T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL ALZHEİMER HASTALIK MODELİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA NİGELLA SATİVA L. VE TİMOKİNON'UN ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

Saliha Ayşenur ÇAM

TIBBİ FARMAKOLOJİ PROGRAMI

Ankara, 2019

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL ALZHEİMER HASTALIK MODELİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA NİGELLA SATİVA L. VE TİMOKİNON'UN ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

Saliha Ayşenur ÇAM

TIBBİ FARMAKOLOJİ PROGRAMI

Bu araştırma; Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 4992 Nolu proje ile desteklenmiştir.

Ankara, 2019

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Deneysel Alzheimer Hastalık Modeli Oluşturulan Sıçanlarda
Nigella sativa L. ve Timokinon'un Etkileri

Saliha Ayşenur ÇAM

Doktora Tezi

01.07.2019

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Seyfullah Oktay ARSLAN

Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Seyfullah Oktay ARSLAN
Prof. Dr. Aslı Fahriye CEYLAN IŞIK
Prof. Dr. Oğuzhan YILDIZ
Dr. Öğr. Üyesi Halil KARA
Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Fatih DOĞAN

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Doktora derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK
Enstitü Müdürü

Bu tezin Doktora derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

01.07.2019



Saliha Ayşenur ÇAM

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana tecrübelerini aktaran, her adımımda yol gösteren ve hoca kimliğinden taviz vermeden baba kimliği ile öğrencilerine yaklaşan değerli hocam Prof. Dr. Seyfullah Oktay ARSLAN'a,

Bu çalışmada tecrübelerinden faydalandığım Dr. Öğr. Üyesi Ali PARLAR, Dr. Öğr. Üyesi Ayhan ÇETİNKAYA'ya

Çalışma süresince desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım Ecz. Fatma UYSAL'a,

Katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Halil KARA, Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Fatih DOĞAN'a ve Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm arkadaşlarıma,

Hayata attığım ilk adımdan itibaren yanımda olan en büyük motivasyon kaynağım annem, babam ve kardeşlerime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vi**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **viii**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **3**

2.1. Alzheimer Hastalığı 3

2.1.1. Alzheimer Hastalığı Tarihçesi 3

2.1.2. Alzheimer Hastalığı Epidemiyolojisi 3

2.1.3. Alzheimer Hastalığı Etiyolojisi 4

2.1.4. Alzheimer Hastalığı Tanı ve Prognozu 6

2.1.5. Alzheimer Hastalığı Belirtileri 7

2.1.6. Alzheimer Hastalığı Patofizyolojisi 7

2.1.7. Alzheimer Hastalığı Tedavisi 14

2.1.8. Alzheimer Hastalığı İlaç Araştırmaları 15

2.2. *Nigella sativa* ve Timokinon 18

2.2.1. *Nigella sativa* Tohumlarının İçeriği 19

2.2.2. Farmakolojik Etkileri 20

3. GEREÇ VE YÖNTEM **28**

3.1. Deney Malzemeleri ve Hayvanlar 28

3.2. Deney Grupları 29

3.3. Deney Protokolü 30

3.4. Davranış Deneyleri 32

3.4.1. Pasif Sakınma Testi 32

3.4.2. Morris Su Tankı Testi 34
3.5. Proenflamatuvar Sitokin Ölçümleri 35
3.5.1. Tümör Nekfoz Faktör Alfa (TNF-α) Tayini 36
3.5.2. İnterlökin 1 Beta (IL-1β) Tayini 37
3.6. İmmünohistokimyasal İncelemeler 38
3.7. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS) Analizi 38
3.7.1. *Nigella sativa* Yağının GC-MS Analizi 39
3.7.2. Serum Yağ Asidi Analizi 39
3.8. İstatistiksel Değerlendirme 40
4. BULGULAR 41
4.1. Canlı Ağırlık Değişimi 41
4.2. Davranış Deneylerinin Bulguları 41
4.2.1. Pasif Sakınma Deneyine İlişkin Bulgular 41
4.2.2. Morris Su Tankı Testine İlişkin Bulgular 42
4.3. Proenflamatuvar Sitokin Ölçümlerine İlişkin Bulgular 48
4.3.1. TNF-α Düzeyleri 48
4.3.2. IL-1β Düzeyleri 49
4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular 49
4.4.1. Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP) Bulguları 50
4.4.2. İyonize Kalsiyum Bağlayıcı Adaptör Molekülü 1 (Iba1) Bulguları 52
4.5. GC-MS Analizlerinin Bulguları 54
4.5.1. *Nigella sativa* Yağının Analizi 56
4.5.2. Serum Yağ Asidi Analizi 57
5. TARTIŞMA 59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 68
7. KAYNAKÇA 69

8. EKLER 92

EK-1. Etik Kurul Onay Belgesi 92

EK-2. Özgeçmiş 93

ÖZET

Deneysel Alzheimer Hastalık Modeli Oluşturulan Sıçanlarda *Nigella sativa* L. ve Timokinonun Etkileri

Alzheimer hastalığı bilişsel işlevlerin giderek bozulması ile karakterize, nörodejeneratif bir hastalıktır. Aβ peptidlerinin birikimi ile oluşmaya başlayan amiloid plaklar hastalığın tipik bulgularındandır. Bu peptidlerin enflamatuvar süreçleri tetiklediği ve hastalığın ilerlemesinde rol oynadığı bilinmektedir. Antienflamatuvar etkinliği bilinen *Nigella sativa* ve Timokinon Alzheimer için potansiyel iyileştirici etkiler taşıyor olabilir. Biz bu çalışmada NS yağı ve Timokinon'un hastalık modeli oluşturulan sıçanlarda bilişsel işlevin azalması ve nöroenflamasyona karşı doza bağlı etkisini değerlendirmeyi amaçladık.

Yetişkin erkek sıçanların hipokampüsü içine $A\beta_{1-42}$ enjeksiyonu ile Alzheimer modeli oluşturuldu. Tedavi gruplarına enjeksiyonun 7 gün öncesinden itibaren, 10 gün sonrasına kadar her gün mide sondası ile NS yağı 0.5 ml/kg, 1 ml/kg, 2 ml/kg veya Timokinon 3 mg/kg, 10 mg/kg, 30 mg/kg uygulanırken, Kontrol ve AH gruplarına mısır yağı verildi. Ardından Pasif Sakınma ve Morris Su Tankı testleri uygulandı. $A\beta_{1-42}$ uygulamasıyla öğrenme ve hafızada oluşan gerileme, NS 1 ml/kg ve 2 ml/kg dozları ve Timokinon 3 mg/kg, 10 mg/kg ve 30 mg/kg dozları ile anlamlı ölçüde azaldı. AH grubunda gözlenen astrosit ve mikroglia aktivite artışının, NS 0.5 ml/kg dozu hariç tedavi gruplarında baskılandığı görüldü. Hipokampüste proenflamatuvar sitokinler TNF-α ve IL-1β düzeylerinin Aβ uygulaması ile arttığı, tedavi gruplarında bu artışın baskılandığı bulundu. Serum yağ asidi düzeylerinde hastalıkla veya tedaviyle ilişkilendirilebilcek bir fark gözlenmedi.

Deney sonucumuza göre, NS ve timokinon uygulaması, $A\beta_{1-42}$ enjeksiyonunu takiben oluşan astoglial ve mikroglial aktivite ve pro-enflamatuvar sitokin artışının baskılanması, hafıza ve öğrenme düzeyinde oluşan gerilemeyi önlemiştir. Sonuçlar, NS ve Timokinon'un öğrenme ve hafıza üzerine iyileştirici etkilerinin anti-nöroenflamatuvar etkisi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer, amiloid beta, Nigella sativa, nöroenflamasyon, timokinon

ABSTRACT

The Effects of Nigella sativa L. and Thymoquinone on Experimental Alzheimer's Disease Model of Rats

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder characterized by progressive deterioration of cognitive functions. Amyloid plaques formed by the accumulation of Aβ peptides, are typical hallmarks of the disease. These peptides are known to induce inflammatory processes and play a role in disease progression. *Nigella sativa* and thymoquinone may have therapeutic potential for the disease by virtue of their anti-inflammatory properties. In this study, we aimed to evaluate the effect of NS oil and thymoquinone in a dose dependent manner against the decrease in cognitive function and neuroinflammation in the disease model of rats.

Alzheimer's disease model was induced by bilateral intrahippocampal injection of $A\beta_{1-42}$ in adult male rats. Treatment groups received 0.5 ml/kg, 1 ml/kg, 2 ml/kg NS oil or 3 mg/kg, 10 mg/kg, 30 mg/kg thymoquinone while Control and Alzheimer's Disease groups received corn oil by gastric gavage daily. After treatments that started 7 days before and continued 10 days after $A\beta_{1-42}$ injection Passive Avoidance and Morris Water Maze tests were performed. Learning and memory decline induced by $A\beta_{1-42}$ administration is reversed by 1 ml/kg 2 ml/kg NS oil and 3 mg/kg, 10 mg/kg and 30 mg/kg thymoquinone delivery. The increase in astrocytes and microglia activity in Alzheimer's disease group was attenuated in all treatment groups except 0.5 ml/kg NS oil group. We found that the increase in proinflammatory cytokine TNF-α and IL-1β levels induced by injecting Aβ in the hippocampus was supressed in treatment groups. No significant differences in serum fatty acid levels that could be related to disease or treatment was found.

According to our experimental results, NS and thymoquinone administration prevented degeneration in memory and learning by inhibiting the increase in pro-inflammatory cytokine levels and astroglial and microglial activation caused by $A\beta_{1-42}$ injection. These results suggest that the beneficial effects of NS and thymoquinone on learning and memory may be associated with their anti-neuroinflammatory effect.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid beta, Nigella sativa, neuroinflammation, thymoquinone

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AH : Alzheimer Hastalığı
AICD : APP intraselüler domain
APOE : Apoenzim E
APP : Amiloid prekürsör protein
Aβ : Amiloid beta
BDNF : Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
ER : Endoplazmik retikulum
GSK : Glikojen sentez kinaz
IFN : İnterferon
IL : İnterlökin
MDA : Malondialdehid
MPO : Miyeloperoksidaz
MRG : Manyetik Rezonans Görüntüleme
MSS : Merkezi Sinir Sistemi
µl : Mikrolitre
NFY : Nöro fibriler yumak
NGF : Sinir büyüme faktörüdnf
NMDA : N-metil D-aspartat
NS : Nigella sativa
PET : Pozitron Emisyon Tomografisi
PGD : Prostaglandin
PSEN : Presenilin
RAGE : İleri glikolizasyon son ürünleri
ROS : Reaktif Oksijen Türleri
SOD : Süperoksid dismutaz
TNF-α : Tümör nekroz faktör-α

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. APP'nin sekretazlarla işlenmesi sonucu amiloid plak oluşumu 9
Şekil 2.2. *Nigella sativa* tohumlarının ana bileşenlerinin kimyasal yapıları 20
Şekil 3.1. Deney protokol şeması 31
Şekil 3.2. Hipokampüs içine enjeksiyon yapılan ve operasyondan sonra kesi yeri sütur ile dikilerek kapatılan sıçanlar 32
Şekil 3.3. Pasif Sakınma düzeneği 33
Şekil 3.4. Morris Su Tankı videosunun bilgisayara aktarılan görüntüsü 35
Şekil 4.1. Pasif Sakınma deney sonuçları 42
Şekil 4.2. Morris Su Tankı testi alıştırma günlerinde deney gruplarının platformu bulma süresi 43
Şekil 4.3. Morris Su Tankı testi son gününde deney gruplarının hedef kadranda geçirdikleri süre 46
Şekil 4.4. Morris Su Tankı'nda sıçanların prob testi yüzme izleri 47
Şekil 4.5. Hipokampüs TNF-α düzeyleri 48
Şekil 4.6. Hipokampüs IL-1β düzeyleri 49
Şekil 4.7. İmmünohistokimyasal GFAP boyanma skorları 50
Şekil 4.8. İmmünohistokimyasal GFAP boyamaları 51
Şekil 4.9. İmmühohistokimyasal Iba-1 boyanma skorları 52
Şekil 4.10. İmmünohistokimyasal Iba-1 boyamaları 53
Şekil 4.11. Yağ asidi standart karışımının kromatogramı 54
Şekil 4.12. *Nigella sativa* yağı kromatogramı 57

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. *Nigella sativa*'nın bilimsel sınıflandırması 18
Tablo 3.1. Deney grupları.....30
Tablo 4.1. Ortalama ağırlık değişimleri 41
Tablo 4.2. Moris Su Tankı testi alıştırma günleri platformu bulma süreleri.....44
Tablo 4.3. Morris Su Tankı testi prob test günü deney gruplarının hedef kadranda geçirdikleri süre 45
Tablo 4.4. Yağ asidi standart karışım içeriği.....55
Tablo 4.5. *Nigella sativa* yağı içeriğindeki yağ asitleri.....56
Tablo 4.6. Serum yağ asidi yüzdeleri 58

1. GİRİŞ

Bunama (demans) olgularının büyük çoğunluğunu oluşturan Alzheimer hastalığı (AH), giderek yükselen beklenen yaşam süresi ile daha fazla insanı ilgilendiren önemli bir sağlık sorunudur. Her geçen gün daha fazla araştırma yapılmasına rağmen hastalığın ilerlemesini durduran veya patolojiyi gerileten bir tedavi sağlanamamış olup mevcut ilaçlar sadece belirtileri hafifletmektedir (1). Hastalığın patofizyolojisini aydınlatmak amacıyla birçok hipotez öne sürülmüştür. Literatürde yaygın olarak kullanılan Amiloid beta (Aβ) hipotezi, hastalığın patofizyolojisini başlatan etmenin, Aβ peptidlerinin kümelenip plaklar oluşturması olduğunu, diğer bulguların ikincil olarak oluştuğunu öne sürer (2). Diğer hipotezlerde hastalık patolojisinin başlangıç noktası farklıdır ancak görülen değişimler benzerlik gösterir (1). Amiloid birikimine ilave olarak; tau hiperfosforilasyonu, demir, kalsiyum, çinko gibi bazı iyonların metabolizmasındaki değişiklikler, oksidatif stres de dahil olmak üzere patofizyolojik değişimler enflamatuvar cevap artışına neden olur. Bağışıklıkta önemli rol oynayan hücreler olan astrosit ve mikroglialar uyaranlara karşı aktive olurlar. Koruyucu etkili olması beklenen enflamatuvar tepki, aşırı düzeyde ve uzun süreli devam ettiğinde normal hücrelere zarar vermeye başlar. Nöron hasarına bağlı olarak ve bilişsel işlevlerde gerilemeye neden olur (3). Alzheimer tedavisinde antienflamatuvar etkili çeşitli ilaçlar denenmiş olup halen araştırılmaktadır (4, 5).

Alzheimer patofizyolojisini aydınlatmak ve/veya tedavi edici maddeler keşfetmek amacıyla çeşitli hayvan modelleri oluşturulmuştur. Deney hayvanlarında hipokampüs içine Aβ enjeksiyonu uygulanması yaygın olarak kullanılan modellerden biridir (6–9). Hastalık modeli oluşturulan hayvanların bilişsel işlevlerin değerlendirilmesinde davranış testleri kullanılmaktadır. Davranış testleri, moleküler düzeyde gerçekleşen değişimlerin fizyolojik değişikliklere ne düzeyde yansıdığının anlaşılmasına ve bunlar arasında ilişki kurulmasına yardımcı olur. Pasif sakınma ve Morris Su Tankı testleri, hafıza ve öğrenme işlevlerinin değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan yöntemlerdendir (10). Pasif sakınma testi ile ağrılı uyarana karşı hayvanların öğrenme yeteneğini değerlendirilir. Morris Su Tankı uzaysal öğrenme ve

referans belleğin ölçüldüğü birkaç gün süren bir testtir (11). Bilişsel işlev bozukluğu modeli oluşturulan hayvanlarda bu testler sıkça kullanılmaktadır (8, 12, 13).

Hipokampüs içine Aβ enjeksiyonunu takiben astrosit ve mikroglial hücre aktivasyonundaki artışın hastalık patolojisi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (14). Diğer yandan, Tümör nekroz faktör-α (TNF-α), İnterlökin 1-β (IL-1β) gibi proenflamatuvar sitokinler enflamasyon varlığı ve şiddetini gösterir.

Alzheimer hastalık modeli oluşturulan hayvanlarda *Satureja bachtiarica*, *Angelica sinensis* gibi bazı bitkilerin ve Timol, Elajik asit, Genistein gibi bileşenlerin etkileri araştırılmaktadır (7, 13, 15–17). Antienflamatuvar ve antioksidan etkili bu bitkiler ve etken maddeler, artmış enflamatuvar cevap ve oksidatif stresin baskılanması ile biyokimyasal ve histolojik bulgularda ve davranış testlerinde iyileşme sağlamıştır. *Nigella sativa* (NS), hafıza üzerinde olumlu etkileri olduğu inancıyla geleneksel olarak kullanılan bir bitkidir. *Nigella sativa* ve onun etken maddeleri içinde en yaygın çalışılanlardan Timokinon'un etkileri birçok hastalık modelinde araştırılmaktadır (18–27). Ayrıca NS ve Timokinon'un nöroprotektif etkileri olduğunu, hafıza ve bilişsel işlevlerde iyileştirici etkileri olabileceğini öne süren çalışmalar vardır (22, 28–30).

Bu çalışmamızda AH gelişiminde Aβ'nın önemli bir rol oynadığı ve enflamatuvar cevabı artırarak nöronal hasar oluşturduğu görüşünden yola çıkarak, sıçanların hipokampüsü içine Aβ enjeksiyonu ile AH modeli oluşturduk. Antienflamatuvar özelliği ile birçok hastalıkta etkileri araştırılan NS ve Timokinon'u AH modeli oluşturulan sıçanlara uygulayarak hastalık üzerindeki etkilerini görmeyi amaçladık. Hayvanların öğrenme ve hafıza işlevlerinin yanı sıra, hipokampüste astroglial ve mikroglial hücre aktivasyonunda, proenflamatuvar sitokinler ve serum serbest yağ asidleri düzeylerinde oluşan değişiklikleri inceledik. Kısaca çalışmamız, NS ve Timokinon'un olası nöroprotektif etkilerinin varlığı ve enflamasyonla ilişkisini incelemeye yöneliktir. Ayrıca, NS içeriğindeki diğer bileşenlerin olası etkileri ve etki mekanizmalarının aydınlatılması için ön çalışma niteliği taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı, beynin hipokampüs ve korteks bölgelerinde geri dönüşümsüz nöron hasarı ile bilişsel işlevlerde bozulma ve öğrenme kabiliyetinin giderek azalması ile kendini gösteren sinsi başlangıçlı, yavaş seyirli bir hastalıktır. En yaygın görülen nörodejeneratif hastalıklardan biri olan Alzheimer, dünya genelindeki bunama olgularının yaklaşık %50-80'inin nedenidir (1, 31). Zihinsel işlevlerde gerilemenin yanı sıra hastalığa kişilik ve davranış bozuklukları da eşlik eder (31).

2.1.1. Alzheimer Hastalığı Tarihçesi

Alzheimer hastalığı ilk defa Alman psikiyatrist Alois Alzheimer tarafından 20. yy'ın başlarında tanımlanmıştır (32). Ancak AH'nin, bunamanın yaygın bir nedeni ve komplikasyonları ile hastaların ölümüne yol açan önemli bir hastalık olduğunun anlaşılması yaklaşık 70 seneyi bulmuştur (33, 34).

Günümüzde AH, belirli genlerin taşınmasına göre (ailesel ve sporadik) ve başlangıç yaşına göre (erken ve geç başlangıçlı) sınıflandırılır. Vakaların büyük çoğunluğu sporadik ve geç başlangıçlıdır (35).

2.1.2. Alzheimer Hastalığı Epidemiyolojisi

Türkiye'de 2008 yılında yapılan bir araştırmaya göre muhtemel AH prevalansı Batı ülkelerine benzer olarak %11 bulunmuştur (36). TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) verilerine göre AH nedeniyle ölen yaşlıların oranı 2011 yılında %2.9 iken 2015 yılında %4.3'e, 2017'de %4.6'ya yükselmiştir. Yine TÜİK verilerine göre beklenen yaşam süresinin her iki cinsiyet için de artması ve nüfus verileri göz önüne alınarak günümüzde 300.000 olduğu tahmin edilen Alzheimerlı hasta sayısının, önümüzdeki yıllarda daha da artması beklenmektedir (37, 38).

