri düzeylerine olan etkileri a) Asetilkolin esteraz (AChE), b) Amiloid Beta (Aβ), c) Amiloid Prekürsör Protein (APP), d) Tau protein, NK: Negatif Kontrol (DMEM). Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.

*Negatif kontrole kıyasla anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0.05$).

**Gruplar arası anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0.05$).

Şekil 4.9 incelendiğinde, FF çözeltilerinin tamamının negatif kontrolle karşılaştırıldığında AH biyogöstergeleri düzeylerinde farklılıklara neden olduğu gözlemlenmektedir. Ancak, AChE seviyelerindeki azalma ve Aβ, APP ve tau protein

düzeylerindeki artış, DMSO ile hazırlanan çözeltide daha belirgindir. Farklı çözücülerde hazırlanmış FF çözeltilerinin AH hücre modelleme çalışmaları ve sitotoksisite sonuçları bir arada değerlendirildiğinde 250 µg/mL derişimdeki FF'nin DMSO'daki ve HFIP'deki çözeltisinde SH-SY5Y hücrelerinde oluşan plakların birikimi gözlenmiş ve HFIP çözeltileri daha toksik olduğu için *in vitro* AH modellemesinde DMSO ile hazırlanan çözeltilerin kullanılmasına karar verilmiştir.

4.1.1. Sitotoksisite Değerlendirmesi

SH-SY5Y hücrelerinin naringine 25 - 1000 µg/mL derişim aralığında 24 saatlik maruziyetinden sonra yapılan sitotoksisite değerlendirmesine dair bulgular Çizelge 4.7 ve Şekil 4.10'da verilmiştir. Naringinin SH-SY5Y hücrelerinde 25-250 µg/mL derişim aralığında önemli bir sitotoksik etki göstermediği ancak 250 µg/mL'nin üzerindeki derişimlerde sitotoksik etkinin arttığı görülmüştür. SH-SY5Y hücrelerinde naringinin IC_{50} değeri 654,04 µg/mL olarak belirlenmiştir.

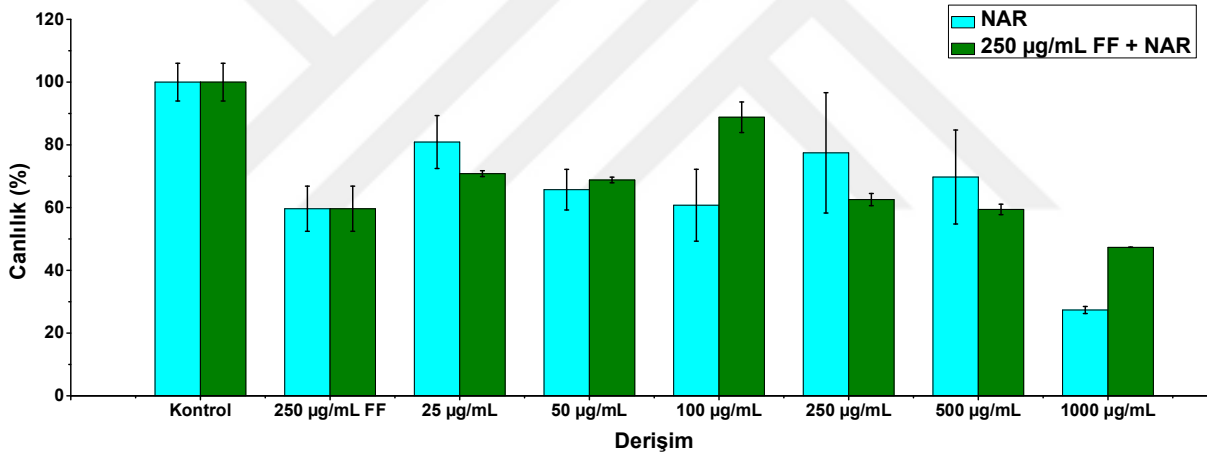
Aynı derişim aralığındaki naringinin AH modeli oluşturulmuş SH-SY5Y hücrelerindeki sitotoksik etkilerine dair bulgular ise Çizelge 4.8 ve Şekil 4.10'da verilmiştir. Naringinin 25-100 µg/mL aralığındaki derişimlerinin AH modeli oluşturulmuş hücrelerde sitotoksik etkisinin az olduğu fakat 100 µg/mL'nin üzerindeki derişimlerinin hücreler için yüksek oranda sitotoksik olduğu görülmüştür. AH modeli oluşturulmuş SH-SY5Y hücrelerinde naringinin IC_{50} değeri 833,47 µg/mL olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.7. Naringin çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik etkileri.

Derişim (µg/mL)	Absorbans Değerleri (ortalama ± standart sapma)	Hücre Canlılığı (%)
Negatif Kontrol, (DMEM (%1 DMSO))	0,900 ± 0,017	100
25	0,728 ± 0,098	80,90
50	0,592 ± 0,076	65,72
100	0,547 ± 0,134	60,76
250	0,697 ± 0,225	77,45
500	0,628 ± 0,180	69,75
1000	0,246 ± 0,13	27,36

Çizelge 4.8. Difenilalanin ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulmuş SH-SY5Y hücrelerinde naringin çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra sitotoksik etkileri.

Derişim (µg/mL)	Absorbans Değerleri (ortalama ± standart sapma)	Hücre Canlılığı (%)
Negatif Kontrol, (DMEM (%1 DMSO))	0,819±0,070	100
250 µg/mL FF	0,485±0,041	59,22
25	0,580±0,011	70,82
50	0,564±0,011	68,80
100	0,727±0,057	88,81
250	0,512±0,023	62,56
500	0,487±0,020	59,42
1000	0,388±0,001	47,31



Şekil 4.10. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin 24 saatlik maruziyetten sonra hücre canlılığı üzerine etkileri.*

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak hesaplanmıştır.
Negatif kontrol olarak DMEM (%1 DMSO) kullanılmıştır.

SH-SY5Y hücrelerinin ursolik aside 0,1 - 10 µg/mL derişim aralığında 24 saatlik maruziyetinden sonra yapılan sitotoksisite değerlendirmesine dair bulgular Çizelge 4.9 ve Şekil 4.11'da verilmiştir. Ursolik asidin 0,1-1 µg/mL derişim aralığında hücre canlılığını %72'lere

kadar düşürdüğü; bu konsantrasyon değerlerinden sonra sitotoksik etkilerin arttığı görülmüştür. SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin IC_{50} değeri 6,22 µg/mL olarak saptanmıştır.

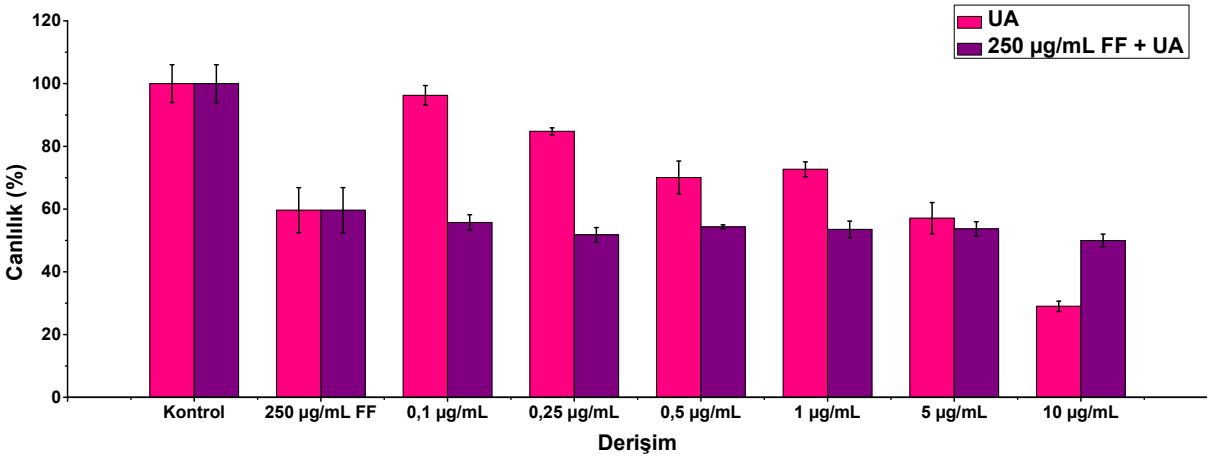
Aynı derişim aralığındaki ursolik asidin AH modeli oluşturulmuş SH-SY5Y hücrelerindeki sitotoksik etkilerine dair bulgular ise Çizelge 4.10 ve Şekil 4.11'de verilmiştir. Ursolik asidin düşük derişimlerinin hücreler için toksik olduğu görülmüş olup, IC_{50} değeri 8,40 µg/mL olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.9. Ursolik asit çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik etkileri.

Derişim (µg/mL)	Absorbans Değerleri (ortalama ± standart sapma)	Hücre Canlılığı (%)
Negatif Kontrol, (DMEM (%1 DMSO))	0,614 ± 0,066	100
0,1	0,59 1± 0,039	96,25
0,25	0,520 ± 0,013	84,79
0,5	0,43 0± 0,061	70,07
1	0,446 ± 0,028	72,68
5	0,350 ± 0,059	57,09
10	0,178 ± 0,019	29,01

Çizelge 4.10. Difenilalanin ile Alzheimer Hastalığı modeli oluşturulmuş SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asit çözeltilerinin 24 saat maruziyetten sonra sitotoksik etkileri.

Derişim (µg/mL)	Absorbans Değerleri (ortalama ± standart sapma)	Hücre Canlılığı (%)
0 (Negatif Kontrol, %1 DMSO, DMEM)	0,800 ± 0,082	100
250 µg/mL FF	0,485±0,041	60,65
0,1	0,446 ± 0,030	55,73
0,25	0,414 ± 0,027	51,81
0,5	0,435 ± 0,008	54,34
1	0,428 ± 0,031	53,52
5	0,430 ± 0,027	53,71
10	0,400± 0,024	49,98

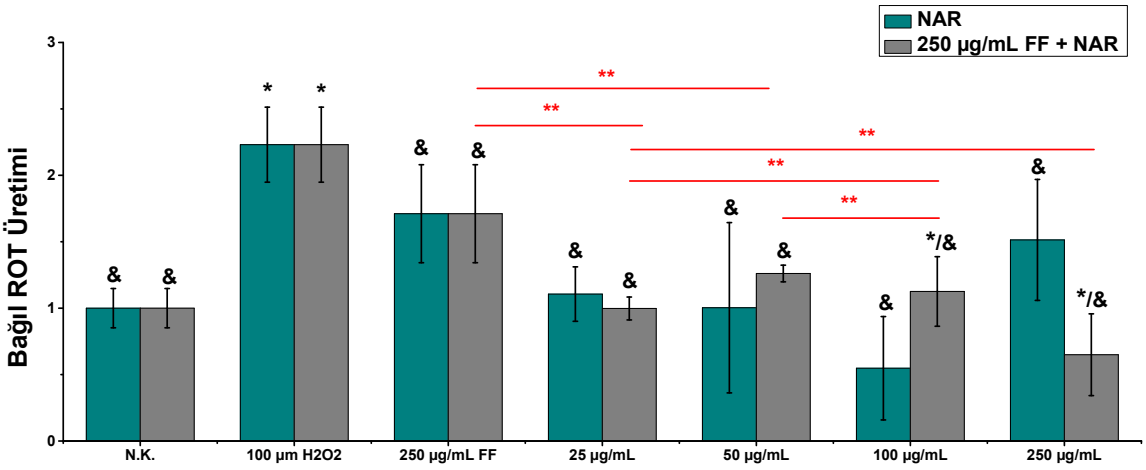


Şekil 4.11. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Yhücrelerinde ursolik asidin 24 saatlik maruziyetten sonra hücre canlılığı üzerine etkileri.*

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak hesaplanmıştır.
Negatif kontrol olarak DMEM (%1 DMSO) kullanılmıştır.

4.2. Reaktif Oksijen Türleri Oluşumunun Değerlendirilmesi

Naringinin sitotoksik olmayan derişimlerinin ROT üretimi üzerine olan etkileri değerlendirildiğinde, 25-250 µg/mL derişim aralığında naringinin pozitif kontrole göre ROT oluşumunu anlamlı derecede azalttığı saptanmıştır. Ayrıca, 250 µg/mL FF uygulanarak AH modeli oluşturulan hücrelerde de düşük derişimlerde ROT üretiminin belirgin derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.12).

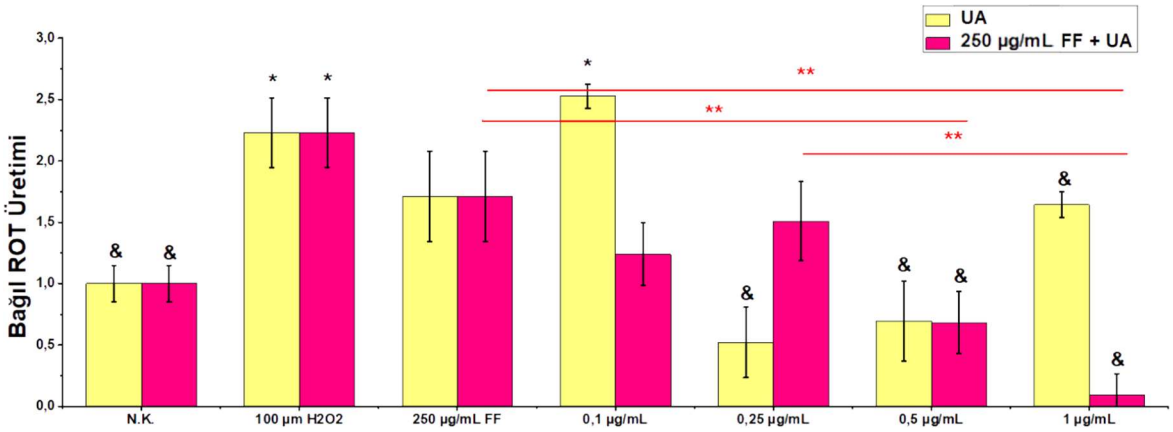


Şekil 4.12. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin ROT üretimi üzerine etkileri.***

*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & pozitif kontrol (100 µM H_2O_2) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); ** Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).

*** Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

Ursolik asidin sitotoksik olmayan derişimlerinin ROT üretimi üzerine olan etkileri değerlendirildiğinde, 0,25 ve 0,5 µg/mL derişimde ursolik asidin pozitif kontrole göre ROT oluşumunu anlamlı derecede azalttığı saptanmıştır. Ayrıca, 250 µg/mL FF uygulanarak AH modeli oluşturulan hücrelerde de derişim artışıyla birlikte artan ROT üretiminin azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin ROT üretimi üzerine etkileri.***

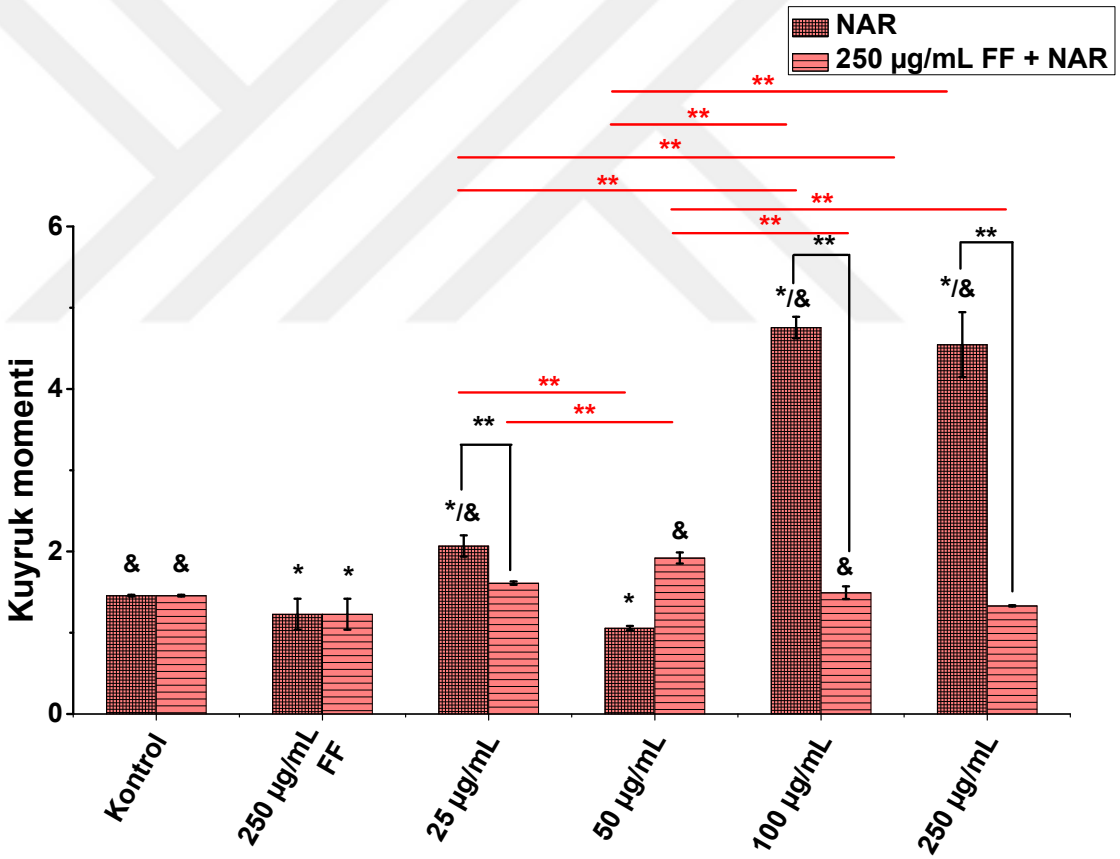
*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & pozitif kontrol (100 µM H_2O_2) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).

***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.3. Genotoksik Etkilerin Değerlendirilmesi

SH-SY5Y hücrelerinde *in vitro* AH modeli oluşturmak üzere kullanılan 250 µg/mL derişimdeki FF'nin negatif kontrolle kıyaslandığında hücreler üzerinde genotoksik bir etki göstermediği saptanmıştır ($p<0.05$) (Şekil 4.14, Şekil 4.15).

Sitotoksik olmayan derişimlerde uygulanan naringinin (25 - 250 µg/mL) ise SH-SY5Y hücrelerinde derişimin artışıyla birlikte DNA hasarında artışa neden olduğu saptanırken FF ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin DNA hasarı üzerine etkileri gözlenmemiştir. FF ile birlikte 25, 100 ve 250 µg/mL derişimde naringin uygulanan gruplardaki DNA hasarının tek başına naringin uygulanan gruplara kıyasla düşük olduğu da gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.14).

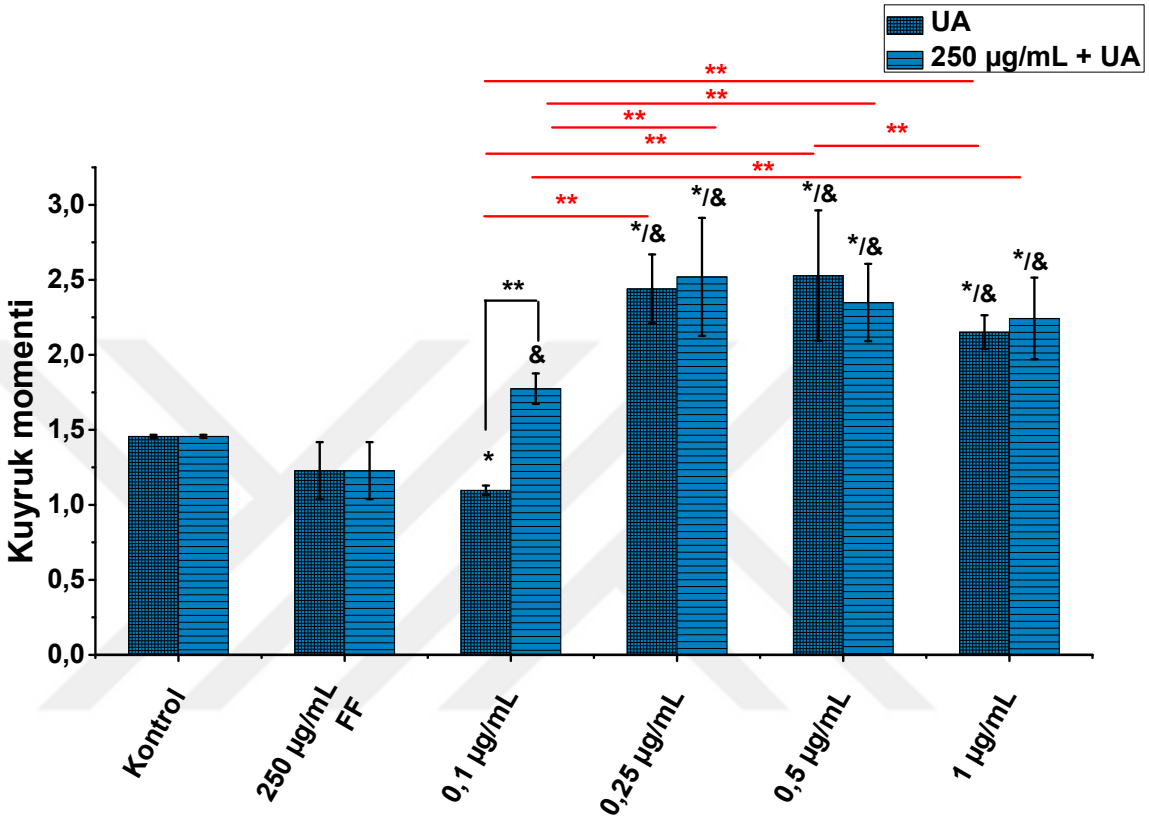


Şekil 4.14. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin DNA hasarı üzerine etkileri.***

*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).

***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

Sitotoksik olmayan derişimlerde uygulanan ursolik asidin (0,1 - 1 µg/mL) ise hem SH-SY5Y hücrelerinde hem de AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde DNA hasarında artışa neden olduğu saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin DNA hasarı üzerine etkileri.***

*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).

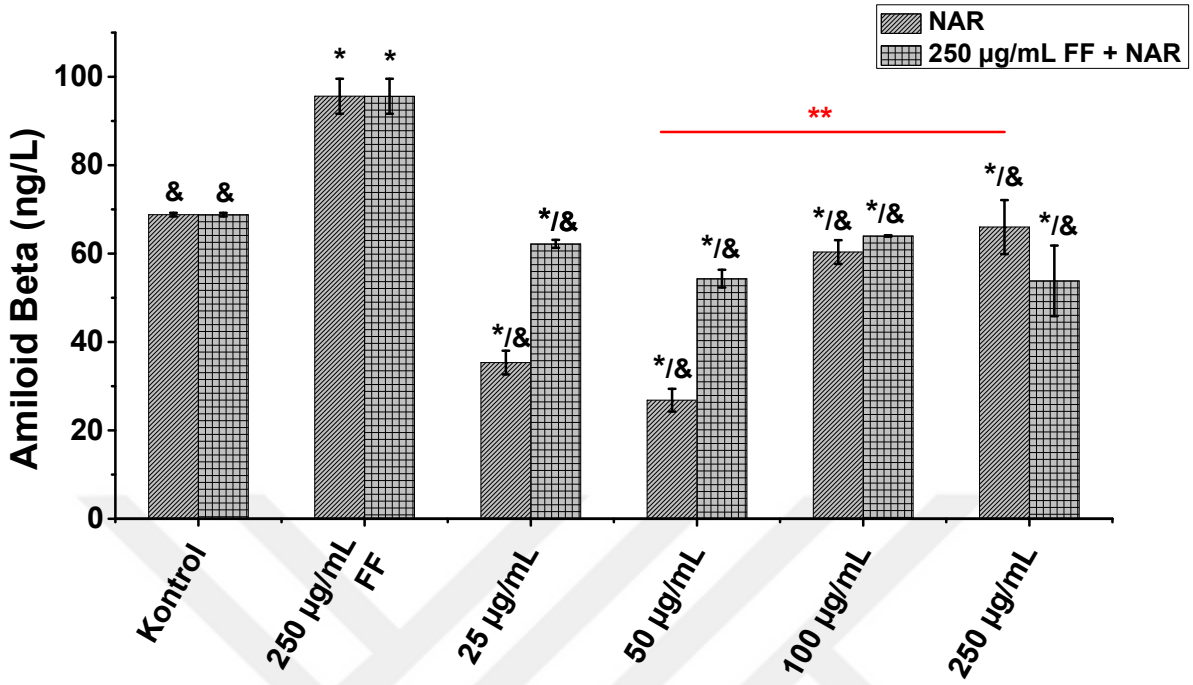
***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.4. Alzheimer Hastalığı Biyogöstergelerindeki Değişikliklerin Belirlenmesi

4.4.1. Amiloid Beta (Aβ) Düzeyleri

FF ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerine 25-250 µg/mL derişim aralığında naringin uygulamasının Aβ düzeylerini negatif kontrolde görülen düzeylerin altına düşürerek azalttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte AH modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde de

Aβ düzeylerinin 25, 50 ve 100 µg/mL derişimde naringin uygulaması ile azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.16).

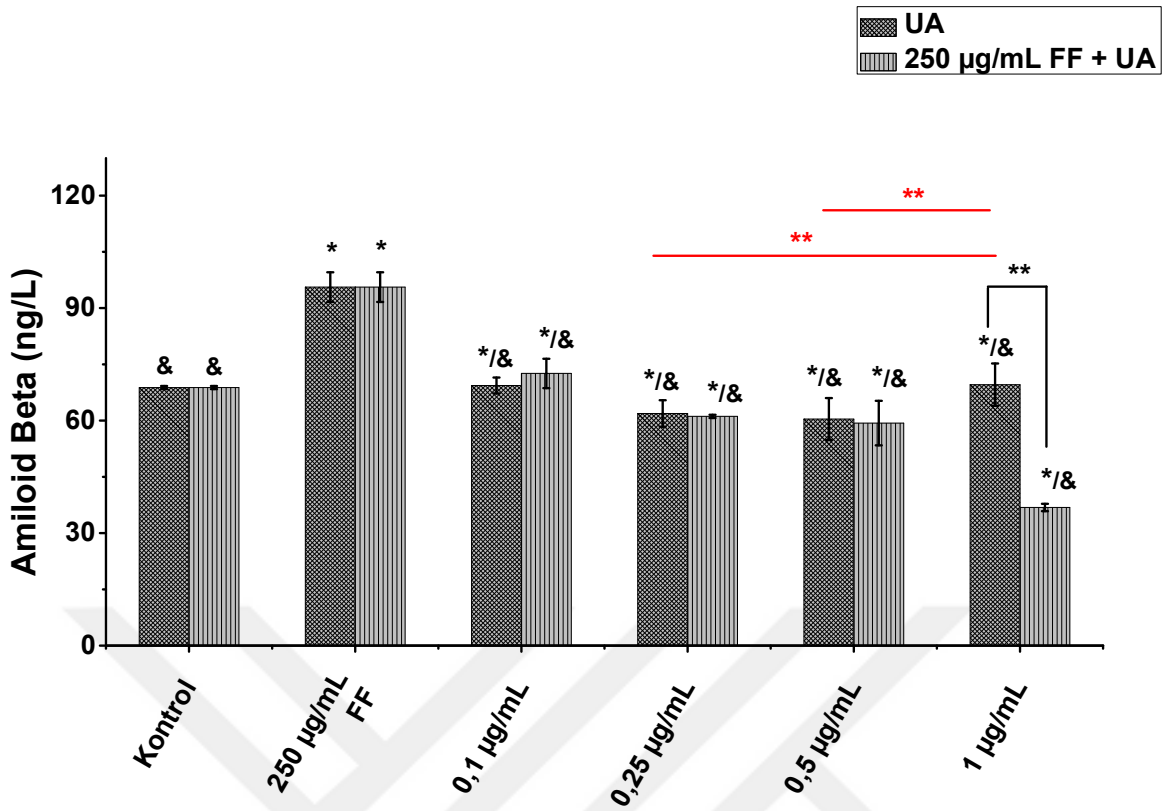


Şekil 4.16. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin amiloid beta (Aβ) düzeyleri üzerine etkileri.***

*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).

***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

Difenilalanin (FF) ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerine 0,1-1 µg/mL derişim aralığında ursolik asit uygulamasının Aβ düzeylerini azalttığı ve en güçlü etkinin de 1 µg/mL ursolik asit uygulanan hücrelerde olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte AH modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde de Aβ düzeylerinin 0,25 ve 0,5 µg/mL derişimde ursolik asit uygulaması ile azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.17).



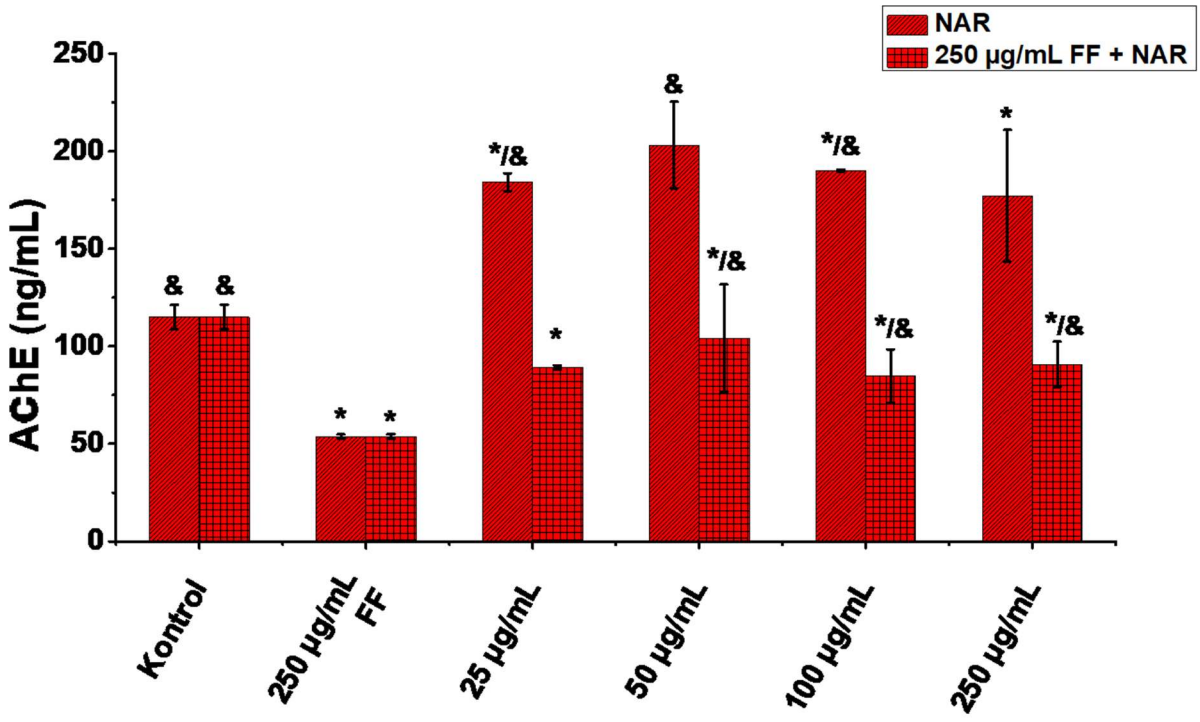
Şekil 4.17. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin amiloid beta (Aβ) düzeyleri üzerine etkileri.***

*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).