Son verilere göre 2018'de ABD'de 5.7 milyon Amerikalı'nın Alzheimer tipi bunama ile yaşadığı, bu hastaların da 5.5 milyonunun 65 yaş ve üzeri olduğu tahmin

edilmektedir. ABD'de yapılan bir araştırmaya göre 65 yaşın üzerindeki her 10 kişiden 1'inde (%10) AH görülürken, görülme sıklığı yaş ile katlanarak artmaktadır (65-74 yaşta %16, 75-84 yaşta %44, 85 yaş ve üstünde %37). Alzheimer tipi bunama hastalarının büyük çoğunluğunu (%81) 75 yaş ve üzeri hastalar oluşturmaktadır (39).

Dünya üzerinde bunamadan etkilenen 50 milyon civarında hasta bulunduğu öngörülmektedir. Bu vakaların çoğu AH ile ilişkilidir (40). Yaş, Alzheimer için en önemli risk faktörüdür. Yaşlı nüfusta her yıl 5-7 milyon yeni AH vakası olduğu tahmin edilmektedir (41). Dünya genelinde 65 yaşın üzerindeki insan sayısının 2000 yılından 2030 yılına kadar 420 milyondan yaklaşık 1 milyara çıkacağı tahmin edilmektedir (42). Ortalama yaşam süresinin arttığı gelişmekte olan ülkelerde AH prevalansının 20 yıl içinde iki katına çıkması beklenmektedir (43).

Yapılan bir araştırmaya göre, ABD'de Alzheimer ve diğer bunama türlerinin prevalansı kadınlarda erkeklere oranla daha yüksektir (33). Ayrıca TÜİK 2015 verilerine göre ülkemizde erkeklerin %3.5'i, kadınların %5.2'sinin ölüm nedeninin AH olduğu belirlenmiştir. Bu oranlar 2017'de erkeklerde %3.6, kadınlarda %5.6'ya yükselmiştir (37, 38).

2.1.3. Alzheimer Hastalığı Etiyolojisi

Alzheimer'ın ailesel biçimi, yaşamın erken dönemlerinde yani 50 yaş ve öncesinde başlaması ile ayırt edilir. Ailesel AH, Amiloid prekürsör protein (APP) (44), Presenilin 1 (PSEN1) ve Presenilin 2 (PSEN2) (45, 46) genlerindeki otozomal dominant mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Ailesel risk faktörlerinde APP genindeki mutasyonun yanı sıra, APP'den Aβ oluşumunu artıran γ-sekretazın bileşeni olan PSEN1 ve PSEN2 genlerinde oluşan mutasyon γ-sekretaz aktivitesini değiştirerek $A\beta_{1-40}$ ve $A\beta_{1-42}$ oluşumunu artırır (47).

Alzheimer'ın sporadik formu genellikle ileri yaşta ortaya çıkar. En büyük risk faktörleri yaşlılık, Alzheimer aile öyküsüne sahip olmak ve Apolipoprotein E (APOE) geni ε4 alleli taşıyıcılığıdır (48, 49). Kronik hastalıkların çoğunda olduğu gibi sporadik Alzheimer hastalığının oluşumunda da birden fazla faktörün etkili olduğu düşünülmektedir. Alzheimer, ihtiyarlamanın doğal bir sonucu olmasa da yaş, bu hastalık için en önemli risk faktörüdür. Birinci dereceden akrabalarında

Alzheimer hastalığı bulunan kişilerin, bulunmayanlara göre AH'ye yakalanma riski daha yüksektir. Birden fazla birinci derece akrabasında AH görülenlerde bu oran daha da artmaktadır (33, 48, 49).

Kanda kolesterolü taşımakla görevli lipoproteinlerin yapısında bulunan apolipoproteinlerden biri apolipoprotein E'ye ait bilgiyi APOE geni sağlar. Her birey anne ve babasından APOE geninin üç formundan birini – ε2, ε3, ε4- genetik olarak alır. En yaygın formu ε3 olup ikinci sırada ε4 formu gelmektedir. İnsanların %5-35'i, ε4'ün bir veya iki kopyasına sahiptir. Bu genin ε4 formuna sahip olanların, diğer iki forma sahip olanlara göre Alzheimer olma riskinin arttığı bildirilmiştir. Genin ε3 formunu taşıyanlarla kıyaslandığında ε4'ün bir kopyasını taşıyanlar üç, iki kopyasını taşıyanlar sekiz ilâ on iki kat daha fazla Alzheimer olma riski taşır. Ayrıca ε4 formu taşıyanlar, genç yaşta AH'ye yakalanmaya daha yatkındır. Alzheimer hastalığına sahip bireylerde yapılan çeşitli araştırmalarda APOE-ε4 geninin bir veya iki kopyasının varlığının toplum genelinden daha yüksek olduğu bulunmuştur (50, 51). APOE-ε4 geni dışında bugüne kadar 20'den fazla lokusun Alzheimer riskini az da olsa artırdığı bilinmektedir (52).

Genetik faktörlerle ilişkisi kurulamayan AH vakalarının patofizyolojisi incelendiğinde epigenetik ve çevresel birçok faktörün hastalığın oluşum ve ilerlemesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Bu amaçla en çok DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları incelenmiştir. (53). Alzheimer modeli oluşturulan hayvanlarda da histon deasetilaz-2 aktivite artışından dolayı histon asetilasyonunda düşüş gözlenmiştir. AH modeli oluşturulan hayvanlarda Histon deasetilaz (HDAC) enzim ailesinin bazı üyelerinin (HDAC2 ve HDAC6) miktarının arttığı, koruyucu etkileri olduğu düşünülen sirtulin1 düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. DNA metilasyonunu inceleyen epigenomik çalışmalarda yaygın metilasyona uğrayan bölgelerin AH hastalığı ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. (42, 54).

Alzheimer patolojisi ile ilişkili olduğu düşünülen ilave risk faktörleri arasında diyabet, hipertansiyon, kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler risk faktörleri ve hareketsiz yaşam tarzı, alkol bağımlılığı, yüksek yağlı diyet ve sigara sayılabilir. Ayrıca, sağlıklı bir diyet ve ömür boyu devam eden öğrenme/bilişsel eğitimin, bilişsel işlevde düşüş riskini azaltabileceğine dair güçlü kanıtlar da vardır (33).

2.1.4. Alzheimer Hastalığı Tanı ve Prognozu

Alzheimer tanısı için mutabakat sağlanan kesin bir kılavuz olmamakla birlikte, yaygın olarak kullanılan çeşitli tanı kriterleri bulunmaktadır. Bu amaçla en yaygın olarak DSM-V (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition) ve NIA-AA (National Institute on Aging–Alzheimer's Association) tanı kriterleri kullanılmaktadır. Bu tanı kriterleri yirmi yılı aşkın süre kullanıldıktan sonra, NIA (National Institute on Aging) ve AA (Alzheimer's Association) tarafından 2011'de gözden geçirilerek güncellenmiştir (55). Bu kriterlere göre AH üç evreye ayrılır: beyinde değişikliklerin başladığı fakat belirti görülmeyen preklinik evre, günlük hayatın sürdürülebildiği ve ciddi olmayan bilişsel bozuklukların gözlendiği AH kaynaklı hafif bilişsel bozukluk evresi, hafıza ve davranış bozukluklarının günlük hayatı önemli derecede etkilediği bunama evresi. Hastalığın klinik belirtileri ortaya çıkmadan 20 yıl öncesinde bile beyinde patolojik değişikliklerin oluşmasının mümkün olduğu gösterilmiştir. Sonradan yapılan düzenlemelerle preklinik evre, hastalık evrelerine dahil edilmiştir (33).

Güncel NIA-AA tanı kriterleri; öğrenme güçlüğü, bellek bozukluğu, yönetsel işlev (sıralama, soyut düşünme, planlama vb) kaybı, kişilik değişikliği, konuşma sorunları gibi belirtiler dikkate alınarak bunama tanısı konulduktan sonra, AH varlığının teşhisi için hastalığa özel durumların incelenmesini önerir. Alzheimer ile karışabilecek diğer hastalık ihtimallerinin dışlanması, bilişsel bozukluğun şiddeti ve şekli, AH ile ilişkili gen mutasyonlarının varlığı incelenir (55). Güncel kılavuzlarda klinisyenin hastalık ile ilişkilendirilebilecek belirtileri gözlemesinin yanı sıra çeşitli biyobelirteçler de hastalık teşhisi için kullanılmaktadır (33). Alzheimer tanısı için benzer belirtiler gösteren merkezi sinir sistemi (MSS) ile ilişkili diğer hastalıkların dışlanması amacıyla Difüzyon Tensor Görüntüleme (DTG), Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG), Pozitron Emisyon Tomografi/Bilgisayarlı Tomografi (PET/BT) gibi görüntüleme tekniklerine başvurulabilir (56).

Alzheimer'ın kesin tanısının konulmasında biyopsi veya otopsi gerektiği için, hastalığın teşhisine yardımcı olabilecek biyobelirteçler araştırılmaktadır. Günümüzde AH ile ilişkilendirilen biyobelirteçler arasında; görüntüleme yöntemleri ile tespit edilen beyindeki Aβ birikimleri, beyin omurilik sıvısı (BOS) Aβ ve tau düzeyleri, kanda belirli protein grupları bulunmaktadır (33, 55). AH tanısında güvenle

kullanılabilecek biyobelirteçler keşfedilirse hastalık preklinik evrede fark edilerek ilerlemesini önlemek mümkün olabilir. Ancak nörogörüntüleme yöntemleri, biyobelirteçler ve nöropsikolojik değerlendirme testleri için kesin tanıda kullanılacak ortak kriterler henüz belirlenememiştir. Daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (57).

2.1.5. Alzheimer Hastalığı Belirtileri

Alzheimer'ın ailesel ve sporadik iki formunun belirtileri benzerlik göstermesine rağmen aynı değildir. Ayrıca hastalığın kalıtsal biçimi ile ilgili vakalar kendi içlerinde klinik ve patolojik belirtilerinde büyük farklılık gösterebilir. Bilişsel hastalık belirtileri, diğer bilişsel işlevlerin kademeli olarak kaybedilmesiyle birlikte, önce kısa süreli, daha sonra uzun süreli hafıza hasarı ile kendini göstermektedir (58).

Alzheimer, hafıza kaybı, konuşma zorlukları ve muhakeme güçlüğü gibi bilişsel işlev bozukluklarına ilaveten psikiyatrik belirtiler ve davranış bozuklukları, depresyon, halüsinasyonlar, sanrı ve ajitasyon gibi bilişsel olmayan bozuklukların da görüldüğü bir hastalıktır (59). Bilişsel bozukluklar, AH'nin tipik özellikleri ortaya çıkmadan çok önce görülmeye başlar ve tüm belirtiler hastalık şiddetine bağlı olarak giderek ağırlaşır. Bilişsel bozulmalar ve diğer sorunların artışı ile hastalığın son aşamasında hasta günlük faaliyetlerini sürdürebilmek için devamlı desteğe ihtiyaç duyacak hale gelir (2, 60).

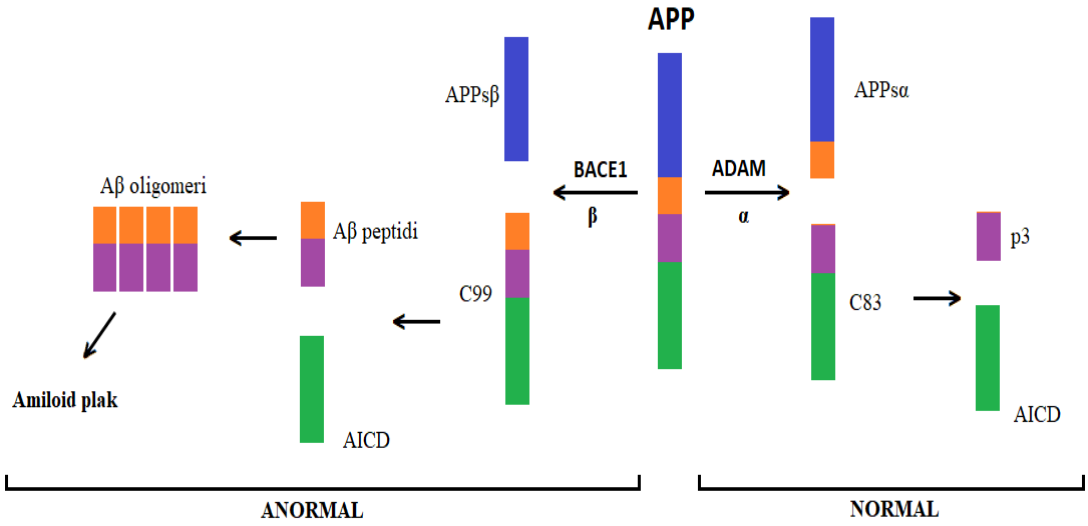
2.1.6. Alzheimer Hastalığı Patofizyolojisi

Alzheimer'ın patofizyolojisi ile ilgili görüşler, Alois Alzheimer'ın 1906 yılında beyinde amiloid plaklar ve hiperfosforile nörofibriler yumakları (NFY) gözlemlemesiyle başlamıştır (32). George Glenner ve Caine Wong tarafından 1984 yılında meningovasküler Aβ'nin izolasyonu ve diziliminin kısmen ortaya çıkarılması, AH'nin temel mekanizmaları için modern araştırmaların kapısını aralamıştır (61).

Otuz yılı aşkın süredir hastalığın çok bileşenli patofizyolojisini açıklamak için kolinerjik hipotez, Aβ hipotezi, tau hipotezi ve enflamasyon hipotezi gibi

hipotezler öne sürülmüştür (1). Alzheimer'la ilgili araştırmalar artış gösterse de halen hastalığın kesin nedeni ve patolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır (62).

Alzheimer hastalığında kişilerin beyninde görülen başlıca patolojik değişimler; senil plaklar, NFY ve nöronal kayıp oluşmasıdır. Senil plaklar, büyük ölçüde transmembranal APP'nin proteolitik klevajı (yarılması) ile üretilen Aβ'dan oluşur (62). Tip I transmembran glikoprotein olan APP, sinaptik işlev, yapı, plastisite, uzaysal bellek, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör işlevi, nöronal olgunlaşma ve farklılaşma ve dendritik omurga oluşumunun düzenlenmesi dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli bir rol oynar (35). Ayrıca hücre içi kalsiyumun düzenlenmesi, metal iyon homeostazı (63), kolesterol bağlama (64) ve hücre büyümesinde (65) rol oynadığı ortaya konmuştur. APP'nin fibroblastların çoğalmasını uyarmak için bir otokrin faktör ve hücre adezyonunda modülatör olarak da rol oynayabileceği öne sürülmektedir (64). Moleküler düzeyde yapılan araştırlamalarla APP'nin önce α sekretazlar veya β sekretazlar (BACE) ile sonrasında γ sekretazlar ile iki proteolitik parçalanma geçirdiği bulunmuştur (31). Şekil 2.1' de görüldüğü gibi, amiloidojenik olmayan yolakta APP önce α sekretaz ile, amiloidojenik yolakta ise β sekretaz enzimleri ile kesilir. Protein, α sekretaz ile kesildiğinde sAPPα ve C83 fragmanı oluşur. Hücre membranında C83 fragmanı kalırken sAPPα ekstraselüler aralığa salınır. Protein, β sekretaz ile kesildiğinde, sAPPβ ve C99 fragmanı oluşur. Hücre membranında C99 kalırken sAPPβ ekstraselüler aralığa salınır. Ardından γ sekretaz ile C83'ten AICD (APP intraselüler domain) ve toksik olmayan P3 oluşurken, C99'dan, AICD ve toksik Aβ fragmanları oluşur (66). Bu proteolitik bölünme ile birden fazla Aβ formu üretilir (43).



Şekil 2.1. APP'nin sekretazlarla işlenmesi sonucu amiloid plak oluşumu.

En yaygın bulunan Aβ formu $A\beta_{1-40}$'tır (67). Senil plaklarda baskın ve daha çok amiloidojenik olan $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-40}$'a göre daha az üretilir. Ancak $A\beta_{1-42}$ toplanma eğilimi gösterir ve ilerleyen yaşla birlikte çökelir (31, 68). Bu peptid, farklılaşmış nöronlarda hasar oluşturabilir, hatta doğrudan nöronun ölümüne neden olabilir. Dolaylı olarak ise, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini teşvik edebildiği; β-katlı agregatlar, fibriler Aβ ve NFY'lerin de klasik kompleman yolunu *in vitro* olarak doğrudan aktive edebildiği gösterilmiştir (69).

Alzheimer'ın temel patolojik bulgularından olan NFY'nin ana bileşeni fosforile tau proteinidir. Tau, hücre içi iskeletin bütünlüğünün sağlanması, aksonal iletinin sürdürülmesi ve mikrotübüllerin stabilize edilmesinde rol alır. Kinaz aktivitesinin artması ve fosfatazların aktivitesinin azalması, AH'de fosforile tau düzeyini artırarak taunun mikrotübüllere bağlanmasını azaltır. Mikrotübüllere bağlanamayan tau proteinleri polimerleşerek çift sarmallı lifler oluşturur. Bu lifler NFY'lere dönüşür ve aksonal iletinin bozulması, hücre hasarı ve nihayetinde nöron ölümüne neden olur. NFY'ler aksonal bağlantı ile yayılır (70).

Nöroenflamasyon, diğer nörodejeneratif hastalıklarda olduğu gibi AH'de de patofizyolojik değişikliklerde rol oynar. Kronik enflamasyon, AH'de beyinde oluşan karakteristik değişikliklerden biridir (71). Aşırı enflamatuvar cevap hastalık patolojisine neden olabilir veya katkıda bulunabilir (3). Alzheimer hastalarının beyin dokusu ve serumlarının incelendiği çalışmalarda 90'lı yılların başında TNF-α ve IL-6

gibi pro-enflamatuvar sitokin düzeylerinin kontrol grubuna göre artmış olduğu bulunmuştur (72, 73). Daha sonra yapılan çalışmalarda da Alzheimer hastalarının MSS'de sitokin düzeyleri değerlendirilmiştir. Bazı sitokinlerin (IL-10, IL-12, IL-6, IL-8 ve IL-1β) düzeylerinde anlamlı bir fark gözlenmediğini ortaya koyan araştırmalar olsa da bazı çalışmalarda AH'de TNF-α, IL-6, IL-8, IL-6 ve GM-CSF düzeylerinin kontrollere göre arttığı bulunmuştur (68). Nöroenflamasyon, nöronal hasara karşı MSS'nin enflamatuvar cevabını gösterir.

Astrositler ve mikroglial hücreler, MSS'de enflamatuvar cevapta rol alan ana hücrelerdir. Mikroglial hücreler, MSS'nin yerleşik makrofajlarıdır, MSS hücre popülasyonunun yaklaşık %10'unu oluştururlar. Mikroglialar nörogenezde, nöronal plastisitede ve rejenerasyonda görevli olmalarının yanı sıra herhangi bir beyin hasarı durumunda ilk immün savunma hattında da önemli rol oynarlar. Toksik ürünleri fagosite etme, sitotoksik faktör salımı yapma ve antijen sunma yeteneğine sahiptirler (74). Yabancı bir uyaranın yokluğunda istirahat halinde ve etkisiz olan mikroglial hücreler, dallanmış morfolojileri ile nöronları ve aktivitelerini etkilemeden yakın bölgeleri ve çevrelerini tarayabilir ve birkaç saatte tüm beyin parenkimasını kontrolden geçirebilirler. Aktif hale geldiklerinde, morfolojik değişikliklere uğrayarak aktif ameboid görünüme kavuşur ve hareketli hale geçerler (75). Hasarlı bölgeye ulaşabilen bu hücreler uzun süre aktif fenotipte kalıp sitokin salabildikleri için MSS hasarını kötüleştiren nörotoksik etki oluşturabilirler (76, 77). Farelerde yapılan bir çalışmada, amiloid birikiminin enflamatuvar koşullar altında arttığı gösterilmiştir. Böylece doğrudan nörotoksik etkiden ayrı olarak, aktif mikroglia ve astrositlerin Aβ birikimini artırabileceği öne sürülmektedir (78). Alzheimer ve diğer nörodejeneratif hastalıklarda enflamatuvar faktörlerin karmaşıklığına bağlı olarak hücresel enflamatuvar değişikliklerin hem yararlı hem zararlı sonuçlar doğurabileceği düşünülmektedir (14). Kaspazlar, hücresel apoptozu düzenlediği bilinen proteazlardır. Kaspaz 1'in pro-enflamatuvar sitokinlerin olgunlaşması için esas olduğu bilinirken, kaspaz 3, 7 ve 8'in protein kinaz C-γ bağımlı bir sinyalleme yoluyla mikroglial aktivasyonu düzenleyebildikleri gösterilmiştir (79). Kemokinler ve kompleman faktörleri de önemli nöroenflamatuvar mediyatörlerdir. Nöroenflamasyonda, kemokinlerin MSS'de upregüle edilerek astrosit ve mikrogliaların kemotaksisini teşvik ettiği gösterilmiştir. Aβ'nin kompleman sistemini

alternatif yoldan da aktive ettiği bilinmektedir; C3a, C3b ve C5a, mikroglial hücrelerin kemotaksi ve fagositik faaliyetlerinde rol alır (3).

Prostaglandinler (PGD), nöroenflamasyonun modülasyonunda rol alır. Bu 20-karbonlu doymuş yağ asitleri, bir uyarıcıya cevap olarak siklooksijenaz (COX) yolağı tarafından üretilir. Beyinde normal olarak ifade edilen COX-1 ve COX-2'nin nörodejenerasyonda etkilerinin olduğu bilinmektedir. Nörodejeneratif bozukluklarda, hem nöronlarda hem de glial hücrelerde özellikle COX-2 ifadesi uyarılır. Alzheimer hastalarının frontal korteksinde PGD2 düzeylerinin kontrollere göre artmış olduğu bulunmuştur. Hem Alzheimer hastalarında hem de fare hastalık modellerinde, senil plaklardaki mikroglia ve astrositlerde PGD2 sentaz ve PGD2 reseptörünün upregüle edildiği görülmüştür (68). Nonsteroidal antienflamatuvar ilaçların AH tedavisinde etkisiz bulunduğunu gösteren çalışmaların yanı sıra, bazı ilaçların COX-2 enzim inhibisyonu aracılığıyla prostaglandin, prostasiklin ve tromboksan düzeylerini düşürerek AH riskini azalttığını ortaya koyan çalışmalar vardır (80, 81).

Alzheimer patolojisinde damar işlev değişiklikleri önemli bir role sahiptir. Kan beyin engeli ve mikrodamar işlevinde bozulmalar nörodejenerasyonda önemli rol oynar. Azalmış/düzensiz kan akımının hayvan modellerinde AH'nin nöropatolojisini güçlendirdiği gösterilmiştir. Ayrıca AH'li beyin mikrodamarları nöronal hasara katkıda bulunabilen daha yüksek miktarlarda sitokin salgılarlar (68).

Kalsiyum, birçok reseptör, protein ve iyon kanalına bağlanan ve konsantrasyon farkı oluşturan önemli fizyolojik görevlere sahip bir hücre içi habercidir. Hücrelerin canlılığını sürdürebilmesi için hücre içi kalsiyum homeostazının düzenlenmesi önemlidir. Endoplazmik retikulum (ER) ve mitokondri, kalsiyum homeostazında ana role sahip organellerdir. Kalsiyumun plazma membranından akışını sağlayan en önemli iki sistem kalsiyum ATPaz pompası ve sodyum-kalsiyum (Na^{+}-Ca^{+2}) pompasıdır. (82). Nöronların kalsiyumu içe alımı, dışa atımı ve hücre içi bölümlere taşınması AH'de bozulur. Normalde kalsiyumun ER'den taşınmasında rol alan PSEN'lerin mutasyonu kalsiyum homeostazını bozar (83). Kalsiyum taşınmasının bozulması; kalsiyum tamponlama kapasitelerinde değişiklikler, kalsiyum kanal aktivitelerinin değişmesi, eksitotoksisite veya mitokondriyal işlev bozulması gibi çeşitli mekanizmaları içerir. Özellikle Aβ, membran ilişkili oksidatif stresi artırarak ve membranda por oluşturarak hücresel

kalsiyumun aşırı artışını destekleyebilir (84). Anormal Aβ metabolizmasının kalsiyum upregülasyonunu uyardığı ve artmış hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun bilişsel işlevlerin azalması ve hücrelerin apoptozu ile ilişkili olduğunu öne süren çalışmalar bulunmaktadır (85).

Moleküler seviyede, hastalığın karmaşık ilerleyişine metal iyon metabolizması bozuklukları (demir, bakır ve çinko), NMDA reseptörleri ile ilgili sinyal yolaklarının bozulması, nöronların hücre döngüsüne tekrar girmesi (re-entry), lipid metabolizmasının bozulması, oksidatif stres ve mitokondriyal yapı ve işlevde bozukluklar eşlik eder (58).

Alzheimer patofizyolojisini aydınlatmak için birçok hipotez sunulmuştur.

2.1.6.1. Kolinerjik Hipotez

Alzheimer patolojisini açıklamaya yönelik en eski hipotez kolinerjik hipotezdir. Bu hipoteze göre beynin çeşitli bölgelerinde kolinerjik faaliyette bozulma hastalık gelişimine yol açar. Biyokimyasal araştırmalar AH hastalarının serebral korteks ve beynin diğer bölümlerinde kolin asetiltransferaz ve asetilkolinesteraz aktivitesinin normal bireylere göre düşük olduğunu göstermiştir. Aβ'nın kolinerjik sinir iletimini engellediği *in vitro* olarak gösterilmiştir (86). Presinaptik kolinerjik terminallerde bulunan nikotinik ve muskarinik asetilkolin reseptör sayısındaki azalmanın, bilişsel işlevleri düşürdüğünü gösteren çalışmalar vardır (87, 88). Alzheimerlı hastaların post-mortem beyin dokularının biyokimyasal olarak incelendiği çalışmalarda, kolin asetiltransferaz aktivitesi (89), asetilkolin sentezi (90), kolin alımı (91) ve asetilkolin salınımında azalma (92) olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalar neticesinde serebral korteks ve diğer alanlardaki kolinerjik sinir iletimindeki kaybın AH'de görülen bilişsel işlev bozulmalarına önemli ölçüde katkıda bulunduğu ortaya konmuştur (2, 93).

Kolinerjik sistemle ilişkili başka bir hipotezde spesifik nörotrofik hormon eksikliğinin kolinerjik işlev kaybına yol açtığı öne sürülmektedir. Nörotrofinler nöronal faaliyetin düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Nörotrofin ailesi, sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin-3, nörotrofin-4=5 ve nörotrofin-6, duyusal ve sempatik sinir sisteminin gelişimi ve

sürdürülmesinde, merkezi sinir sisteminin kolinerjik ve bilişsel işlevleri ve bellek oluşumunda önemli rol oynar. Alzheimer hastalarının beyinlerinde NGF, NGF resepörü olan TrkA ve BDNF düzeylerinin düştüğünü gösteren çalışmalar vardır (2).

2.1.6.2. Amiloid Beta Kaskad Hipotezi

Amiloid beta kaskad hipotezi 90'ların başında öne sürülmüştür. Bu hipoteze göre AH'nin oluşmasına neden olan sinaptik iletimde bozulma ve nörodejenerasyona sebep olan ana faktör amiloid plakların veya oligomerlerin oluşumudur (94, 95). Amiloid hipotezi, beyinde aşırı miktarda Aβ peptidinin, özellikle $A\beta_{1-42}$'nin, amiloid plaklar, nörofibriler yumaklar, sinaps kaybı ve nihai nöronal hücre ölümünü içeren AH ile ilgili patolojiden sorumlu olmasına dayanır (43).

Hücre dışında gözlenen amiloid plaklar, AH'de en belirgin nöropatolojik bulgulardan biridir. Normalde α-sekretaz ile işlenen APP'nin, anormal olarak ve β- ve ardından γ-sekretazlar tarafından işlenmesi sonucu 39-43 aminoasitlik, 4 kDa ağırlığında Aβ peptidleri oluşur. Sağlıklı bireylerde α-sekretaz etkinliği baskınken, AH'li bireylerde artmış β-sekretaz aktivitesi, Aβ üretim ve klerensi arasındaki bir dengesizlik oluşturur. Bunun sonucunda fazla üretilen Aβ peptidleri fibril ve plak oluşturmaya meyillidir (1, 61). Bu peptidler çözünebilir oligomerler halinde kümelenir ve beta-katlı konformasyonda çözünmeyen fibriller oluşturarak kümelenir ve birleşerek diffüz senil plaklarda depolanır (96).

Amiloid plaklar, Aβ'nın yanı sıra proteoglikanları, apolipoproteinleri, akut faz proteinleri, kemokinler, sitokinler gibi enflamatuvar molekülleri, seruloplazmin, ferritin gibi antioksidan proteinleri, proteaz ve klerens ile ilişkili proteinleri, kolinesterazlar ve metal iyonlarını (çinko, bakır ve demir) ve başka birçok bileşeni içerir (97).

Plakların temel bileşeni olan $A\beta_{1-42}$ oligomerleri, oksidatif hasarı indükler, tau hiperfosforilasyonunu artırır ve bunun sonucunda sinaps ve mitokondriler üzerinde toksik etkiler oluşturur (98). Mikroglial aktivasyon, IL-1β, TNF-α ve interferon gama (IFN-γ) dahil olmak üzere proenflamatuvar sitokinlerin üretimi ve salınımını uyarır. Bu sitokinler daha fazla $A\beta_{1-42}$ oligomeri üretmek için yakındaki astrosit-nöronu uyarır, böylece daha fazla $A\beta_{1-42}$ üretimini ve yayılımını teşvik ederler (99, 100).

Ayrıca Aβ oligomerleri, nöron-astrosit kompleksi ile ilişkili oligodendrogliaların yıkımına da yol açar. Bu oligomer agregatlarının AH'li beyinlerde nöronal ve vasküler dejenerasyondan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu agregasyon, özellikle indirgenmiş glutatyon (GSH) içeriği düşük, demir konsantrasyonu yüksek olduğu için oksijen radikallerini süpürme yeteneği yetersiz olan oligodendroglialara karşı oksidatif stres ile sonuçlanır (1).

2.1.6.3. Tau hipotezi

Tau proteininin AH hastalarının beyin dokusunda birikimi ilk kez 1986'da tanımlanmıştır (101). Tau fosforilasyonunun AH'de NFY oluşmasına katkı sağlama potansiyeli olduğu ileri sürülmüştür. AH'li hastalarda, tau proteinlerindeki bazı aminoasitlerin hiperfosforilasyonu, proteinlerin mikrotübüllerden ayrılması ile transport yapısının bozulmasına ve nöronların açlığına, nihayetinde hücre ölümüne neden olur. Dolayısıyla hiperfosforile tau, hücre içi nörofibriller değişiklikler ve AH ve ilgili tauopatilerin patogenezinde önemli bir role sahiptir (43).

Hücre içinde bulunan NFY'ler, hiperfosforile tau proteinleri tarafından oluşturulmuş eşleştirilmiş sarmal filamentlerdir. Hiperfosforilasyon eşleştirilmiş sarmal filamentlerde tau agregasyonunu kolaylaştırır, mikrotübüllerin destabilizasyonuna, membran dejenerasyonuna ve nöronal hasara yol açar. Alzheimer'da görülen nörofibriler yumaklar amigdala, hipokampal oluşum, parahipokampal girus ve temporal asosiyasyon korteksinde bulunurken, senil plaklar striatumda bulunur (68).

2.1.7. Alzheimer Hastalığı Tedavisi

Mevcut ilaç tedavileri, kolinerjik hipotezi temel almaktadır. Bu yaklaşım, ölümcül Alzheimer tipi bunamanın belirtilerine neden olan nöron hasar ve yıkımını durdurmaz veya geri döndüremez. Alzheimer tedavisi için FDA tarafından onaylı olan ilaçlar beyinde nörotransmitterlerin miktarını artırarak geçici olarak belirtileri iyileştirmektedir. Bu ilaçların etkinliği kullanım süresi ile sınırlıdır ve bireyler arasında değişiklik gösterir (2, 33).

Alzheimer tedavisinde asetilkolinesteraz inhibitörleri donepezil, rivastigmin, galantamin ve NMDA reseptör antagonisti memantin kullanılmaktadır. Asetilkolinesteraz inhibitörleri, tedavinin ilk yılında bilişsel performansı ve günlük faaliyetleri yürütebilirliği sağlamaya yardımcı olur. Bilişsel işlevler giderek azalsa da tedavinin sürdürülmesi bazı yararlar sağlayabilir. Memantin, tek başına veya bir kolinesteraz inhibitörü ile beraber kullanıldığında orta ila şiddetli bunama görülen hastalarda fayda sağlayabilir (102).

Farmakolojik olmayan tedaviler gündelik hayatı sürdürmek ve genel yaşam kalitesini artırmak için bilişsel işlevlerin sürdürülmesi veya geliştirilmesi amacıyla uygulanır. Ayrıca, depresyon, duygulanım yoksunluğu (apati), dalgınlık, uyku bozuklukları, ajitasyon ve saldırganlık gibi davranışsal belirtilerin azaltılması amacı ile de kullanılabilirler. Bu yöntemlere örnek olarak bilgisayarlı hafıza eğitimi, hafızayı canlandırmak için en sevilen müziği dinleme, uyku bozukluklarını azaltmak için uygulanan çeşitli yöntemler verilebilir (33).

Bilişsel rehabilitasyon, yalnızca hastaya değil, yakınları ve bakıcılarına yönelik destek programlarını ve tüm bilişsel eğitim programlarını içerir. Bilişsel eğitim hafıza, dikkat, lisan gibi belirli alanlarda planlanmış standart çalışmaların uygulanmasıdır. Bireysel şekilde veya grup aktivitesi şeklinde uygulanabilmektedir (103).

Tüm bunlara rağmen, farmakolojik ve farmakolojik olmayan tedavilerin Alzheimer hastalığında radikal olarak iyileşme sağladığı gösterilememiştir (33).

2.1.8. Alzheimer Hastalığı İlaç Araştırmaları

Alzheimer tedavisi için 2002-2014 yılları arasında, 244 ilaç aday molekülünün clinicaltrials.gov'a kayıtlı klinik araştırması yapılmasına rağmen, bunlardan yalnızca biri klinik araştırmaları başarı ile tamamlayıp FDA'dan onay almıştır (33).

Kullanımda olan asetilkolin esteraz inhibitörleri ve NMDA reseptör antagonistinin hastalık patolojisini geriletmemesi, yeni tedavi stratejilerinin araştırılmasına yol açmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda en büyük hedef Aβ ve

Tau'yu merkeze alan araştırmalardır. Anti-amiloid yaklaşım; Aβ üretimi, taşınması, agregasyonu, yıkımını hedef alır (1). Umut verici sonuçlar beklenen olası tedavi stratejileri; γ- ve β-sekretaz inhibitörleri, Aβ aşılaması, Cu-Zn şelatörleri, kolesterol düşürücü ilaçlar, statinler ve non-steroid antienflamatuvar ilaçları içerir (1). Geçen son 30 yılda AH tedavisi için yapılan ilaç araştırmalarının çoğu toksik Aβ agregatlarının birikimini önlemeyi hedefleyen çalışmalardır. Ancak hiçbiri klinik araştırmaları başarıyla sonuçlandıramamıştır (56).

Transgenik fareler kullanılarak yapılan bir araştırmada kan beyin engelinde düşük dansiteli lipoprotein ile ilişkili proteinin (LRP) Aβ'ya bağlanarak klerensini artırdığı ve Aβ-indüklü LRP kaybının Aβ birikimine neden olduğunun anlaşılması, LRP'yi AH tedavisinde hedef haline getirmiştir (104). Alzheimer modeli oluşturulan farelere uygulanan rekombinant LRP-IV, farelerde doğal olarak bulunan sLRP'nin yerini alarak Aβ'nın uzaklaştırılmasını artırmıştır (105).

Klinik araştırmalarda Faz III çalışmaları devam eden Azeliragon (PF-04494700 veya TTP488), bir İleri Glikolizasyon Son Ürün Reseptörü (RAGE) antagonistidir. RAGE düzeyi artışının Alzheimer patolojisini ilerlettiği görüşü temel alınarak geliştirilen bu ilaç aday molekülünün, beyinde Aβ düzeyini ve depolanmasını azalttığı, sAPPβ düzeyini düşürüp sAPPα düzeyini artırdığı, enflamatuvar sitokin düzeyini azalttığı ve bilişsel işlevlerdeki azalmayı yavaşlattığı öne sürülmüştür. Ancak Faz III çalışmalarında ilaç plaseboya karşı anlamlı bir fark ortaya koymamıştır (106–110).

Gama sekretaz inhibisyonu ile Aβ üretimini azaltmayı amaçlayarak geliştirilen semagasestatın cilt kanseri ve enfeksiyon riskini artırması, avagasestatın ise dermatolojik ve gastrointestinal sistem üzerindeki yan etkileri nedeniyle klinik araştırmaları yarıda bırakılmıştır (111, 112). Beta sekretaz inhibisyonu yapan rosiglitazonun klinik araştırmaları ciddi istenmeyen etkiler görülmesi nedeniyle Faz III aşamasında durdurulmuştur. BACE1 inhibitörü RG-7129 (RO5508887), LY2811376, LY2886721, faz I çalışmalarını başarı ile tamamlamalarına rağmen toksik etkileri nedeniyle faz çalışmalarına devam edilememiştir (113).

Tau fosforilasyonunun NFY'leri oluşturması ve AH'de önemli rol oynaması anti-tau tedavi hedeflerinin oluşmasını sağlamıştır. Taunun fosforilasyonunda görevli

kinazların inhibisyonu ve agregasyonun önlenmesi veya çözülmesi amaçlanmaktadır. Glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3) tau fosforilasyonunda rol alan primer enzimlerden biridir. Bu enzimin lityum ve valproat ile inhibe edilmesi ile tau patolojisini azalttığı ortaya konmuştur (114). GSK3 inhibisyonu yapan başka bileşikler ve etkileri ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır (115). Tideglusib Faz IIb çalışmaları tamamlanmış geri dönüşümsüz GSK3β inhibitörüdür, Faz III çalışmalarına devam edilmemiştir.

Mikrotübül stabilizasyonu yapan bileşikler de tau patolojisini önlemede araştırılan bileşiklerdendir (70). Alzheimer modeli oluşturulmuş sıçanlara metilen mavisi yüklü nanokompozit uygulanmasının tau üzerinden AH patolojisini azalttığı ortaya konmuştur (116).

Oksidatif stresin AH'de önemli rol oynaması nedeniyle antioksidan özellikli maddelerin kullanımının AH tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla yapılan araştırmalarda AH hayvan modellerinde, antioksidan sodyum selenat, L-selenometiyonin, E vitamini, ferulik asit, D vitamini, melatonin, MitoQ ve koenzimlerin Aβ moleküllerinin sayısını azalttığı ortaya konmuştur (117).

Aβ yıkımında rol alan proteazlardan olan neprisilin, İnsülin Parçalayan Enzim ve neprisilinin etkinliğini artıran somatostatin de tedavi yaklaşımlarında hedef moleküllerdendir. Kallikrein İlişkili Peptidaz 7, diğerlerinden farklı olarak fibril yapıdaki Aβ'yı da parçalayabilen yakın zamanda keşfedilen bir enzimdir ve AH tedavisinde hedeflerden biridir (118).

Verubecestat (MK-8931) araştırmaları, hafif-orta şiddetli Alzheimer hastalarında yapılan çalışmalarda bilişsel işlevlerde düşüşün azalmaması ve ciddi yan etkiler gözlenmesi nedeniyle durdurulmuştur (119).

AZD3293, E2609, CTS-21166 ve PF-05297909 klinik araştırmaları devam etmektedir (120).

Bunlar dışında asetilkolin esteraz inhibitörleri, GABAerjik nöronların düzenlenmesi, serotonin reseptörleri, histamin modülatörleri, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, antienflamatuvar tedavi ve diğer birçok alan AH tedavisinde hedef alınmaktadır (1).