***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.4.2. Asetilkolinesteraz (AChE) Düzeyleri

Difenilalanin (FF) ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerine 50, 100 ve 250 µg/mL derişimde naringin uygulamasının AChE enzim düzeylerini artırdığı gözlenmekle birlikte tüm değerler negatif kontrole kıyasla düşüktür. Bununla birlikte AH modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde de AChE enzim düzeylerinin uygulanan tüm derişimlerinde naringin tarafından artırıldığı belirlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.18).

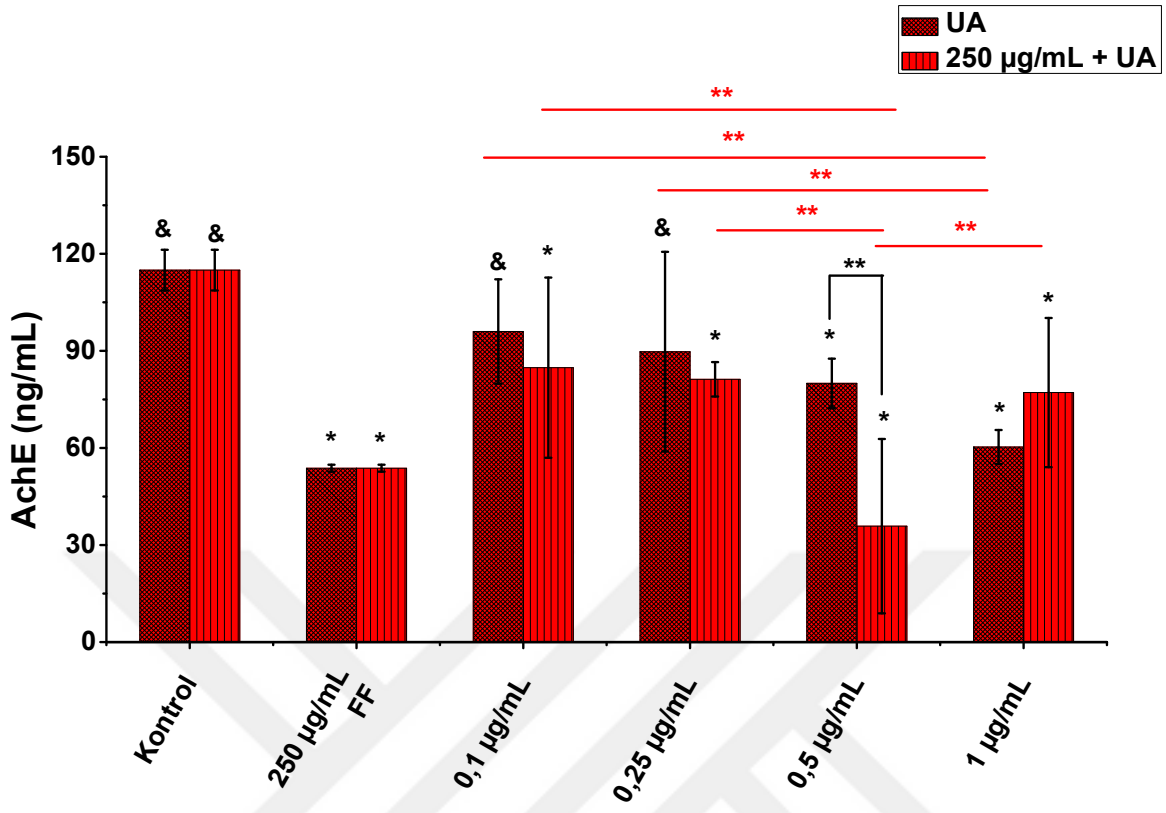


Şekil 4.18. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin asetilkolin esteraz (AChE) düzeyleri üzerine etkileri.**

*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).

**Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

Difenilalanin (FF) ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerine 0,1, 0,25 ve 1 µg/mL derişimde ursolik asit uygulaması AChE enzim düzeylerini artırsa ve tüm değerler negatif kontrole kıyasla düşük olsa da bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 0,5 µg/mL derişimde ursolik asit uygulaması AChE enzim düzeylerini azaltmış olsa bu azalma FF grubuna göre anlamlı değildir. Bununla birlikte AH modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde de AChE enzim düzeylerinin 0,5 ve 1 µg/mL derişimde ursolik asit uygulaması ile azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.19).

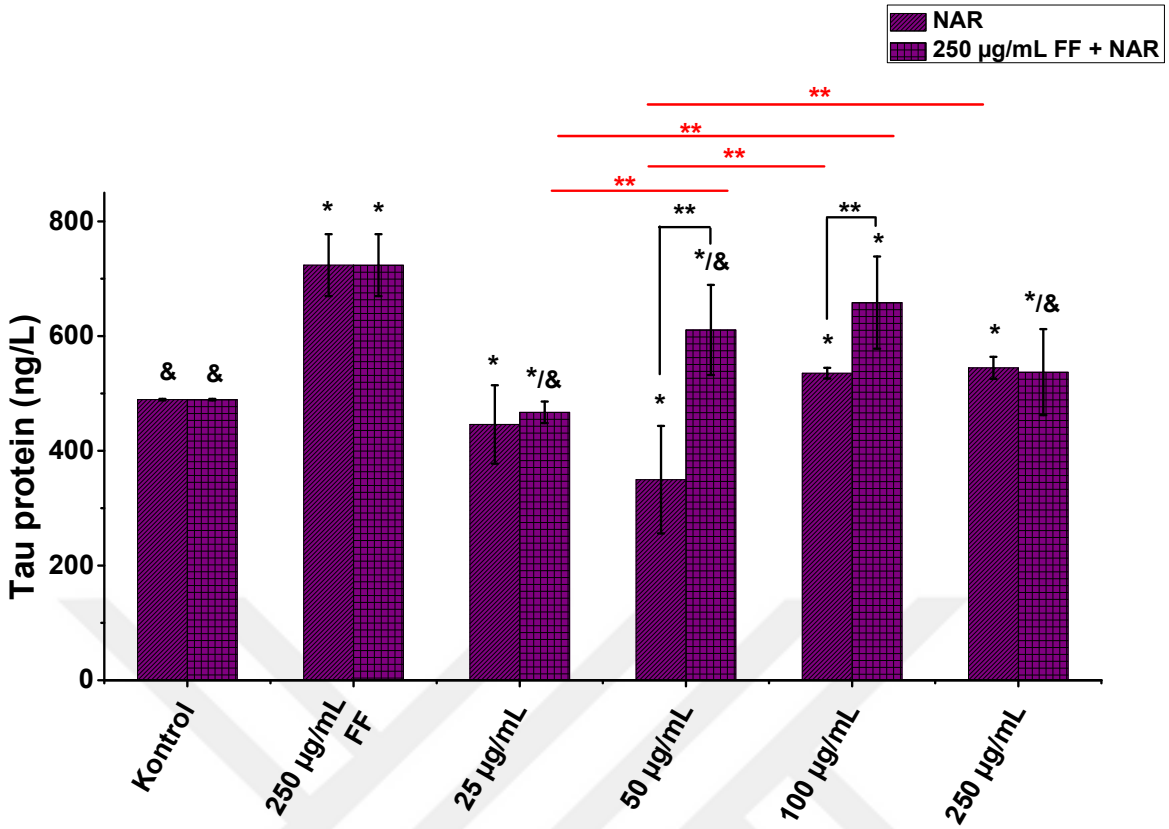


Şekil 4.19. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin asetilkolin esteraz (AChE) düzeyleri üzerine etkileri. ***

*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).
***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.4.3. Tau Protein Düzeyleri

Difenilalanin (FF) ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerine 25-250 µg/mL derişimde naringin uygulaması artmış olan FF düzeylerini azaltmış olsa da sadece 100 µg/mL derişimde naringin uygulamasında FF uygulanan gruba göre farklılık gözlenmemiştir. Bununla birlikte, AH modeli oluşturulmayan hücrelerde naringinin 25 ve 50 µg/mL derişimlerde tau protein düzeylerini negatif kontrole kıyasla azaltmış olması ve 100 ve 250 µg/mL derişimlerde tau protein düzeylerini negatif kontrole kıyasla artırmış olması dikkat çekicidir ($p<0,05$) (Şekil 4.20).

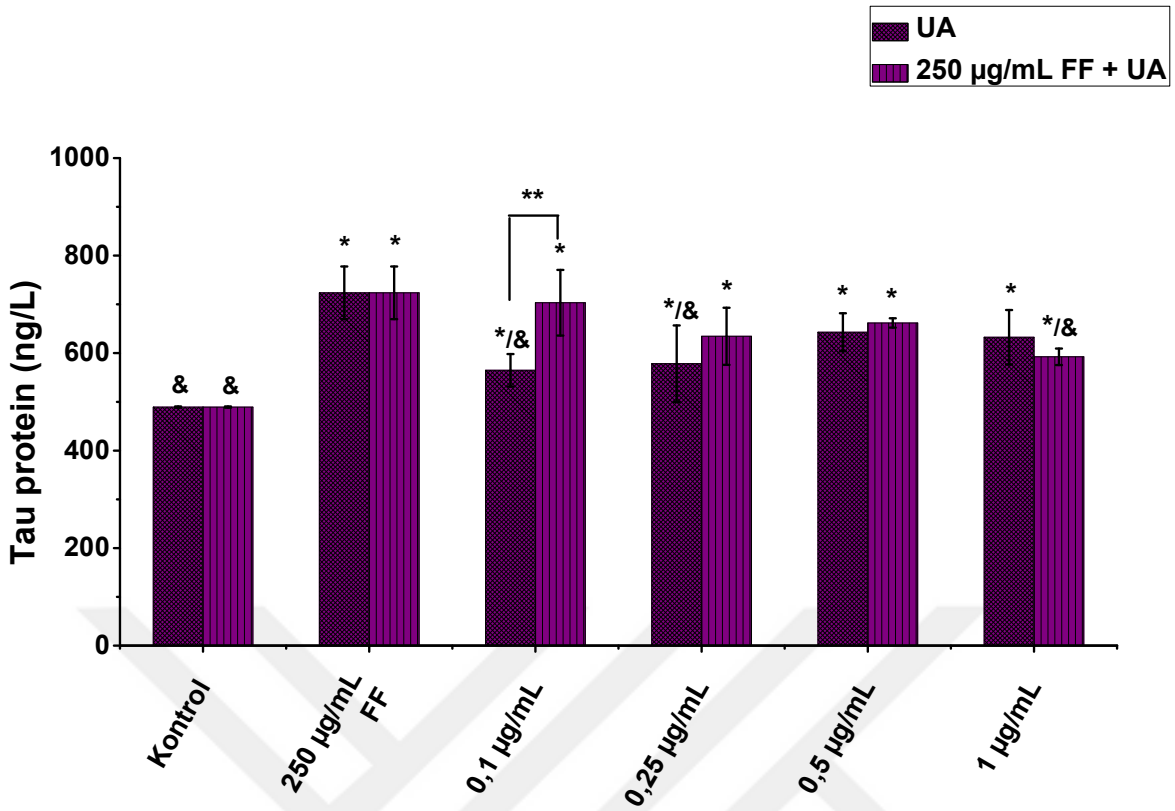


Şekil 4.20. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin tau protein düzeyleri üzerine etkileri. ***

*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).

***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

Difenilalanin (FF) ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerine 0,1-1 µg/mL derişimde ursolik asit uygulaması, artmış olan FF düzeylerini azaltmış olsa da sadece 1 µg/mL derişimde ursolik asit uygulamasında FF uygulanan gruba göre farklılık gözlenmiştir. Dikkat çekici olan nokta, AH modeli oluşturulmayan hücrelerde ursolik asidin tüm uygulanan derişimlerinde tau protein düzeylerini artırmış olmasıdır ($p<0,05$) (Şekil 4.21).



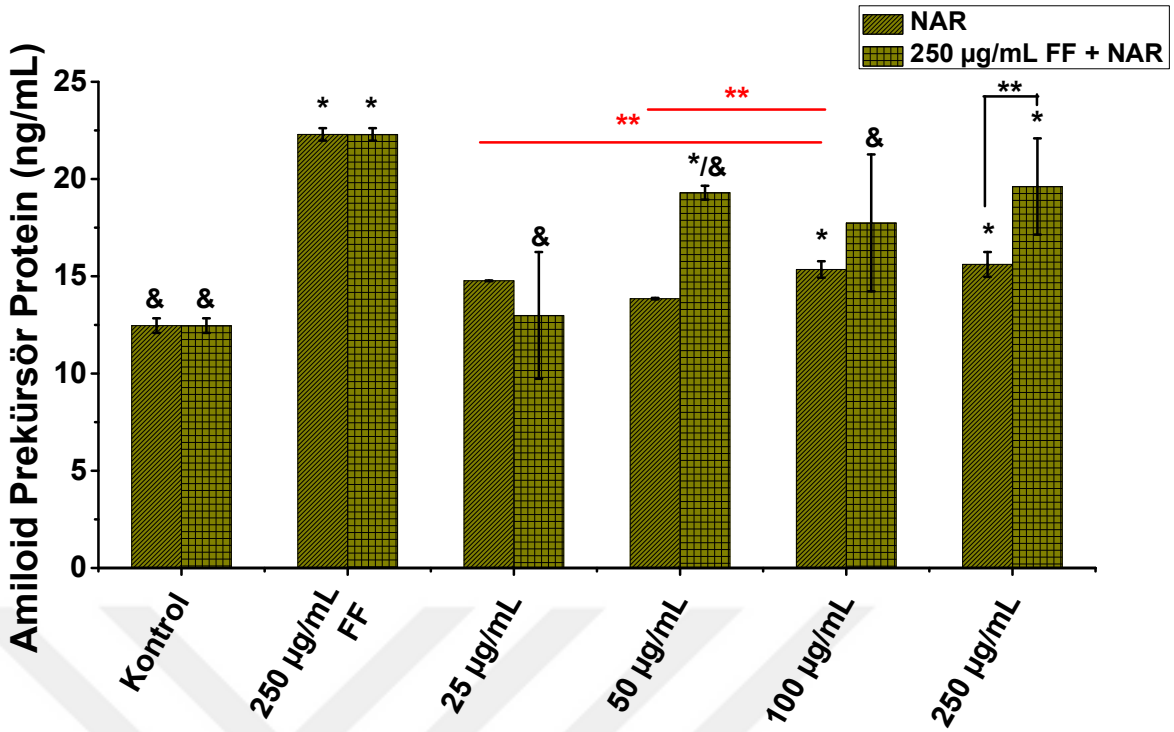
Şekil 4.21. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin tau protein düzeyleri üzerine etkileri. ***

*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).

***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.4.4. Amiloid Prekürsör Protein (APP) Düzeylerinin Ölçümü Bulguları

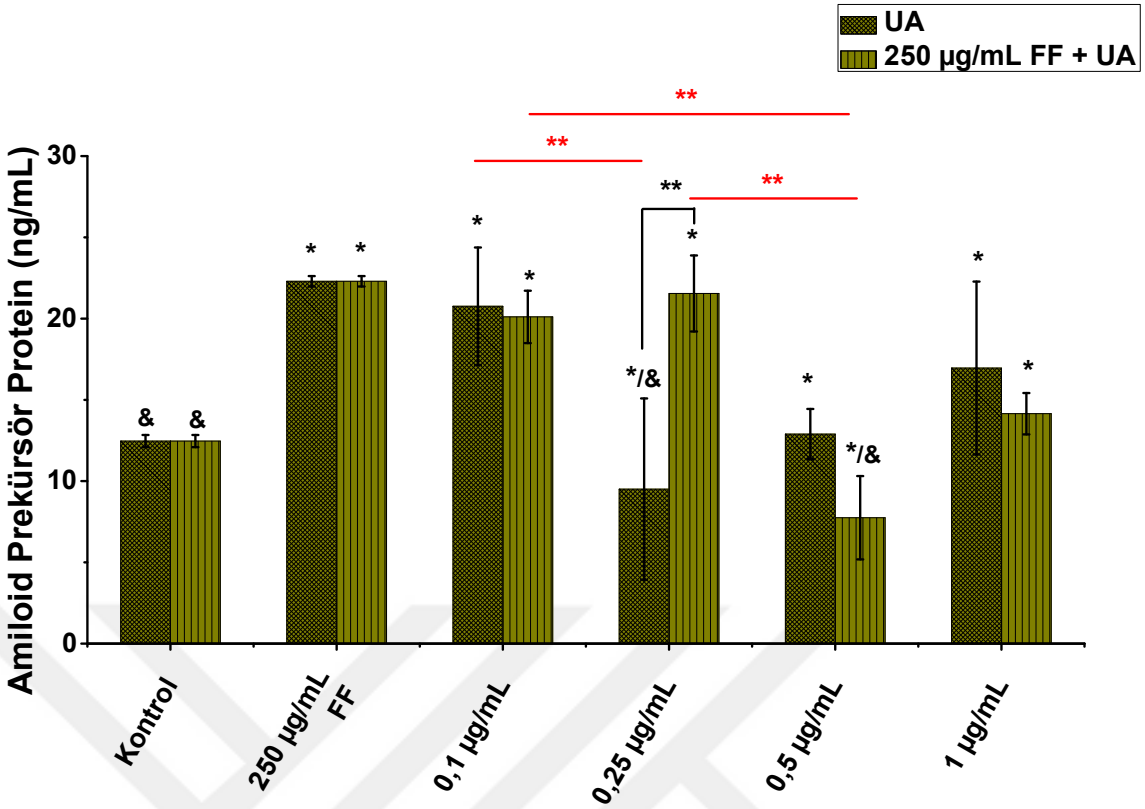
Difenilalanin (FF) ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerine 25-250 µg/mL derişimde naringin uygulaması artmış olan APP düzeylerini azaltmış olsa da sadece 250 µg/mL derişimde naringin uygulamasında FF uygulanan gruba göre farklılık gözlenmemiştir. Bununla birlikte, AH modeli oluşturulmayan hücrelerde naringinin 100 ve 250 µg/mL derişimlerde APP düzeylerini negatif kontrole kıyasla artırmış olması dikkat çekicidir ($p<0,05$) (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin amiloid prekürsör protein (APP) düzeyleri üzerine etkileri. ***

*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).
***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

Difenilalanin (FF) ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerine 0,1-1 µg/mL derişimde ursolik asit uygulaması artmış olan APP düzeylerini azaltmış olsa da sadece 0,25 ve 0,5 µg/mL derişimde ursolik asit uygulamasında FF uygulanan gruba göre farklılık gözlenmiştir. Bununla birlikte, AH modeli oluşturulmayan hücrelerde ursolik asidin 0,25 µg/mL derişimi uygulanan grubu haricinde APP düzeylerini negatif kontrole kıyasla artırmış olması dikkat çekicidir ($p<0,05$) (Şekil 4.23).



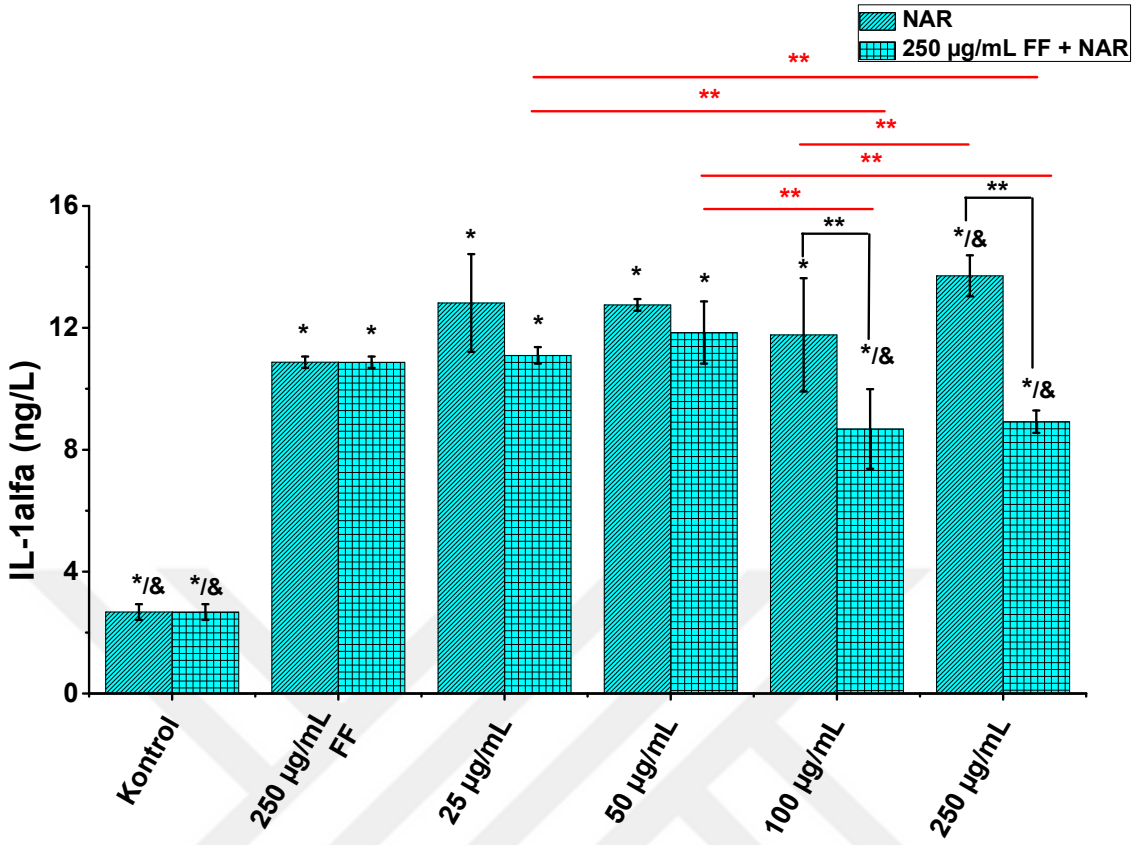
Şekil 4.23. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin amiloid prekürsör protein (APP) düzeyleri üzerine etkileri.***

*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).
***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.5. Enflamasyon Biyogöstergeleri Düzeylerindeki Değişimlerin Belirlenmesi

4.5.1. İnterlökin-1 Alfa (IL-1α) Düzeylerinin Ölçümü Bulguları

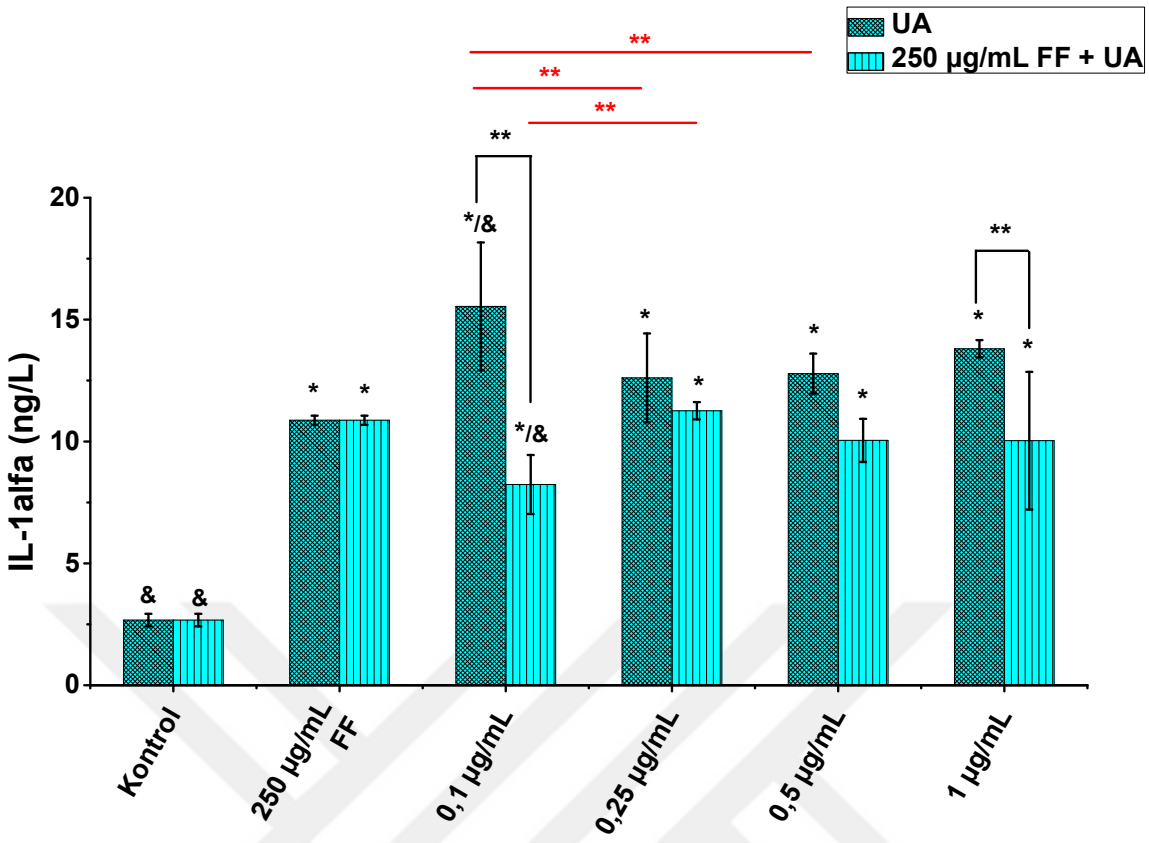
Alzheimer hastalığı (AH) modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde 25-250 µg/mL derişimde naringin uygulamasının IL-1α düzeylerini artırdığı gözlenmiş olup FF ile AH modeli oluşturulan hücrelerde ise artan IL-1α düzeyleri 25-250 µg/mL derişimde naringin uygulaması ile azalmış olsa da 25 ve 50 µg/mL derişimde naringin uygulanan hücrelerde bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin interlökin (IL)-1α düzeyleri üzerine etkileri. ***

*Negatif kontrol (%1 DMSO DMEM) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).
***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

Alzheimer hastalığı (AH) modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde 0,1-1 µg/mL derişimde ursolik asit uygulamasının IL-1α düzeylerini artırdığı gözlenmiş olup FF ile AH modeli oluşturulan hücrelerde ise artan IL-1α düzeyleri 0,1-1 µg/mL derişimde ursolik asit uygulaması ile azalmış olsa da 0,25, 0,5 ve 1 µg/mL derişimde ursolik asit uygulanan hücrelerde bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.25).