2.2. *Nigella sativa* ve Timokinon

Ranunculacea familyasına ait olan Nigella cinsine mensup *Nigella sativa* L. türü 20-30 cm yükseklikte, az veya çok tüylü, bir yıllık otsu bir bitkidir (Tablo 2.1). Çoğunlukla Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde yetişen, ayrıca Suudi Arabistan, Pakistan ve Hindistan da dahil olmak üzere Asya'nın bazı bölgelerinde ve ülkemizde en çok Afyon, Burdur, Isparta'da yetişmektedir. Geleneksel olarak uzun yıllardır kullanılan NS, aynı zamanda tıbbi alanda en yaygın kullanılan ve araştırmalara konu olan Nigella türüdür. Meyveleri, çörek otu olarak adlandırılan, aromatik ve acı tada sahip siyah tohumları içeren büyük, şişkin kapsüllerdir. Olgun tohumlarından sıkılarak çıkarılan kırmızımtırak kestane renkli, NS yağı elde edilir. Farmakolojik etkilerini araştırmak amacıyla çoğunlukla bitki tohumunun sabit ve uçucu yağları kullanılmıştır (121–123).

Tablo 2.1. *Nigella sativa*'nın bilimsel sınıflandırması (121).

Alem: Plantae
Bölüm: Magnoliophyta
Sınıf: Magnoliopsida
Takım: Ranunculales
Familya: Ranunculacea
Cins: Nigella
Tür: N. Sativa

Timokinon (2-izopropil-5-metilbenzo-1, 4-kuinon), NS tohumlarının uçucu yağ bileşiminde bulunan, pek çok farmakolojik çalışmada etkisi araştırılan önemli bir bileşiktir. Aynı zamanda NS sabit yağında da bulunur. Timokinon, *Ranunculaceae* familyasının yanı sıra *Lamiaceae, Cupressaceae* familyası gibi farklı familyalara mensup diğer tıbbi bitkilerin içeriğinde de bulunan biyoaktif bir bileşendir. Başta antioksidan, antienflamatuvar özellikleri olmak üzere birçok etkisi araştırılmaktadır (23).

Timokinon hidrofobik yapıdadır. İntravenöz, intraperitonal ve oral yolla uygulanabilir. Deneysel çalışmalarda timokinon oral yoldan 10-100 mg/kg doz aralığında toksik etkiden yoksun, güvenli bulunmuştur (23).

2.2.1. *Nigella sativa* Tohumlarının İçeriği

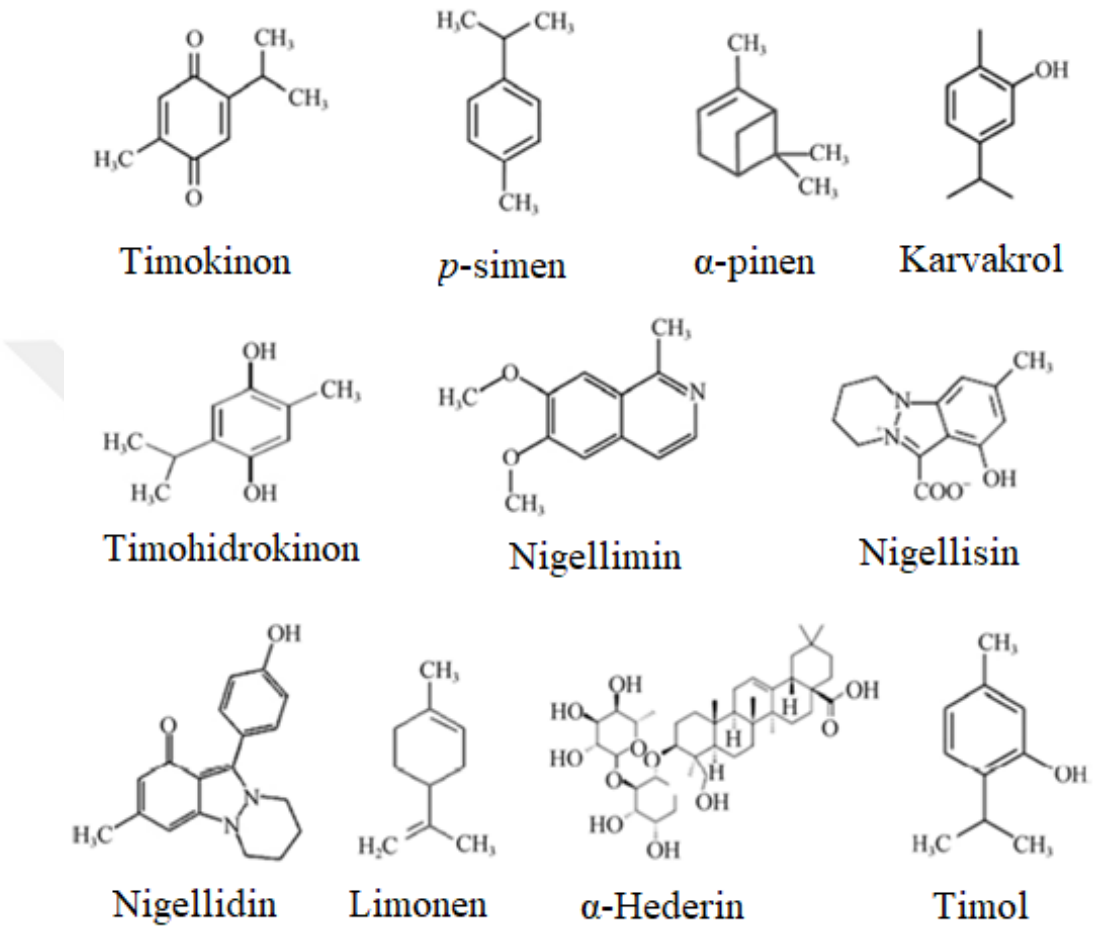
Nigella sativa tohumlarının kimyasal yapısı ilk kez Greenish tarafından 1880'de tanımlanmıştır (27). Tohumlardan %43.75 verimle elde edilen sabit yağın GS-MS ile analizinde; miristik asit, palmitik asit, palmitoleik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asit, linolenik asit, araşidik asit, eikosenoik asit, eikozadienoik asit içerdiği ve bu içeriğin yaklaşık %74'ünü linoleik ve oleik asitin oluşturduğu bulunmuştur (121).

Clevenger düzeneği kullanılarak su distilasyonu ile %3.33 verimle elde edilen uçucu yağın GC-MS analizinde α-pinen, β-pinen, limonen, β-fellandren, 1.8-sineol, γ-terpinen, p-simen, terpinolen, karvon, karvakrol, 4-terpineol, t-anetol, longifolen, α-tuyen, o-simen, β-elemen, timokinon, timol, timohidrokinon, cis-4-metoksituyan, trans-metoksituyan gibi bileşenler içerdiği çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur (121).

Nigella sativa metanol özüt analizinde timol ve kersetin, (-) epikateşin başta olmak üzere birçok fenolik bileşen içerdiği belirlenmiştir. Fosfor, potasyum, kalsiyum, magnezyum yönünden zengin olan tohumların sodyum, alüminyum, krom, mangan, demir, nikel, çinko, bakır, selenyum içerdiği tespit edilmiştir (121). Bunların yanında vitaminlerden A, B1, B2, B3, B6, B9 ve C vitaminleri bulunmaktadır. NS tohumlarında bulunan bazı bileşenlerin kimyasal yapısı Şekil 2.2'de gösterilmiştir.

Günümüze kadar Nigella'nın farklı türlerinden çeşitli kimyasal bileşenleri ayrılarak tanımlanmıştır. Yapılan bir çalışmada tohum kilogram başına; 216 g protein, 406 g yağ, 45 g kabuk, 84 g lif, 249 g azotsuz ekstrakt, 38 g nem, 105 mg demir, 18 mg bakır, 60 mg çinko, 527 mg fosfor, 1860 mg kalsiyum, 15.4 mg tiamin, 57 mg niasin ve 160 µg folik asit içermektedir (124). Bunlar dışında, timokinon, timol, limonen, karvakrol, p-simen, alfa-pinen, 4-terpineol, longifolen ve t-anetol benzen gibi aktif farmasötik bileşenlerin NS tohumlarında varlığı bilinmektedir.

Diğer bazı fitokimyasal çalışmalar, bitki tohumlarının nigellimin-N-oksit gibi izokinolin alkaloidleri ve nigellidin ve nigellisin gibi pirazol alkaloidlerini içeren iki sınıf alkaloid içerdiğini ortaya koymuştur. Tohumların diğer bileşenleri arasında saponinler, flavonoidler, indazol tipi alkaloidler, glikozitler de bulunur (122).



Şekil 2.2. Nigella sativa tohumlarının ana bileşenlerinin kimyasal yapıları.

2.2.2. Farmakolojik Etkileri

Nigella sativa, Güneydoğu Asya, Kuzey Afrika ve Orta Doğu'da geleneksel olarak çeşitli hastalıkların (ör. astım, bronşit, romatizma, baş ağrısı ve dizanteri) tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca tohumların şurubunun, sindirim, iştah kaybı, amenore ve dismenore tedavisi ve deri döküntülerinde yararlı olduğu bulunmuştur (122).

2.2.2.1. Gastroprotektif Etki

Sıçanlarda etanol ile oluşturulan akut gastrik ülser modelinde, lipid peroksidasyon belirteci olarak artan süperoksid dismutaz (SOD), malondialdehid (MDA) ve azalan glutatyon (GSH) düzeylerine karşı 20 mg/kg uygulanan timokinonun etkisi araştırılmıştır. Timokinon uygulamasının ülser indeksini düşürdüğü, MDA ve GSH düzeylerindeki değişimi düzelttiği gözlenmiştir (125).

Deksametazon ile mide hasarı oluşturulmuş sıçanlarda *Nigella sativa*'nın tek başına veya montelukast ile beraber kullanımının koruyucu etkileri araştırılmıştır. Yedi gün süren deney sonunda sıçanların mideleri çıkartılarak biyokimyasal ve histolojik incelemeler yapılmıştır. Deksametazon indüksiyonu ile MDA seviyesi, SOD ve miyeloperoksidaz (MPO) aktivitelerinde belirgin artış, mukus sekresyonunda azalma meydana getirmiştir. Montelukast ve NS'nin ise bu değişiklikleri azalttığı, mide hasarlanmasına karşı koruyucu etkisinin olduğu ortaya konmuştur (126).

Timokinonun mide koruyucu etki mekanizmasının araştırıldığı bir çalışmada 10 ve 20 mg/kg timokinon veya aynı dozda omeprazol veya kombinasyonlarının denendiği hayvanlarda iskemi/reperfüzyon ile mide asit salgısı, mide mukoza içeriği ve aktivitesi, lipid peroksidasyonu, ülser endeksi gibi birkaç paremetrede artış meydana gelmiştir. Timokinonun, özellikle yüksek dozda bu değişimleri omeprazolün oluşturduğu etki ile karşılaştırılabilecek düzeyde düzelttiği bulunmuştur. Bu çalışma ile timokinonun antioksidan özelliğinin yanı sıra proton pompası, asit salgısı, nötrofil infiltrasyonunu inhibe ederek, musin salgısı ve nitrik oksid üretimini de artırarak mide koruyucu etki gösterdiği ortaya konmuştur (127).

2.2.2.2. Antitümör Etki

Bir çalışmada nanoemülsiyonu hazırlanan NS yağının meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Bu sonuca göre NS yağının meme kanseri tedavisinde iyileştirme potansiyeli olabileceği ortaya konmuştur (128).

Uzun süreli sisplatin tedavisinin beraberinde getirdiği nefrotoksik yan etkileri hafifletme amacıyla sıçanlarda sisplatin ile oluşturulan nefrotoksisite modelinde NS yağı ve timokinonun etkileri incelenmiştir. Deneyin son gününe kadar NS grubundaki sıçanlar 2 ml/kg dozda NS yağı, timokinon grubundakiler 1.5 mg/kg timokinon ile oral olarak beslenmiştir. Timokinon veya NS yağı ile beslenme başladıktan 14 gün sonra 20 gün boyunca 4 günde 1 defa intraperitonal sisplatin (3 mg/kg) uygulanmıştır. Bu çalışma sonucunda sisplatinin oluşturduğu kan üre azotu (BUN), serum kreatinin düzeyi artışı ve diğer değişiklikleri timokinon ve NS yağı uygulamalarının iyileştirdiği biyokimyasal ve histolojik verilerle ortaya konmuştur. Bu sonuca bağlı olarak kanser kemoterapisinde sisplatinin uzun süre kullanılması gerektiğinde nefrotoksik etkilerini hafifletmek için NS ve timokinonun beslenme takviyesi olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (129).

2.2.2.3. Antidiyabetik Etki

Streptozosin ile diyabet modeli oluşturulmuş ve yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda, günlük NS yağı uygulamasının kan glukozu, lipid profili, oksidatif stres parametreleri ve insülin reseptörü ile uyarılan bazı genlerin ifadesine etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda NS yağı alan sıçanların diğerlerine göre insülin reseptörünün gen ekspresyonunun indüklendiği, ilaveten insülin benzeri büyüme faktörü-1 ve fosfoinositid-3 kinaz ekspresyonunun arttığı, ADAM-17 eskpresyonunun azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca kan glukoz seviyesi, lipid bileşenleri ve oksidatif stres parametreleri de NS yağı alanlarda düşmüş ve NS'nin antidiyabetik etkinliğinin olduğu gösterilmiştir (24).

2.2.2.4. İmmünomodülatör Etki

Formaldehit inhalasyonunun sıçanların hümoral bağışıklığını nasıl etkilediği ve NS yağının koruyucu etkisini araştıran dört haftalık bir çalışmada formaldehit inhalasyonunun sıçanların serum immünogloblin A (IgA), IgM ve C3 seviyesini artırdığı, IgG seviyelerini azalttığı tespit edilmiştir. NS uygulamasının sıçanlarda Formaldehit-indüklü IgA, IgM ve C3 artışını azalttığı ve NS'nin immünomodülatör etkili olduğu ortaya konmuştur (130).

Atopik dermatit benzeri lezyonların oluşturulduğu farelerde timokinonun hem oral hem de topikal uygulaması, serumda artmış IgE düzeyi ve periferal eozinofilinin eşlik ettiği hastalık bulgularını azaltmıştır. Ayrıca bazı proenflamatuvar sitokinlerin düzeyini ve kandaki enflamatuvar hücrelerin infiltrasyonunu düşürerek atopik dermatit skorunda iyileşmeye yol açmıştır (131).

Romatoid artrit modeli oluşturulan sıçanlarda timokinon Toll-benzeri reseptör-2 ve 4 ve proenflamatuvar sitokinler TNF-α, IL-1 ve Nükleer faktör kappa B ekspresyon seviyelerini düşürerek antienflamatuvar ve immünomodülatör etki göstermiştir. Bu sonuca göre timokinonun romatoid artriti iyileştirme potansiyeline sahip olabileceği öne sürülmüştür (132).

2.2.2.5. Hepatoprotektif Etki

Tavşanlarda karaciğer oksidatif hasarını iyileştirmede NS tohumlarının etkisinin araştırıldığı bir çalışmada kurşun asetata maruz kalan tavşanların MDA seviyeleri artarken, glutatyon seviyesi, GST ve GPx aktivitesi düşmüştür. Kurşun asetat uygulamasını takiben 2 ay boyunca günlük 20 g/kg NS tohumu tüketen tavşanlarda ise bu parametrelerin seviyelerinin anlamlı derecede düşük olduğu gözlenmiştir. Bu çalışma, NS tohumlarının kurşun asetat kaynaklı oksidatif strese karşı güçlü bir etkinliğinin olduğunu ortaya koymuştur (26).

Hepatoprotektif etkisini araştırmak üzere yapılan bir çalışmada 10 gün boyunca Timokinon (30mg/kg) ile oral yolla beslenen sıçanlarda iskemi-reperfüzyon ile kısmi hepatektomi oluşturulmuştur. Alanin aminotransferaz aktivitesi, histolojik bulgular, antioksidan parametreler, hepatik ATP içeriği, karaciğer rejenerasyon indeksi ve apoptoz düzeyleri değerlendirilen bu çalışmada timokinonun, oluşan patolojik bulguların tümünü hafiflettiği gösterilmiştir. Bu çalışma ile timokinonun iskemi-reperfüzyondan önce uygulanmasının oluşacak karaciğer hasarını azaltmaya karşı etkili bir strateji olabileceği öne sürülmüştür (133).

2.2.2.6. Antioksidan Etki

Nigella sativa tohum ekstrelerinin koruyucu etkilerini araştırmak için yapılan bir çalışmada TIB-73 hücreleri ve sıçanlarda asetaminofen ile indüklenmiş hepatotoksisiteye karşı NS tohum ekstrelerinin antioksidan etki göstererek hem lipid peroksidasyonu hem de ROS oluşumunu baskılamıştır. Böylece hepatotoksisite ve metabolik bozukluklara karşı *in vitro* ve *in vivo* koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (20).

İnsanlar üzerinde NS'nin antioksidan ve antienflamatuvar etkilerinin araştırıldığı randomize, çift kör, plasebo kontrollü klinik bir çalışmada, 42 romatoid artrit hastasına 8 hafta boyunca 500 mg NS yağı veya plasebo verilerek çalışmanın başında ve sonunda serum TNF-α, IL-10 ve tam kanda oksidatif stres parametreleri düzeyleri ölçülmüştür. Antienflamatuvar IL-10 düzeyinin NS verilen grupta anlamlı ölçüde arttığı, MDA ve NO düzeylerinin ise başlangıca göre anlamlı ölçüde azaldığı bulunurken TNF-α, SOD ve katalaz düzeylerinde NS ile beslenmeye bağlı bir değişim gözlenmemiştir (134).

2.2.2.7. Antiastmatik Etki

Ovalbümin ile indüklenmiş sıçanlara farklı dozlarda uygulanması ile timokinonun, lökotrien reseptör antagonisti olan montelukast ile karşılaştırmalı olarak lökosit sayısı değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda timokinonun astım modeli oluşturulmuş sıçanlarda antiastmatik etkisi olduğu bulunmuştur (135).

2.2.2.8. Kardiyoprotektif Etki

Fareler üzerinde yapılan 14 günlük bir çalışmada, timokinonun intraperitonal doksorubisin ile oluşturulan kardiyotoksisiteye karşı etkileri araştırılmıştır. Timokinon tedavi gruplarına 10 ve 20 mg/kg/gün oral yolla uygulanmıştır. Hastalık modeli oluşturulan grupta serum belirteçlerinden aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferazı (ALT), kreatin kinaz-miyokardial band (CK-MB) ve laktat dehidrojenaz (LDH)'nin ve oksidatif stres bulguları olan lipid peroksidasyonunun yükseldiği, antioksidan katalaz (CAT), SOD, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon

redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST) düzeylerinin düştüğü gözlenirken timokinon her iki dozda da bu değişimleri baskılamıştır. Ayrıca doksorubisin uygulaması ile artan proenflamatuvar sitokin IL-2'nin de tedavi gruplarında artışı önlenmiştir. Bu sonuçlara göre timokinonun kardiyomiyopati için potansiyel bir ilaç molekülü olabileceği ileri sürülmüştür (136).

2.2.2.9. Nefroprotektif Etki

Sisplatin ile nefrotoksisite modeli oluşturulmuş sıçanlarda NS'nin koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada renal korteks ve medullanın antioksidan koruma sistemi ve fırça kenar membranı enzim aktiviteleri ile serum parametreleri, karbonhidrat metabolizma enzimlerinin düzeyleri ölçülmüştür. Sisplatin uygulamasından önce ve sonra oral NS uygulamasının sıçanlarda sisplatine bağlı olarak artan serum kreatinin, kan üre azotu (BUN) seviyelerindeki artışı azalttığı, renal korteks ve medulladaki fırça kenar membran enzimlerinin aktivitesindeki azalmayı önlediği gösterilmiştir. Histopatolojik bulgular da NS'nin böbrek hasarını belirgin derecede önlediğini göstermiştir (137).