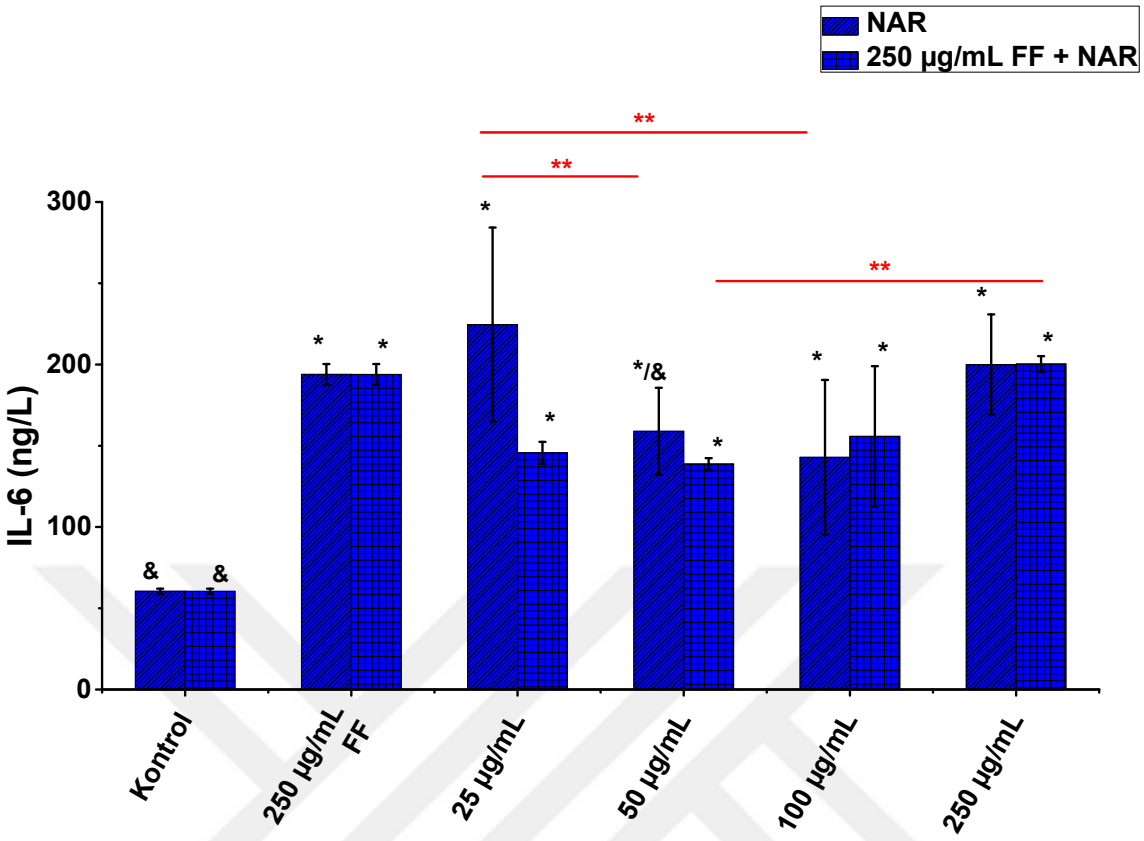


Şekil 4.25. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin interlökin (IL)-1α düzeyleri üzerine etkileri. ***

*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).
***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.5.2. İnterlökin-6 (IL-6) Düzeylerinin Ölçümü Bulguları

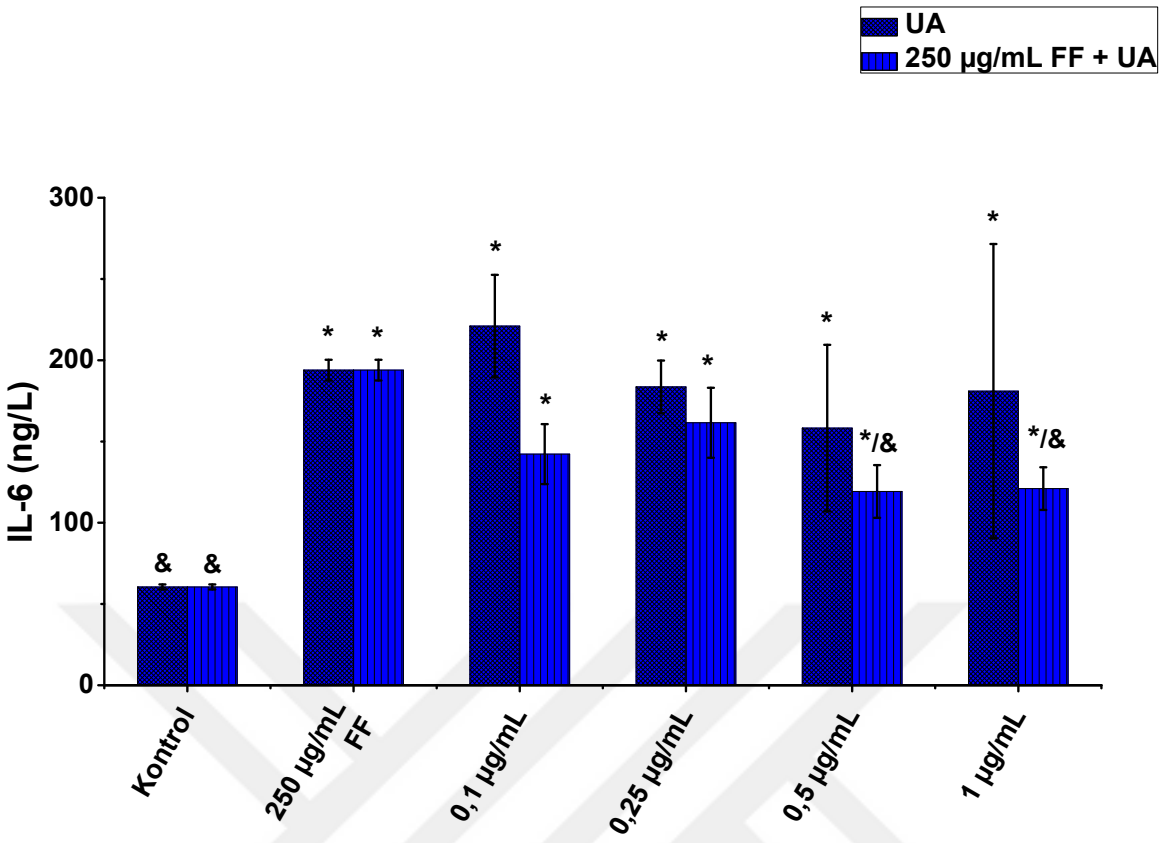
Alzheimer hastalığı (AH) modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde 25-250 µg/mL derişimde naringin uygulamasının IL-6 düzeylerini artırdığı gözlenmiş olup FF ile AH modeli oluşturulan hücrelerde ise artan IL-6 düzeyleri 25-250 µg/mL derişimde naringin uygulaması ile azalmış olsa da bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin IL-6 düzeyleri üzerine etkileri. ***

*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).
***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

Alzheimer hastalığı (AH) modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde 0,1-1 µg/mL derişimde ursolik asit uygulamasının IL-6 düzeylerini artırdığı gözlenmiş olup FF ile AH modeli oluşturulan hücrelerde ise artan IL-6 düzeyleri 0,1-1 µg/mL derişimde ursolik asit uygulaması ile azalmış olsa da 0,1 ve 0,25 µg/mL derişimde ursolik asit uygulamasının neden olduğu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.27).

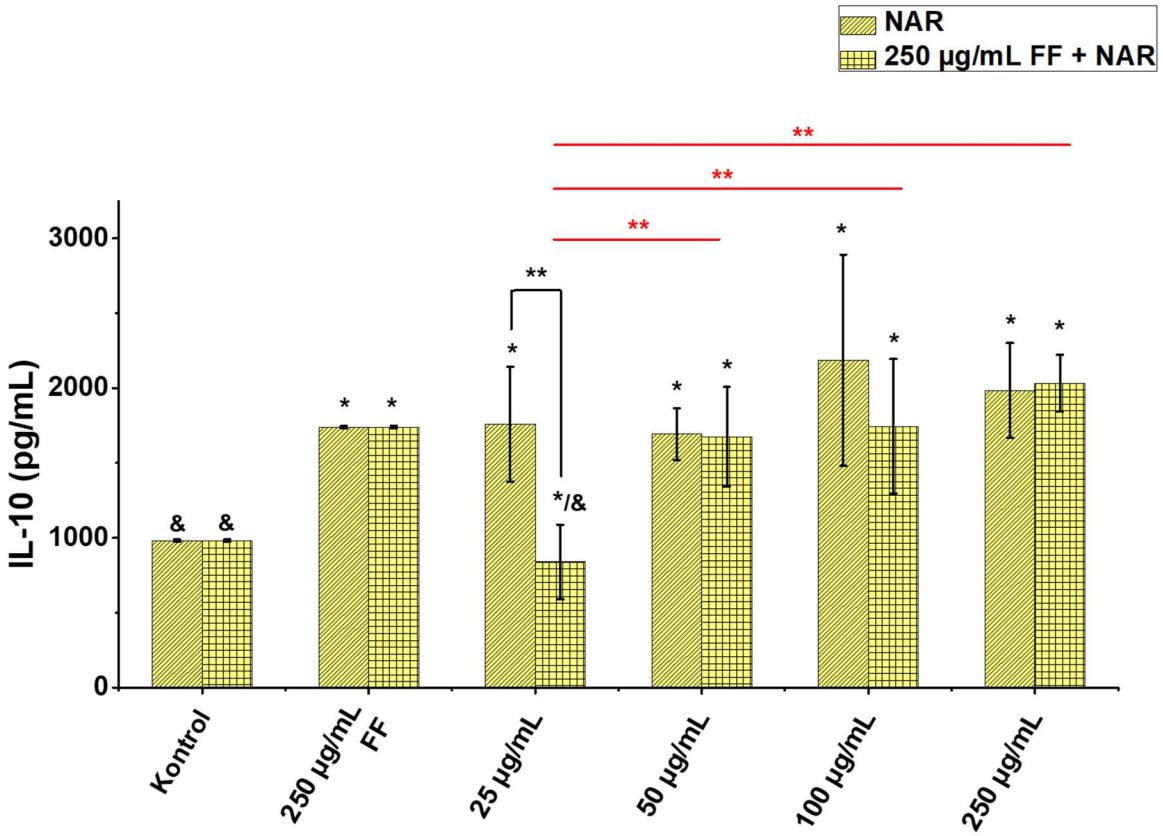


Şekil 4.27. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin IL-6 düzeyleri üzerine etkileri.**

*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).
**Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.5.3. İnterlökin-10 (IL-10) Düzeylerinin Ölçümü Bulguları

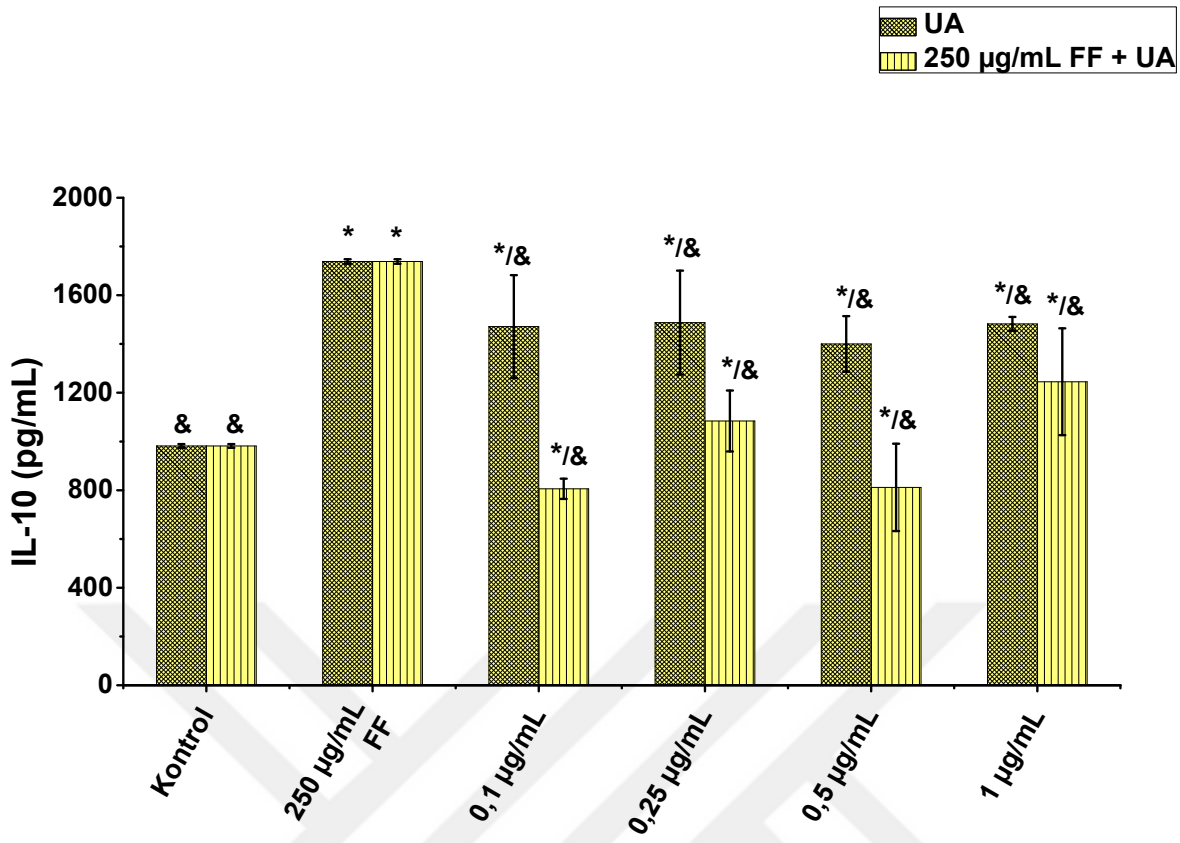
Difenilalanin (FF) ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerine 25 µg/mL derişimde naringin uygulamasının FF uygulaması ile artan IL-10 düzeylerini azalttığı bulunmuştur. Bununla birlikte, AH modeli oluşturulmayan hücrelerde 25-250 µg/mL derişimde naringin uygulamasının IL-10 düzeylerini artırmış olması dikkat çekicidir ($p<0,05$) (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin IL-10 düzeyleri üzerine etkileri.***

*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).
***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

Difenilalanin (FF) ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerine 0,1-1 µg/mL derişimde ursolik asit uygulamasının FF uygulaması ile artan IL-10 düzeylerini azalttığı bulunmuştur. Bununla birlikte, AH modeli oluşturulmayan hücrelerde de aynı derişimlerde ursolik asit uygulamasının IL-10 düzeylerini artırmış olması dikkat çekicidir ($p<0,05$) (Şekil 4.29).



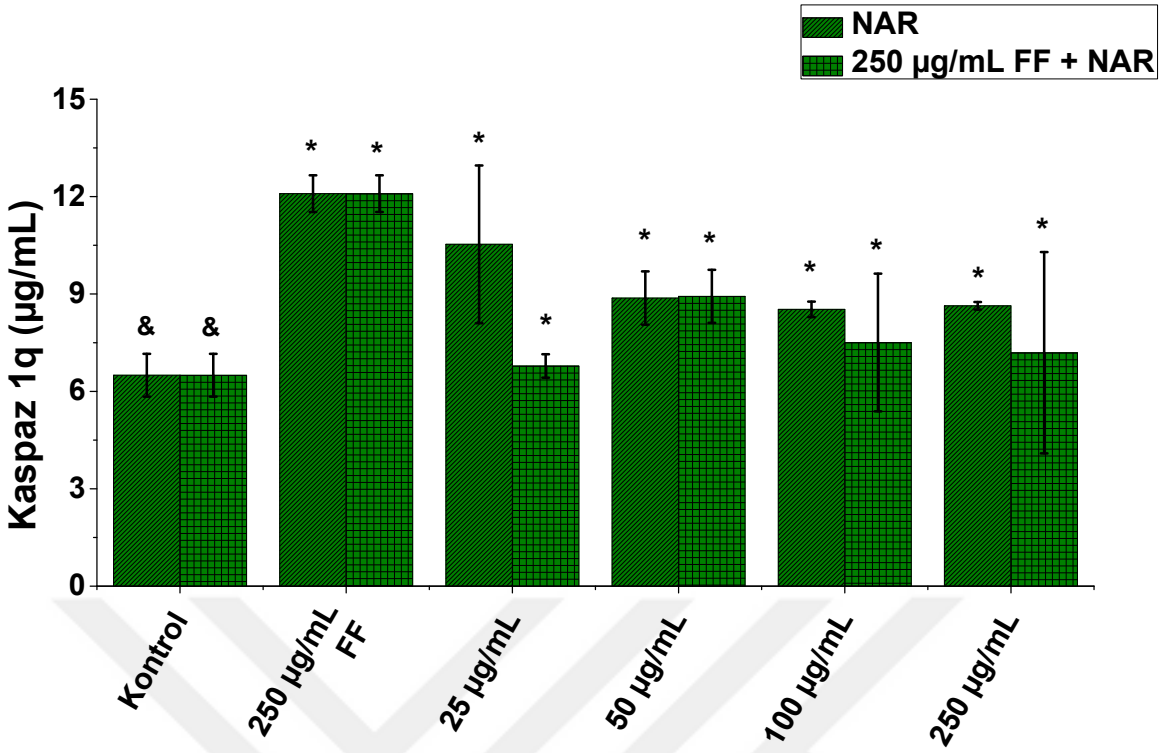
Şekil 4.29. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin IL-10 düzeyleri üzerine etkileri.**

*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).

**Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.5.4. Kaspaz 1q (C1q) Düzeylerinin Ölçümü Bulguları

Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde 25-250 µg/mL naringin uygulamasının C1q düzeylerini artırmış olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, FF uygulaması ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde artmış olan C1q düzeyleri naringin uygulaması ile birlikte azalmış olsa da bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p<0,05$) (Şekil 4.30).

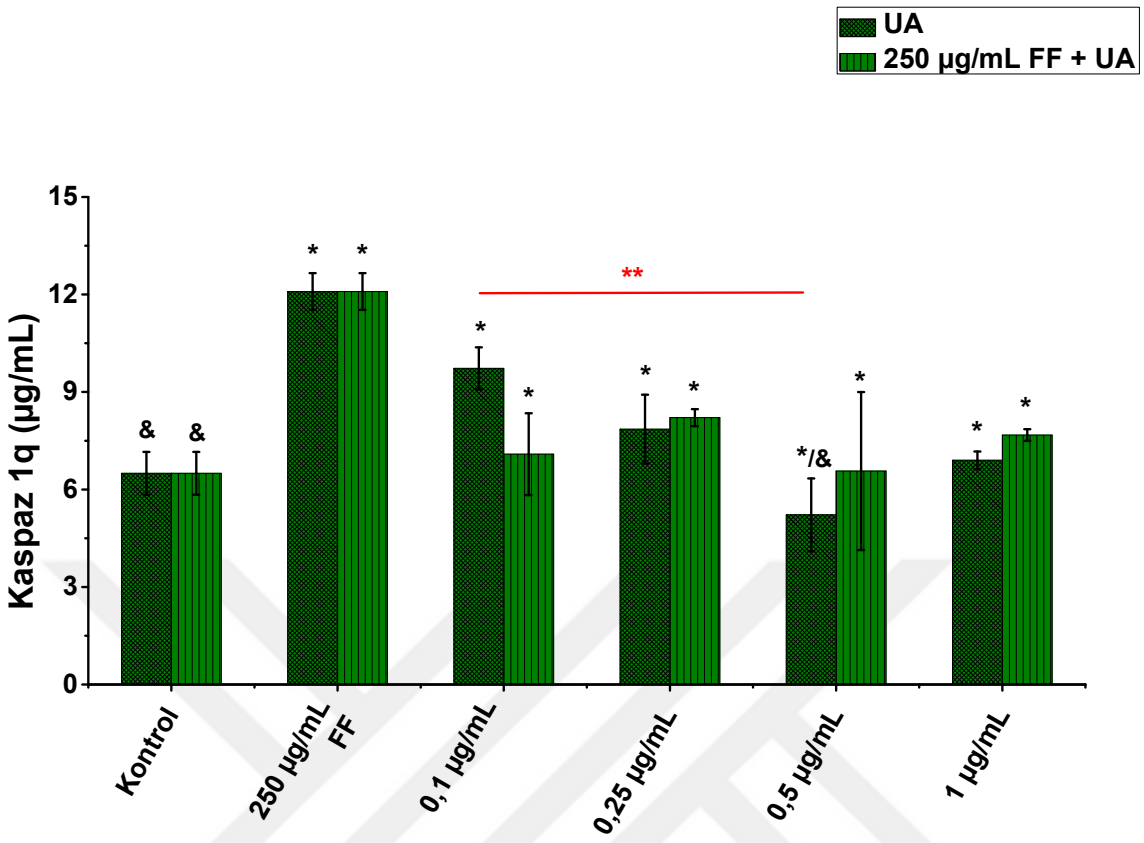


Şekil 4.30. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin kaspaz 1q (C1q) düzeyleri üzerine etkileri.**

*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).

**Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde 0,1-1 µg/mL ursolik asit uygulamasının C1q düzeylerini artırmış olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, FF uygulaması ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde artmış olan C1q düzeyleri ursolik asit uygulaması ile birlikte azalmış olsa da sadece 0,25 µg/mL ursolik asit uygulanan hücrelerdeki C1q düzeylerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$) (Şekil 4.31).

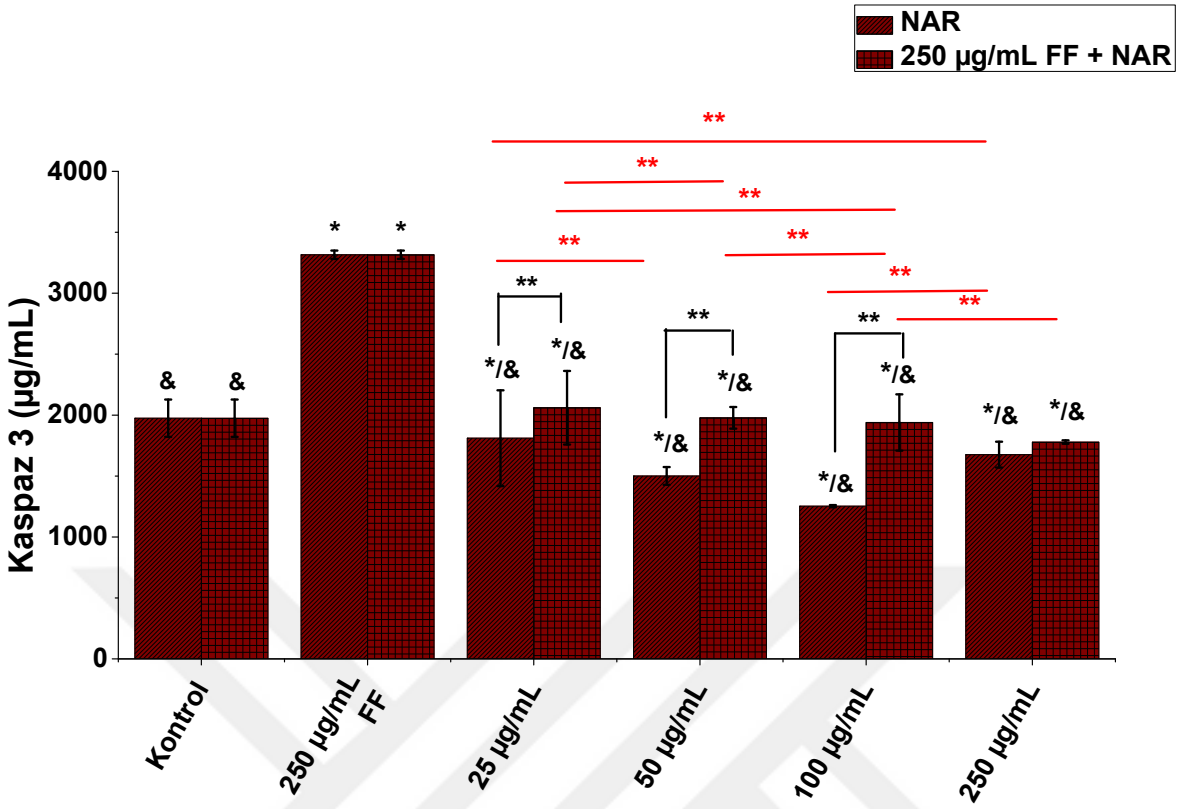


Şekil 4.31. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin kaspaz 1q (C1q) düzeyleri üzerine etkileri. ***

*Negatif kontrol (%1 DMSO DMEM) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).
***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.5.5. Kaspaz 3 (C3) Düzeylerinin Ölçümü Bulguları

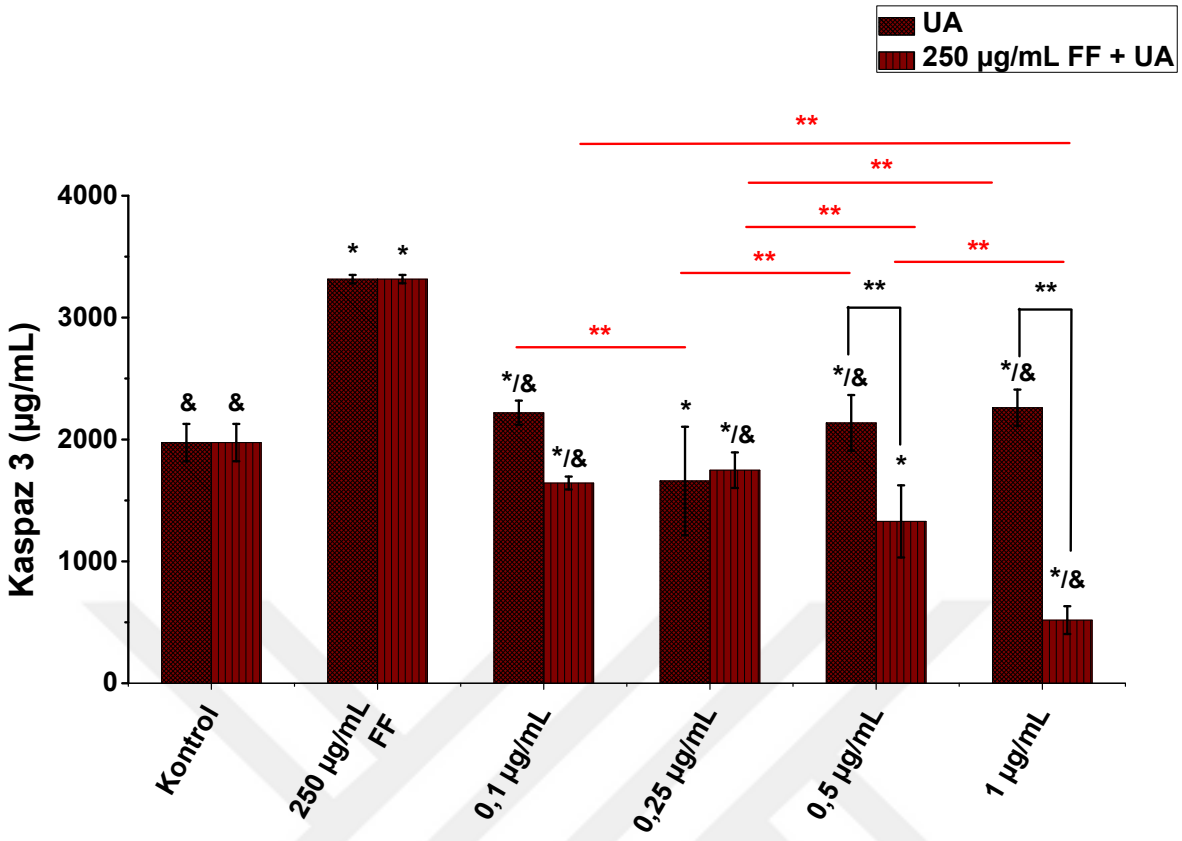
Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde 25-250 µg/mL naringin uygulamasının C3 düzeylerini önemli derecede azaltmış olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, FF uygulaması ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde artmış olan C3 düzeylerinin de aynı derişimlerdeki naringin uygulaması ile birlikte önemli derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin kaspaz 3 (C3) düzeyleri üzerine etkileri. ***

*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).
***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde 0,1-1 µg/mL ursolik asit uygulamasının C3 düzeylerini önemli derecede azaltmış olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, FF uygulaması ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde artmış olan C3 düzeylerinin de aynı derişimlerdeki ursolik asit uygulaması ile birlikte önemli derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.33).

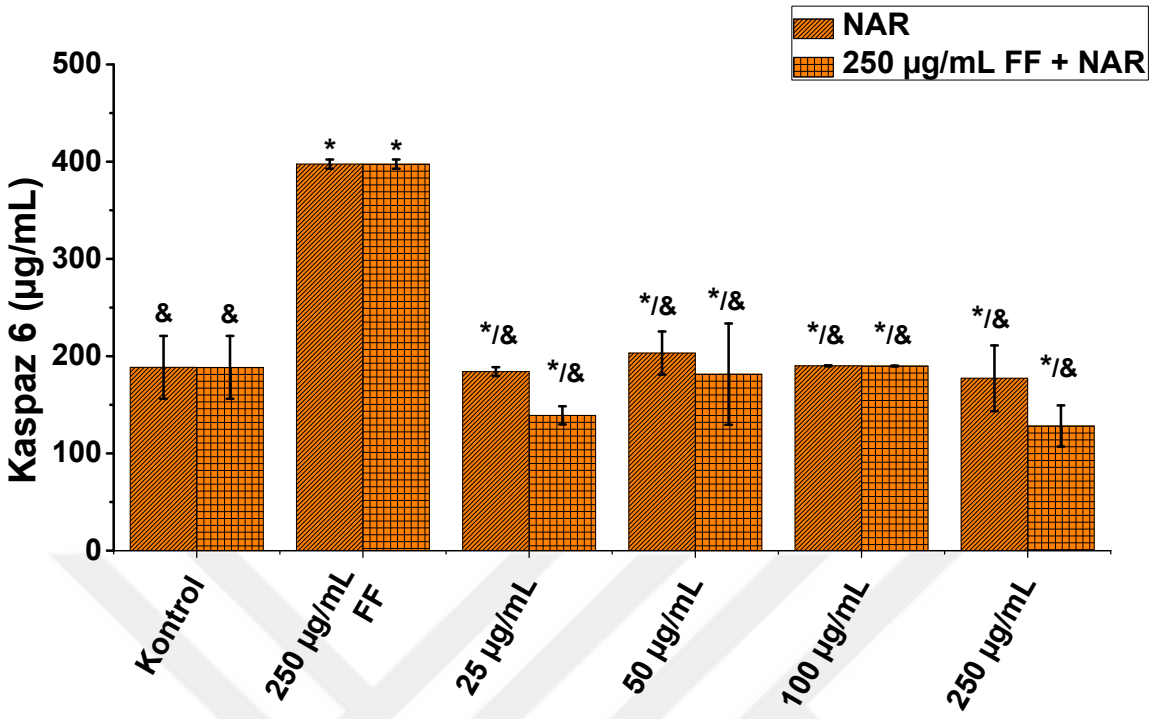


Şekil 4.33. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asit uygulamasının kaspaz 3 (C3) düzeyleri üzerine etkileri.***

*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).
***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.5.6. Kaspaz 6 (C6) Düzeyleri

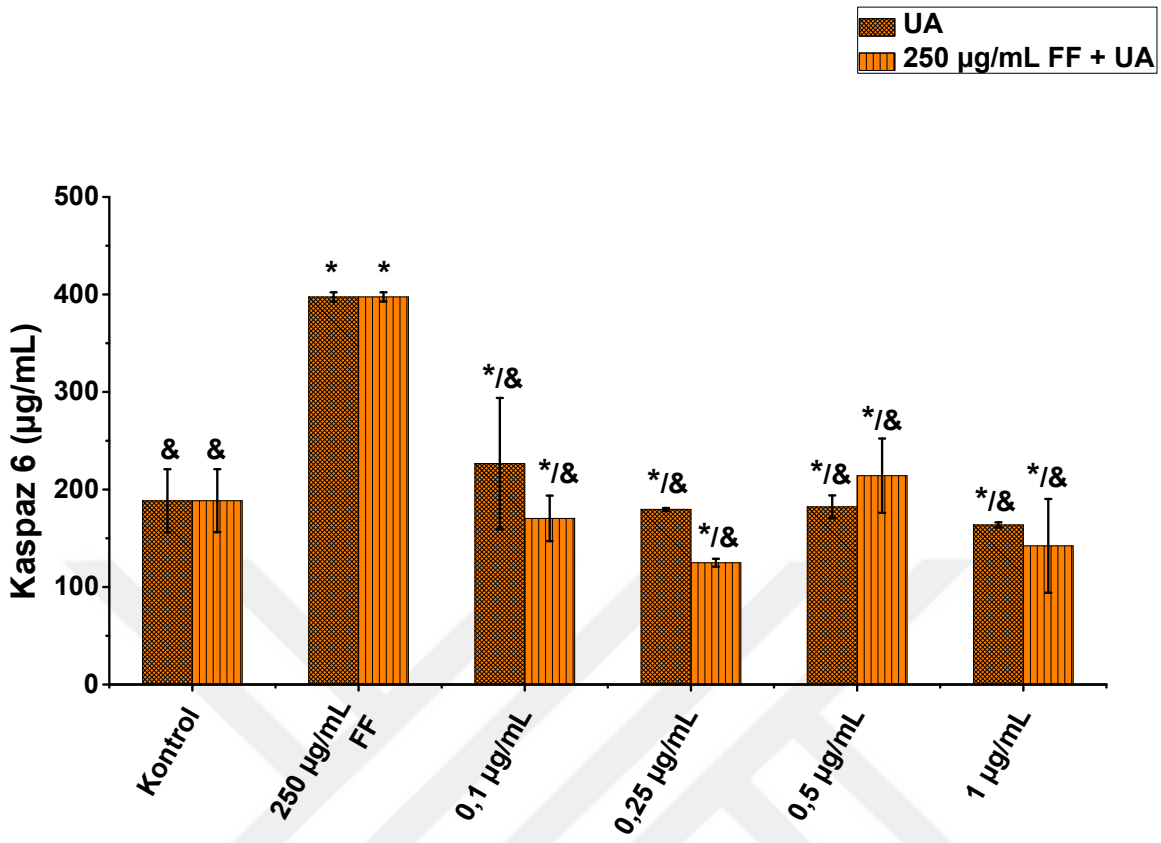
Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde 25-250 µg/mL naringin uygulamasının C6 düzeylerini önemli derecede azaltmış olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, FF uygulaması ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde artmış olan C6 düzeylerinin de aynı derişimlerdeki naringin uygulaması ile birlikte önemli derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin kaspaz 6 (C6) düzeyleri üzerine etkileri.**

*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).
**Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde 0,1-1 µg/mL ursolik asit uygulamasının C6 düzeylerini önemli derecede azaltmış olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, FF uygulaması ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde artmış olan C6 düzeylerinin de aynı derişimlerdeki ursolik asit uygulaması ile birlikte önemli derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.35).

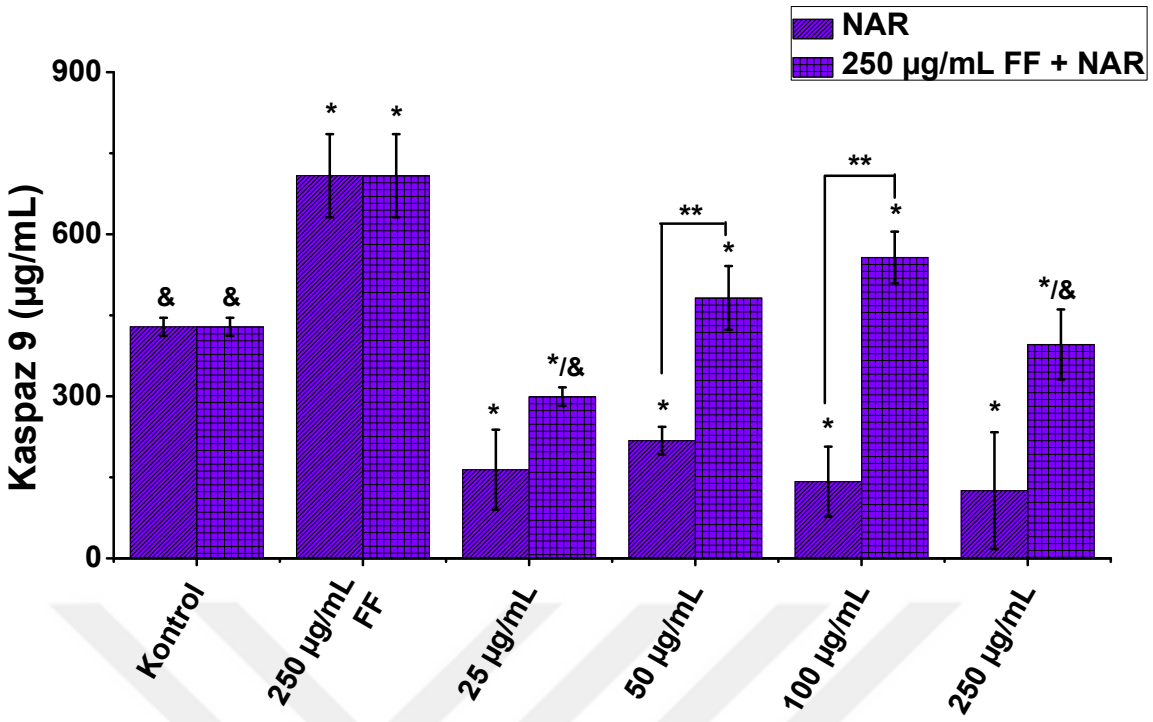


Şekil 4.35. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin kaspaz 6 (C6) düzeyleri üzerine etkileri.**

*Negatif kontrol (DMEM (%1 DMSO)) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).
**Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.5.7. Kaspaz 9 (C9) Düzeyleri

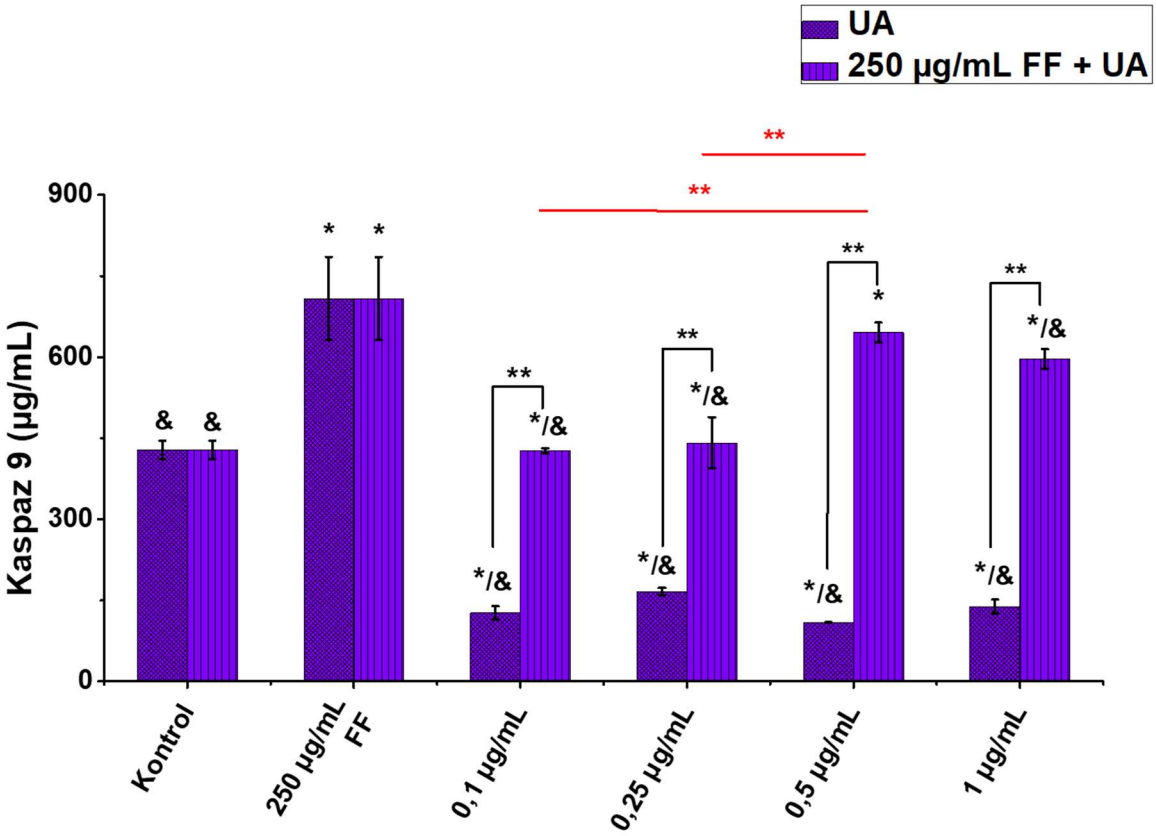
Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde 25-250 µg/mL naringin uygulamasının C9 düzeylerini önemli derecede azaltmış olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, FF uygulaması ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde artmış olan C9 düzeylerinin de 25 ve 250 µg/mL naringin uygulaması ile birlikte önemli derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin kaspaz 9 (C9) düzeyleri üzerine etkileri. ***

*Negatif kontrol (%1 DMSO DMEM) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).
***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde 0,1-1 µg/mL ursolik asit uygulamasının C9 düzeylerini önemli derecede azaltmış olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, FF uygulaması ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde artmış olan C9 düzeylerinin de aynı derişimlerde ursolik asit uygulaması ile birlikte önemli derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.37).

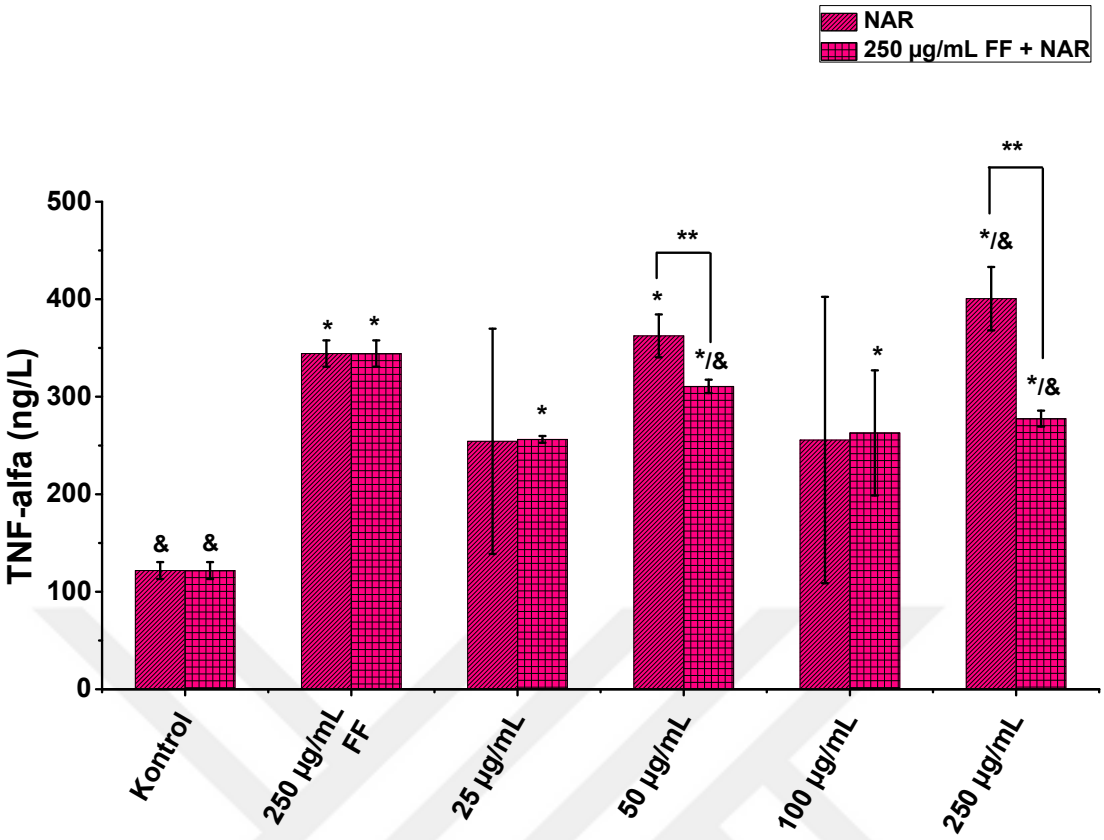


Şekil 4.37. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin kaspaz 9 (C9) düzeyleri üzerine etkileri.***

*Negatif kontrol (%1 DMSO DMEM) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).
***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.5.8. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF-α) Düzeylerinin Ölçümü

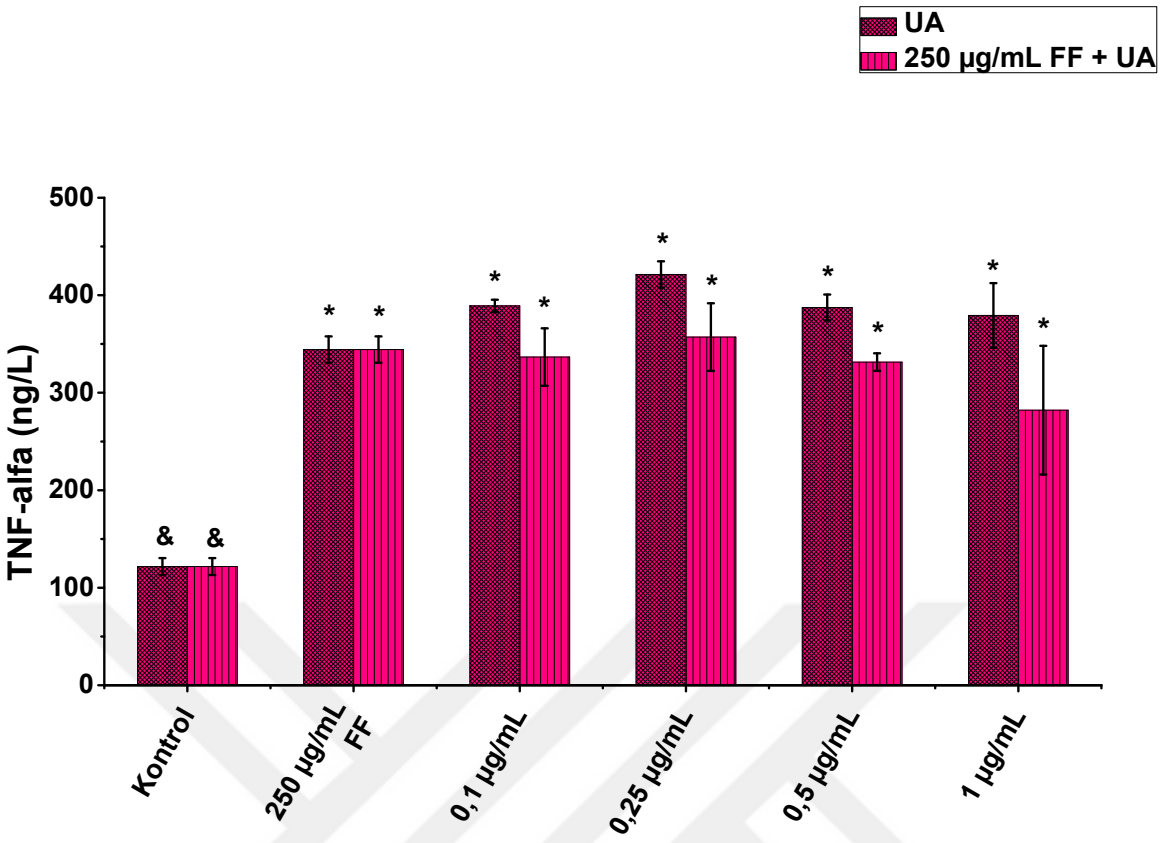
Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde 50 ve 250 µg/mL naringin uygulamasının TNF-α düzeylerini önemli derecede artırmış olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, FF uygulaması ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde artmış olan TNF-α düzeylerinin de 50 ve 250 µg/mL naringin uygulaması ile birlikte önemli derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin TNF-α düzeyleri üzerine etkileri. ***

*Negatif kontrol (%1 DMSO DMEM) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).
***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde 0,1-1 µg/mL ursolik asit uygulamasının TNF-α düzeylerini önemli derecede artırmış olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, FF uygulaması ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde artmış olan TNF-α düzeylerinin de belirtilen derişimlerde ursolik asit uygulaması ile azalmış olduğu saptansa da bu değişiklik istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p<0,05$) (Şekil 4.39).

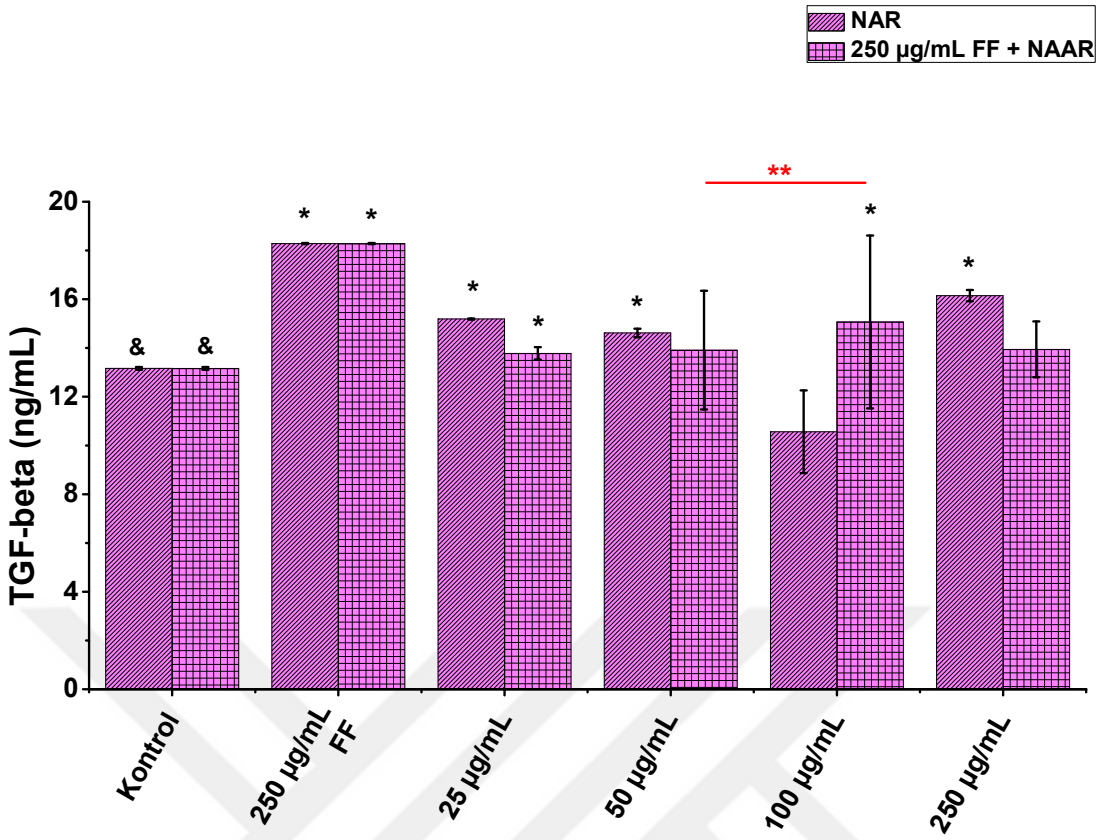


Şekil 4.39. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin tümör nekroz faktör (TNF)-α düzeyleri üzerine etkileri. **

*Negatif kontrol (%1 DMSO DMEM) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).
**Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.5.9. Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta (TGF-β) Ölçümü

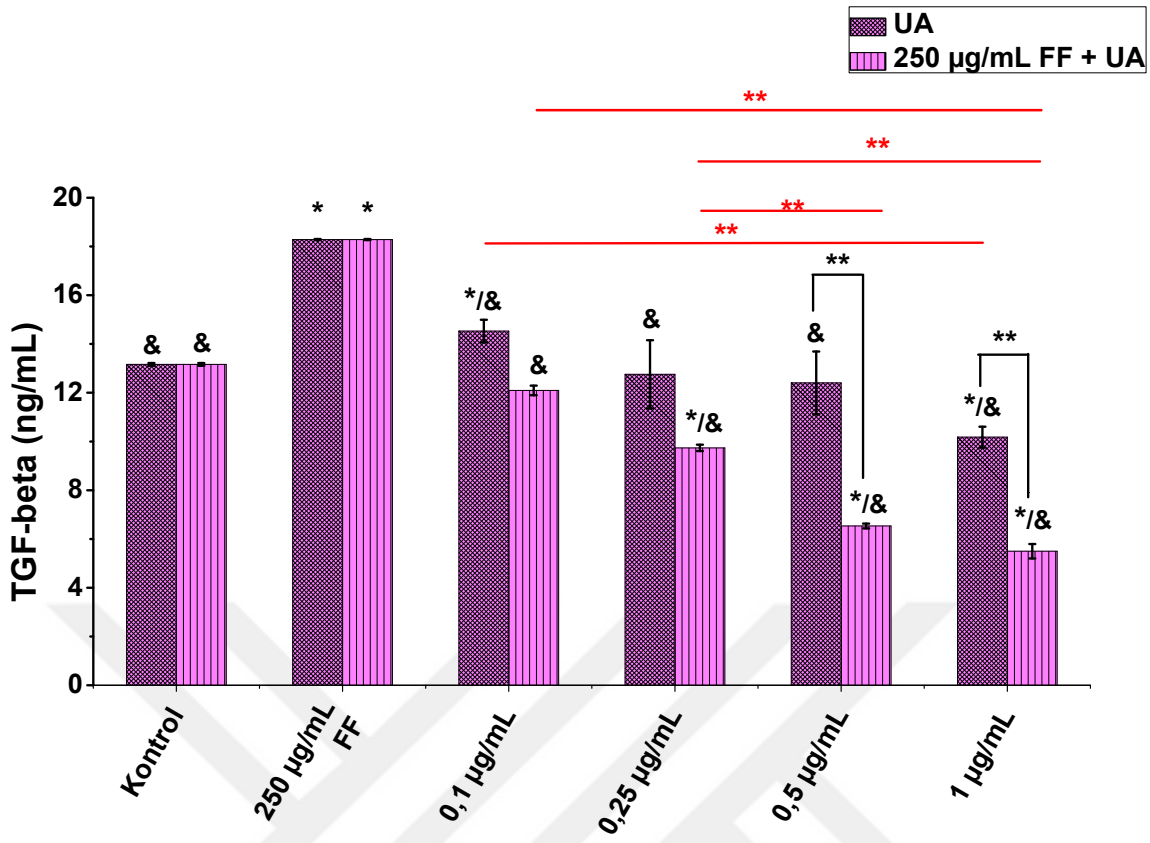
Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde 25-250 µg/mL naringin uygulamasının TGF-β düzeylerini önemli derecede artırmış olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, FF uygulaması ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde artmış olan TGF-β düzeyleri üzerine naringinin etkisi saptanmamıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.40).



Şekil 4.40. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)-β düzeyleri üzerine etkileri. ***

*Negatif kontrol (%1 DMSO DMEM) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).
***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde 0,1 µg/mL ursolik asit uygulamasının TGF-β düzeylerini önemli derecede artırmış olduğu ve 1 µg/mL ursolik asit uygulamasının TGF-β düzeylerini önemli derecede azaltmış olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, FF uygulaması ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde artmış olan TGF-β düzeylerinin de 0,1-1 µg/mL ursolik asit uygulaması ile önemli derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.41).

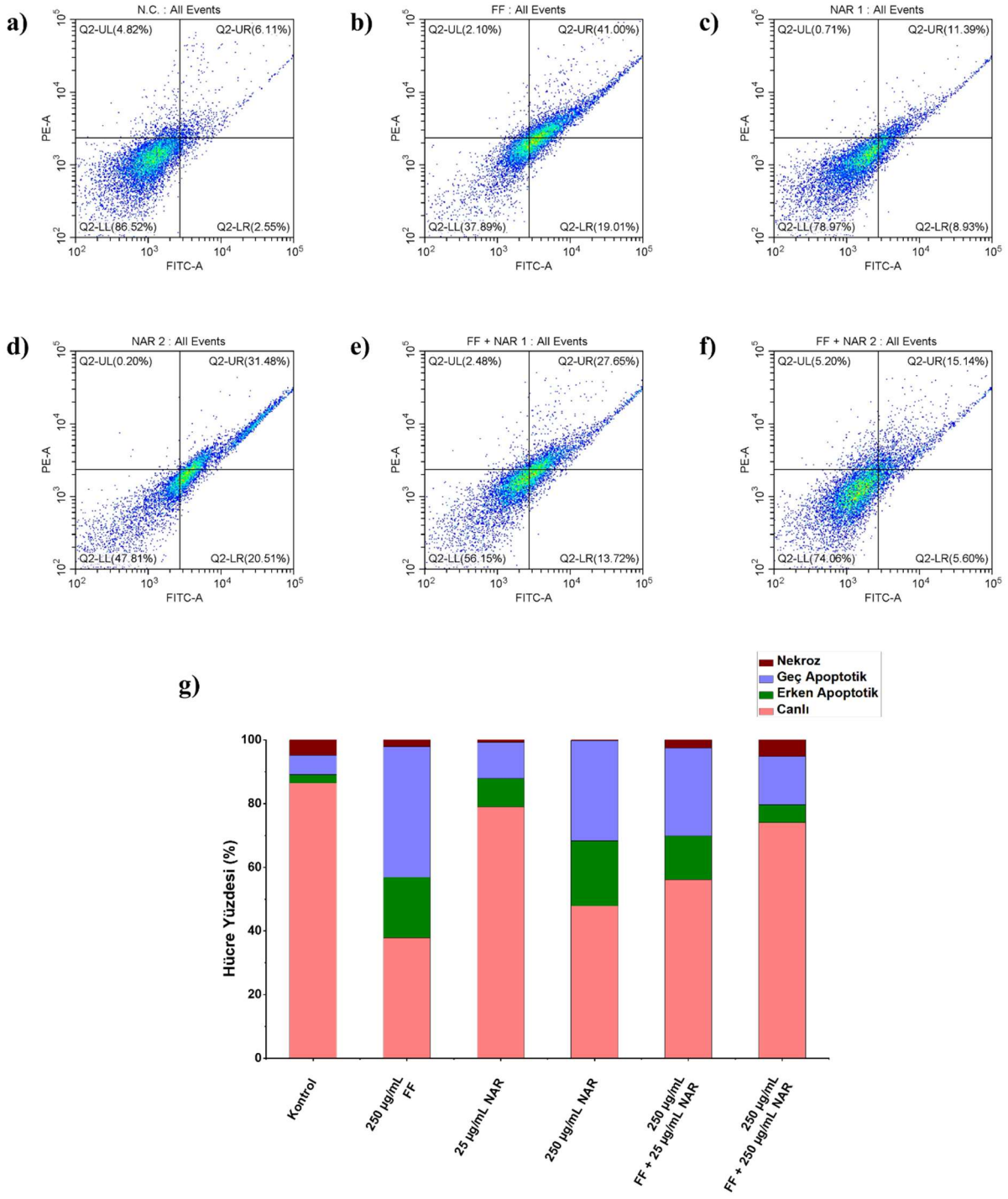


Şekil 4.41. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)-β düzeyleri üzerine etkileri. ***

*Negatif kontrol (%1 DMSO DMEM) ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); & 250 µg/mL FF ile karşılaştırılmıştır ($p<0,05$); **Gruplar karşılaştırılmıştır ($p<0,05$).
***Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.6. Apoptoz Üzerine Etkilerin Değerlendirilmesi

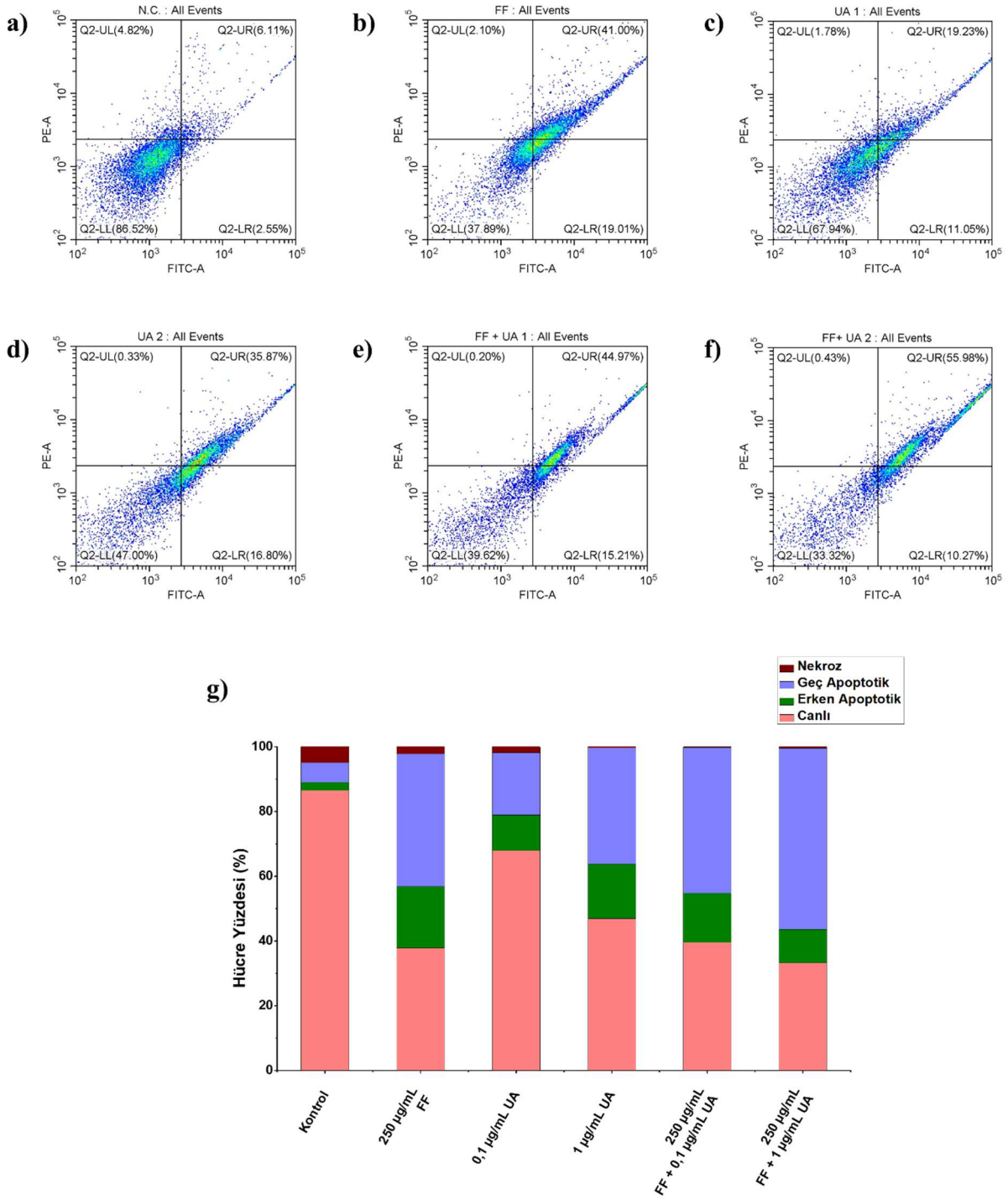
SH-SY5Y hücrelerinde ve FF ile AH modeli oluşturtulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin apoptoz üzerine etkileri Şekil 4.42'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere negatif kontrol hücrelerinde (DMEM (%1 DMSO)) canlı hücrelerin oranı %85'in üzerinde olup; nekroz, erken ve geç apoptotik hücreler toplam hücrelerin %15'ini oluşturmaktadır. FF ile AH modeli oluşturulan hücrelerde ise canlı hücre sayısının azaldığı ve apoptotik hücrelerin arttığı görülmüştür. Hücrelere 25 ve 250 µg/mL derişimdeki naringin uygulamasının apoptotik hücre sayısını doza bağlı arttırdığı, fakat FF'nin neden olduğu apoptotik hücre sayısındaki artışı azalttığı ve canlı hücre sayısını artırdığı gözlenmiştir. Bununla birlikte FF uygulanan hücrelerde 250 µg/mL naringinin nekrotik hücre sayısını da artırdığı saptanmıştır.