2.2.2.10. Öğrenme ve Bilişsel İşlevlere Etki

Hafıza ve kan biyobelirteçleri üzerine NS'nin etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada 40 gönüllü iki gruba ayrılarak bir gruba dokuz hafta boyunca günde iki defa 500 mg NS kapsül, diğer yarısına plasebo verilmiştir. Deney sonunda kalp, böbrek ve karaciğer ile ilişkili biyobelirteç düzeylerinde anlamlı bir farklılık saptanmazken, çalışma öncesi ve sonunda yapılan öğrenme ve hafıza testleri, NS'nin hafıza üzerine olumlu etkisi olduğunu ortaya koymuştur (22).

Bangladeş'te 14-17 yaş arası 48 gönüllü iki gruba ayrılarak 4 hafta süreyle bir gruba 500 mg NS kapsülü, diğer gruba plasebo verilmiştir. Deneyin başında ve sonunda yapılan öğrenme ve hafıza testleri ile gönüllülerin sırasıyla hafıza, ruh hali ve anksiyete durumları değerlendirilmiştir. Deney sonunda her üç durum için de NS'nin istatistiksel olarak anlamlı olumlu etki gösterdiği bildirilmiştir (138).

Pentilentetrazol indüksiyonu ile nöronal hasar oluşturulan sıçanlarda tekrarlayan nöbetlere karşı NS'nin etkisini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada sıçanlar beş gruba ayrılarak kontrol, hastalık ve üç farklı doz NS sulu alkol özütü (100, 200, 400 mg/kg) uygulanan tedavi grupları oluşturulmuştur. Her pentilentetrazol enjeksiyonundan 30 dk önce NS'nin sulu alkol özütü intraperitonal olarak beş gün boyunca verilmiştir. Deney sonunda tedavi gruplarının hastalık grubuna göre daha az nöbet geçirdiği, pasif sakınma testinde karanlık bölgeye daha geç geçtikleri, histolojik incelemelerde ise hipokampüsün farklı bölgelerinde stres, iskemi ve nöbet ile arttığı bilinen koyu renkli (dark) nöron üretiminin inhibe edildiği gösterilmiştir. Bu çalışma ile NS'nin hipokampal sinir hasarını önleme potansiyeli olduğu ortaya konmuştur (139).

Arsenik ile ilişkili nöropatolojik değişikliklere karşı timokinonun etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, sekiz gün boyunca oral 10 mg/kg arsenik alımının hipokampüste oluşturduğu ROS artışı, mitokondriyel disfonksiyon ve apoptotik olayların arsenik maruziyetinden önce oral timokinon (2.5 ve 5 mg/kg) uygulaması ile önlendiği ortaya konmuştur. Bu çalışma sonucunda timokinonun nöroprotektif etkili olduğu gösterilmiştir (140).

Timokinonun nöroprotektif etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada NMDA reseptörünün, l-glutamik aside aşırı maruz kalması ile artan hücre içi kalsiyum miktarı ve mitokondriyel disfonksiyon sonucu eksitotoksisite ile hücre ölümü gerçekleştirilerek sıçanlarda nörotoksik etki modeli oluşturulmuştur. Yedi gün, intraperitonal 2 g/kg/gün glutamat uygulaması ile hastalık modeli oluşturulan sıçanlarda, tedavi gruplarına yedi gün intraperitonal 2.5 mg/kg ve 10 mg/kg timokinon uygulanmıştır. Morris Su Tankı ve Y-maze davranış testleri ile bellek faaliyetleri değerlendirilen sıçanlarda glutamat ile bozulan işlevlerin, tedavi gruplarında anlamlı ölçüde iyileştiği gösterilmiştir. Glutamatla oluşan patolojinin bir sonucu olarak artan Cyto-c ekspresyonu, kaspaz-3 seviyesi, beyin LDH düzeyi ve $A\beta_{1-42}$ düzeyi, tedavi gruplarında her iki dozda da anlamlı derecede düşmüştür. Bu çalışma ile anti-amiloidojenik, anti-apoptotik ve antioksidan etkileri ile timokinonun nöroprotektif özelliği ortaya konmuştur (141).

Parkinson modeli oluşturmak amacıyla çevresel bir zehir olan rotenon uygulanan sıçanlara, bu uygulamadan bir saat önce 7.5 mg/kg ve 15 mg/kg dozlarda

oral olarak timokinon uygulanmıştır. Çalışma sonucunda antioksidan ve nöroprotektif etkileri ile timokinonun rotenon kaynaklı hasarı önemli ölçüde önlediği ortaya konmuştur (142).

Lityum-pilokarpin uygulaması ile status epileptikus modeli oluşturulan sıçanlarda timokinonun beyin hasarını önlemede etkisi araştırılmıştır. Elektrosefalogram, Racine skalası kullanılarak nöbetin şiddeti, pasif sakınma testi kullanılarak öğrenme davranışı değerlendirilen hayvanların, biyokimyasal bulguları da incelenmiştir. Tüm parametreler, timokinonun lityum-pilokarpin toksisitesi kaynaklı beyin hasarını azalttığını ortaya koymuştur (143).

Timokinonun etkinliğinin *in vitro* olarak araştırıldığı bir çalışmada lipopolisakkarid ile uyarılmış BV-2 fare mikroglia hücrelerine karşı timokinonun enflamasyonla ilişkili sitokin düzeylerini azalttığı ve belirgin şekilde antienflamatuvar özellik gösterdiği ortaya konmuştur. Bu çalışma sonucunda, timokinonun, aktive edilmiş mikroglia hücrelerini içeren enflamasyonla ilişkili nörodejeneratif hastalıkların gelişimini geciktirme potansiyeli olabileceği öne sürülmüştür (144).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Malzemeleri ve Hayvanlar

Deney Hayvanları

Çalışmanın deney hayvanlarında yürütülme izni, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu'ndan 14.02.2018 tarih ve 2018/06 karar numaralı Etik Kurul belgesi ile alındı. Çalışma Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Toplamda 56 adet 4 aylık 290-320 g ağırlığında Wistar-Albino erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar her bir kafeste dört adet olacak şekilde ayrı ayrı kafeslere yerleştirildi. Bir haftalık süre boyunca hayvanların deney ortamına ve çalışmayı yapan araştırıcıya alışmaları sağlandı. Hayvanların barındığı ortamın havalandırması merkezi havalandırma düzeni ile sağlandı ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü uygulandı. Deney süresince hayvanlar musluk suyu ve sıçan yemi ile beslendi. Sadece gavaj uygulamalarında 1 gece öncesinden kısmi yem kısıtlaması yapıldı.

Kimyasallar

Amiloid Beta 1-42 peptid ($A\beta_{1-42}$, California Peptide, ABD),
Yağ asidi standart karışımı (Chem-Lab, Belçika)
Mısır yağı (Sırma),
Nigella sativa yağı (Taze NS tohumlarının günaşırı soğuk sıkımı ile elde edilen yağı)
Timokinon (Sigma-Aldrich 274666-5G, ABD)
Formaldehit %10 (Biochemika-Fluka Japonya)
Fosfat Tampon Sıvısı (PBS, Sigma-Aldrich, ABD)
Ketamin (Alfamine %10 enjeksiyonluk çözelti, Alfasan, Hollanda)
Ksilazin (Alfazyne %2 enjeksiyonluk çözelti, Alfasan, Hollanda)

Kitler

TNF-α (ELISA kiti, Abcam ab100785, Cambridge, İngiltere)
IL-1β (ELISA kiti, Abcam ab100768, Cambridge, İngiltere)
Anti-Iba1 (Antikor, Abcam ab178847, Cambridge, İngiltere)
DAB kiti (Leica, Bond Polymer Refine Detection, Hollanda)

Malzeme ve Cihazlar

GC-MS cihazı (Trace1300, ThermoFisher, ABD)
Morris Su Tankı (160 cm çapında, 60 cm yüksekliğinde, yerli)
Morris testi video düzeneği (Noldus EthoVision XT10, Noldus Information Technology, Hollanda)
Pasif Sakınma Cihazı ve Düzeneği (Noldus MAY PAV211, Noldus Information Technology, Hollanda)
Stereotaksi
İmmünhistokimya Boyama Cihazı (Leica, Bond max, Avustralya)
Spektrofotometre (Thermo Scientific, Multiskan Go, 1510, Finlandiya)
Sonikatör (Sonics & Materials Inc, Vcx 130PB, ABD)
Santrifüj (Hettich, 1406, Almanya)
Mikroskop (Leica, Avustralya)
Derin dondurucu (-80°C) (ThermoFisher, ABD)
Hamilton mikroenjektör (5 mikrolitre (µl), Hamilton, ABD)
Otomatik mikropipet 100 µL, 500µL, 1000µL (Eppendorf, ABD)
Enjektör (2.5 mL, 5 mL, 10 mL)
Hassas terazi (ADAM, Nimbus, NBL 214e, ABD)
Tıraş makinesi (Oster, ABD)
Mikro matkap (paslanmaz çelik)
Cerrahi malzeme seti (Bistüri, makas, pens, portegü vs)
Cerrahi iplik (3/0 ipek)

3.2. Deney Grupları

Her grupta 7 sıçan olacak şekilde 8 grup oluşturuldu (Tablo 3.1). Gruplara yapılan uygulamalar aşağıdaki ilgili başlıklar altında ayrıntılı olarak verildi.

Tablo 3.1. Deney grupları.

Kontrol	Mide sondası ile mısır yağı + hipokampüs içi serum fizyolojik uygulanan kontrol grubu
Hastalık (AH)	Mide sondası ile mısır yağı + hipokampüs içi $A\beta_{1-42}$ uygulanan hastalık modeli grubu
Nigella sativa yağı 0.5 ml/kg (NS-A)	Mide sondası ile 0.5 ml/kg/gün NS + hipokampüs içi $A\beta_{1-42}$ uygulanan tedavi grubu
Nigella sativa yağı 1 ml/kg (NS-B)	Mide sondası ile 1 ml/kg/gün NS+ hipokampüs içi $A\beta_{1-42}$ uygulanan tedavi grubu
Nigella sativa yağı 2 ml/kg (NS-C)	Mide sondası ile 2 ml/kg/gün NS + hipokampüs içi $A\beta_{1-42}$ uygulanan tedavi grubu
Timokinon 3 mg/kg (TK-A)	Mide sondası ile 3 mg/kg/gün TK + hipokampüs içi $A\beta_{1-42}$ uygulanan tedavi grubu
Timokinon 10 mg/kg (TK-B)	Mide sondası ile 10 mg/kg/gün TK + hipokampüs içi $A\beta_{1-42}$ uygulanan tedavi grubu
Timokinon 30 mg/kg (TK-C)	Mide sondası ile 30 mg/kg/gün TK + hipokampüs içi $A\beta_{1-42}$ uygulanan tedavi grubu

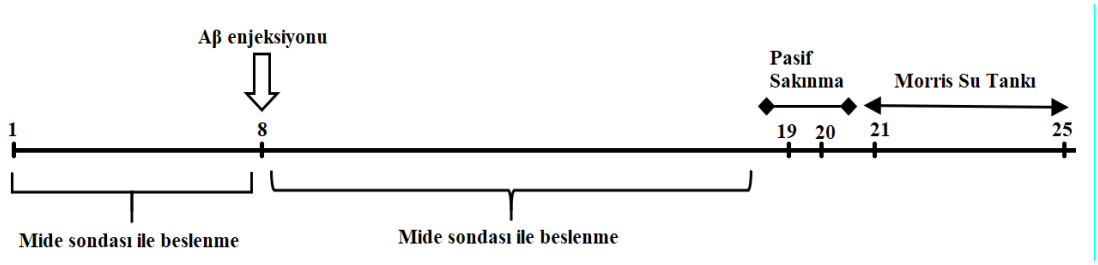
3.3. Deney Protokolü

Çözeltilerin Hazırlanması

Timokinon ve NS yağı uygulamalarının tümü toplam hacim 2 ml/kg olacak şekilde mısır yağı ile tamamlandı. Timokinon dozları 3, 10 ve 30 mg/kg/gün, NS dozları 0.5, 1 ve 2 ml/kg/gün olarak uygulandı.

NS tohumlarından gün aşırı soğuk sıkım ile NS yağı elde edildi. Her üç NS yağı grubu 2 ml/kg'a mısır yağı ile tamamlandı. Timokinon stok çözeltileri mısır yağında çözülerek hazırlandı. Hayvanlara günlük uygulanan timokinonun 3, 10 ve 30 mg/kg günlük dozları, bu stok çözeltilerden doğrudan alınarak kullanıldı.

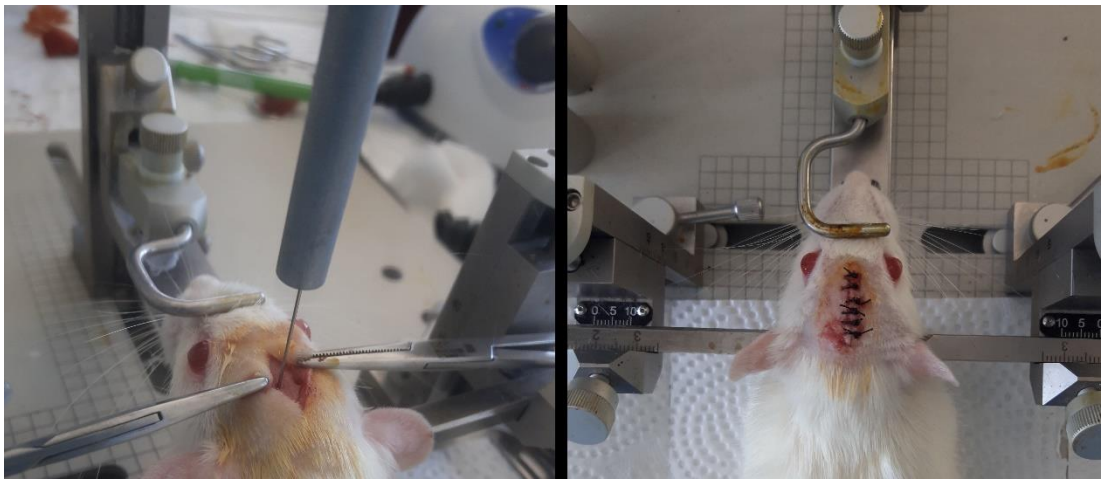
Hastalık modeli oluşturma amacıyla $A\beta_{1-42}$ çözeltisi hazırlanmasında $A\beta_{1-42}$ peptidinin 1 mg'ı 250 µl distile suda çözüldü. Fibril benzeri yapılar ve oligomerler oluşması için 7 gün 37°C'deki etüvde inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.1. Deney protokol şeması.

Deneysel Alzheimer Modelinin Oluşturulması

Tedavi ve hastalık gruplarındaki sıçanlar, intraperitonal ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin (5 mg/kg) ile anestezi altına alındı. Kafa derisi üzerindeki tüyleri nazikçe tıraş edildi. Stereotakside kulak çubukları ile kulaklarından ve ön dişlerinden sabitlendi. Hayvanların kafa derisi bistüri ile orta hattan kesilerek açıldıktan sonra bregmanın (sagital ve koronal süturların kesişim noktası) koordinatları tespit edildi. Enjeksiyon için hipokampüsün koordinatları Paxinos&Watson sıçan beyin atlasına göre belirlendi (145). Beyin kemik dokusu mikrodelici ile sagital kesiklerden açıldı. $A\beta_{1-42}$ peptidi Hamilton mikroenjektörü ile hipokampüs içine AP: -3.5 mm, ML: ± 2.0 mm, DV: -2.8 mm koordinatlarında iki taraflı (bilateral) 1µl/taraf enjekte edildi. Kontrol grubuna $A\beta_{1-42}$ yerine aynı miktarda serum fizyolojik enjekte edildi. Enjeksiyonlar 1 µl/dk hızında gerçekleştirildi. Aβ'nın uygulama yerinden dışarı kaçmaması için enjektör 5 dakika enjeksiyon bölgesinde bekletildi. Enjeksiyonlar tamamlandıktan sonra kesi yeri 3/0 mm cerrahi dikiş ipliği kullanılarak basit sütur ile kapatıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Hipokampüs içine enjeksiyon yapılan ve operasyondan sonra kesi yeri sütur ile kapatılan sıçanlar.

Nigella sativa ve Timokinon Uygulamaları

Hipokampüs içine $A\beta_{1-42}$ uygulamasından önceki 7 gün ve sonraki 10 gün NS-A, NS-B ve NS-C gruplarına sırasıyla 0.5 ml/kg, 1 ml/kg, 2 ml/kg Nigella sativa soğuk sıkım yağı, TK-A, TK-B, TK-C gruplarına sırasıyla 3 mg/kg, 10 mg/kg ve 30 mg/kg mısır yağında çözünmüş timokinon mide sondası ile uygulandı. Uygulamalar her gün sabah aynı saatlerde yapıldı.

Kontrol ve hastalık gruplarına NS yağı ve timokinon yerine, aynı hacimde (2 ml/kg) mısır yağı verildi.

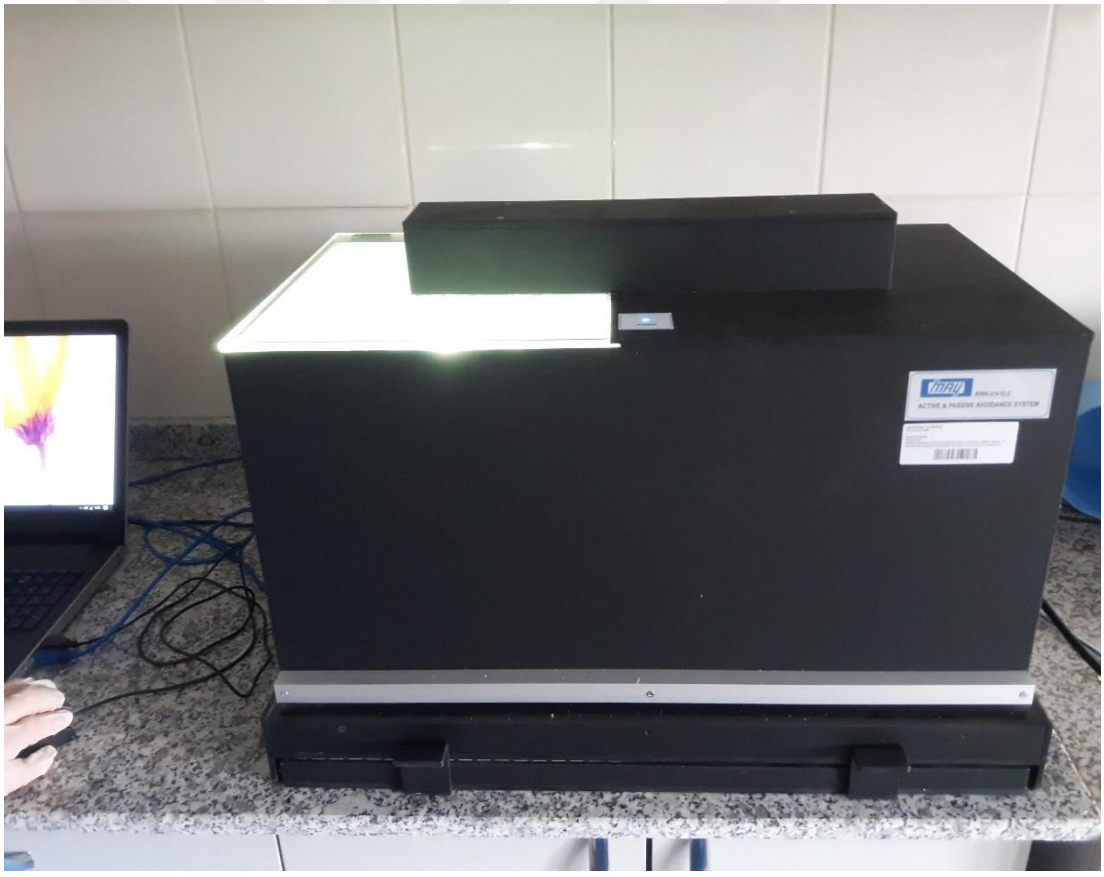
3.4. Davranış Deneyleri

Timokinon, NS yağı veya mısır yağı uygulamaları bittikten sonra iki gün sürecek olan Pasif Sakınma testi, test bittikten sonra beş gün sürecek olan Morris Su Tankı deneyleri uygulandı.