Şekil 4.42. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin apoptoz üzerine etkileri.

Şekil 4.43'te ursolik asidin ve FF'nin SH-SY5Y hücrelerinde apoptoz üzerine etkileri verilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere negatif kontrol hücrelerinde canlı hücrelerin oranı %85'in üzerinde olup; nekroz, erken ve geç apoptotik hücreler toplam hücrelerin %15'ini

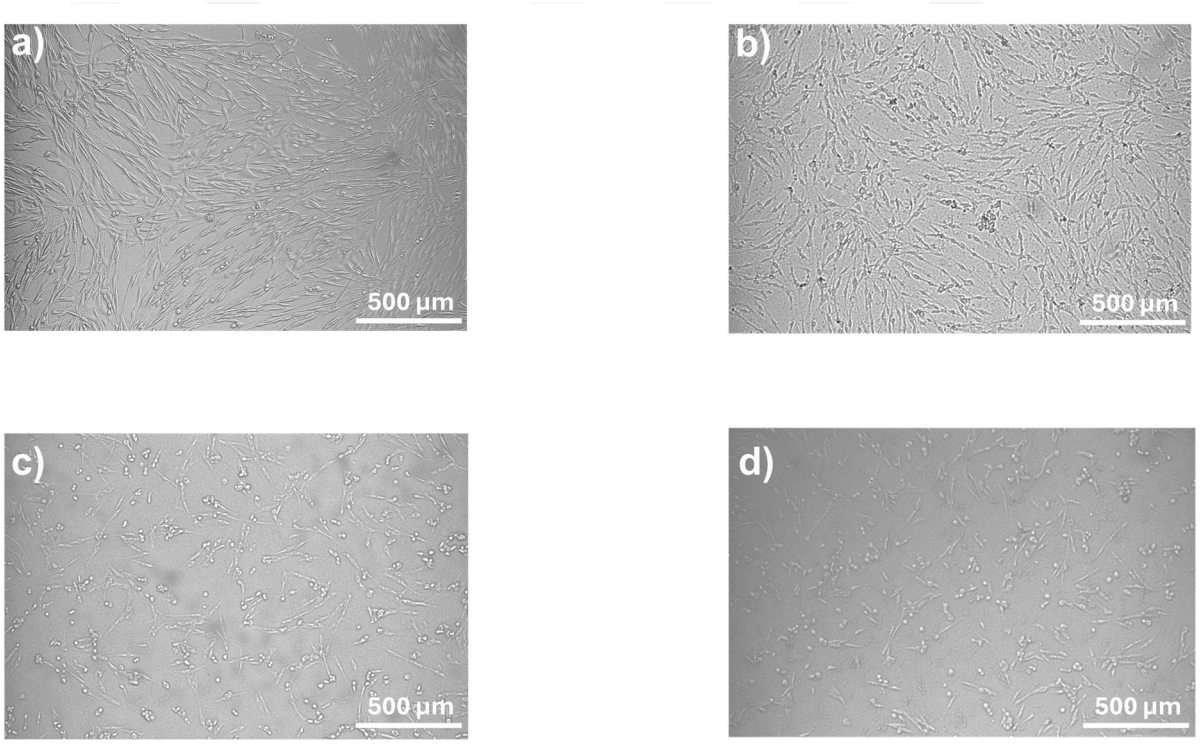
oluşturmaktadır. FF ile AH modeli oluşturulan hücrelerde ise canlı hücre sayısının azaldığı ve apoptotik hücrelerin arttığı görülmüştür. Hücrelere uygulanan 0,1 ve 1 µg/mL derişimdeki ursolik asit uygulamasının apoptotik hücre sayısını doza bağlı arttırdığı, aynı zamanda FF'nin neden olduğu apoptotik hücre sayısındaki artışı da artırdığı gözlenmiştir.



Şekil 4.43. SH-SY5Y hücreleri ve difenilalanin (FF) ile Alzheimer Hastalığı (AH) modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin apoptoz üzerine etkileri.

4.7. Naringin ve Ursolik Asidin Amiloid Plak Oluşumuna Olan Etkilerinin Değerlendirilmesi

Şekil 4.44(a)'da %1 DMSO ile 24 saat süre ile maruz bırakılan SH-SY5Y hücrelerinin; Şekil 4.44(b)'de ise 250 µg/mL derişimde FF 24 saat süre ile maruziyet sonrası AH modeli oluşturulan hücrelerin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri verilmiştir. Görüntüler incelendiğinde FF ile uygulanan hücrelerde amiloid plakların birikimi belirgin şekilde görülmektedir. Şekil 4.44(c)'de FF ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde 250 µg/mL derişimde naringin uygulamasının ve Şekil 4.44(d)'de FF ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde 1 µg/mL derişimde ursolik asit uygulamasının hücrelerde neden olduğu değişiklikler incelendiğinde ise hücrelerde oluşan amiloid plakların azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.44. SH-SY5Y hücrelerinin a) %1 DMSO, b) 250 µg/mL difenilalanin (FF), c) 250 µg/mL naringin, d) 1 µg/mL ursolik aside 24 saat maruziyet sonrası ışık mikroskobu altındaki görüntüleri.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında fitokimyasal bileşikler olan naringin ve ursolik asidin AH'ye karşı etkileri *in vitro* ortamda değerlendirilerek hastalığın tedavisindeki olası etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Antioksidan aktiviteye sahip olan fenolik bileşikler, fitokimyasal maddeler grubunun bir üyesidir. Bu özelliklerinden dolayı oksidatif strese bağlı hastalıkların önlenmesinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bazı fenolik antioksidanların yüksek dozlarda prooksidan etki gösterebileceği de ileri sürülmektedir [315]. Ayrıca bazı fenolik bileşikler ve polifenoller AH'de önemli rol oynayan Aβ proteinlerinin toksik agregasyon süreçlerini engelleyici etkiler göstermektedir. Özellikle mirisetin, kurkumin, ferulik asit, rosmarinik asit gibi doğal bileşiklerin hem *in vitro* hem de *in vivo* Aβ agregasyonunu azaltabildiği ve bazı durumlarda bilişsel bozulmayı hafiflettiği vurgulanmaktadır. Fakat yapılan diğer çalışmalarda bu etkilerin her zaman tutarlı olmadığı örneğin kurkumin ve nordihidroguaiaretik asidin (NDGA) bazı çalışmalarda Aβ oligomerlerinin oluşumunu engelleyip fibril oluşumunu destekleyebildiği bildirilmektedir. Bu durum, fenolik bileşiklerin Aβ ile etkileşimlerinin hem güçlü hem de karmaşık olduğunu göstermektedir [316].

Naringin, turunçgillerden ekstrakte edilebilen en önemli flavonoidlerden biridir. Güçlü antioksidan, antienflamatuvar, antiapoptotik, antiülser, antiosteoporoz ve antikanser özellikleri nedeniyle önem kazanmıştır [24]. Yapılan çalışmalar, naringinin oksidatif hasarı azaltabileceğini ve beyin, *striatum* ve hipokampusta iskemik reperfüzyonun neden olduğu histopatolojik değişiklikleri en aza indirebileceğini göstermiştir [25]. Ayrıca, önceki araştırmalar, naringinin AH'ye sahip transgenik farelerde uzun süreli hafızayı geliştirebileceğini ve nöroprotektif bir ajan olarak kullanılabileceğini belirtmektedir [26].

Ursolik asit, terapötik potansiyele sahip bir pentasiklik triterpenoid olarak tanımlanmaktadır [138]. Ursolik asit ile yapılmış birçok çalışmada farklı biyolojik etkileri gösterilmiştir. Bunlar sinir sistemini koruyucu [153,317], antikanser [154-156], antimikrobiyal [157,158], antihiperlipidemik [159], hepatoprotektif [27], antienflamatuvar, antioksidan [160] ve antidiyabetik [30], kardiyovasküler sistemi koruyucu [161] etkilerini içerir. Bu özellikleri, ursolik asidin kanserde, bakteriyel enfeksiyonlarda, diyabette, AH'de, immünolojik hastalıklarda önleyici veya terapötik bir ajan olabileceğini göstermektedir. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalar, ursolik asidin hem endojen hem de eksojen enflamatuvar uyarıcılara karşı etkili olduğunu ve olumlu antienflamatuvar etkilere sahip olduğunu göstermiştir.

Alzheimer hastalığında (AH), beyin hücrelerinde Aβ yapısındaki 42 zincirli proteinlerin çökmesiyle plaklar meydana gelmekte ve bilişsel fonksiyonlar bozulmaktadır. Bu 42 zincirli proteinlerin 19. ve 20. pozisyonlarında yer alan FF dipeptit yapısının, proteinin kendi kendine bir araya gelme özelliğinden sorumlu olduğu düşünülmektedir [318]. Bu nedenle AH modeli için FF yapısı kullanılarak bir *in vitro* AH modeli oluşturulmuştur. Bu amaçla, öncelikle FF yapısının altı farklı çözücüde (2-propanol, DMSO, etanol, HFIP, metanol ve su) kendi kendine bir araya gelme davranışları incelenmiş; ardından insan nöroblastoma hücrelerinde sitotoksisiteleri ve plak oluşturma kapasiteleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, FF'nin, SH-SY5Y hücrelerinde DMSO içinde hazırlanmış 250 μg/mL'lik çözeltisine 24 saatlik maruziyet sonrası maliyet etkin ve hızlı bir şekilde *in vitro* bir AH modeli oluşturma potansiyeline sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Çalışılan farklı çözücü ortamlarında düzenlenme sonrası oluşan yapılar arasındaki farklılıkları açıklayabilmek için çözücülerin dielektrik sabitlerinin karşılaştırılması, H bağı oluşturma kapasiteleri, çözünürlükleri ve polariteleri gibi farklı yaklaşımlar kullanılabilir. FF-çözücü etkileşimleri dielektrik sabiti açısından incelendiğinde, dielektrik sabitin büyüklüğü hakkında yorum yapılabilir. Bu bakış açısıyla değerlendirildiğinde, dielektrik sabiti 4'ten büyük olan çözücüler, FF dipeptit molekülünün hidrofilik baş grupları ile etkileşime girme ve bu grupları çözme eğilimindedir. Öte yandan, dielektrik sabiti 4'ten küçük olan çözücüler, dipeptit moleküllerini geri dönüşümlü misel yapılar oluşturacak veya ağ benzeri yapılara organize olacak şekilde zorlamaktadır. Böylece hidrofilik grup sayısı azalır. Bu çalışmada kullanılan protik çözücüler, iyonik molekülleri hidrojen bağları aracılığıyla çok iyi çevrelemektedir. Buradaki düzenlenmede hidrofobik etkileşimlerin ve molekül içi hidrojen bağlarının etkili olduğu düşünülmektedir. FF dipeptit molekülleri arasındaki hidrofobik etkileşimler, düzenlenmenin ilk aşamasında aktif hale gelmekte ve molekül üzerinde enerji dağılımı sağlayarak yönlenmeyi ve düzenlenmeyi etkilemektedir. Etkileşim sonrasında dipeptidler başlangıçta uzamış pileli levhalar (pleated sheets) oluşturur. Bu yapılar daha sonra enerjilerini azaltmak amacıyla tüpler ve küreler gibi son şekillerini almaktadır [319,320].

Farklı çözücülerdeki FF dipeptitlerinin kendi kendine bir araya gelme davranışlarının belirlenmesinin ardından, hazırlanan çözeltilerin nöroblastoma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde, tüm çözücülerde hazırlanan FF çözeltilerinin konsantrasyon artışına bağlı olarak SH-SY5Y hücrelerinin yaşamsal aktivitelerinde bir azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, etanol ve su kullanılarak hazırlanan FF çözeltilerinin daha düşük sitotoksik etkilere yol açtığı görülmüştür. Bununla

birlikte, hücreler üzerinde en belirgin sitotoksik etkiyi gösteren çözeltinin HFIP ile hazırlanan çözelti olduğu da belirlenmiştir.

Bilişsel bozukluk derecesiyle korelasyon gösteren kolinerjik aktivitedeki azalma, ACh sentezi için hız sınırlayıcı bir enzim olan kolin asetiltransferaz ve ACh'yi hidrolize eden enzim olan AChE düzeylerindeki düşüş ile ilişkilendirilmektedir [321]. Ayrıca, bir Tip I transmembran glikoproteini olan APP'nin metabolizması sonucu üretilen Aβ peptidinin beyinde birikmesinin, AH sürecinin başlangıcı olduğu düşünülmektedir. Birçok çalışma, beyinde Aβ birikiminin tau fosforilasyonunu, nörofibriler yumak (NFT) oluşumunu, sinaps kaybını, nöronal ölümü ve bilişsel bozuklukları tetiklediğini de bildirmiştir [322]. Bu nedenle, AChE, Aβ, APP ve tau seviyeleri AH biyogöstergeleri olarak kullanılabilir. Bu bilgiler doğrultusunda, çözeltilerin hücrelerde amiloid plak birikimi üzerindeki etkileri mikroskop görüntüleri yardımıyla belirlendikten sonra, her bir çözeltinin AH biyogöstergeleri olan AChE, Aβ, APP ve tau protein seviyeleri üzerindeki etkileri incelenmiş ve böylece SH-SY5Y hücrelerinde FF çözeltileri ile bir *in vitro* AH modeli oluşturulma başarısı değerlendirilmiştir. FF dipeptitlerinin tüm çözeltilerinin, negatif kontrol grubuna kıyasla AH biyogöstergeleri düzeylerinde farklılıklar oluşturduğu görülmektedir. Ancak, AChE seviyelerindeki azalma ve Aβ, APP ve tau protein seviyelerindeki artış, özellikle DMSO ile hazırlanan çözeltide daha belirgin bir şekilde gözlemlenmiştir.

Alzheimer hastalığı (AH) modeli oluşturulduktan sonra hem model oluşturulmayan SH-SY5Y hücreleri hem de AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücreleri üzerinde naringinin ve ursolik asitin MTT yöntemi ile sitotoksisitesi araştırılmıştır.

SH-SY5Y hücrelerine naringinin 25 - 1000 µg/mL derişim aralığında 24 saat süreyle uygulanmasının ardından yapılan sitotoksisite değerlendirmesinde, naringinin 25-250 µg/mL derişim aralığında SH-SY5Y hücrelerinde anlamlı bir sitotoksik etki oluşturmadığı belirlenmiştir. Ancak 250 µg/mL'nin üzerindeki konsantrasyonlarda sitotoksik etkinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu doğrultuda, SH-SY5Y hücrelerinde naringinin IC_{50} değeri 654,04 µg/mL olarak saptanmıştır. Aynı konsantrasyon aralığında, AH modeli oluşturulmuş SH-SY5Y hücrelerinde yapılan değerlendirmede ise, naringinin 25-100 µg/mL konsantrasyonları düşük düzeyde sitotoksisite gösterirken, 100 µg/mL'nin üzerindeki konsantrasyonların hücreler üzerinde yüksek düzeyde sitotoksik etki oluşturduğu belirlenmiştir. AH modeli oluşturulmuş SH-SY5Y hücrelerinde naringinin IC_{50} değeri 833,47 µg/mL olarak bulunmuştur.

Qiu ve ark. tarafından, PC12 hücreleri üzerine naringinin sitotoksik etkisi araştırılmış ve 100 pM-1 µM konsantrasyon aralığında naringinin sitotoksik olmadığı görülmüştür. $A\beta_{25–35}$

ile modellenmiş PC12 hücrelerinde ise naringin 100 pM-100 µM konsantrasyon aralığında naringin uygulaması 1 µM konsantrasyonundaki naringinin PC12 hücrelerinde canlılığı anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür [130]. Başka bir çalışmada retononun SH-SY5Y hücrelerindeki sitotoksik etkisine karşılık hücrelere 1-5-10 µM konsantrasyonlarında naringin uygulanmasının bu hücrelerdeki retononun neden olduğu toksik etkiye koruma sağlamış oluğu ve hücre canlılığını anlamlı ölçüde artırdığı bildirilmektedir [90].

SH-SY5Y hücrelerine ursolik asidin 0,1-10 µg/mL konsantrasyon aralığında 24 saat süreyle uygulanmasının ardından yapılan sitotoksisite değerlendirmesinde, ursolik asidin 0,1-1 µg/mL aralığında hücre canlılığını %72'ye kadar düşürdüğü ve bu konsantrasyonların üzerindeki dozlarda sitotoksik etkinin arttığı gözlemlenmiştir. SH-SY5Y hücrelerinde ursolik asidin IC_{50} değeri 6,22 µg/mL olarak belirlenmiştir. Aynı konsantrasyon aralığında, AH modeli oluşturulmuş SH-SY5Y hücrelerinde yapılan değerlendirmede ise, ursolik asidin düşük konsantrasyonlarda dahi hücreler için toksik etkiler gösterdiği saptanmış olup, IC_{50} değeri 8,40 µg/mL olarak bulunmuştur.

Ursolik asidin PC12 hücrelerinde hidrojen peroksit (H_2O_2) ve 1-metil-4-fenilpiridinyum ion (MPP^+) kaynaklı oksidatif ve enflamatuvar hasarlara karşı koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada Tsai ve Yin, ursolik asidin hücre canlılığı ve antioksidan savunma sistemleri ile enflamatuvar yanıtlar üzerindeki etkilerini incelemeyi hedeflemişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen veriler, ursolik asidin oksidatif stres (H_2O_2) ve mitokondriyal toksisite (MPP^+) kaynaklı hücre hasarına karşı belirgin bir hücre koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. MTT testi ile doğrulanan bu etki, ursolik asidin konsantrasyona bağlı olarak hücre yaşamını sürdürme kapasitesini artırdığını göstermektedir. Bu durum, ursolik asidin sitoprotektif özelliklere sahip olduğunu ve PC12 hücrelerini apoptoza karşı koruyabildiğini göstermiştir [323]. Ursolik asidin A549 hücrelerinde influenza A virüsünün tetiklediği enflamasyon ve oksidatif stres üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışmada ise ursolik asidin 0-20 µg/mL aralığında bu hücrelerdeki sitotoksik etkisinin olmadığı vurgulanmıştır [187]. Mevcut çalışma ile yapmış olduğumuz çalışma kıyaslandığında ursolik asidin farklı hücrelerde farklı konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterebileceği düşünülmektedir.

Oksidatif stres, serbest radikallerin üretimi ile hücrelerin onlara karşı savunma yapabilme yetenekleri arasındaki dengesizliği ifade eder. Oksidatif stresin, nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere birçok insan hastalığında hücresel hasarın ana nedeni olduğu yönünde giderek artan kanıtlar bulunmaktadır [324]. Bu çalışmada, naringin ve ursolik asidin sitotoksik olmayan konsantrasyonlarının ROT üretimi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

Naringin, 25-250 µg/mL derişim aralığında, pozitif kontrole kıyasla ROT oluşumunu anlamlı şekilde azaltmıştır. Ayrıca, FF uygulanarak Alzheimer hastalığı (AH) modeli oluşturulan hücrelerde de naringinin düşük derişimlerinde ROT üretiminin belirgin düzeyde azalttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Naringinin, 3-nitropropiyonik asit (3-NP) ile indüklenen nörotoksisiteye karşı PC12 hücrelerindeki koruyucu etkisini araştıran bir çalışmada naringinin antioksidan etkisini PI3K/Akt yolakları üzerinden Nrf2 aktivasyonu ile oluşturduğu değerlendirilmiştir. PC12 hücrelerine 3-NP uygulaması ile oluşan ROT üretimini naringinin azaltarak PC12 hücrelerinin korunmasını sağladığı belirtilmektedir [325].

Aynı şekilde, ursolik asidin sitotoksik olmayan konsantrasyonlarının ROT üretimine etkileri incelendiğinde, 0,25 ve 0,5 µg/mL derişimlerinde pozitif kontrole göre ROT oluşumunu anlamlı derecede azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca, FF ile AH modeli oluşturulmuş hücrelerde, derişim artışına bağlı olarak artan ROT üretiminin, ursolik asit uygulamasıyla azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$).

Lu ve ark.'nın yapmış oldukları *in vivo* çalışmada ise, ursolik asidin prefrontal korteks dokusunun D-galaktoz (D-gal) ile indüklenmesinin ardından enflamatuvar yanıt üzerindeki koruyucu etkisi gösterilmiştir. Çalışmada ROT ölçümü için DCF-DA floresan probu kullanılmış ve D-gal uygulaması prefrontal kortekste AGEs, ROT ve protein karbonil seviyelerini önemli derecede artırmıştır. Bu artış, davranışsal bozulmalarla ilişkilendirilmiştir. Ancak, ursolik asit uygulanması, D-gal ile indüklenen bu oksidatif stres göstergelerini (AGEs, ROT ve protein karbonil seviyeleri) azaltmış ve davranışsal bozulmaları iyileştirmiştir [326]. Ayrıca, Wei ve ark. yapmış olduğu çalışmada influenza A virüsünün A549 hücre hattında neden olduğu oksidatif stresi DCF-DA floresan probu ile ölçmüş olup çalışmada ursolik asidin influenza A virüsünün A549 hücrelerdeki neden olduğu ROT seviyelerini azalttığını göstermişlerdir [187].

Tez kapsamında, FF tarafından indüklenen genotoksik etkiler ile naringin ve ursolik asidin olası antigenotoksik özelliklerini incelemek amacıyla Comet testi kullanılmıştır. SH-SY5Y hücrelerinde *in vitro* AH modeli oluşturmak üzere kullanılan 250 µg/mL derişimdeki FF'nin negatif kontrolle (DMEM (%1 DMSO)) kıyaslandığında hücreler üzerinde genotoksik bir etki göstermemiştir ($p<0.05$).

Sitotoksik olmayan derişimlerde uygulanan naringin (25 - 250 µg/mL) ise SH-SY5Y hücrelerinde derişimin artışıyla birlikte DNA hasarında artışa neden olmuş ve FF ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde 25 ve 250 µg/mL derişimde uygulanan naringin FF

uygulanan gruba kıyasla DNA hasarında azalmaya neden olmuştur. FF ile birlikte 25, 100 ve 250 µg/mL derişimde naringin uygulanan gruplardaki DNA hasarının tek başına naringin uygulanan gruplara kıyasla düşük olduğu da görülmüştür ($p<0,05$). Bu verilere bakıldığında, naringinin DNA hasarını azaltması beklenirken 250 µg/mL derişimdeki FF'nin SH-SY5Y hücre hattında DNA hasarına karşı koruma sağladığı düşünülmektedir. Aynı çalışmada kullanılan ursolik asit (0,1-1 µg/mL) ise hem SH-SY5Y hücrelerinde hem de AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde DNA hasarında artışa neden olmuştur ($p<0,05$).

Bacanlı ve ark. yapmış olduğu çalışmada naringinin genotoksisitesi incelenerek potansiyel koruyucu etkilerine bakılmıştır. Naringinin 50, 100, 500, 1000, 2000 µM derişimleri kullanılarak insan lenfosit ve Çin hamsteri fibroblast (V79) hücreleri üzerinde yapılan Comet analizinde verilen tüm derişimlerde DNA hasarında artışa neden olmamış, ayrıca her konsantrasyonda H_2O_2 kaynaklı DNA hasarını azaltıcı etki göstermiştir [315]. V79 hücre hattında yapılan bir çalışmada, naringinin, genotoksik bir ajan olan bleomisinin neden olduğu DNA hasarını ve hücre canlılığına olumsuz etkilerini azaltabildiği gösterilmiştir. Bleomisin öncesinde 1 mM naringinle yapılan ön muamele, DNA zincir kırıkları ve alkaliye duyarlı bölgelerin onarımını destekleyerek hasarı önemli ölçüde baskılamıştır. Bu etkinin sonucunda, yalnızca bleomisin uygulanan grupla karşılaştırıldığında, hücre canlılığında %38'lik bir artış rapor edilmiştir [327].

Bazı çalışmalarda ursolik asidin serbest radikal temizleyici aktiviteye sahip olmadığı öne sürülmüş olsa da [328,329], Bacanlı ve ark.nın yapmış olduğu çalışmada ursolik asidin çalışılan konsantrasyonlarında (5, 10, 25, 50, 100 µM) antioksidan kapasite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ancak, bu ursolik asidin antioksidan kapasitesi, fitokimyasalların antioksidan kapasitesini belirlemede yaygın olarak kullanılan troloks eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) testiyle ölçüldüğünde, referans antioksidan olan troloksa kıyasla daha düşük bulunmuştur [330]. Ramos ve ark. yaptığı çalışmada ise ursolik asidin DNA onarımını artırarak DNA hasarına karşı koruyucu etkiler gösterebileceği öne sürülmektedir [331]. Bu sonuçlarla birlikte kendi çalışmamız birlikte değerlendirildiğinde, ursolik asidin hem SH-SY5Y hücrelerinde hem de FF ile AH modellemesi yapılan SH-SY5Y hücrelerinde DNA hasarını artırdığı gözlemlenmiş; bu durum, ursolik asidin farklı hücre hatları ve konsantrasyonlarda yapılan çalışmalarda farklı biyolojik etkiler gösterebileceğini ortaya koymuştur. Önceki bazı çalışmalarda antioksidan ve nöroprotektif etkiler gösterdiği bildirilen ursolik asidin, bu çalışmada DNA hasarını artırması, onun farklı koşullarda prooksidan ya da genotoksik bir profile sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda, ursolik asidin genotoksisite

potansiyelinin, doz, hücre tipi ve hastalık modeli gibi değişkenler ışığında dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi gerektiği ortaya çıkmaktadır.

Alzheimer Hastalığı (AH) modellemesi oluşturulan hücrelerde daha önce de bahsedildiği üzere bazı protein ve sitokin moleküllerinde artış olduğu bilinmektedir. Aβ proteinlerinin beyin dokusunda birikmesi, AH'de en bilinen patolojik belirtidir. Tau proteini ve fosforilasyonu ise nöronlar içerisinde yığınlar oluşturarak sinir hücrelerinin yapısını bozmaktadır. Diğer belirteç grubu olan pro-enflamatuvar sitokinlerin (IL-10, IL-6, IL-1α) AH'de seviyeleri yükselerek beyin içindeki enfeksiyonu artırıp hastalığın ilerlemesine katkı sağlar. TNF-α ve TNF-β sitokin grubunun da AH'nin enflamasyon süreçlerinde önemli roller oynadıkları bilinmektedir. Ayrıca kompleman sisteminin bileşenleri olan C1q, C3, C6 ve C9 AH patogenezinde rol oynayan enflamasyon süreçlerini etkileyebilir. Son olarak AChE, AH'de asetilkolin düzeylerini düşürerek kognitif bozulmaya yol açar. APP ise anormal işlenmesi sonucu Aβ plaklarının birikmesine ve nörodejenerasyona neden olarak hastalığın ilerlemesine katkı sağlar.

Bu biyogöstergelerin düzeyleri, ELISA kiti yardımıyla AH modellemesi yapılan ve yapılmayan SH-SY5Y hücrelerinde tespit edilmiş ve naringin ile ursolik asidin bu biyogöstergelerin düzeyleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

Difenilalanin (FF) ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerine, 25-250 μg/mL derişim aralığında uygulanan naringin, Aβ düzeylerini negatif kontrol grubunda gözlemlenen seviyelerin altına düşürerek anlamlı bir azalma sağlamıştır. Ayrıca, AH modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde de 25, 50 ve 100 μg/mL derişimlerde naringin uygulaması, Aβ düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürmüştür ($p<0,05$).

Öte yandan, AH modeli oluşturulan hücrelere 50, 100 ve 250 μg/mL derişimlerde uygulanan naringin, AChE enzim düzeylerinde bir artışa yol açmış olsa da bu artışın tüm gruplarda negatif kontrol grubuna kıyasla daha düşük düzeylerde kaldığı belirlenmiştir. Buna ek olarak, AH modeli oluşturulmayan hücrelerde, naringin uygulanan tüm derişimlerde AChE enzim düzeylerinde anlamlı artış gözlenmiştir ($p<0,05$).

Naringin uygulamasının tau protein düzeyleri üzerindeki etkilerine bakıldığında, FF ile modelleme yapılan hücrelerde 25-250 μg/mL derişimlerinde artmış tau düzeylerini azalttığı görülmüş; ancak 100 μg/mL derişiminde, FF uygulanan grupla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. Buna karşılık, AH modeli oluşturulmayan hücrelerde, naringin 25 ve 50 μg/mL derişimlerde tau düzeylerini negatif kontrole kıyasla azaltırken, 100 ve 250 μg/mL derişimlerde ise tau düzeylerini anlamlı şekilde artırdığı dikkat çekmiştir ($p<0,05$).

Benzer şekilde, APP düzeyleri açısından, FF ile AH modeli oluşturulan hücrelerde 25-250 µg/mL aralığında naringin uygulaması ile artmış APP düzeylerinin azaldığı saptanmış; ancak bu azalma, sadece 250 µg/mL derişimde FF uygulanan grupla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bununla birlikte, AH modeli oluşturulmayan hücrelerde, naringin uygulamasının 100 ve 250 µg/mL derişimlerde APP düzeylerini negatif kontrole göre artırmış olması dikkat çekici bir bulgudur ($p<0,05$).

Literatürde, naringinin AH gibi nörodejeneratif hastalıklar üzerinde nöroprotektif etkiler gösterdiğini destekleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Meng ve ark.nın *in vivo* çalışmasında, naringinin hidrokortizonla bellek bozukluğu oluşturulan farelerde Aβ ve APP düzeylerini anlamlı şekilde azalttığı ve bu etkilerin Aβ metabolizması üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir. Ayrıca, östrojen reseptörü inhibitörü uygulandığında bu etkilerin kaybolması, naringinin ER aracılı bir mekanizma ile bu proteinler üzerinde düzenleyici rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Meng ve ark.nın çalışmasında, hidrokortizon ile oluşturulan fare modelinde p-Tau ve CDK5 protein düzeyleri anlamlı şekilde artmış; ancak naringin uygulaması bu protein düzeylerini belirgin olarak azaltmıştır. Ayrıca, nöroprotektif etkisi bilinen KN15112502 molekülü ile naringin arasında p-Tau ve CDK5 düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır [332]. Bu sonuçlar, tez çalışmasındaki naringinin nöroprotektif etkisini destekleyen bulgularla da uyumludur. Silva ve ark. yapmış oldukları çalışmada AH tedavisi için enzimatik inhibitörler üzerinde yoğunlaşmışlar ve AChE'yi inhibe edici moleküller ile çalışmışlardır. Çalışmada 50 µg/mL naringinin AChE'yi %55,68 oranında inhibe ettiği bulunmuştur. Bu durum naringinin iyi bir AChE inhibitörü olduğunu göstermektedir [333].

Difenilalanin (FF) ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerine 0,1–1 µg/mL derişim aralığında ursolik asit uygulandığında, hücrelerdeki Aβ düzeylerinin azaldığı ve bu azalmada en güçlü etkinin 1 µg/mL derişiminde gözlemlendiği belirlenmiştir. Benzer şekilde, AH modeli oluşturulmayan SH-SY5Y hücrelerinde de 0,25 ve 0,5 µg/mL derişimlerinde yapılan ursolik asit uygulamaları Aβ düzeylerini anlamlı şekilde düşürmüştür ($p<0,05$).

Öte yandan, FF ile AH modeli oluşturulan hücrelerde, 0,1, 0,25 ve 1 µg/mL derişimlerinde ursolik asit uygulaması AChE enzim düzeylerinde artışa neden olmuş, ancak bu artışlar negatif kontrole kıyasla düşük düzeylerde kalmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Buna karşılık, 0,5 µg/mL derişiminde yapılan uygulama AChE düzeylerini azaltsa da bu azalma FF grubuna kıyasla anlamlı değildir. İlginç olarak, AH modeli oluşturulmayan hücrelerde, 0,5 ve 1 µg/mL derişimlerinde yapılan ursolik asit uygulamaları AChE düzeylerinde anlamlı düşüşe neden olmuştur ($p<0,05$).

Aynı çalışmada, FF ile AH modeli oluşturulan hücrelerde 0,1–1 μg/mL derişim aralığında uygulanan ursolik asit, artmış tau protein düzeylerini genel olarak azaltmış, ancak bu azalma yalnızca 1 μg/mL derişiminde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Önemli bir bulgu olarak, AH modeli oluşturulmayan hücrelerde, ursolik asidin uygulandığı tüm derişimlerde tau protein düzeylerini anlamlı şekilde artırdığı saptanmıştır ($p<0,05$).

Son olarak, FF ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerine 0,1–1 μg/mL aralığında uygulanan ursolik asit, APP düzeylerini azaltmış olsa da bu azalma sadece 0,25 ve 0,5 μg/mL derişimlerinde FF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca, AH modeli oluşturulmayan hücrelerde, 0,25 μg/mL hariç tüm derişimlerde yapılan ursolik asit uygulamalarının APP düzeylerini negatif kontrole kıyasla anlamlı şekilde artırmış olması dikkat çekicidir ($p<0,05$).

Daha önce yapılan araştırmalarda, ursolik asidin PC12 hücrelerinde Aβ kaynaklı serbest radikal üretimini ve lipid peroksidasyonunu azalttığı bildirilmiştir [334]. Aynı zamanda ursolik asit Aβ-indüklenmiş *Candida elegans* modelinde Aβ birikimini engellemiş, oligomer ve monomer düzeylerini düşürmüştür [335]. Ursolik asidin nörorejeneratif etkisi, Aβ kaynaklı nörotoksisite ve hafıza bozukluklarına sahip farelerde bilişsel fonksiyonların iyileşmesiyle gösterilmiştir [336]. Bu sonuç, ursolik asidin güçlü bir asetilkolinesteraz inhibitörü olarak etki etmesi ile desteklenmiştir [337,338]. Ayrıca ursolik asidin oksidatif stres ve enflamasyonu baskılayıcı etkileri sayesinde merkezi sinir sistemi ile ilişkili bozuklukların iyileştirilmesinde çok hedefli özellikler sergilediği bildirilmiştir [336,339,340]. Çalışmamızda AH modellenmiş hücrelerde ursolik asidin tau proteininin birikimini baskılayabileceği dolayısı ile hastalık durumundaki patolojik fosfo-tau oluşumunu azaltma potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir. Fakat modellenmemiş hücre grubunda tau protein düzeylerinin artması ursolik asidin tau ekspresyonunu uyarabileceğini, yani bir çeşit nörogenez veya hücresel adaptasyon yanıtı oluşturabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu artış, hastalık modeli yokken tau'nun patolojik değil fizyolojik formda olabileceği için farklı bir biyolojik etkiyi temsil edebilir. Sonuç olarak, bu veriler ursolik asidin tau protein düzeyleri üzerinde duruma özgü etkileri olabileceğini göstermektedir. AH modeli hücrelerde tau birikimini azaltıcı etkisi, onun potansiyel Alzheimer'a karşı koruyucu ve/veya tedavi edici özelliğine işaret ederken; normal hücrelerdeki artış, bu molekülün dikkatli doz değerlendirmesiyle kullanılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Alzheimer hastalığında (AH) enflamasyon biyogöstergelerindeki değişimlere bakıldığında; IL-1α düzeyleri açısından değerlendirildiğinde, AH modeli oluşturulmayan

hücrelerde naringin uygulamasının IL-1α düzeylerini artırdığı gözlenmiştir. Buna karşın, FF ile AH modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerine 25-250 µg/mL derişimlerde uygulanan naringin, artan IL-1α düzeylerini azaltmıştır; ancak 25 ve 50 µg/mL derişimlerinde bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p<0,05$). Benzer şekilde, IL-6 düzeylerine bakıldığında, AH modeli oluşturulmayan hücrelerde naringin uygulaması IL-6 düzeylerini artırırken, FF ile AH modeli oluşturulan hücrelerde artan IL-6 düzeyleri 25-250 µg/mL naringin uygulaması ile azalmış, ancak bu azalma da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p<0,05$). IL-10 düzeyleri açısından ise, FF ile AH modeli oluşturulan hücrelere 25 µg/mL derişimde uygulanan naringinin, FF uygulamasıyla artan IL-10 düzeylerini azalttığı bulunmuştur. Buna karşılık, AH modeli oluşturulmayan hücrelerde 25-250 µg/mL derişimde uygulanan naringin, IL-10 düzeylerini anlamlı şekilde artırmıştır ($p<0,05$).

IL-6 mikrogilia hücrelerini aktive ederek amiloid plakların oluşumunu aktive ederek sinaptik plastisiteyi olumsuz etkilemektedir. Bu durum AH'de nöroenflamasyonun sürmesinde katkıda bulunur. Long ve ark.nın yapmış oldukları çalışmada, CCL2 ile indüklenen enflamasyona naringinin etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmada IL-6 mRNA ifadesinin miktarına bakılmış olup naringin uygulanan grupta CCL2'nin arttırmış olduğu IL-6 mRNA ifade seviyeleri anlamlı şekilde azalmıştır [341]. Kankılıç ve ark.nın yapmış olduğu *in vivo* bir çalışmada; kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan paklitakselin (PTX) testis dokusunda oluşturduğu toksisiteye karşı, naringinin koruyucu etkisi incelenmiştir. Çalışmada PTX'in testis dokusunda IL-6 mRNA düzeyini anlamlı bir şekilde arttırdığı görülmüş olup naringin tedavisinin bu artışı anlamlı düzeyde azaltarak enflamasyonu hafiflettiği tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada 100 mg/kg dozundaki naringin, 50 mg/kg dozuna kıyasla IL-6 düzeyini düşürmede daha etkili bulunmuş olup naringinin doza bağlı bir baskılayıcı etkisi olduğunu göstermişlerdir [342].

Kompleman sistemi bileşenlerinden C1q düzeyleri, AH modeli oluşturulmayan hücrelerde naringin uygulaması ile artmış; buna karşılık, AH modeli oluşturulan hücrelerde artmış olan C1q düzeyleri naringin uygulaması ile azalmış olsa da bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p<0,05$). Öte yandan, C3, C6 ve C9 düzeyleri açısından anlamlı değişiklikler gözlenmiştir. AH modeli oluşturulmayan hücrelerde 25-250 µg/mL naringin uygulaması bu üç bileşenin düzeylerini önemli ölçüde azaltmıştır. Aynı şekilde, FF ile AH modeli oluşturulan hücrelerde artmış olan C3, C6 ve C9 düzeylerinin de naringin uygulaması ile anlamlı şekilde azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$).

Long ve ark. tarafından yapılan çalışmada, CCL2 kullanılan sıçanlarda kistein-aspartik asit-spesifik proteaz 3 (kaspaz-3)'ın mRNA ekspresyonu anlamlı şekilde arttığı, naringin uygulamasının ise kaspaz-3'ün mRNA ekspresyonunu anlamlı şekilde azalttığı bildirilmiştir [341]. PTX uygulanan *in vivo* bir çalışmada apoptoz belirteci olan C3, C6, C9 ve enflamasyon belirteci olan NF-$_k$B protein düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır. Çalışmada uygulan farklı derişimlerdeki naringinin ise C3, C6, C9 ve NF-κB protein düzeylerini azaltarak apoptoz ve enflamasyonu baskıladığı gösterilmiştir [342].

Pro-enflamatuvar sitokinlerden TNF-α düzeyleri, AH modeli oluşturulmayan hücrelerde 50 ve 250 μg/mL derişimlerinde naringin uygulaması ile anlamlı şekilde artmıştır. Ancak, FF ile AH modeli oluşturulan hücrelerde artmış TNF-α düzeyleri, aynı derişimlerdeki naringin uygulaması ile anlamlı derecede azalmıştır (p<0,05). TGF-β düzeyleri ise AH modeli oluşturulmayan hücrelerde 25-250 μg/mL naringin uygulaması ile anlamlı şekilde artmıştır. Ancak FF ile AH modeli oluşturulan hücrelerde artmış TGF-β düzeyleri üzerine naringin uygulamasının anlamlı bir etkisi saptanmamıştır (p<0,05).

Okadaik asit (OKA) uygulanan sıçanların hipokampüs ve serebral korteks bölgelerinde ciddi düzeyde oksidatif stresin oluştuğu bir çalışmada naringin uygulaması ile (50, 100 ve 200 mg/kg) bu oksidatif stresin anlamlı bir şekilde azaldığı bildirilmiştir. Özellikle 200 mg/kg dozda naringin, rivastigmin ile benzer düzeyde bir antioksidan koruyuculuk sağlamıştır. OKA uygulanmış grupta, pro-inflamatuar sitokinler olan TNF-α, TGF-β ve IL-1β seviyelerinde belirgin artış gözlenmiştir. Bu artış, OKA'nın nöroenflamatuvar yanıtı tetiklediğini ortaya koymaktadır. Naringin tedavisi ise, bu enflamatuvar belirteçlerin düzeylerini doza bağımlı şekilde anlamlı ölçüde düşürmüştür ($p < 0,001$) [343].

Ursolik asit uygulanmasında da SH-SY5Y hücreleri üzerinde AH modeli oluşturulan ve oluşturulmayan koşullarda çeşitli enflamatuvar belirteçlerinin miktarları değerlendirilmiştir. FF ile AH modeli oluşturulan hücrelere 0,1–1 μg/mL derişimlerde uygulanan ursolik asit, FF uygulamasıyla artan IL-10 düzeylerini azaltmıştır. Buna karşılık, AH modeli oluşturulmayan hücrelerde aynı derişimlerdeki ursolik asit uygulaması IL-10 düzeylerini anlamlı şekilde artırmıştır (p<0,05). IL-6 düzeylerine bakıldığında, AH modeli oluşturulmayan hücrelerde ursolik asit uygulaması bu sitokinin düzeylerini artırmış; FF ile AH modeli oluşturulan hücrelerde ise artmış IL-6 düzeyleri belirli ölçüde azalmış, ancak bu azalma 0,1 ve 0,25 μg/mL derişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p<0,05). Benzer şekilde, IL-1α düzeyleri de AH modeli olmayan hücrelerde ursolik asit ile artmış; AH modeli oluşturulan

hücrelerde ise 0,1–1 μg/mL arasında azalma eğilimi gösterdiği halde, 0,25, 0,5 ve 1 μg/mL derişimlerinde bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p<0,05$).

Çalışmalarda, uzun süreli ursolik asit uygulamasının NF-κB sinyal yolunu inhibe ettiği ve interlökinler (IL-1, IL-6, IL-12), interferon-gamma, matriks metalloproteinaz-2 ve -9 (MMP-2, MMP-9) düzeylerinde azalma sağladığı gösterilmiştir [192, 326].

Kompleman sistemi bileşenlerinden C1q düzeyleri, AH modeli oluşturulmayan hücrelerde ursolik asit uygulamasıyla artmış; buna karşılık, FF ile AH modeli oluşturulan hücrelerde artmış C1q düzeyleri azalmış, ancak bu azalma yalnızca 0,25 μg/mL derişiminde anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Öte yandan, C3, C6 ve C9 düzeyleri hem AH modeli oluşturulmayan hem de oluşturulan hücrelerde 0,1–1 μg/mL ursolik asit uygulamasıyla anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0,05$). Bu bulgular, ursolik asidin kompleman sistemi üzerinde belirgin baskılayıcı etkiler oluşturduğunu göstermektedir.

Farklı deneysel modellerde yürütülen çalışmalarda, ursolik asidin C3 ve C9 gibi apoptotik efektör proteinlerin düzeylerini azalttığı raporlanmıştır [344,345]. NO üretiminin beyinde nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) aracılığıyla gerçekleştiği, enflamatuvar süreçlerde ise indüklenebilir nitrik oksit sentazın (iNOS) aktive olduğu bilinmektedir [346]. Ayrıca, uzun süreli ursolik asit tedavisinin iNOS aktivitesini azalttığı da gösterilmiştir [347].

Pro-enflamatuvar sitokinlerden TNF-α düzeyleri, AH modeli oluşturulmayan hücrelerde 0,1–1 μg/mL derişimlerinde anlamlı biçimde artarken, FF ile AH modeli oluşturulan hücrelerde bu sitokin düzeylerinde azalma saptanmış; ancak bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p<0,05$). TGF-β düzeyleri açısından ise çift yönlü bir etki dikkat çekmiştir: AH modeli oluşturulmayan hücrelerde 0,1 μg/mL derişiminde TGF-β düzeyleri anlamlı şekilde artmışken AH modeli oluşturulan hücrelerde ise 0,1–1 μg/mL aralığındaki ursolik asit uygulaması artmış TGF-β düzeylerini anlamlı biçimde azaltmıştır ($p<0,05$).

Genel olarak değerlendirildiğinde, ursolik asidin SH-SY5Y hücrelerinde enflamatuvar belirteçler üzerindeki etkileri hem uygulanan derişime hem de hücrelerin içinde bulunduğu fizyolojik ya da patolojik duruma bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. AH modeli oluşturulmayan hücrelerde genellikle pro-enflamatuar yanıtın arttığı, buna karşılık hastalık modeli oluşturulan hücrelerde pro-enflamatuvar ve kompleman aktivitesinin baskılandığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular, ursolik asidin potansiyel bir nöroprotektif ve immün modülatör ajan olabileceğini göstermektedir.

Zhao ve ark. tarafından yapılan *in vitro* çalışma, ursolik asidin enflamasyonu baskılayıcı etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. LPS ile uyarılan makrofaj hücrelerinde ursolik asit, TNF-

α, IL-6 ve IL-1β gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin düzeyini azaltmıştır. Bu etkilerin, Toll benzeri reseptör 4/myeloid diferansiyasyon 88 (TLR4/MyD88) sinyal yolunun inhibisyonuyla gerçekleştiği belirlenmiştir. Ayrıca ursolik asit, otofajiyi artırarak bu yolu dolaylı olarak da baskılamış; otofaji inhibisyonu ise bu etkileri tersine çevirmiştir. Bu bulgular, ursolik asidin enflamasyonu hem doğrudan sinyal yollarını hedef alarak hem de otofaji üzerinden dolaylı şekilde düzenleyebildiğini göstermektedir [186]. Qu ve ark.nın yapmış olduğu diğer bir çalışmada, ursolik asidin enflamasyonla ilişkili apoptoz mekanizmaları üzerinde düzenleyici bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Kaspaz ailesi proteazları arasında merkezi bir rol üstlenen C3, hücre ölümü sürecinin temel yürütücüsü olup, enflamatuvar süreçlerle doğrudan ilişkilidir. Ursolik asidin, H_2O_2 ile uyarılmış PC12 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesini anlamlı düzeyde azalttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, ursolik asidin antioksidan bileşik olan ATS ile birlikte kullanımı, tekli uygulamalara kıyasla daha güçlü bir inhibisyon sağlamıştır. Mitokondriyal membran potansiyelinin (MMP) korunmasına yönelik etkiler de ursolik asidin apoptozu dolaylı olarak baskıladığını desteklemektedir. MMP düşüşü, C9 aracılığıyla C3 aktivasyonunu tetikleyen temel bir mekanizmadır. Ursolik asit uygulaması, mitokondriyal disfonksiyonu önleyerek bu zincirleme süreci engellemekte ve enflamatuvar yanıtın ilerlemesini sınırlandırmaktadır. Elde edilen veriler, ursolik asidin antienflamatuvar etkisinin yalnızca sitokin üretiminin baskılanması ile sınırlı kalmadığını; aynı zamanda hücre ölümüyle ilişkili kaspaz yolaklarını hedef alarak daha geniş kapsamlı bir koruyucu mekanizma sunduğunu göstermektedir [348]. Başka bir çalışma da ise influenza A virüsü ile enfekte A549 hücrelerine uygulanan ursolik asidin TNF-α, IL-1β, IL-18 ve IL-6 gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin üretimini, viral yükü ve oksidatif stresi belirgin şekilde azalttığı gösterilmiştir [187].

SH-SY5Y hücrelerinde naringin ve FF ile AH modeli oluşturtulan SH-SY5Y hücrelerinde naringinin apoptoz üzerine etkileri incelendiğinde; negatif kontrol hücrelerinde canlı hücrelerin oranı %85'in üzerinde olup; nekroz, erken ve geç apoptotik hücreler toplam hücrelerin %15'ini oluşturmaktadır. FF ile AH modeli oluşturulan hücrelerde ise canlı hücre sayısı azalmış ve apoptotik hücre sayısı artmıştır. Hücrelere 25 ve 250 µg/mL derişimdeki naringin uygulamasının apoptotik hücre sayısını doza bağlı arttırdığı, fakat FF'nin neden olduğu apoptotik hücre sayısındaki artışı azalttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte FF uygulanan hücrelerde 250 µg/mL naringinin nekrotik hücre sayısını da artırdığı saptanmıştır. 0,1 ve 1 µg/mL derişimdeki ursolik asit uygulaması ise apoptotik hücre sayısını doza bağlı arttırdığı gibi FF'nin neden olduğu apoptotik hücre sayısındaki artışı da artırmıştır.

Literatürde yer alan *in vivo* bir çalışmada, naringinin hidrokortizon ile oluşturulan hafıza bozukluğu modelinde bilişsel yetileri artırarak nöroprotektif etkiler gösterdiği ve AH tedavisi için potansiyel bir aday olabileceği belirlenmiştir. Çalışmada naringinin bu etkisinin, apoptozu inhibe etmesine bağlı olduğu ve bu amaçla C3, Bad ve Bcl-2 proteinlerinin ekspresyonları incelenmiş olup yapılan Western blot analizleri, hidrokortizonun cleaved-kaspaz-3 ve Bad düzeylerini artırıp Bcl-2 düzeyini azalttığını, naringinin ise bu değişiklikleri tersine çevirdiğini göstermiştir. Qiu ve ark. tarafından yapılan *in vitro* çalışmada ise Aβ25–35 ile muamele edilen PC12 hücrelerinde apoptoz oranı anlamlı şekilde arttığı gösterilmiş fakat naringin ile yapılan ön işlem sonrasında hücrelerde apoptoz oranı belirgin şekilde azalmış, bu da naringinin koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir [130]. Her iki çalışmada da östrojen reseptörü inhibitörünün kullanıldığı ayrı bir düzenek hazırlanmış; naringin bu inhibitörle birlikte uygulandığında, nöroprotektif etkisinin azaldığı gösterilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmalarda, naringinin nöroprotektif etkilerini östrojen reseptörü aracılığıyla gerçekleştirdiği belirtilmektedir.

Daha önce ursolik asidin prostat, meme, kolon ve karaciğer kanserlerinde antikanser etkileri çalışılmıştır [349-351]. Ursolik asit ile yapılan *in vitro* bir çalışmada ise *Oldenlandia diffusa* (Rubiaceae) bitkisinden izole edilen ursolik asidin yumurtalık kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik (programlanmış hücre ölümü) etkileri incelenmiştir [175]. Ursolik asidin SK-OV-3 ve A2780 hücrelerinde sırasıyla 50 μM ve 65 μM IC_{50} değerlerinde sitotoksik etki gösterdiği ve SK-OV-3 hücrelerinde apoptotik cisimciklere rastlandığı bildirilmiştir. Ursolik asidin apoptozu, yapılan Western Blot analizlerinde apoptoz yolaklarında yer alan kaspaz-9 ile C3'ü aktive ederek sağladığı tespit edilmiştir. Yaptığımız tez çalışmasında da ursolik asidin düşük derişimlerinde bile apoptotik hücre sayısını arttırdığı görülmüş olup bu bağlamda çalışmamız literatür bilgileri ile paralellik göstermektedir.

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, naringin ve ursolik asidin, SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattında difenilalanin (FF) kullanılarak oluşturulan *in vitro* Alzheimer hastalığı (AH) modelindeki olası etkileri çok yönlü biyokimyasal ve moleküler analizlerle değerlendirilmiştir.

Naringin uygulaması, özellikle düşük konsantrasyonlarda, oksidatif stres düzeylerinde anlamlı bir azalma sağlayarak antioksidan savunma kapasitesini artırmış, Aβ, tau ve APP düzeylerini düşürerek nörodejeneratif süreci baskılamış, AChE inhibisyonu yoluyla kolinerjik sistemi desteklemiş ve enflamatuvar biyogöstergelerde (IL-1α, IL-6, TNF-α gibi) belirgin azalmalarla nöroenflamasyonun baskılanmasına katkıda bulunmuştur. Ayrıca genotoksisite ve apoptoz düzeylerinde de düşüş gözlemlenmiş, bu etkiler naringinin güçlü bir nöroprotektif aday olduğunu göstermiştir.

Ursolik asit ise bazı derişimlerde apoptoz ve genotoksisiteyi artırma eğilimi göstermiş olmakla birlikte, Aβ, tau ve APP protein düzeylerinde azalma sağlamış ve enflamatuvar biyogöstergelerde genel bir azalma eğilimi göstermiştir. Bu durum, ursolik asidin de potansiyel olarak AH ile ilişkili patolojik süreçleri baskılayabileceğini, ancak etki ve toksisite profilinin doz, hücre tipi ve patolojik ortam gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini ortaya koymuştur.

Genel olarak değerlendirildiğinde, elde edilen bulgular hem naringin hem de ursolik asidin, AH modelinde olumlu etkilere sahip olabileceğini göstermekte olup, özellikle naringinin daha belirgin ve çok yönlü koruyucu etkiler sunduğu anlaşılmıştır. Bununla birlikte, her iki bileşiğin de klinik uygulamalara yönelik olarak değerlendirilmesi için ileri düzey farmakokinetik, farmakodinamik ve *in vivo* çalışmaların yapılması gerekliliği önemle vurgulanmaktadır.

Bu tez, doğal kaynaklı fitokimyasalların AH'ye karşı olası terapötik yaklaşımlar geliştirilmesinde değerli bir veriler sunmakta olup bu alandaki ileri çalışmalara ışık tutabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Breijyeh, Z. and R. Karaman, Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment. Molecules, 2020. 25(24): p. 5789.
2. Zhang, J., et al., Salidroside attenuates beta amyloid-induced cognitive deficits via modulating oxidative stress and inflammatory mediators in rat hippocampus. Behavioural brain research, 2013. 244: p. 70–81.
3. Gella, A. and N. Durany, Oxidative stress in Alzheimer disease. Cell adhesion & migration, 2009. 3(1): p. 88–93.
4. Bonda, D.J., et al., Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention. Neuropharmacology, 2010. 59(4-5): p. 290–294.
5. Konrath, E.L., et al., Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2013. 65(12): p. 1701–1725.
6. Williamson, J., J. Goldman, and K.S. Marder, Genetic aspects of Alzheimer disease. The neurologist, 2009. 15(2): p. 80–86.
7. Cooper, E.L. and M.J. Ma, Alzheimer Disease: Clues from traditional and complementary medicine. Journal of traditional and complementary medicine, 2017. 7(4): p. 380–385.
8. Penney, J., W.T. Ralvenius, and L.-H. Tsai, Modeling Alzheimer's disease with iPSC-derived brain cells. Molecular psychiatry, 2020. 25(1): p. 148–167.
9. Kolarova, M., et al., Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. International journal of Alzheimer's disease, 2012. 2012(1): p. 731526.
10. Farrag, E., et al., Vitamin E attenuates cardiomyopathy via alleviation of autophagic stress. Int. J. Sci. Basic Appl. Res, 2021. 60: p. 67–86.
11. Zhao, Y., et al., High dose vitamin E attenuates diabetic nephropathy via alleviation of autophagic stress. Frontiers in physiology, 2019. 9: p. 1939.
12. Beking, K. and A. Vieira, Flavonoid intake and disability-adjusted life years due to Alzheimer's and related dementias: a population-based study involving twenty-three developed countries. Public health nutrition, 2010. 13(9): p. 1403–1409.
13. Singh, B., et al., Association of mediterranean diet with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. J Alzheimers Dis, 2014. 39(2): p. 271–82.
14. Scarmeas, N., C.A. Anastasiou, and M. Yannakoulia, Nutrition and prevention of cognitive impairment. The Lancet Neurology, 2018. 17(11): p. 1006–1015.
15. Nagpal, R., et al., Modified Mediterranean-ketogenic diet modulates gut microbiome and short-chain fatty acids in association with Alzheimer's disease markers in subjects with mild cognitive impairment. EBioMedicine, 2019. 47: p. 529–542.
16. Shishtar, E., et al., Long-term dietary flavonoid intake and risk of Alzheimer disease and related dementias in the Framingham Offspring Cohort. The American journal of clinical nutrition, 2020. 112(2): p. 343–353.

17. Rao, R.V., et al., Ayurvedic medicinal plants for Alzheimer's disease: a review. Alzheimers Res Ther, 2012. 4(3): p. 22.

18. Velmurugan, B.K., et al., Neuroprotective Role of Phytochemicals. Molecules, 2018. 23(10).

19. Hussain, G., et al., Putative Roles of Plant-Derived Tannins in Neurodegenerative and Neuropsychiatry Disorders: An Updated Review. Molecules, 2019. 24(12).

20. Gregory, J., et al., Neuroprotective Herbs for the Management of Alzheimer's Disease. Biomolecules, 2021. 11(4).

21. Gezici, S., Cancer preventive and neuroprotective potentials of red hulls, kernels and oleo-gum resins from Pistachio. International Journal of Agriculture Environment and Food Sciences, 2019. 3(3): p. 137–143.

22. Khan, A., et al., Neuroprotection: Targeting Multiple Pathways by Naturally Occurring Phytochemicals. Biomedicines, 2020. 8(8).

23. Amat-Ur-Rasool, H., et al., Anti-Cholinesterase Combination Drug Therapy as a Potential Treatment for Alzheimer's Disease. Brain Sci, 2021. 11(2).

24. Chen, R., et al., Therapeutic potential of naringin: an overview. Pharm Biol, 2016. 54(12): p. 3203–3210.

25. Cao, W., S.J. Feng, and M.C. Kan, Naringin Targets NFKB1 to Alleviate Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation-Induced Injury in PC12 Cells Via Modulating HIF-1α/AKT/mTOR-Signaling Pathway. J Mol Neurosci, 2021. 71(1): p. 101–111.

26. Wang, D.M., et al., Naringin Enhances CaMKII Activity and Improves Long-Term Memory in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. Int J Mol Sci, 2013. 14(3): p. 5576–86.

27. Li, S., et al., Therapeutic role of ursolic acid on ameliorating hepatic steatosis and improving metabolic disorders in high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease rats. PLoS One, 2014. 9(1): p. e86724.