3.4.1. Pasif Sakınma Testi

Öğrenme ve kısa süreli belleğin ölçüldüğü Pasif Sakınma testi, giyotin bir kapı ile aydınlık ve karanlık iki bölüme ayrılmış, tabanı elektriği ileten tel ızgara ile

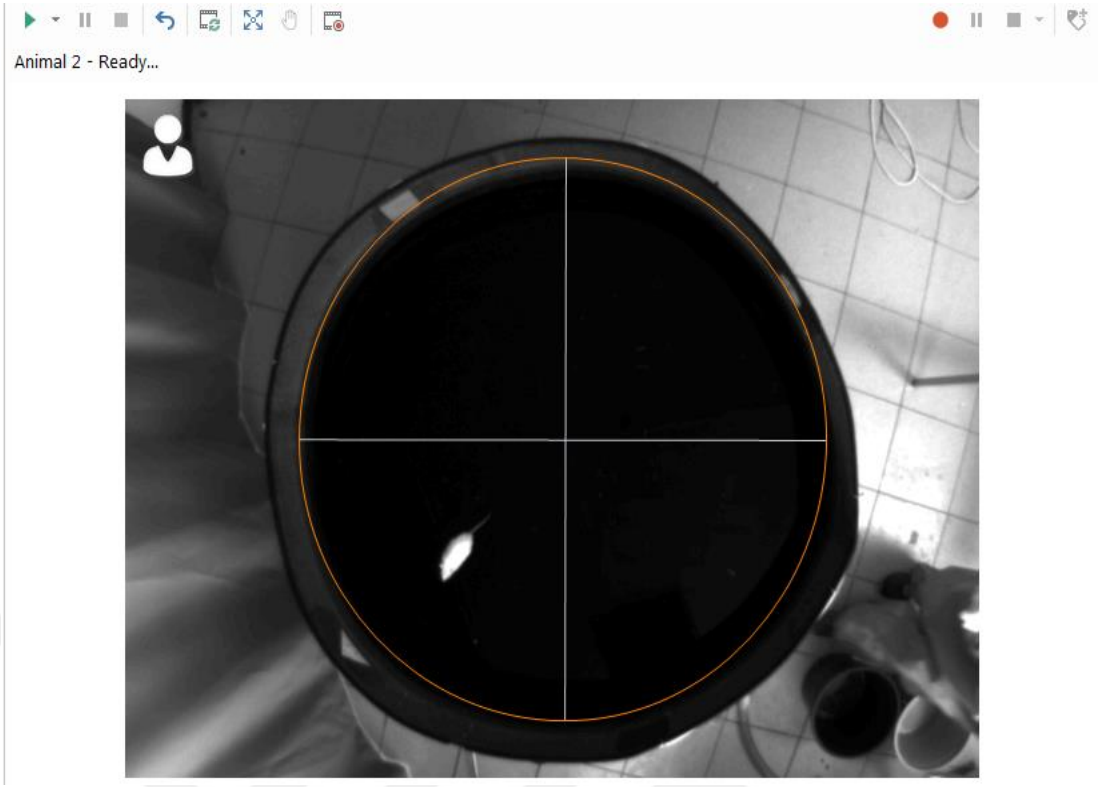
döşenmiş cihaz düzeneğinden oluşur (Şekil 3.3). Hayvanın bölümler arası geçişini algılayan sensörler ışık, elektrik ve giyotin açılma/kapanmasını otomatik olarak ayarlamaktadır. Bu deneyin ilk gününde sıçan aydınlık bölmeye bırakıldı, 20 saniye alışma periyodundan sonra giyotin kapı otomatik olarak açıldı. Hayvanın giyotin kapı açıldıktan sonra karanlık bölmeye geçme süresi kaydedildi, 60 saniye boyunca geçmeyen hayvanlar deney dışı bırakıldı. Hayvan karanlık bölmeye geçtiğinde kapı otomatik olarak kapandı ve 3 sn süre ile 0.5 mA elektrik şoku uygulandı. Sonrasında hayvan alındı ve kafesine koyuldu. Deney bitiminden 24 saat sonra hayvan tekrar aydınlık bölmeye bırakıldıktan 10 saniye sonra giyotin kapı açıldı. Kapı açıldıktan sonra 300 saniyeye kadar hayvanın karanlık bölgeye geçme süresi kaydedildi. 300 sn boyunca geçmeyen hayvanlar öğrenmiş kabul edildi.



Şekil 3.3. Pasif Sakınma düzeneği.

3.4.2. Morris Su Tankı Testi

Deneyin gerçekleştirileceği 160 cm çapında 50 cm yüksekliğindeki tank, yaklaşık 30 cm yüksekliğine kadar su ile doldurudu. Suyun sıcaklığı 23±1 °C aralığında tutuldu. Tankın tepesindeki tavana, tankı ortalayacak şekilde bir video kaydedici kamera sistemi yerleştirildi. Hayali olarak 4 eşit parçaya ayrılmış olan tankın bir kadranının ortasına suyun 2 cm altında kalacak şekilde bir kenarı 10 cm olan kare bir platform yerleştirildi. Hayvanın yönünü belirleyebilmesi için tankın suyla temas etmeyen iç kısımlarına dört farklı renk ve şekilde geometrik işaretler yerleştirildi. Hayvanın yön duygusunun karışmaması için araştırmacı deney esnasında tankın içerisinden görülebilecek bir şekilde bulunmadı. Deneyin ilk dört günü hayvanlar önceden belirlenen 5 farklı noktadan tanka bırakıldı. Tüm hayvanlar sırayla aynı noktalardan bırakıldı. Sıçanlar suya bırakıldıktan sonra bilgisayara bağlı olan kameranın algılamasıyla deney otomatik olarak başlayarak 90 saniye boyunca hayvanın hareketleri kaydedildi. Belirlenen süre içerisinde platformu bulamayan sıçanlara platformun yeri gösterilerek 20 saniye platform üzerinde kalmaları sağlandı. Dört günün sonunda 20 defa platformu bulma alıştırmaları yapılmış olan sıçanlar beşinci günde teste alındı. Test gününde platform kaldırılarak tanka bırakılan hayvanların 60 sn boyunca yüzmeleri sağlandı ve program tarafından önceden platformun olduğu kadranda geçirilen süre kaydedildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Morris Su Tankı videosunun bilgisayara aktarılan görüntüsü.

Dokuların Alınması

Davranış deneylerinin sonlandırılması ile intramüsküler ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin (5 mg/kg) ile anesteziye sokulan sıçanların 10 ml'lik enjektör ile kalplerinden alınan kan antikoagülan içermeyen biyokimya tüplerine aktarıldı. Kanlar 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek serumlar yağ asidi analizi için ayrıldı. Buz üzerinde beyin dokuları çıkarılarak sağ hemisfer hipokampüsü biyokimyasal analizler için PBS ile dolu kaplara, sol hemisfer histolojik incelemeler için formol ile dolu kaplara alındı. Biyokimyasal analizler için ayrılan beyin dokuları ve serumlar derhal -20 °C'ye, sonrasında -80 °C'ye kaldırıldı.

3.5. Proenflamatuvar Sitokin Ölçümleri

Sıçanların hipokampüslerinde ELISA kitleri kullanılarak TNF-α ve IL-1β düzeyleri ölçüldü. Örneklerdeki TNF-α ve IL-1β miktarı standart eğri kullanılarak pg/ml doku olarak hesaplandı.

3.5.1. Tümör Nekfoz Faktör Alfa (TNF-α) Tayini

Tüm materyaller ve reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Kılavuzda belirtilen oranlara göre deneyde kullanılacak reaktiflerin seyreltmeleri yapıldı. Standart çözeltileri hazırlandı. Hipokampüs dokuları -80ºC'den çıkarılarak çözündükten sonra tartıldı. Kit içersindeki lizis çözeltisi eklenerek sonikatörde homojenize edildi. Dokular santrifüj edildikten sonra süpernatant alınarak Örnek Seyreltme Tamponu ile seyreltildi ve kuyucuklara 100 µL standart eklenerek kuyucuklar kaplandı ve oda sıcaklığında 2.5 saat yavaşça çalkalanarak inkübe edildi. Solüsyon uzaklaştırıldı ve 4 defa 300 µL yıkama solüsyonu ile çok kanallı pipet kullanılarak yıkandı. Bu işlemden ileride kısaca yıkama olarak bahsedilecektir. Yıkamanın ardından kuyucuklar boşaltılıp, fazla kalan yıkama solüsyonu ters çevrilip temiz havlu kağıda karşı hafifçe vurularak uzaklaştırıldı. 100 µL Biyotinlenmiş TNF-α Deteksiyon Antikoru her bir kuyucuğa eklendi. Plak hafifçe çalkalanarak 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırılarak yıkama işlemi tekrarlandı. 100 µL HRP-Streptavidin solüsyonu kuyucuklara eklendi ve yavaşça çalkalanarak oda sıcaklığında 45 dk inkübe edildi. Yıkama işlemi tekrarlandı. 100 µL TMB Tek-basamak Substrat Reaktifi her bir kuyucuğa eklendi ve 30 dk karanlıkta, yavaşça çalkalanarak inkübe edildi. 50 µL Stop Solüsyonu kuyucuklara eklendi ve hızlıca 450 nm'de okuma yapıldı.

TNF-α ELISA Kit İçeriği

Mikroplate
Yıkama Solüsyonu
Rekombinant TNF-α standardı
Numune Seyreltme Solüsyonu
Genel seyreltici (assay diluent)
Biyotinlenmiş anti-rat TNF-α
HRP-Streptavidin Konsantratı
TMB Tek-Basamak Substrat Reaktifi
Stop Solüsyonu
Hücre Lizis Tamponu

3.5.2. İnterlökin 1 Beta (IL-1β) Tayini

Tüm materyaller ve reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Kılavuzda belirtilen oranlara göre deneyde kullanılacak reaktiflerin seyreltmeleri yapıldı. Standart çözeltileri hazırlandı. Hipokampüs dokuları -80ºC'den çıkarılarak çözündükten sonra tartıldı. Kit içersindeki lizis çözeltisi eklenerek sonikatörde homojenize edildi. Dokular santrifüj edildikten sonra süpernatant alınarak Örnek Seyreltme Tamponu ile seyreltildi ve kuyucuklara 100 µL standart eklenerek kuyucuklar kaplandı ve oda sıcaklığında 2.5 saat yavaşça çalkalanarak inkübe edildi. Solüsyon uzaklaştırıldı ve 4 defa 300 µL yıkama solüsyonu ile çok kanallı pipet kullanılarak yıkandı. Bu işlemden ileride kısaca yıkama olarak bahsedilecektir. Yıkamanın ardından kuyucuklar boşaltılıp, fazla kalan yıkama solüsyonu ters çevrilip temiz havlu kağıda karşı hafifçe vurularak uzaklaştırıldı. 100 µL Biyotinlenmiş IL-1β Deteksiyon Antikoru her bir kuyucuğa eklendi. Plak hafifçe çalkalanarak 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırılarak yıkama işlemi tekrarlandı. 100 µL HRP-Streptavidin solüsyonu kuyucuklara eklendi ve yavaşça çalkalanarak oda sıcaklığında 45 dk inkübe edildi. Yıkama işlemi tekrarlandı. 100 µL TMB Tek-basamak Substrat Reaktifi her bir kuyucuğa eklendi ve 30 dk karanlıkta, yavaşça çalkalanarak inkübe edildi. 50 µL Stop Solüsyonu kuyucuklara eklendi ve hızlıca 450 nm'de okuma yapıldı.

IL-1β ELISA Kit İçeriği

Mikroplate
Yıkama Solüsyonu
Rekombinant IL-1β standardı
Numune Seyreltme Solüsyonu
Genel seyreltici (assay diluent)
Biyotinlenmiş anti-rat IL-1β
HRP-Streptavidin Konsantratı
TMB Tek-Basamak Substrat Reaktifi
Stop Solüsyonu
Hücre Lizis Tamponu

3.6. İmmünohistokimyasal İncelemeler

Dokuların tamamı %10'luk formalinde fikse edildikten sonra parafine gömüldü. 3-4 µm kalınlığında koronal kesitler kesit alma cihazı (Leica RM 2155) ile elde edildikten sonra poly-L-lizin kaplı lamlara alınarak kesitler hazırlandı. Kesitler etüvde 72 ºC'de yarım saat bekletildi. Antikorlar; iyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekülü 1 (Iba1) 1:8000, Glial fibriler asidik protein (GFAP) 1:100 oranında dilüe edildi.

Doku kesitleri, otomatik immünohistokimyasal boyama cihazına (Leica Bond-Max) yerleştirildikten sonra 30 dakika 60ºC'de parafinin erimesi sağlandı. Bu işlemin ardından, 15 dakika dewax solüsyonunda tutularak kesitlerin deparafinizasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra kesitler 15 dakika %99'luk alkolde tutularak rehidratasyon işlemi tamamlandı ve Wash Buffer solüsyonuyla 3 dakika yıkama işlemi yapıldı. Iba1 için 40 dk EDTA çözeltisinde, GFAP için 5 dk sitrat çözeltisinde antijen retrival işlemi gerçekleştirildikten sonra Wash Buffer solüsyonuyla 3 dakika 3 defa yıkama işlemi tekrarlandı. Örnekler %3'lük hidrojen peroksidazda 5 dk bekletildikten sonra yıkama işlemi tekrarlanarak antikor damlatılarak 15 dk bekletildi. Yıkama işleminin ardından lamlara önce Post Primer solüsyon damlatılarak 8 dk, yıkama işleminin ardından daha sonra Polimer solüsyon damlatılarak 8 dk bekletildi. Yıkama işlemi, üçüncü basamağı deiyonize su olacak şekilde yapıldı. Örnekler DAB+Kromojen damlatıldıktan sonra 6 dk bekletildi. Örnekler tekrar distile suda yıkandıktan sonra, hematoksilende 7 dakika boyandı ve son defa distile suda yıkandıktan sonra alkol ve ksilolden geçirilen kesitler kapatıldı.

İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde GFAP ve Iba1 için boyanmanın şiddeti ve yaygınlığı, ayrıca astroglia ve mikroglia hücrelerinin aktive olmuş morfolojiye sahip olup olmamaları esas alındı. İmmün boyanmanın şiddeti ve yaygınlığı 0'dan +3'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı: 0=Yok, +1=Az, +2=Orta, +3=Şiddetli.

3.7. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS) Analizi

Sıçan serumları ve NS yağının yağ asidi içeriklerinin belirlenmesi amacıyla GC-MS analizi yapıldı.

3.7.1. *Nigella sativa* Yağının GC-MS Analizi

Nigella sativa Sabit Yağ Ekstraksiyonu ve Yağ Asidi Metil Esterleri Hazırlanması

Öğütülmüş 10 g NS tohumu, hekzanla 24 saat boyunca oda sıcaklığında ekstrakte edildi. Hekzanlı özüt azot altında kuruluğa kadar uçurulduktan sonra tartıldı, verim hesabından sonra kullanılana kadar +4°C'de saklandı. Bir santrifüj tüpüne 0.5 g özütten alındı. Üzerine 10 ml n-hekzan ve 2 ml 2 N metanollü KOH ilave edildi. Karışım 2 dk vortekste karıştırıldıktan sonra 15 dk 4000 rpm'de santrifüjlendi. Üst faz başka bir santrifüj tüpüne alınıp 5 ml distile su ilave edilerek 2 dk vorteksle karıştırıldı. 15 dk 4000 rpm'de santrifüjlendi. Üst faz analiz için enjektörle viyale alınarak analize kadar +4°C'de saklandı.

GC-MS Analiz Koşulları

Nigella sativa sabit yağının yağ asitlerinin analizi GC-MS (Trace 1300, Thermo Scientific) kullanılarak yapıldı. Viyale alınan numune autosampler ile cihaza verildi. Kolon olarak TR-FAME (120 x 0.25mm x 0.25µm) seçildi. Taşıyıcı gaz helyumun akış hızı 1.2 mL/dk olarak ayarlandı. Sıcaklık 100 °C'de 5 dk tutulduktan sonra 4 °C/dk hızla 240 °C'ye çıkarıldı, 240 °C'de 22 dk tutuldu. Split oranı: 1:10 olarak ayarlandı.

3.7.2. Serum Yağ Asidi Analizi

Deney sonunda -80°C'de saklanan serumlar oda sıcaklığında çözünmeye bırakıldı. 30 dk sonra 100 µL serum alınarak 1.5 ml kloroform:metanol (1:2 v/v) ile ekstrakte edildi. Ardından 500 µL kloroform ve 500 µL su eklenerek 90 saniye vorteks ile karıştırıldı. 10 dk 4500 g'de santrifüj edildikten sonra organik faz (alt faz) alınarak üst faz 500 µL kloroform ile yukarıdaki gibi tekrar ekstrakte edildi. Alt fazlar birleştirilerek çözücü azot altında kuruluğa kadar uçuruldu. Sonrasında 1 ml 1 M H2SO4/CH3OH eklenerek ağzı sıkıca kapalı tüpte blok ısıtıcıda 80°C'de 90 dk tutuldu. Tüpteki çözelti oda sıcaklığında soğuması beklendikten sonra iki defa 1 ml hekzan ile 3 dk vorteksle karıştılıp hekzan fazları alınıp azot altında kuruluğa kadar uçurulduktan sonra 50 µl hekzanda çözülerek GC-MS analizi için viale alındı.

GC-MS Analiz Koşulları

Yağ asidi analizinde GC-MS analizi (Trace 1300, Thermo Scientific), TR-FAME kolonu (120 x 0.25mm x 0.25µm) kullanılarak yapıldı. Kolon sıcaklığı 100 °C'de 1 dk tutulduktan sonra 4°C/dk hızla 240 °C'ye çıkarıldı ve 240°C'de 22 dk tutuldu. Taşıyıcı gaz helyumun akış hızı 1.2 ml/dk olarak ayarlandı. Dedektör sıcaklığı 240°C olarak ayarlandı. Numune 20:1 split oranı ile verildi.

3.8. İstatistiksel Değerlendirme

Deney çalışmalarında elde edilen veriler Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows 25 programı ile değerlendirildi. Gruplar arası değerlendirmde normal dağılım gösterip göstermemelerine bağlı olarak One-way ANOVA testi ve devamında Post-hoc Bonferonni testi veya Kruskal Wallis Analizi ve onu takiben Mann-Whitney U Testi kullanılarak yapıldı. Grafikleri oluşturmada GraphPad Prism 7 kullanıldı.

İstatistiksel anlamlılık için $p<0.05$ değeri referans alındı. $p<0.05$: anlamlı "*", $p<0.01$: çok anlamlı "**", $p<0.001$: yüksek derecede anlamlı "***" olarak belirtildi. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verildi.

4. BULGULAR

4.1. Canlı Ağırlık Değişimi

Deney başında ve sonunda yapılan ölçümlerde tüm grupların ortalama ağırlığında artış gözlendi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Ortalama ağırlık değişimleri.

GRUP	1. Hafta ağırlık (g)	3. Hafta ağırlık (g)
KON	304.6±16.3	317.9±22.9
AH	296.6±13.3	303.9±14.5
NS-A	313.1±14.3	323.8±14.6
NS-B	295.5±17.3	304.8±17.0
NS-C	290.3±15.1	303.3±17.8
TK-A	292.7±14.6	297.3±16.5
TK-B	310.2±11.7	315.3±13.6
TK-C	291.0±14.0	295.9±19.6

(AH: Alzheimer Hastalık grubu, NS-A: 0.5 ml/kg, NS-B: 1 ml/kg, NS-C: 2 ml/kg Nigella sativa uygulanan gruplar, TK-A: 3 mg/kg, TK-B: 10 mg/kg, TK-C: 30 mg/kg Timokinon uygulanan gruplar)

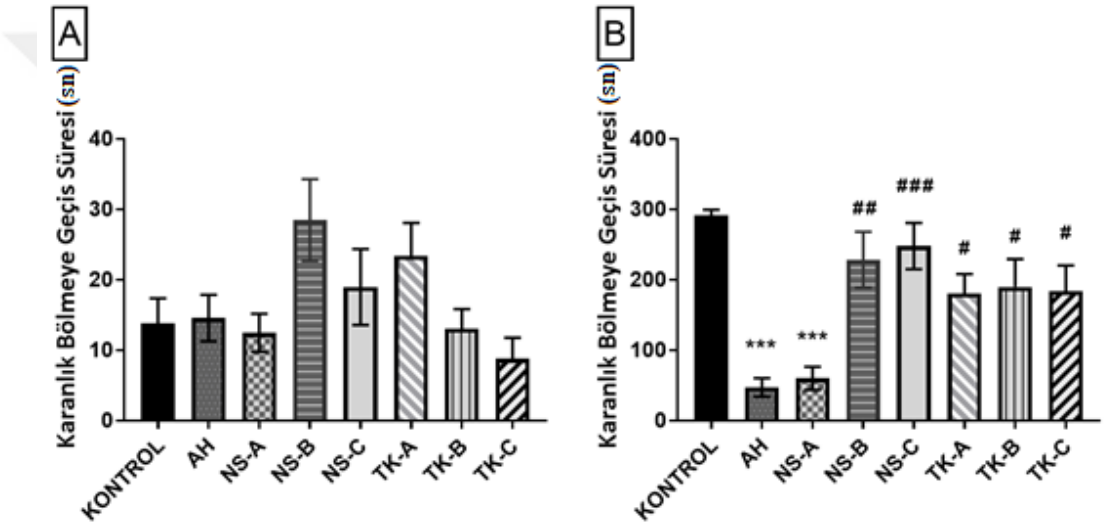
4.2. Davranış Deneylerinin Bulguları

4.2.1. Pasif Sakınma Deneyine İlişkin Bulgular

Pasif sakınma deneyi sonuçları, öğrenmenin gerçekleşmesi için elektrik şoku uygulanan ilk gün ve öğrenmenin test edildiği ikinci gün (test) hayvanların karanlık bölmeye geçiş sürelerinin grup içi ortalaması olarak verilmiştir (Şekil 4.1).

Pasif sakınma deneyinin ilk günü aydınlık kompartmana konan hayvanların karanlık kompartmana geçiş süreleri Kontrol 13.8±3.6, AH 14.6±3.3, NS-A 12.5±2.7, NS-B 28.5±5.8, NS-C 19±5.4, TK-A 23.4±4.7, TK-B 13.1±3.6 ve TK-C 8.8±3 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

İkinci gün karanlık bölmeye geçiş süreleri Kontrol 292±7.5, AH 47.5±11.5, NS-A 60.6±16.6, NS-B 228.9±34.7, NS-C 248.2±28.5, TK-A 180.7±27.9, TK-B 190±38.7 ve TK-C 184.2±36.5 karşılaştırıldı. AH grubu ile Kontrol ($p<0.001$), NS-B ($p<0.01$), NS-C ($p<0.001$), TK-A ($p<0.05$), TK-B ($p<0.05$), TK-C ($p<0.05$) grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 4.1).

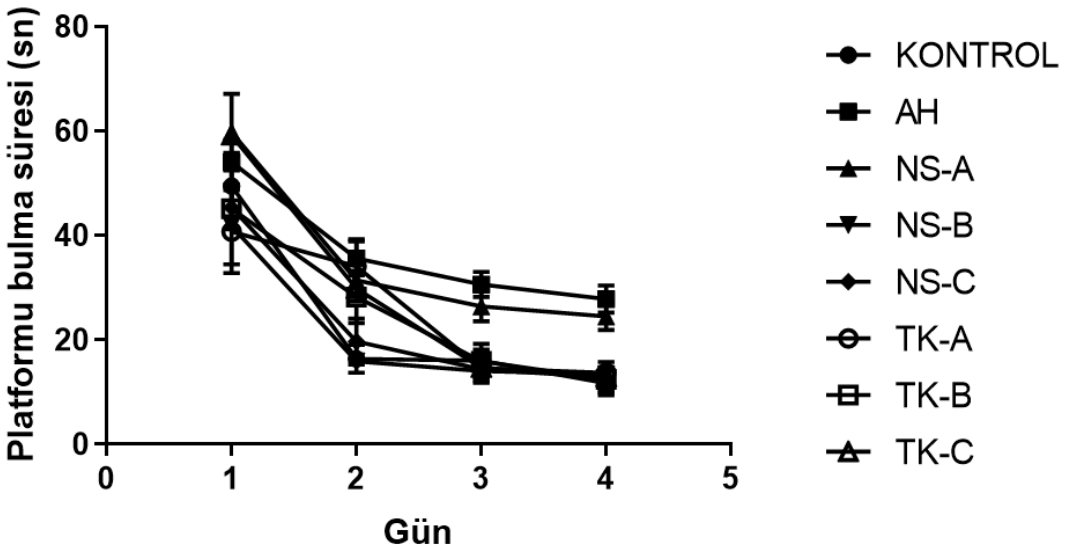


Şekil 4.1. Pasif Sakınma deney sonuçları. (A) Pasif sakınma testinin ilk gününde deney gruplarının karanlık bölmeye geçiş süresi, (B) Pasif sakınma testinin ikinci gününde deney gruplarının karanlık bölmeye geçiş süresi. (***$p<0.001$ Kontrol grubuna göre, #$p<0.05$, ##$p<0.01$, ###$p<0.001$ AH grubuna göre kıyaslamayı göstermektedir. AH: Alzheimer Hastalık grubu, NS-A: 0.5 ml/kg, NS-B: 1 ml/kg, NS-C: 2 ml/kg Nigella sativa uygulanan gruplar, TK-A: 3 mg/kg, TK-B: 10 mg/kg, TK-C: 30 mg/kg Timokinon uygulanan gruplar)

4.2.2. Morris Su Tankı Testine İlişkin Bulgular

Morris Su Tankı'nda dört gün boyunca her gün beşer defa yüzdürülen sıçanların platformu bulma süreleri kaydedildi. Platformu bulma süreleri gruplar arası kıyaslandığında ilk gün istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi Kontrol ile AH grubunun platformu bulma sürelerinde iki, üç ve dördüncü gün anlamlı bir farklılık gözlendi ($p<0.05$). Platformu bulma süreleri açısından Kontrol

grubu ile NS-A grubu arasında dördüncü gün anlamlı bir farklılık gözlenirken ($p<0.05$), diğer tedavi grupları ile Kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Tedavi grupları NS-B, NS-C, TK-A, TK-B ve TK-C'nin üçüncü ve dördüncü gün platformu bulma sürelerinin AH grubundan kısa olduğu bulundu ($p<0.05$) (Tablo 4.2, Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Morris Su Tankı testi alıştırma günlerinde deney gruplarının platformu bulma süresi. (AH: Alzheimer Hastalık grubu, NS-A: 0.5 ml/kg, NS-B: 1 ml/kg, NS-C: 2 ml/kg Nigella sativa uygulanan gruplar, TK-A: 3 mg/kg, TK-B: 10 mg/kg, TK-C: 30 mg/kg Timokinon uygulanan gruplar)

Tablo 4.2. Moris Su Tankı alıştırma günleri platformu bulma süreleri (sn).

	1. gün	2.gün	3. gün	4. gün
KONTROL	49.5±5.8	16.4±2.7	16.0±3.2	11.7±2.4
AH	54.1±4.3	35.6±3.3 *	30.6±2.4 *	27.8±2.6 *
NS-A	59.9±7.4	31.4±4.0	26.4±2.9	24.5±3.3 *
NS-B	41.8±4.7	15.9±1.9 #	14.1±1.6 #	13.4±4.0 #
NS-C	45.4±4.1	19.7±4.4	14.4±2.2 #	12.8±2.9 #
TK-A	40.7±8.0	34.1±5.2	14.6±2.8 #	13.7±1.3 #
TK-B	45.2±10.7	28.2±5.0	15.9±2.3 #	12.4±2.2 #
TK-C	59.2±5.8	29.8±8.3	14.7±3.2 #	12.9±1.8 #

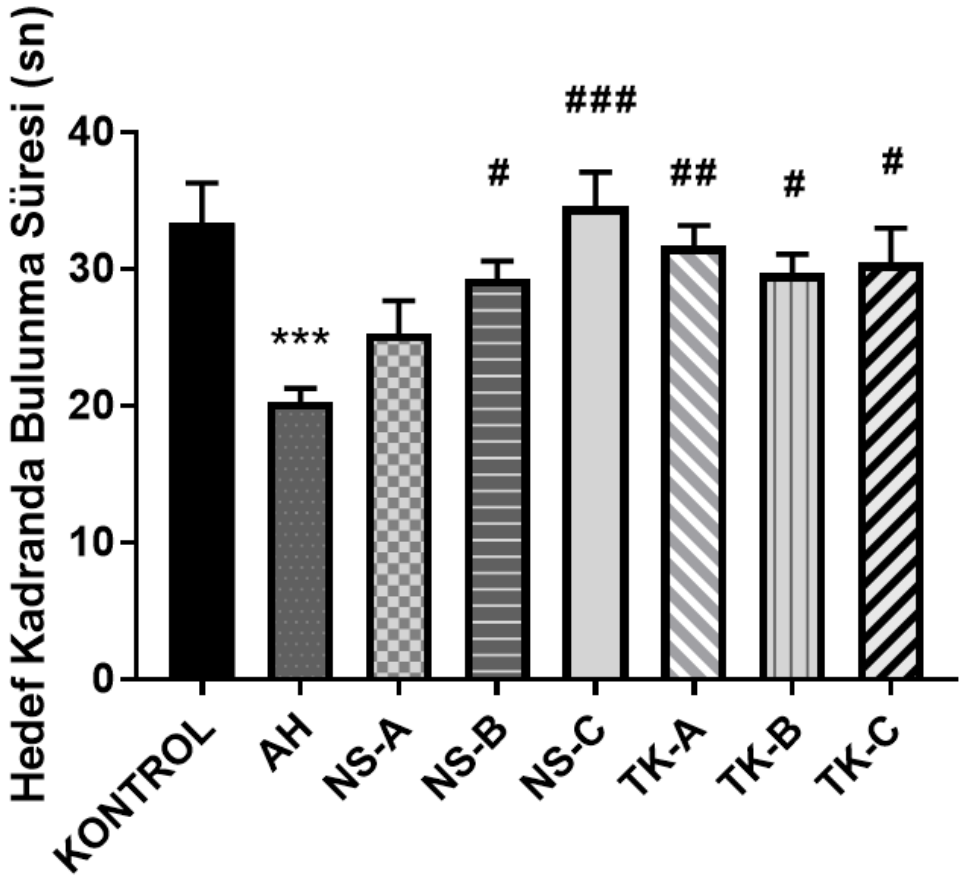
(*$p<0.05$ Kontrol grubuna göre, #$p<0.05$, AH grubuna göre gün içi kıyaslamayı göstermektedir. AH: Alzheimer Hastalık grubu, NS-A: 0.5 ml/kg, NS-B: 1 ml/kg, NS-C: 2 ml/kg Nigella sativa uygulanan gruplar, TK-A: 3 mg/kg, TK-B: 10 mg/kg, TK-C: 30 mg/kg Timokinon uygulanan gruplar)

Morris Su Tankı'nda alıştırma günleri yüzdürülerek (her sıçan için toplam 20 yüzüş) platformu bulmayı öğrenmesi beklenen sıçanlar, beşinci gün prob testinde platform çıkarıldıktan sonra aynı havuza atılarak hedef kadranda geçirdikleri süre kamera sistemi ile kaydedildi. Hedef kadranda geçirilen süreler incelendiğinde Kontrol grubunun 33.4±2.9 ile AH grubuna 20.3±1.1 göre hedef kadranda daha uzun bulunduğu gözlendi ($p<0.001$). NS-B 29.3±1.3 ($p<0.05$), NS-C 34.6±2.5 ($p<0.001$), TK-A 31.7±1.5 ($p<0.01$), TK-B 29.7±1.4 ($p<0.05$) ve TK-C 30.5±2.5 ($p<0.05$) gruplarının hedef kadranda geçirdiği süre AH grubuna göre anlamlı derecede kısa bulundu. NS-A 25.3±2.4 grubundaki artış AH grubuna kıyasla anlamlı değildir ($p>0.05$) (Tablo 4.3, Şekil 4.3).

Tablo 4.3. Morris Su Tankı testi prob test günü deney gruplarının hedef kadranda geçirdikleri süre.

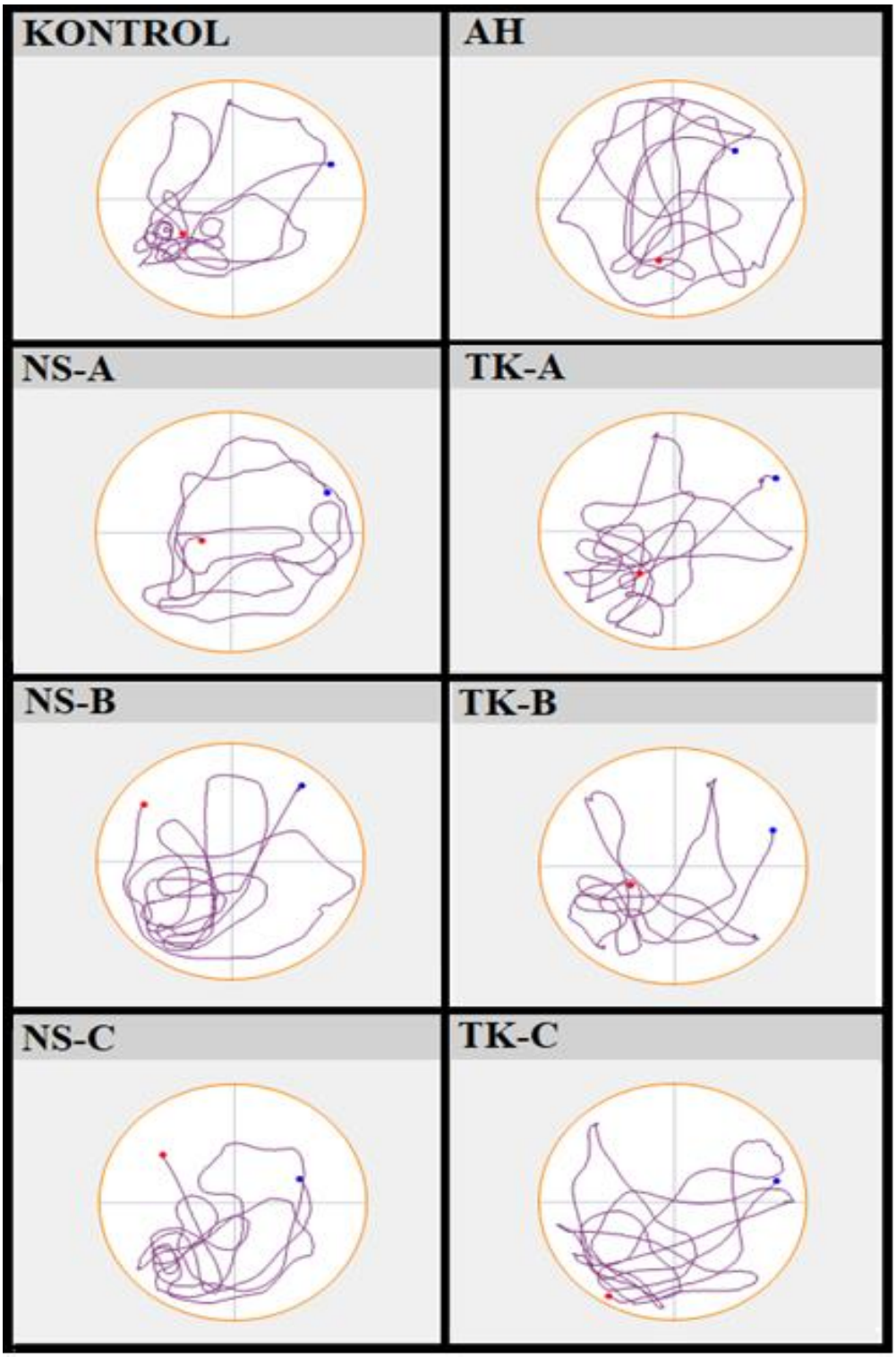
Grup	Prob Test Ortalamaları ± Standart Hata (sn)
KON	33.4±2.9
AH	20.3±1.1 ***
NS-A	25.3±2.4
NS-B	29.3±1.3 #
NS-C	34.6±2.5 ###
TK-A	31.7±1.5 ##
TK-B	29.7±1.4 #
TK-C	30.5±2.5 #

(***p<0.001 Kontrol grubuna göre, #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 AH grubuna göre kıyaslamayı göstermektedir. AH: Alzheimer Hastalık grubu, NS-A: 0.5 ml/kg, NS-B: 1 ml/kg, NS-C: 2 ml/kg Nigella sativa uygulanan gruplar, TK-A: 3 mg/kg, TK-B: 10 mg/kg, TK-C: 30 mg/kg Timokinon uygulanan gruplar)



Şekil 4.3. Morris Su Tankı testinin son gününde deney gruplarının hedef kadranda geçirdikleri süre. (***p<0.001 Kontrol grubuna göre, #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 AH grubuna göre kıyaslamayı göstermektedir. AH: Alzheimer Hastalık grubu, NS-A: 0.5 ml/kg, NS-B: 1 ml/kg, NS-C: 2 ml/kg Nigella sativa uygulanan gruplar, TK-A: 3 mg/kg, TK-B: 10 mg/kg, TK-C: 30 mg/kg Timokinon uygulanan gruplar)

Su tankının üzerinde bulunan kamera ile kaydedilen sıçan hareket kayıtları incelendiğinde sol alt kadranda dört gün bulundurulup test günü uzaklaştırılan platformun yerini hatırlayan sıçanların o bölgede daha uzun süre bulundukları görülmektedir (Şekil 4.4).