28. Bergamin, L.S., et al., Interference of ursolic acid treatment with glioma growth: An *in vitro* and *in vivo* study. Eur J Pharmacol, 2017. 811: p. 268–275.

29. López-Hortas, L., et al., Recent developments on the extraction and application of ursolic acid. A review. Food Res Int, 2018. 103: p. 130–149.

30. Jang, S.M., et al., Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic beta-cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a high-fat diet. Int Immunopharmacol, 2009. 9(1): p. 113–9.

31. Liu, R.H., Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. J Nutr, 2004. 134(12 Suppl): p. 3479s–3485s.

32. Atanasov, A.G., et al., Natural products in drug discovery: advances and opportunities. Nat Rev Drug Discov, 2021. 20(3): p. 200–216.

33. Kumar, S. and A.K. Pandey, Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. ScientificWorldJournal, 2013. 2013: p. 162750.

34. Ferraz, C.R., et al., Therapeutic Potential of Flavonoids in Pain and Inflammation: Mechanisms of Action, Pre-Clinical and Clinical Data, and Pharmaceutical Development. Molecules, 2020. 25(3).

35. Ullah, A., et al., Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. Molecules, 2020. 25(22).

36. Zhang, Q. and Y. Yan, The role of natural flavonoids on neuroinflammation as a therapeutic target for Alzheimer's disease: a narrative review. Neural Regen Res, 2023. 18(12): p. 2582–2591.

37. Patel, K., et al., New insights into the medicinal importance, physiological functions and bioanalytical aspects of an important bioactive compound of foods 'Hyperin': Health benefits of the past, the present, the future. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 2018. 7(1): p. 31–42.

38. Cushnie, T.P. and A.J. Lamb, Assessment of the antibacterial activity of galangin against 4-quinolone resistant strains of Staphylococcus aureus. Phytomedicine, 2006. 13(3): p. 187–91.

39. Badshah, S.L., et al., Antiviral activities of flavonoids. Biomed Pharmacother, 2021. 140: p. 111596.

40. Alghamdi, S., Antinociceptive Effect of the Citrus Flavonoid Eriocitrinon Postoperative Pain Conditions. J Pain Res, 2020. 13: p. 805–815.

41. Lall, R.K., V.M. Adhami, and H. Mukhtar, Dietary flavonoid fisetin for cancer prevention and treatment. Mol Nutr Food Res, 2016. 60(6): p. 1396–405.

42. Jung, H.J., et al., Anti-ulcerogenic effects of the flavonoid-rich fraction from the extract of Orostachys japonicus in mice. J Med Food, 2007. 10(4): p. 702–6.

43. Maleki, S.J., J.F. Crespo, and B. Cabanillas, Anti-inflammatory effects of flavonoids. Food Chem, 2019. 299: p. 125124.

44. Nijveldt, R.J., et al., Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am J Clin Nutr, 2001. 74(4): p. 418–25.

45. Zheng, Y.Z., et al., Theoretical studies on the antioxidant activity of pinobanksin and its ester derivatives: Effects of the chain length and solvent. Food Chem, 2018. 240: p. 323–329.

46. Zheng, Y.Z., et al., The influence of the H5···OC4 intramolecular hydrogen-bond (IHB) on the antioxidative activity of flavonoid. Phytochemistry, 2019. 160: p. 19–24.

47. Yadav, S.S., et al., Traditional knowledge to clinical trials: A review on therapeutic actions of Emblica officinalis. Biomed Pharmacother, 2017. 93: p. 1292–1302.

48. Huntley, A.L., The health benefits of berry flavonoids for menopausal women: cardiovascular disease, cancer and cognition. Maturitas, 2009. 63(4): p. 297–301.

49. Walle, T., Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass? Semin Cancer Biol, 2007. 17(5): p. 354–62.

50. Andújar, I., et al., Cocoa polyphenols and their potential benefits for human health. Oxid Med Cell Longev, 2012. 2012: p. 906252.

51. Zhao, M., et al., Immunomodulatory and anticancer activities of flavonoids extracted from litchi (Litchi chinensis Sonn) pericarp. Int Immunopharmacol, 2007. 7(2): p. 162–6.

52. Mahmoud, A.M., W. Yang, and M.C. Bosland, Soy isoflavones and prostate cancer: a review of molecular mechanisms. J Steroid Biochem Mol Biol, 2014. 140: p. 116–32.

53. McKay, D.L. and J.B. Blumberg, The role of tea in human health: an update. J Am Coll Nutr, 2002. 21(1): p. 1–13.

54. Amjadi, M., et al., Evaluation of Flavonoid Derivative and Doxorubicin Effects in Lung Cancer Cells (A549) Using Differential Pulse Voltammetry Method. Adv Pharm Bull, 2018. 8(4): p. 637–642.

55. Aleksandar, P., et al., Wild edible onions - Allium flavum and Allium carinatum - successfully prevent adverse effects of chemotherapeutic drug doxorubicin. Biomed Pharmacother, 2019. 109: p. 2482–2491.

56. Villa, T.G., et al., Antivirals against animal viruses. Biochem Pharmacol, 2017. 133: p. 97–116.

57. Chiow, K.H., et al., Evaluation of antiviral activities of Houttuynia cordata Thunb. extract, quercetin, quercetrin and cinanserin on murine coronavirus and dengue virus infection. Asian Pac J Trop Med, 2016. 9(1): p. 1–7.

58. Badshah, S.L. and A. Ullah, New developments in non-quinolone-based antibiotics for the inhibiton of bacterial gyrase and topoisomerase IV. Eur J Med Chem, 2018. 152: p. 393–400.

59. Ahmad, A., et al., A Review on Phytoconstituents and Biological activities of Cuscuta species. Biomed Pharmacother, 2017. 92: p. 772–795.

60. Ngueyem, T.A., et al., The genus Bridelia: a phytochemical and ethnopharmacological review. J Ethnopharmacol, 2009. 124(3): p. 339–49.

61. Chinsembu, K.C., Tuberculosis and nature's pharmacy of putative anti-tuberculosis agents. Acta Trop, 2016. 153: p. 46–56.

62. Iranshahi, M., et al., Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin. Life Sci, 2015. 137: p. 125–32.

63. Ngankeu Pagning, A.L., et al., New triterpene and new flavone glucoside from Rhynchospora corymbosa (Cyperaceae) with their antimicrobial, tyrosinase and butyrylcholinesterase inhibitory activities. Phytochemistry Letters, 2016. 16: p. 121–128.

64. Loredana, L., et al., Biochemical, antioxidant properties and antimicrobial activity of different onion varieties in the Mediterranean area. Journal of Food Measurement and Characterization, 2019. 13(2): p. 1232–1241.

65. Basli, A., et al., Wine polyphenols: potential agents in neuroprotection. Oxid Med Cell Longev, 2012. 2012: p. 805762.

66. Bensalem, J., et al., Protective effects of berry polyphenols against age-related cognitive impairment. Nutrition and Aging, 2015. 3(2-4): p. 89–106.

67. Nile, S.H. and S.W. Park, Edible berries: bioactive components and their effect on human health. Nutrition, 2014. 30(2): p. 134–44.

68. Pohanka, M., Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. Int J Mol Sci, 2014. 15(6): p. 9809–25.

69. Eruygur, N., et al., *In vitro* antioxidant assessment, screening of enzyme inhibitory activities of methanol and water extracts and gene expression in Hypericum lydium. Mol Biol Rep, 2019. 46(2): p. 2121–2129.

70. Peng, Y., et al., Regulatory mechanism and therapeutic potentials of naringin against inflammatory disorders. Heliyon, 2024. 10(3): p. e24619.

71. Shilpa, V.S., et al., Phytochemical Properties, Extraction, and Pharmacological Benefits of Naringin: A Review. Molecules, 2023. 28(15).

72. Budel, R.G., et al., Toxicological evaluation of naringin-loaded nanocapsules *in vitro* and *in vivo*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2020. 188: p. 110754.

73. Kanaze, F.I., et al., Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. Eur J Clin Nutr, 2007. 61(4): p. 472–7.

74. Choudhury, R., et al., Interactions of the flavonoid naringenin in the gastrointestinal tract and the influence of glycosylation. Biochem Biophys Res Commun, 1999. 265(2): p. 410–5.

75. Steed, A.L., et al., The microbial metabolite desaminotyrosine protects from influenza through type I interferon. Science, 2017. 357(6350): p. 498–502.

76. Wei, Y., et al., The intestinal microbial metabolite desaminotyrosine is an anti-inflammatory molecule that modulates local and systemic immune homeostasis. Faseb j, 2020. 34(12): p. 16117–16128.

77. Felgines, C., et al., Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. 279(6): p. G1148–54.

78. Fang, T., et al., A rapid LC/MS/MS quantitation assay for naringin and its two metabolites in rats plasma. J Pharm Biomed Anal, 2006. 40(2): p. 454–9.

79. Ghanbari-Movahed, M., et al., A Systematic Review of the Preventive and Therapeutic Effects of Naringin Against Human Malignancies. Front Pharmacol, 2021. 12: p. 639840.

80. Bharti, S., et al., Preclinical Evidence for the Pharmacological Actions of Naringin: A Review. Planta medica, 2014. 80.

81. Joshi, R., Y.A. Kulkarni, and S. Wairkar, Pharmacokinetic, pharmacodynamic and formulations aspects of Naringenin: An update. Life Sci, 2018. 215: p. 43–56.

82. Rivoira, M.A., et al., New Perspectives in the Pharmacological Potential of Naringin in Medicine. Curr Med Chem, 2021. 28(10): p. 1987–2007.

83. Karami, K., et al., Synthesis and spectroscopic characterization study of new palladium complexes containing bioactive O,O-chelated ligands: evaluation of the DNA/protein

BSA interaction, *in vitro* antitumoural activity and molecular docking. J Biomol Struct Dyn, 2018. 36(13): p. 3324–3340.

84. Aroui, S., et al., Naringin inhibits the invasion and migration of human glioblastoma cell via downregulation of MMP-2 and MMP-9 expression and inactivation of p38 signaling pathway. Tumour Biol, 2016. 37(3): p. 3831–9.

85. Guo, B., et al., Naringin suppresses the metabolism of A375 cells by inhibiting the phosphorylation of c-Src. Tumour Biol, 2016. 37(3): p. 3841–50.

86. Kweon, K.H., et al., Sirt1 induction confers resistance to etoposide-induced genotoxic apoptosis in thyroid cancers. Int J Oncol, 2014. 45(5): p. 2065–75.

87. Zhou, J., L. Xia, and Y. Zhang, Naringin inhibits thyroid cancer cell proliferation and induces cell apoptosis through repressing PI3K/AKT pathway. Pathol Res Pract, 2019. 215(12): p. 152707.

88. Wu, X., et al., Effects and mechanism of inhibition of naringin in combination with atorvastatin on prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Phytochemistry Letters, 2019. 32: p. 168–176.

89. Yamane, K. and Y. Kato, Handbook on flavonoids: Dietary sources, properties and health benefits. 2012. 1–557.

90. Kim, H.J., et al., Naringin Protects against Rotenone-induced Apoptosis in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. Korean J Physiol Pharmacol, 2009. 13(4): p. 281–5.

91. Puranik, N.V., et al., Determination and analysis of agonist and antagonist potential of naturally occurring flavonoids for estrogen receptor (ERα) by various parameters and molecular modelling approach. Sci Rep, 2019. 9(1): p. 7450.

92. Elansary, H., et al., Polyphenol Profile and Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Natural Mentha × piperita and Mentha longifolia Populations in Northern Saudi Arabia. Processes, 2020. 8: p. 479.

93. Li, H., et al., Naringin inhibits growth potential of human triple-negative breast cancer cells by targeting β-catenin signaling pathway. Toxicol Lett, 2013. 220(3): p. 219–28.

94. Yoshinaga, A., et al., NEU3 inhibitory effect of naringin suppresses cancer cell growth by attenuation of EGFR signaling through GM3 ganglioside accumulation. Eur J Pharmacol, 2016. 782: p. 21–9.

95. Elsawy, H., et al., Naringin alleviates methotrexate-induced liver injury in male albino rats and enhances its antitumor efficacy in HepG2 cells. Biosci Rep, 2020. 40(6).

96. Li, L., et al., Naringin Regulates Microglia BV-2 Activation and Inflammation via the JAK/STAT3 Pathway. Evid Based Complement Alternat Med, 2022. 2022: p. 3492058.

97. Sost, M.M., et al., A Citrus Fruit Extract High in Polyphenols Beneficially Modulates the Gut Microbiota of Healthy Human Volunteers in a Validated *In Vitro* Model of the Colon. Nutrients, 2021. 13(11).

98. Chen, S.Y., et al., The Aurantii Fructus Immaturus flavonoid extract alleviates inflammation and modulate gut microbiota in DSS-induced colitis mice. Front Nutr, 2022. 9: p. 1013899.

99. von Knethen, A., M. Soller, and B. Brüne, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) and sepsis. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2007. 55(1): p. 19–25.

100. Kim, J.K., et al., Naringin protects acrolein-induced pulmonary injuries through modulating apoptotic signaling and inflammation signaling pathways in mice. J Nutr Biochem, 2018. 59: p. 10–16.

101. Jiang, J., et al., Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of total flavonoids of Qu Zhi Ke (peel of Citrus changshan-huyou) on non-alcoholic fatty liver disease in rats via modulation of NF-κB and MAPKs. Phytomedicine, 2019. 64: p. 153082.

102. Mohammadi, M., et al., The antifibrotic effects of naringin in a hypochlorous acid (HOCl)-induced mouse model of skin fibrosis. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2022. 44(5): p. 704–711.

103. Yen, J.H., et al., Improved Wound Healing by Naringin Associated with MMP and the VEGF Pathway. Molecules, 2022. 27(5).

104. Vabeiryureilai, M., K. Lalrinzuali, and G.C. Jagetia, NF-κB and COX-2 repression with topical application of hesperidin and naringin hydrogels augments repair and regeneration of deep dermal wounds. Burns, 2022. 48(1): p. 132–145.

105. Adiguzel, S., et al., Doxorubicin-loaded liposome-like particles embedded in chitosan/hyaluronic acid-based hydrogels as a controlled drug release model for local treatment of glioblastoma. Int J Biol Macromol, 2024. 278(Pt 4): p. 135054.

106. Alsakhawy, M.A., et al., Naringin-loaded Arabic gum/pectin hydrogel as a potential wound healing material. Int J Biol Macromol, 2022. 222(Pt A): p. 701–714.

107. Mu, H., et al., Naringin Attenuates High Fat Diet Induced Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Gut Bacterial Dysbiosis in Mice. Front Microbiol, 2020. 11: p. 585066.

108. Zhang, X., et al., Naringin improves lipid metabolism in a tissue-engineered liver model of NAFLD and the underlying mechanisms. Life Sci, 2021. 277: p. 119487.

109. Wang, R., et al., Naringin attenuates renal interstitial fibrosis by regulating the TGF-β/Smad signaling pathway and inflammation. Exp Ther Med, 2021. 21(1): p. 66.

110. Pérez, A., et al., Naringin prevents diabetic nephropathy in rats through blockage of oxidative stress and attenuation of the mitochondrial dysfunction. Can J Physiol Pharmacol, 2023. 101(7): p. 349–360.

111. Chen, F., et al., Naringin ameliorates the high glucose-induced rat mesangial cell inflammatory reaction by modulating the NLRP3 Inflammasome. BMC Complement Altern Med, 2018. 18(1): p. 192.

112. Amini, N., et al., The renoprotective effects of naringin and trimetazidine on renal ischemia/reperfusion injury in rats through inhibition of apoptosis and downregulation of micoRNA-10a. Biomed Pharmacother, 2019. 112: p. 108568.

113. Amini, N., et al., Protective effects of naringin and trimetazidine on remote effect of acute renal injury on oxidative stress and myocardial injury through Nrf-2 regulation. Pharmacol Rep, 2019. 71(6): p. 1059–1066.

114. Zhang, H.H., et al., Naringin suppressed airway inflammation and ameliorated pulmonary endothelial hyperpermeability by upregulating Aquaporin1 in lipopolysaccharide/cigarette smoke-induced mice. Biomed Pharmacother, 2022. 150: p. 113035.

115. Shi, R., et al., Naringin and Naringenin Relax Rat Tracheal Smooth by Regulating BK(Ca) Activation. J Med Food, 2019. 22(9): p. 963–970.

116. Ni, K., et al., Naringin as a plant-derived bitter tastant promotes proliferation of cultured human airway epithelial cells via activation of TAS2R signaling. Phytomedicine, 2021. 84: p. 153491.

117. George, M.Y., et al., Naringin treatment improved main clozapine-induced adverse effects in rats; emphasis on weight gain, metabolic abnormalities, and agranulocytosis. Drug Dev Res, 2021. 82(7): p. 980–989.

118. Hager-Theodorides, A.L., et al., Hesperidin and Naringin Improve Broiler Meat Fatty Acid Profile and Modulate the Expression of Genes Involved in Fatty Acid β-oxidation and Antioxidant Defense in a Dose Dependent Manner. Foods, 2021. 10(4).

119. Barajas-Vega, J.L., et al., Naringin reduces body weight, plasma lipids and increases adiponectin levels in patients with dyslipidemia. Int J Vitam Nutr Res, 2022. 92(3-4): p. 292–298.

120. Pengnet, S., et al., Naringin Reverses High-Cholesterol Diet-Induced Vascular Dysfunction and Oxidative Stress in Rats via Regulating LOX-1 and NADPH Oxidase Subunit Expression. Biomed Res Int, 2019. 2019: p. 3708497.

121. Tedgui, A. and Z. Mallat, Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. Physiol Rev, 2006. 86(2): p. 515–81.

122. Uryash, A., et al., Effects of Naringin on Cardiomyocytes From a Rodent Model of Type 2 Diabetes. Front Pharmacol, 2021. 12: p. 719268.

123. Tang, G., et al., Naringin Relieves Diabetic Cardiac Autonomic Neuropathy Mediated by P2Y(14) Receptor in Superior Cervical Ganglion. Front Pharmacol, 2022. 13: p. 873090.

124. Zhao, Z., et al., Naringin enhances endothelial progenitor cell (EPC) proliferation and tube formation capacity through the CXCL12/CXCR4/PI3K/Akt signaling pathway. Chem Biol Interact, 2018. 286: p. 45–51.

125. Li, F., et al., Naringin attenuates rat myocardial ischemia/reperfusion injury via PI3K/Akt pathway-mediated inhibition of apoptosis, oxidative stress and autophagy. Exp Ther Med, 2021. 22(2): p. 811.

126. Pan, J., et al., Targeting protein phosphatases for the treatment of inflammation-related diseases: From signaling to therapy. Signal Transduct Target Ther, 2022. 7(1): p. 177.

127. Madore, C., et al., Microglia, Lifestyle Stress, and Neurodegeneration. Immunity, 2020. 52(2): p. 222–240.

128. Petrine, J.C.P. and B. Del Bianco-Borges, The influence of phytoestrogens on different physiological and pathological processes: An overview. Phytother Res, 2021. 35(1): p. 180–197.

129. Jahanshahi, M., M. Khalili, and A. Margedari, Naringin Chelates Excessive Iron and Prevents the Formation of Amyloid-Beta Plaques in the Hippocampus of Iron-Overloaded Mice. Front Pharmacol, 2021. 12: p. 651156.

130. Qiu, Q., et al., Naringin Protects against Tau Hyperphosphorylation in Aβ (25-35)-Injured PC12 Cells through Modulation of ER, PI3K/AKT, and GSK-3β Signaling Pathways. Behav Neurol, 2023. 2023: p. 1857330.

131. Varshney, V. and D. Garabadu, Naringin Exhibits Mas Receptor-Mediated Neuroprotection Against Amyloid Beta-Induced Cognitive Deficits and Mitochondrial Toxicity in Rat Brain. Neurotox Res, 2021. 39(4): p. 1023–1043.

132. Hernández-Vázquez, L., et al., Recovery of naringin-rich flavonoid extracts from agroresidues with anxiolytic-and antidepressant-like effects in mice. Molecules, 2022. 27(23): p. 8507.

133. Gao, C., et al., Naringin Mediates Adult Hippocampal Neurogenesis for Antidepression via Activating CREB Signaling. Front Cell Dev Biol, 2022. 10: p. 731831.

134. Yang, J., et al., Protective Effects of Naringin in Cerebral Infarction and Its Molecular Mechanism. Med Sci Monit, 2020. 26: p. e918772.

135. Tolosa, E., et al., Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. Lancet Neurol, 2021. 20(5): p. 385–397.

136. Bai, X., Z. Bian, and M. Zhang, Targeting the Nrf2 signaling pathway using phytochemical ingredients: A novel therapeutic road map to combat neurodegenerative diseases. Phytomedicine, 2023. 109: p. 154582.

137. Garabadu, D. and N. Agrawal, Naringin Exhibits Neuroprotection Against Rotenone-Induced Neurotoxicity in Experimental Rodents. Neuromolecular Med, 2020. 22(2): p. 314–330.

138. Cargnin, S.T. and S.B. Gnoatto, Ursolic acid from apple pomace and traditional plants: A valuable triterpenoid with functional properties. Food Chem, 2017. 220: p. 477–489.

139. Anyanwu, G.O., et al., Medicinal plants of the genus Anthocleista--A review of their ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. J Ethnopharmacol, 2015. 175: p. 648–67.

140. Woźniak, Ł., S. Skąpska, and K. Marszałek, Ursolic Acid--A Pentacyclic Triterpenoid with a Wide Spectrum of Pharmacological Activities. Molecules, 2015. 20(11): p. 20614–41.

141. Jäger, S., et al., Pentacyclic triterpene distribution in various plants–rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. Molecules, 2009. 14(6): p. 2016–2031.

142. Ngo, S.N., D.B. Williams, and R.J. Head, Rosemary and cancer prevention: preclinical perspectives. Crit Rev Food Sci Nutr, 2011. 51(10): p. 946–54.

143. NA, J.C.F., et al., Pentacyclic Triterpene Bioavailability: An Overview of *In Vitro* and *In Vivo* Studies. Molecules, 2017. 22(3).

144. Zhou, X.J., et al., Preparation and body distribution of freeze-dried powder of ursolic acid phospholipid nanoparticles. Drug Dev Ind Pharm, 2009. 35(3): p. 305–10.

145. Chen, Q., et al., Development of a liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of ursolic acid in rat plasma and tissue: application to the pharmacokinetic and tissue distribution study. Anal Bioanal Chem, 2011. 399(8): p. 2877–84.

146. Yin, M.C., et al., Bioavailability, distribution, and antioxidative effects of selected triterpenes in mice. J Agric Food Chem, 2012. 60(31): p. 7697–701.

147. Tsai, S.J. and M.C. Yin, Anti-oxidative, anti-glycative and anti-apoptotic effects of oleanolic acid in brain of mice treated by D-galactose. Eur J Pharmacol, 2012. 689(1-3): p. 81–8.

148. Jinhua, W., Z. Ying, and L. Yuhua, PXR-ABC drug transporters/CYP-mediated ursolic acid transport and metabolism *in vitro* and vivo. Arch Pharm (Weinheim), 2020. 353(9): p. e2000082.

149. Yang, L., et al., Physicochemical properties and oral bioavailability of ursolic acid nanoparticles using supercritical anti-solvent (SAS) process. Food Chem, 2012. 132(1): p. 319–25.

150. Zhang, N., et al., Solubilization and delivery of Ursolic-acid for modulating tumor microenvironment and regulatory T cell activities in cancer immunotherapy. J Control Release, 2020. 320: p. 168–178.

151. Song, J., et al., Development and characterisation of ursolic acid nanocrystals without stabiliser having improved dissolution rate and *in vitro* anticancer activity. AAPS PharmSciTech, 2014. 15(1): p. 11–19.

152. Jiang, Q., et al., Dual strategies to improve oral bioavailability of oleanolic acid: Enhancing water-solubility, permeability and inhibiting cytochrome P450 isozymes. Eur J Pharm Biopharm, 2016. 99: p. 65–72.

153. Nieoczym, D., K. Socała, and P. Wlaź, Assessment of the Anticonvulsant Potency of Ursolic Acid in Seizure Threshold Tests in Mice. Neurochem Res, 2018. 43(5): p. 995–1002.

154. Yang, L.J., et al., Inter-regulation of IGFBP1 and FOXO3a unveils novel mechanism in ursolic acid-inhibited growth of hepatocellular carcinoma cells. J Exp Clin Cancer Res, 2016. 35: p. 59.

155. Gu, G., et al., Oldenlandia diffusa extracts exert antiproliferative and apoptotic effects on human breast cancer cells through ERα/Sp1-mediated p53 activation. J Cell Physiol, 2012. 227(10): p. 3363–72.

156. Xavier, C.P., et al., Ursolic acid induces cell death and modulates autophagy through JNK pathway in apoptosis-resistant colorectal cancer cells. J Nutr Biochem, 2013. 24(4): p. 706–12.

157. Qian, W., et al., Antimicrobial and antibiofilm activities of ursolic acid against carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae. J Antibiot (Tokyo), 2020. 73(6): p. 382–391.

158. Jyoti, M.A., et al., *In vitro* effect of ursolic acid on the inhibition of Mycobacterium tuberculosis and its cell wall mycolic acid. Pulm Pharmacol Ther, 2015. 33: p. 17–24.

159. Yuliang, W., et al., The hypolipidemic effect of artesunate and ursolic acid in rats. Pak J Pharm Sci, 2015. 28(3): p. 871–4.

160. Liu, B., et al., Ursolic acid protects against ulcerative colitis via anti-inflammatory and antioxidant effects in mice. Mol Med Rep, 2016. 13(6): p. 4779–85.

161. Dong, X., et al., Downregulation of miR-21 is involved in direct actions of ursolic acid on the heart: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. Cardiovascular therapeutics, 2015. 33 4: p. 161–7.

162. Zang, L.L., et al., Research progress of ursolic acid's anti-tumor actions. Chin J Integr Med, 2014. 20(1): p. 72–9.

163. Conway, G.E., et al., Ursolic Acid Inhibits Collective Cell Migration and Promotes JNK-Dependent Lysosomal Associated Cell Death in Glioblastoma Multiforme Cells. Pharmaceuticals (Basel), 2021. 14(2).

164. Jiang, W., et al., Discovery of antitumor ursolic acid long-chain diamine derivatives as potent inhibitors of NF-κB. Bioorg Chem, 2018. 79: p. 265–276.

165. Zheng, Q.Y., et al., Ursolic acid induces ER stress response to activate ASK1-JNK signaling and induce apoptosis in human bladder cancer T24 cells. Cell Signal, 2013. 25(1): p. 206–13.

166. Lind, D.S., et al., Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer. Surgery, 2001. 130(2): p. 363–9.

167. Kojima, M., et al., Increased nuclear factor-kB activation in human colorectal carcinoma and its correlation with tumor progression. Anticancer Res, 2004. 24(2b): p. 675–81.

168. Ban, J.O., et al., Inhibition of cell growth and induction of apoptosis via inactivation of NF-kappaB by a sulfurcompound isolated from garlic in human colon cancer cells. J Pharmacol Sci, 2007. 104(4): p. 374–83.

169. Prasad, S., et al., Ursolic acid inhibits growth and metastasis of human colorectal cancer in an orthotopic nude mouse model by targeting multiple cell signaling pathways: chemosensitization with capecitabine. Clin Cancer Res, 2012. 18(18): p. 4942–53.

170. Shan, J.Z., et al., Proliferation-inhibiting and apoptosis-inducing effects of ursolic acid and oleanolic acid on multi-drug resistance cancer cells *in vitro*. Chin J Integr Med, 2011. 17(8): p. 607–11.

171. Kim, K.H., et al., Induction of apoptotic cell death by ursolic acid through mitochondrial death pathway and extrinsic death receptor pathway in MDA-MB-231 cells. Arch Pharm Res, 2011. 34(8): p. 1363–72.

172. Yeh, C.T., C.H. Wu, and G.C. Yen, Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, suppresses migration and invasion of human breast cancer cells by modulating c-Jun N-terminal kinase, Akt and mammalian target of rapamycin signaling. Mol Nutr Food Res, 2010. 54(9): p. 1285–95.

173. Wang, J.S., T.N. Ren, and T. Xi, Ursolic acid induces apoptosis by suppressing the expression of FoxM1 in MCF-7 human breast cancer cells. Med Oncol, 2012. 29(1): p. 10–5.

174. Lin, C.C., et al., Antiangiogenic potential of three triterpenic acids in human liver cancer cells. J Agric Food Chem, 2011. 59(2): p. 755–62.

175. Song, Y.H., et al., Ursolic acid from Oldenlandia diffusa induces apoptosis via activation of caspases and phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 beta in SK-OV-3 ovarian cancer cells. Biol Pharm Bull, 2012. 35(7): p. 1022–8.

176. Huang, C.Y., et al., Inhibition of cell proliferation, invasion and migration by ursolic acid in human lung cancer cell lines. Toxicol *In Vitro*, 2011. 25(7): p. 1274–80.

177. Grudniak, A., et al., Oleanolic and Ursolic Acids Influence Affect the Expression of the Cysteine Regulon and the Stress Response in Escherichia coli. Current microbiology, 2011. 62: p. 1331–6.

178. Quéré, L., T. Wenger, and H.J. Schramm, Triterpenes as potential dimerization inhibitors of HIV-1 protease. Biochem Biophys Res Commun, 1996. 227(2): p. 484–8.

179. Kong, L., et al., Oleanolic acid and ursolic acid: novel hepatitis C virus antivirals that inhibit NS5B activity. Antiviral Res, 2013. 98(1): p. 44–53.

180. Saraswat, B., P.K. Visen, and D.P. Agarwal, Ursolic acid isolated from Eucalyptus tereticornis protects against ethanol toxicity in isolated rat hepatocytes. Phytother Res, 2000. 14(3): p. 163–6.

181. Saravanan, R., P. Viswanathan, and K.V. Pugalendi, Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. Life Sci, 2006. 78(7): p. 713–8.

182. Shukla, B., et al., Hepatoprotective activity in the rat of ursolic acid isolated from eucalyptus hybrid. Phytotherapy Research, 1992. 6(2): p. 74–79.

183. Martin-Aragón, S., et al., Pharmacological modification of endogenous antioxidant enzymes by ursolic acid on tetrachloride-induced liver damage in rats and primary cultures of rat hepatocytes. Exp Toxicol Pathol, 2001. 53(2-3): p. 199–206.

184. Wang, X., et al., Ursolic acid ameliorates hepatic fibrosis in the rat by specific induction of apoptosis in hepatic stellate cells. J Hepatol, 2011. 55(2): p. 379–87.

185. Cheng, J., et al., Ursolic acid alleviates lipid accumulation by activating the AMPK signaling pathway *in vivo* and *in vitro*. J Food Sci, 2020. 85(11): p. 3998–4008.

186. Zhao, J., et al., Ursolic acid exhibits anti-inflammatory effects through blocking TLR4-MyD88 pathway mediated by autophagy. Cytokine, 2019. 123: p. 154726.

187. Wei, X., et al., Ursolic acid represses influenza A virus-triggered inflammation and oxidative stress in A549 cells by modulating the miR-34c-5p/TLR5 axis. Cytokine, 2022. 157: p. 155947.

188. Somova, L.O., et al., Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology, 2003. 10: p. 115–21.

189. Leng, S., et al., Ursolic acid enhances macrophage autophagy and attenuates atherogenesis. J Lipid Res, 2016. 57(6): p. 1006–16.

190. Wang, T.Z., et al., Ursolic acid ameliorates adipose tissue insulin resistance in aged rats via activating the Akt-glucose transporter 4 signaling pathway and inhibiting inflammation. Exp Ther Med, 2021. 22(6): p. 1466.

191. Jia, Y., et al., Ursolic acid is a PPAR-α agonist that regulates hepatic lipid metabolism. Bioorg Med Chem Lett, 2011. 21(19): p. 5876–80.

192. Rai, S.N., et al., Anti-inflammatory Activity of Ursolic Acid in MPTP-Induced Parkinsonian Mouse Model. Neurotox Res, 2019. 36(3): p. 452–462.

193. Werner, C. and K. Engelhard, Pathophysiology of traumatic brain injury. Br J Anaesth, 2007. 99(1): p. 4–9.

194. Cornelius, C., et al., Traumatic brain injury: oxidative stress and neuroprotection. Antioxid Redox Signal, 2013. 19(8): p. 836–53.

195. Kandhare, A.D., et al., Effect of glycosides based standardized fenugreek seed extract in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats: Decisive role of Bax, Nrf2, NF-κB, Muc5ac, TNF-α and IL-1β. Chemico-Biological Interactions, 2015. 237: p. 151–165.

196. Wang, B., et al., Histone deacetylase inhibition activates transcription factor Nrf2 and protects against cerebral ischemic damage. Free Radic Biol Med, 2012. 52(5): p. 928–36.

197. Xu, J., et al., Luteolin provides neuroprotection in models of traumatic brain injury via the Nrf2-ARE pathway. Free Radic Biol Med, 2014. 71: p. 186–195.

198. Ding, K., et al., Melatonin stimulates antioxidant enzymes and reduces oxidative stress in experimental traumatic brain injury: the Nrf2-ARE signaling pathway as a potential mechanism. Free Radic Biol Med, 2014. 73: p. 1–11.

199. Ding, H., et al., Ursolic Acid Ameliorates Early Brain Injury After Experimental Traumatic Brain Injury in Mice by Activating the Nrf2 Pathway. Neurochem Res, 2017. 42(2): p. 337–346.

200. Görbitz, C.H., Nanotube formation by hydrophobic dipeptides. Chemistry, 2001. 7(23): p. 5153–9.

201. Gazit, E., Self-assembled peptide nanostructures: the design of molecular building blocks and their technological utilization. Chemical Society Reviews, 2007. 36(8): p. 1263–1269.

202. Reches, M. and E. Gazit, Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes. Science, 2003. 300(5619): p. 625–7.

203. Song, Y., et al., Synthesis of peptide-nanotube platinum-nanoparticle composites: Electronic supplementary information (ESI) available: EDX spectrum and SAED patterns of the platinum-peptide composites. See http://www.rsc.org/suppdata/cc/b4/b402126f. Chemical Communications - CHEM COMMUN, 2004.

204. Kelly, C., et al., Conformational dynamics and aggregation behavior of piezoelectric diphenylalanine peptides in an external electric field. Biophysical Chemistry, 2015.

205. Görbitz, C.H., The structure of nanotubes formed by diphenylalanine, the core recognition motif of Alzheimer's β-amyloid polypeptide. Chemical Communications, 2006(22): p. 2332–2334.

206. Lakshmanan, A., et al., Aliphatic peptides show similar self-assembly to amyloid core sequences, challenging the importance of aromatic interactions in amyloidosis. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(2): p. 519–24.

207. Cukalevski, R., et al., Role of aromatic side chains in amyloid β-protein aggregation. ACS Chem Neurosci, 2012. 3(12): p. 1008–16.

208. Senguen, F.T., et al., Probing aromatic, hydrophobic, and steric effects on the self-assembly of an amyloid-β fragment peptide. Molecular BioSystems, 2011. 7(2): p. 486–496.

209. Grabowski, T.J., et al., Novel amyloid precursor protein mutation in an Iowa family with dementia and severe cerebral amyloid angiopathy. Ann Neurol, 2001. 49(6): p. 697–705.

210. Brahmachari, S., et al., Diphenylalanine as a Reductionist Model for the Mechanistic Characterization of β-Amyloid Modulators. ACS Nano, 2017. 11(6): p. 5960–5969.

211. Sharma, N.S., et al., Advances in Modeling Alzheimer's Disease *In Vitro*. Advanced NanoBiomed Research, 2021. 1(12): p. 2100097.

212. Bousquet, J. and J.M. Meunier, [Organotypic culture, on natural and artificial media, of fragments of the adult rat hypophysis]. C R Seances Soc Biol Fil, 1962. 156: p. 65–7.

213. Slanzi, A., et al., *In vitro* Models of Neurodegenerative Diseases. Front Cell Dev Biol, 2020. 8: p. 328.

214. Crain, S.M., Development of “Organotypic” Bioelectric Activities in Central Nervous Tissues During Maturation in Culture11This work was supported by grants NB-03814 and NB-K3-2904 from the National Institute of Neurological Diseases and Blindness, in International Review of Neurobiology, C.C. Pfeiffer and J.R. Smythies, Editors. 1966, Academic Press. p. 1–43.

215. Walsh, K., J. Megyesi, and R. Hammond, Human central nervous system tissue culture: a historical review and examination of recent advances. Neurobiol Dis, 2005. 18(1): p. 2–18.

216. Giri, T.K., et al., Current Status of Stem Cell Therapies in Tissue Repair and Regeneration. Curr Stem Cell Res Ther, 2019. 14(2): p. 117–126.

217. Kovalevich, J., M. Santerre, and D. Langford, Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. Methods Mol Biol, 2021. 2311: p. 9–23.

218. Belle, S.H., et al., Use of cognitive enhancement medication in persons with Alzheimer disease who have a family caregiver: results from the Resources for Enhancing Alzheimer's Caregiver Health (REACH) project. Am J Geriatr Psychiatry, 2004. 12(3): p. 250–7.

219. Puangmalai, N., et al., Neuroprotection of N-benzylcinnamide on scopolamine-induced cholinergic dysfunction in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. Neural Regen Res, 2017. 12(9): p. 1492–1498.

220. Konar, A., et al., Protective role of Ashwagandha leaf extract and its component withanone on scopolamine-induced changes in the brain and brain-derived cells. PLoS One, 2011. 6(11): p. e27265.

221. Yu, D., et al., Isoflavonoids from Astragalus mongholicus protect PC12 cells from toxicity induced by L-glutamate. J Ethnopharmacol, 2005. 98(1-2): p. 89–94.

222. Bagaméry, F., et al., The impact of differentiation on cytotoxicity and insulin sensitivity in Streptozotocin treated SH-SY5Y cells. Neurochemical Research, 2021. 46: p. 1350–1358.

223. Wang, Y., et al., Fine particulate matter induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in human SH-SY5Y cells. Chemosphere, 2019. 218: p. 577–588.

224. Chen, J., et al., The effects of sodium nitroprusside and L-glutamate on the regulation of the cytoskeletal associated protein tau in primary cultured neurons from rat, in Biochemical, pharmacological, and clinical aspects of nitric oxide. 1995, Springer. p. 205–212.

225. Plaschke, K. and J. Kopitz, *In vitro* streptozotocin model for modeling Alzheimer-like changes: effect on amyloid precursor protein secretases and glycogen synthase kinase-3. Journal of neural transmission, 2015. 122: p. 551–557.

226. Takaki, J., et al., L-glutamate released from activated microglia downregulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: the 'collusion' hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. J Neuroinflammation, 2012. 9: p. 275.

227. Lee, J., et al., Curcumin and hesperetin attenuate D-galactose-induced brain senescence *in vitro* and *in vivo*. Nutr Res Pract, 2020. 14(5): p. 438–452.

228. Rahimi, V.B., V.R. Askari, and S.H. Mousavi, Ellagic acid reveals promising anti-aging effects against d-galactose-induced aging on human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y: A mechanistic study. Biomed Pharmacother, 2018. 108: p. 1712–1724.

229. Hou, J., et al., D-galactose induces astrocytic aging and contributes to astrocytoma progression and chemoresistance via cellular senescence. Mol Med Rep, 2019. 20(5): p. 4111–4118.

230. Dong, Y., et al., The anesthetic sevoflurane induces tau trafficking from neurons to microglia. Commun Biol, 2021. 4(1): p. 560.

231. Wei, G.H., et al., The common anesthetic, sevoflurane, induces apoptosis in A549 lung alveolar epithelial cells. Mol Med Rep, 2014. 9(1): p. 197–203.

232. Boost, K.A., et al., Sevoflurane and isoflurane decrease TNF-alpha-induced gene expression in human monocytic THP-1 cells: potential role of intracellular IkappaBalpha regulation. Int J Mol Med, 2009. 23(5): p. 665–71.

233. Liu, J., et al., Sevoflurane induced neurotoxicity in neonatal mice links to a GSK3β/Drp1-dependent mitochondrial fission and apoptosis. Free Radic Biol Med, 2022. 181: p. 72–81.

234. Huang, D., et al., Naringin protects against steroid-induced avascular necrosis of the femoral head through upregulation of PPARγ and activation of the Notch signaling pathway. Mol Med Rep, 2018. 17(2): p. 3328–3335.

235. Nie, C.L., et al., Formaldehyde at low concentration induces protein tau into globular amyloid-like aggregates *in vitro* and *in vivo*. PLoS One, 2007. 2(7): p. e629.

236. Lu, J., et al., Formaldehyde induces hyperphosphorylation and polymerization of Tau protein both *in vitro* and *in vivo*. Biochim Biophys Acta, 2013. 1830(8): p. 4102–16.

237. Mustafa Rizvi, S.H., et al., Aluminium induced endoplasmic reticulum stress mediated cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cell line is independent of p53. PLoS One, 2014. 9(5): p. e98409.

238. Kawahara, M., et al., Aluminum promotes the aggregation of Alzheimer's amyloid beta-protein *in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. 198(2): p. 531–5.

239. Hong, Y. and Z. An, Hesperidin attenuates learning and memory deficits in APP/PS1 mice through activation of Akt/Nrf2 signaling and inhibition of RAGE/NF-κB signaling. Arch Pharm Res, 2018. 41(6): p. 655–663.

240. Sanajou, S., et al., Antioxidant dihydrolipolic acid protects against *in vitro* aluminum-induced toxicity. J Appl Toxicol, 2023. 43(12): p. 1793–1805.

241. Cai, T., et al., Manganese induces tau hyperphosphorylation through the activation of ERK MAPK pathway in PC12 cells. Toxicol Sci, 2011. 119(1): p. 169–77.

242. Tong, Y., et al., High manganese, a risk for Alzheimer's disease: high manganese induces amyloid-β related cognitive impairment. J Alzheimers Dis, 2014. 42(3): p. 865–78.

243. Yang, Y., et al., Dysregulated APP expression and α-secretase processing of APP is involved in manganese-induced cognitive impairment. Ecotoxicol Environ Saf, 2021. 220: p. 112365.

244. Wang, X., et al., Insulin inhibits Abeta production through modulation of APP processing in a cellular model of Alzheimer's disease. Neuro Endocrinol Lett, 2014. 35(3): p. 224–9.

245. Kamat, P.K., Streptozotocin induced Alzheimer's disease like changes and the underlying neural degeneration and regeneration mechanism. Neural Regen Res, 2015. 10(7): p. 1050–2.

246. Sun, P., et al., Streptozotocin Impairs Proliferation and Differentiation of Adult Hippocampal Neural Stem Cells *in vitro*-Correlation With Alterations in the Expression of Proteins Associated With the Insulin System. Front Aging Neurosci, 2018. 10: p. 145.

247. Bagaméry, F., et al., Lack of insulin resistance in response to streptozotocin treatment in neuronal SH-SY5Y cell line. J Neural Transm (Vienna), 2020. 127(1): p. 71–80.

248. Bansal, S., et al., Everolimus: A potential therapeutic agent targeting PI3K/Akt pathway in brain insulin system dysfunction and associated neurobehavioral deficits. Fundam Clin Pharmacol, 2021. 35(6): p. 1018–1031.

249. Bonneh-Barkay, D. and C.A. Wiley, Brain extracellular matrix in neurodegeneration. Brain Pathol, 2009. 19(4): p. 573–85.

250. Barros, C.S., S.J. Franco, and U. Müller, Extracellular matrix: functions in the nervous system. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. 3(1): p. a005108.

251. Long, K.R. and W.B. Huttner, How the extracellular matrix shapes neural development. Open Biol, 2019. 9(1): p. 180216.

252. Lv, D., et al., Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. Oncol Lett, 2017. 14(6): p. 6999–7010.

253. Jensen, C. and Y. Teng, Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? Front Mol Biosci, 2020. 7: p. 33.

254. Antoni, D., et al., Three-dimensional cell culture: a breakthrough *in vivo*. Int J Mol Sci, 2015. 16(3): p. 5517–27.

255. Ravi, M., et al., 3D cell culture systems: advantages and applications. J Cell Physiol, 2015. 230(1): p. 16–26.

256. Ranjan, V.D., et al., A microfiber scaffold-based 3D *in vitro* human neuronal culture model of Alzheimer's disease. Biomaterials Science, 2020. 8(17): p. 4861–4874.

257. Choi, S.H., et al., A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. Nature, 2014. 515(7526): p. 274–8.

258. Mabrouk, M., H.H. Beherei, and D.B. Das, Recent progress in the fabrication techniques of 3D scaffolds for tissue engineering. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2020. 110: p. 110716.

259. Perez-Puyana, V., et al., Fabrication and Characterization of Hydrogels Based on Gelatinised Collagen with Potential Application in Tissue Engineering. Polymers (Basel), 2020. 12(5).

260. Koroleva, A., et al., *In Vitro* Development of Human iPSC-Derived Functional Neuronal Networks on Laser-Fabricated 3D Scaffolds. ACS Applied Materials & Interfaces, 2021. 13(7): p. 7839–7853.

261. Hoffman, A.S., Hydrogels for biomedical applications. Adv Drug Deliv Rev, 2002. 54(1): p. 3–12.

262. Dillon, G.P., et al., The influence of physical structure and charge on neurite extension in a 3D hydrogel scaffold. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 1998. 9(10): p. 1049–1069.

263. Balgude, A.P., et al., Agarose gel stiffness determines rate of DRG neurite extension in 3D cultures. Biomaterials, 2001. 22(10): p. 1077–84.

264. Ruoslahti, E., Brain extracellular matrix. Glycobiology, 1996. 6(5): p. 489–492.

265. Fang, Y. and R.M. Eglen, Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. SLAS Discov, 2017. 22(5): p. 456–472.

266. Nakano, T., et al., Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. Cell Stem Cell, 2012. 10(6): p. 771–785.

267. Muguruma, K., et al., Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. Cell Rep, 2015. 10(4): p. 537–50.

268. Mansour, A.A., et al., An *in vivo* model of functional and vascularized human brain organoids. Nat Biotechnol, 2018. 36(5): p. 432–441.

269. Pham, M.T., et al., Generation of human vascularized brain organoids. Neuroreport, 2018. 29(7): p. 588–593.

270. Lancaster, M.A., et al., Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. Nature, 2013. 501(7467): p. 373–9.

271. Sun, N., et al., Applications of brain organoids in neurodevelopment and neurological diseases. J Biomed Sci, 2021. 28(1): p. 30.

272. Di Lullo, E. and A.R. Kriegstein, The use of brain organoids to investigate neural development and disease. Nat Rev Neurosci, 2017. 18(10): p. 573–584.

273. Premeaux, T.A., et al., Next-Generation Human Cerebral Organoids as Powerful Tools To Advance NeuroHIV Research. mBio, 2021. 12(4): p. e0068021.

274. Camp, J.G., et al., Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. 112(51): p. 15672–7.

275. Amin, N.D. and S.P. Paşca, Building Models of Brain Disorders with Three-Dimensional Organoids. Neuron, 2018. 100(2): p. 389–405.

276. Qian, X., H. Song, and G.L. Ming, Brain organoids: advances, applications and challenges. Development, 2019. 146(8).

277. Sloan, S.A., et al., Human Astrocyte Maturation Captured in 3D Cerebral Cortical Spheroids Derived from Pluripotent Stem Cells. Neuron, 2017. 95(4): p. 779–790.e6.

278. Choi, S.H., et al., 3D culture models of Alzheimer's disease: a road map to a "cure-in-a-dish". Molecular Neurodegeneration, 2016. 11(1): p. 75.

279. Gonzalez, C., et al., Modeling amyloid beta and tau pathology in human cerebral organoids. Mol Psychiatry, 2018. 23(12): p. 2363–2374.

280. Zhao, J., et al., APOE4 exacerbates synapse loss and neurodegeneration in Alzheimer's disease patient iPSC-derived cerebral organoids. Nature Communications, 2020. 11(1): p. 5540.

281. Raja, W.K., et al., Self-Organizing 3D Human Neural Tissue Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate Alzheimer's Disease Phenotypes. PLoS One, 2016. 11(9): p. e0161969.

282. Chandrasekaran, A., et al., Astrocyte Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells: New Tools for Neurological Disorder Research. Front Cell Neurosci, 2016. 10: p. 215.

283. Hodge, R.D., et al., Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. Nature, 2019. 573(7772): p. 61–68.

284. Warren, M.S., et al., Comparative gene expression profiles of ABC transporters in brain microvessel endothelial cells and brain in five species including human. Pharmacol Res, 2009. 59(6): p. 404–13.

285. Baker, B.M. and C.S. Chen, Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. J Cell Sci, 2012. 125(Pt 13): p. 3015–24.

286. Velasco, S., et al., Individual brain organoids reproducibly form cell diversity of the human cerebral cortex. Nature, 2019. 570(7762): p. 523–527.

287. Huh, D., G.A. Hamilton, and D.E. Ingber, From 3D cell culture to organs-on-chips. Trends Cell Biol, 2011. 21(12): p. 745–54.

288. Moraes, C., et al., Organs-on-a-chip: a focus on compartmentalized microdevices. Ann Biomed Eng, 2012. 40(6): p. 1211–27.

289. Zhang, B., et al., Advances in organ-on-a-chip engineering. Nature Reviews Materials, 2018. 3.

290. Nicolas, J., et al., 3D Extracellular Matrix Mimics: Fundamental Concepts and Role of Materials Chemistry to Influence Stem Cell Fate. Biomacromolecules, 2020. 21(6): p. 1968–1994.

291. Li, Y., et al., Microfluidics-Based Systems in Diagnosis of Alzheimer's Disease and Biomimetic Modeling. Micromachines (Basel), 2020. 11(9).

292. Holloway, P.M., et al., Advances in microfluidic *in vitro* systems for neurological disease modeling. J Neurosci Res, 2021. 99(5): p. 1276–1307.

293. Caffrey, T.M., E.B. Button, and J. Robert, Toward three-dimensional *in vitro* models to study neurovascular unit functions in health and disease. Neural Regen Res, 2021. 16(11): p. 2132–2140.

294. Bang, S., et al., Engineered neural circuits for modeling brain physiology and neuropathology. Acta Biomater, 2021. 132: p. 379–400.

295. Brown, M.R., S.E. Radford, and E.W. Hewitt, Modulation of β-Amyloid Fibril Formation in Alzheimer's Disease by Microglia and Infection. Front Mol Neurosci, 2020. 13: p. 609073.

296. Wainberg, M., et al., The viral hypothesis: how herpesviruses may contribute to Alzheimer's disease. Mol Psychiatry, 2021. 26(10): p. 5476–5480.

297. Vigasova, D., et al., Multi-pathogen infections and Alzheimer's disease. Microb Cell Fact, 2021. 20(1): p. 25.

298. Abbott, A., Are infections seeding some cases of Alzheimer's disease? Nature, 2020. 587(7832): p. 22–25.

299. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, 1983. 65(1): p. 55–63.

300. Denizot, F. and R. Lang, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods, 1986. 89(2): p. 271–7.

301. Liu, Y., et al., Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. J Neurochem, 1997. 69(2): p. 581–93.

302. Hansen, C.H. and N. Brunner, MTT-cell proliferation assay. Cell biology, 1998.

303. Fu, Y., et al., Increased unsaturated lipids underlie lipid peroxidation in synucleinopathy brain. Acta Neuropathologica Communications, 2022. 10(1): p. 165.

304. Perluigi, M., F. Di Domenico, and D.A. Butterfield, Oxidative damage in neurodegeneration: roles in the pathogenesis and progression of Alzheimer disease. Physiol Rev, 2024. 104(1): p. 103–197.

305. Pritam, P., et al., Antioxidants in Alzheimer's Disease: Current Therapeutic Significance and Future Prospects. Biology (Basel), 2022. 11(2).

306. Donato, M. and L. Tolosa, High-Content Screening for the Detection of Drug-Induced Oxidative Stress in Liver Cells. Antioxidants (Basel), 2021. 10(1).

307. Wang, H. and J.A. Joseph, Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. Free Radic Biol Med, 1999. 27(5-6): p. 612–6.

308. Kuchařová, M., et al., Comet assay and its use for evaluating oxidative DNA damage in some pathological states. Physiol Res, 2019. 68(1): p. 1–15.

309. Ostling, O. and K.J. Johanson, Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun, 1984. 123(1): p. 291–8.

310. Singh, N.P., et al., A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res, 1988. 175(1): p. 184–91.

311. Collins, A.R., et al., The comet assay: topical issues. Mutagenesis, 2008. 23(3): p. 143–51.

312. David, S.S. and S.D. Williams, Chemistry of Glycosylases and Endonucleases Involved in Base-Excision Repair. Chem Rev, 1998. 98(3): p. 1221–1262.

313. Hampel, H., et al., Biomarkers for Alzheimer's disease: academic, industry and regulatory perspectives. Nat Rev Drug Discov, 2010. 9(7): p. 560–74.

314. Simrén, J., et al., Fluid biomarkers in Alzheimer's disease. Adv Clin Chem, 2023. 112: p. 249–281.

315. Bacanlı, M., A.A. Başaran, and N. Başaran, The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. Food Chem Toxicol, 2015. 81: p. 160–170.

316. Hamaguchi, T., et al., Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid-beta aggregation pathway. Am J Pathol, 2009. 175(6): p. 2557–65.

317. Zhang, Y., et al., A dual effect of ursolic acid to the treatment of multiple sclerosis through both immunomodulation and direct remyelination. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. 117(16): p. 9082–9093.

318. Kour, A., et al., Anti-Amyloidogenic and Fibril-Disaggregating Potency of the Levodopa-Functionalized Gold Nanoroses as Exemplified in a Diphenylalanine-Based Amyloid Model. Bioconjug Chem, 2022. 33(2): p. 397–410.

319. Demirel, G., N. Malvadkar, and M.C. Demirel, Control of protein adsorption onto core-shell tubular and vesicular structures of diphenylalanine/parylene. Langmuir, 2010. 26(3): p. 1460–3.

320. Erdogan, H., et al., Morphological Versatility in the Self-Assembly of Val-Ala and Ala-Val Dipeptides. Langmuir, 2015. 31(26): p. 7337–7345.

321. Lane, R.M., M. Kivipelto, and N.H. Greig, Acetylcholinesterase and its inhibition in Alzheimer disease. Clin Neuropharmacol, 2004. 27(3): p. 141–9.

322. Panza, F., et al., A critical appraisal of amyloid-β-targeting therapies for Alzheimer disease. Nat Rev Neurol, 2019. 15(2): p. 73–88.

323. Tsai, S.J. and M.C. Yin, Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells. J Food Sci, 2008. 73(7): p. H174–8.

324. Barnham, K.J., C.L. Masters, and A.I. Bush, Neurodegenerative diseases and oxidative stress. Nat Rev Drug Discov, 2004. 3(3): p. 205–14.

325. Kulasekaran, G. and S. Ganapasam, Neuroprotective efficacy of naringin on 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial dysfunction through the modulation of Nrf2 signaling pathway in PC12 cells. Mol Cell Biochem, 2015. 409(1-2): p. 199–211.

326. Lu, J., et al., Ursolic acid attenuates D-galactose-induced inflammatory response in mouse prefrontal cortex through inhibiting AGEs/RAGE/NF-κB pathway activation. Cereb Cortex, 2010. 20(11): p. 2540–8.

327. Jagetia, A., G.C. Jagetia, and S. Jha, Naringin, a grapefruit flavanone, protects V79 cells against the bleomycin-induced genotoxicity and decline in survival. J Appl Toxicol, 2007. 27(2): p. 122–32.

328. Ali, M.S., et al., Ursolic acid: a potent inhibitor of superoxides produced in the cellular system. Phytother Res, 2007. 21(6): p. 558–61.

329. Ramos, A.A., C. Pereira-Wilson, and A.R. Collins, Protective effects of ursolic acid and luteolin against oxidative DNA damage include enhancement of DNA repair in Caco-2 cells. Mutat Res, 2010. 692(1-2): p. 6–11.

330. Rice-Evans, C.A., et al., The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. Free Radic Res, 1995. 22(4): p. 375–83.

331. Ramos, A.A., et al., Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: evaluation by the comet assay. Toxicol Lett, 2008. 177(1): p. 66–73.

332. Meng, X., et al., Naringin ameliorates memory deficits and exerts neuroprotective effects in a mouse model of Alzheimer's disease by regulating multiple metabolic pathways. Mol Med Rep, 2021. 23(5).

333. Silva, T., et al., Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: from natural products to drug prototypes. Ageing Res Rev, 2014. 15: p. 116–45.

334. Heo, H.J., et al., Ursolic acid of Origanum majorana L. reduces Abeta-induced oxidative injury. Mol Cells, 2002. 13(1): p. 5–11.

335. Wang, N., et al., Ursolic acid ameliorates amyloid β-induced pathological symptoms in Caenorhabditis elegans by activating the proteasome. Neurotoxicology, 2022. 88: p. 231–240.

336. Liang, W., et al., Ursolic acid attenuates beta-amyloid-induced memory impairment in mice. Arq Neuropsiquiatr, 2016. 74(6): p. 482–8.

337. Chung, Y.K., et al., Inhibitory effect of ursolic acid purified from Origanum majorana L on the acetylcholinesterase. Mol Cells, 2001. 11(2): p. 137–43.

338. Loesche, A., et al., Ursolic and oleanolic acid derivatives with cholinesterase inhibiting potential. Bioorg Chem, 2019. 85: p. 23–32.

339. Habtemariam, S., Antioxidant and Anti-inflammatory Mechanisms of Neuroprotection by Ursolic Acid: Addressing Brain Injury, Cerebral Ischemia, Cognition Deficit, Anxiety, and Depression. Oxid Med Cell Longev, 2019. 2019: p. 8512048.

340. Lu, J., et al., Ursolic acid ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in the brain of senescent mice induced by D-galactose. Biochem Pharmacol, 2007. 74(7): p. 1078–90.

341. Long, J.Y., et al., Naringin provides neuroprotection in CCL2-induced cognition impairment by attenuating neuronal apoptosis in the hippocampus. Behav Brain Funct, 2020. 16(1): p. 4.

342. Kankılıç, N.A., et al., Naringin protects against paclitaxel-induced toxicity in rat testicular tissues by regulating genes in pro-inflammatory cytokines, oxidative stress, apoptosis, and JNK/MAPK signaling pathways. J Biochem Mol Toxicol, 2024. 38(7): p. e23751.

343. Sachdeva, A.K. and K. Chopra, Naringin mitigate okadaic acid-induced cognitive impairment in an experimental paradigm of Alzheimer's disease. Journal of Functional Foods, 2015. 19: p. 110–125.

344. Zhang, T., et al., Ursolic acid reduces oxidative stress to alleviate early brain injury following experimental subarachnoid hemorrhage. Neurosci Lett, 2014. 579: p. 12–7.

345. Li, J., et al., Protective effect of ursolic acid on ischemic brain injury by regulating hypoxia-inducible factor 1-alpha. Int. J. Clin. Exp. Med, 2019. 12: p. 3612–3621.

346. Fricker, M., et al., Neuronal Cell Death. Physiol Rev, 2018. 98(2): p. 813–880.

347. Chen, Y., et al., The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. Cell Prolif, 2020. 53(3): p. e12781.

348. Qu, Y.J., et al., Acteoside and ursolic acid synergistically protects H(2)O(2)-induced neurotrosis by regulation of AKT/mTOR signalling: from network pharmacology to experimental validation. Pharm Biol, 2022. 60(1): p. 1751–1761.

349. Shanmugam, M.K., et al., Inhibition of CXCR4/CXCL12 signaling axis by ursolic acid leads to suppression of metastasis in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. Int J Cancer, 2011. 129(7): p. 1552–63.

350. Kassi, E., et al., Ursolic acid triggers apoptosis and Bcl-2 downregulation in MCF-7 breast cancer cells. Cancer Invest, 2009. 27(7): p. 723–33.

351. Andersson, D., et al., Ursolic acid inhibits proliferation and stimulates apoptosis in HT29 cells following activation of alkaline sphingomyelinase. Anticancer Res, 2003. 23(4): p. 3317–22.