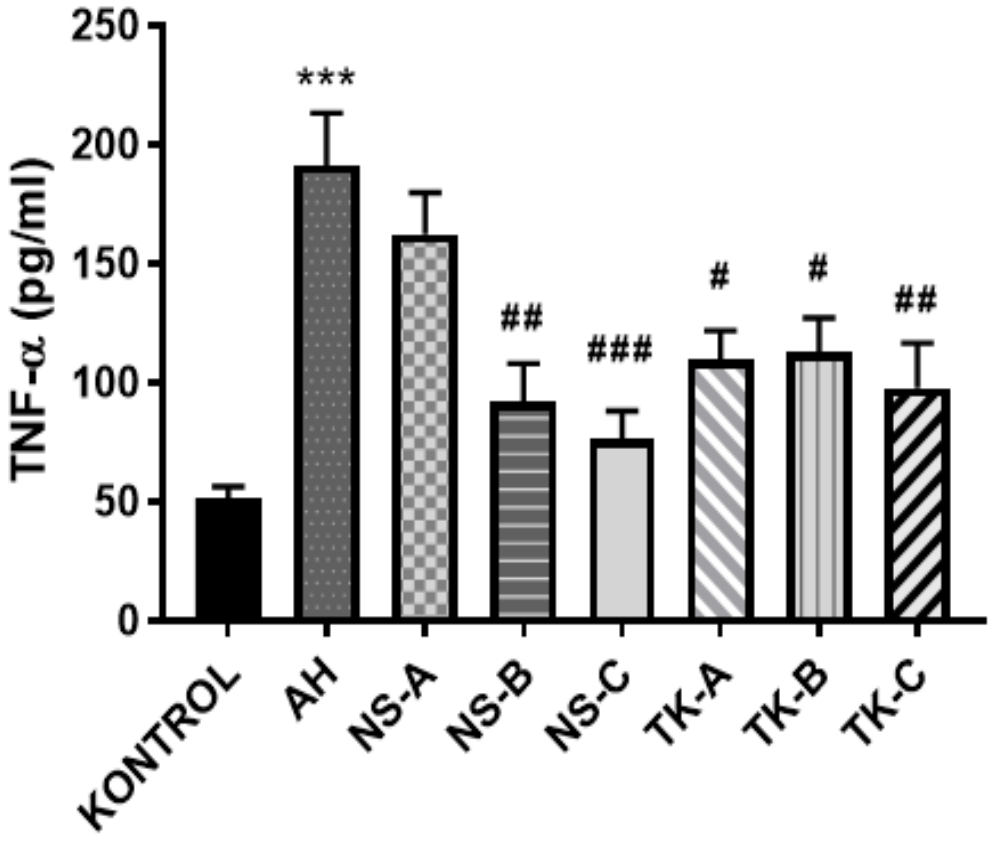


Şekil 4.4. Morris Su Tankı'nda sıçanların prob testi yüzme izleri. (AH: Alzheimer Hastalık grubu, NS-A: 0.5 ml/kg, NS-B: 1 ml/kg, NS-C: 2 ml/kg Nigella sativa uygulanan gruplar, TK-A: 3 mg/kg, TK-B: 10 mg/kg, TK-C: 30 mg/kg Timokinon uygulanan gruplar)

4.3. Proenflamatuvar Sitokin Ölçümlerine İlişkin Bulgular

4.3.1.TNF-α Düzeyleri

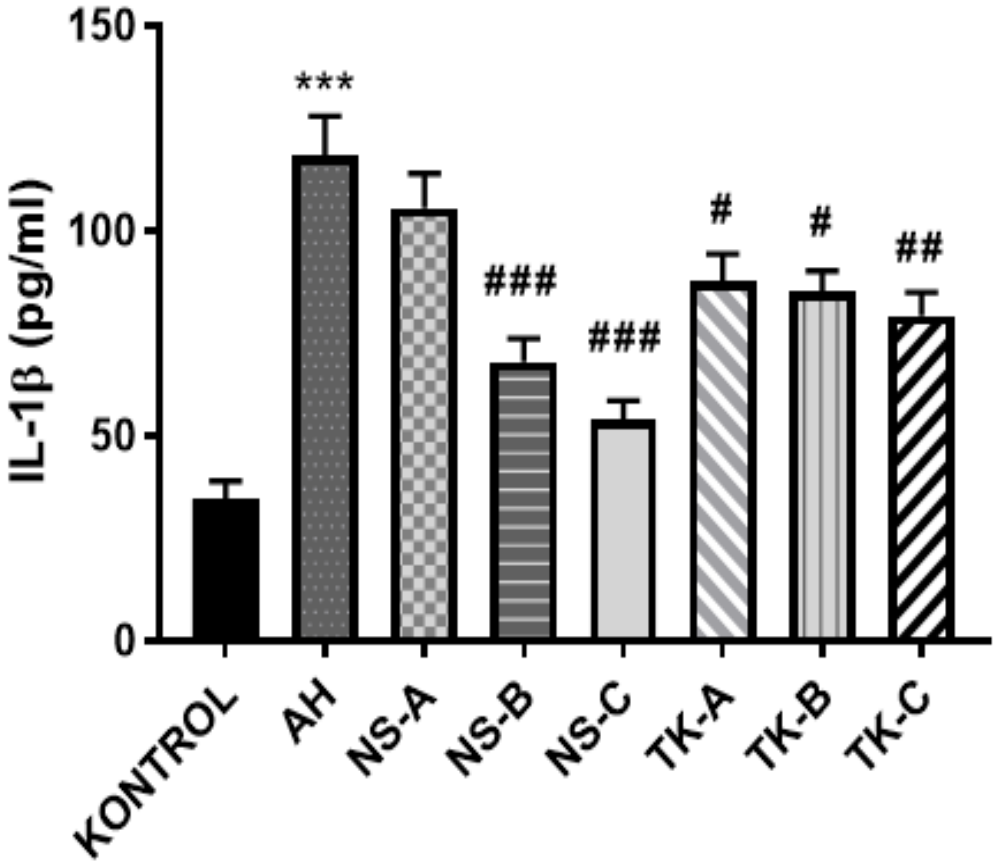
AH grubu 191.3±22 TNF-α düzeylerinde Kontrol grubuna 51.5±4.8 göre yüksek bulundu ($p<0.001$). Tedavi grupları NS-B 91.9±16.1 ($p<0.01$), NS-C 76.3±11.7 ($p<0.001$), TK-A 109.5±12.3 ($p<0.05$), TK-B 108±6.4 ($p<0.05$) ve TK-C 92.5±7.1 ($p<0.01$) TNF-α düzeylerinin ise AH'ye göre düşük olduğu belirlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Hipokampüs TNF-α düzeyleri. (***$p<0.001$ Kontrol grubuna göre, #$p<0.05$, ##$p<0.01$, ###$p<0.001$ AH grubuna göre kıyaslamayı göstermektedir. AH: Alzheimer Hastalık grubu, NS-A: 0.5 ml/kg, NS-B: 1 ml/kg, NS-C: 2 ml/kg Nigella sativa uygulanan gruplar, TK-A: 3 mg/kg, TK-B: 10 mg/kg, TK-C: 30 mg/kg Timokinon uygulanan gruplar)

4.3.2. IL-1β Düzeyleri

AH grubu 118.3±9.6 IL-1β düzeylerinin Kontrol grubuna 34.6±4.3 göre yüksek olduğu bulundu ($p<0.001$). Tedavi grupları NS-B 67.9±5.8 ($p<0.001$), NS-C 53.9±4.6 ($p<0.001$), TK-A 87.7±6.6 ($p<0.05$), TK-B 85±5.2 ($p<0.05$) ve TK-C 79.2±5.7 ($p<0.01$) IL-1β düzeylerinin ise AH'ye göre düşük olduğu belirlendi (Şekil 4.6).



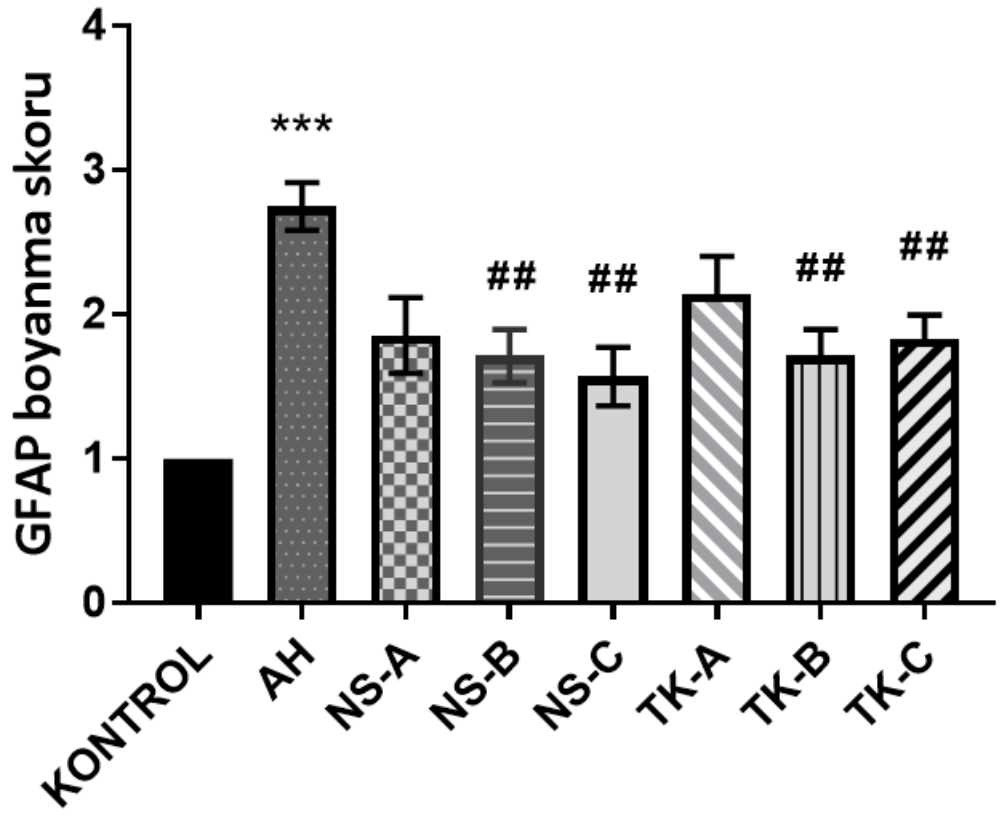
Şekil 4.6. Hipokampüs IL-1β düzeyleri**.** (***$p<0.001$ Kontrol grubuna göre, #$p<0.05$, ##$p<0.01$, ###$p<0.001$ AH grubuna göre kıyaslamayı göstermektedir. AH: Alzheimer Hastalık grubu, NS-A: 0.5 ml/kg, NS-B: 1 ml/kg, NS-C: 2 ml/kg Nigella sativa uygulanan gruplar, TK-A: 3 mg/kg, TK-B: 10 mg/kg, TK-C: 30 mg/kg Timokinon uygulanan gruplar)

4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

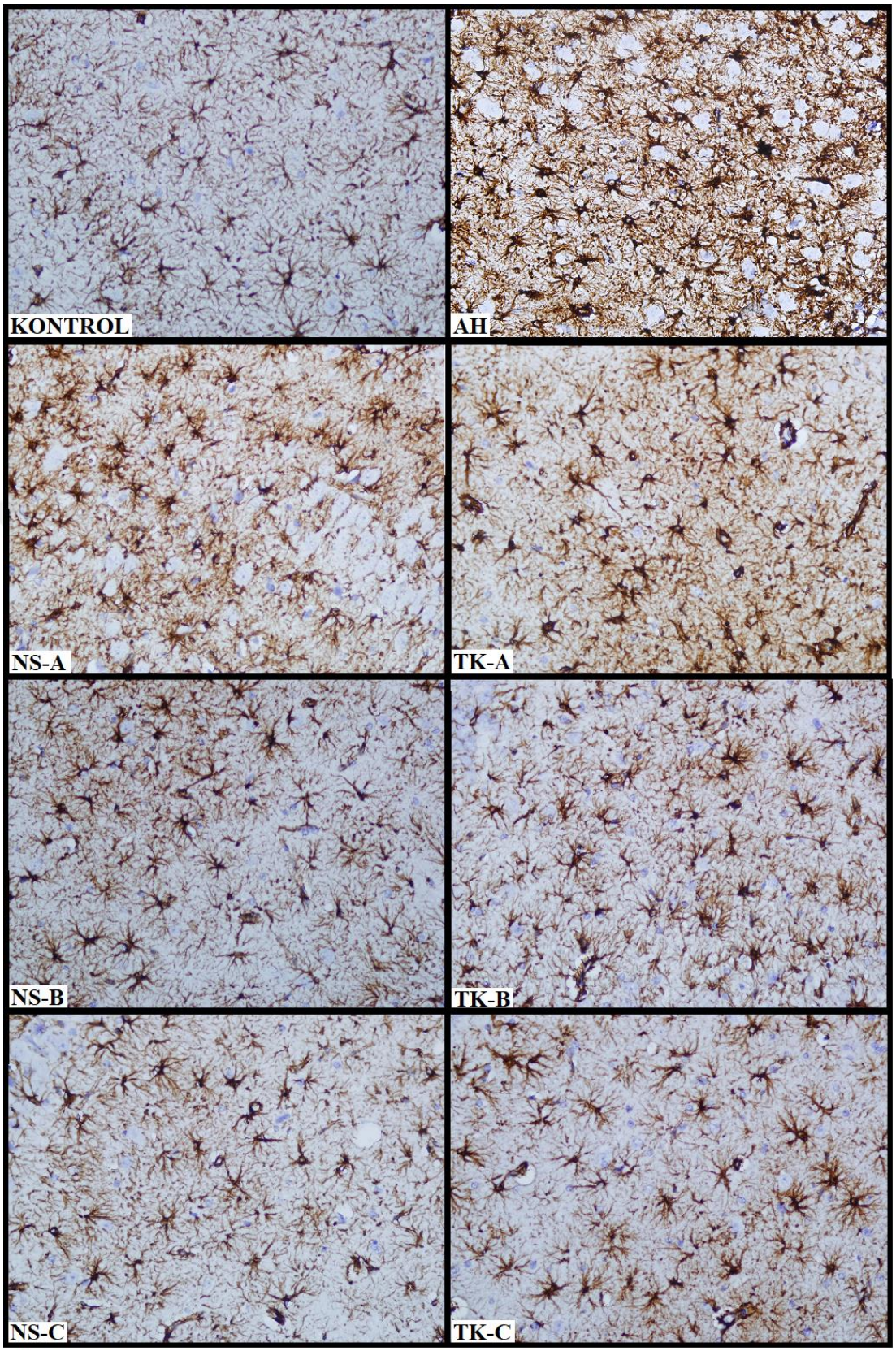
Deney gruplarının hipokampüs dokularının GFAP ve Iba1 immünohistokimyasal boyanma düzeyleri semi-kantitatif olarak değerlendirildi.

4.4.1. Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP) Bulguları

GFAP boyama sonuçları incelendiğinde AH grubunun Kontrol grubuna göre boyanma skorunun yüksek olduğu gözlendi ($p<0.001$). Tedavi grupları NS-B ($p<0.01$), NS-C ($p<0.01$), TK-B ($p<0.01$), TK-C ($p<0.01$) GFAP boyanma skorunun AH grubuna göre düşük olduğu gözlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. İmmünohistokimyasal GFAP boyanma skorları. (***$p<0.001$ Kontrol grubuna göre, ##$p<0.01$ AH grubuna göre kıyaslamayı göstermektedir. AH: Alzheimer Hastalık grubu, NS-A: 0.5 ml/kg, NS-B: 1 ml/kg, NS-C: 2 ml/kg Nigella sativa uygulanan gruplar, TK-A: 3 mg/kg, TK-B: 10 mg/kg, TK-C: 30 mg/kg Timokinon uygulanan gruplar)

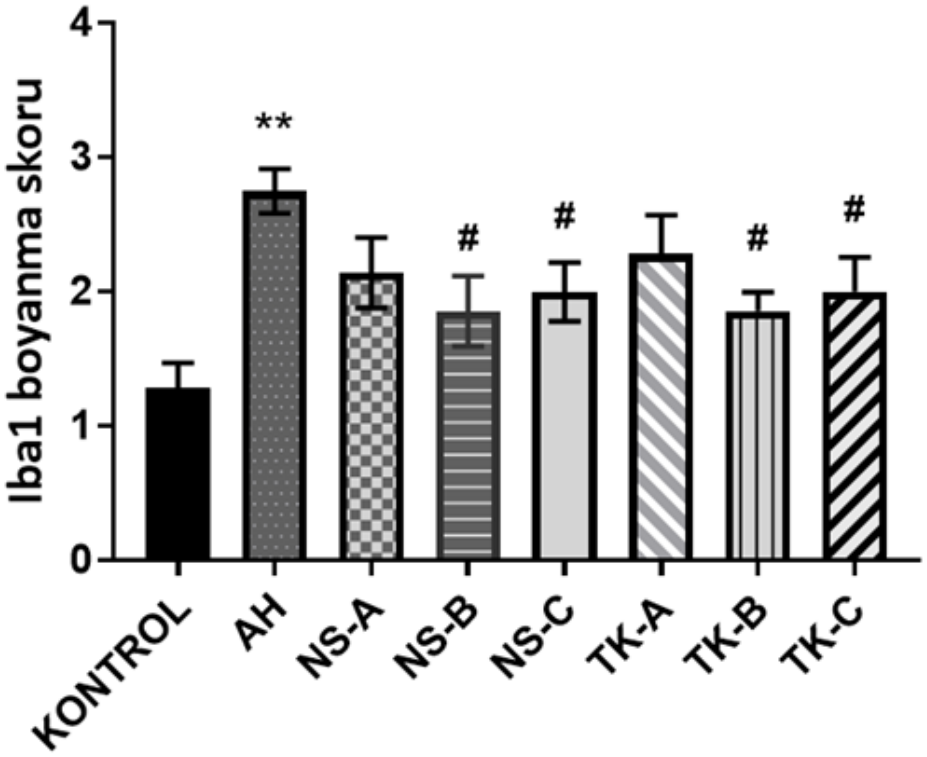


Şekil 4.8. İmmünohistokimyasal GFAP boyamaları (40 x büyütme). (AH: Alzheimer Hastalık grubu, NS-A: 0.5 ml/kg, NS-B: 1 ml/kg, NS-C: 2 ml/kg Nigella sativa uygulanan gruplar, TK-A: 3 mg/kg, TK-B: 10 mg/kg, TK-C: 30 mg/kg Timokinon uygulanan gruplar)

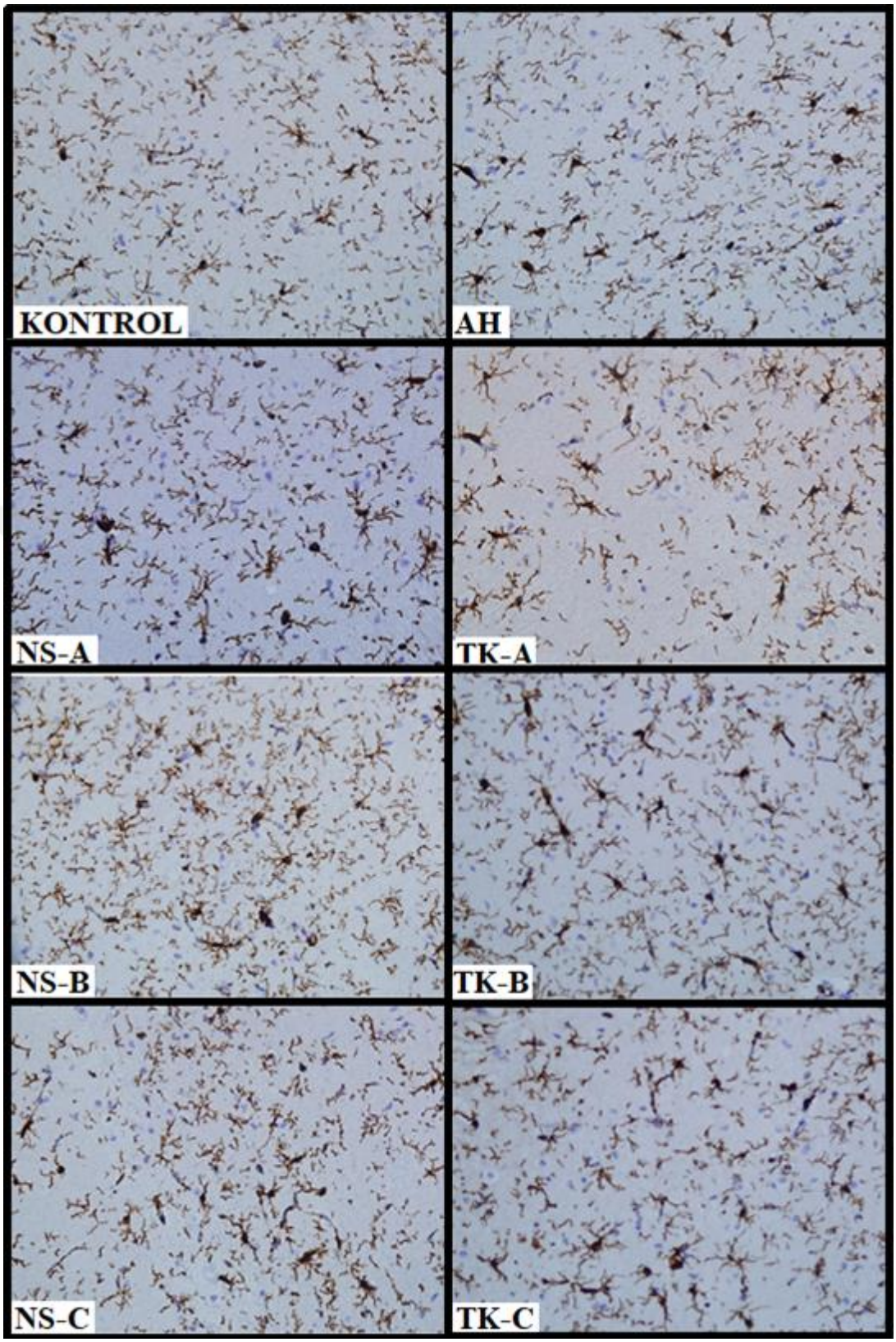
4.4.2. İyonize Kalsiyum Bağlayıcı Adaptör Molekülü 1 (Iba1) Bulguları

Anti-Iba1 ile yapılan immünohistokimyasal boyama ile mikroglia hücreleri boyandı. Mikroglia sayısı ve aktive olan mikroglia oranı göz önüne alınarak semi-kantitatif skorlama yapıldı.

Boyanma skorları incelendiğinde AH grubunun boyanma skorunun Kontrol grubuna göre arttığı gözlendi ($p<0.01$). Tedavi grupları NS-B ($p<0.05$), NS-C ($p<0.05$), TK-B ($p<0.05$), TK-C ($p<0.05$) boyanma skorunun AH grubuna göre anlamlı ölçüde düşük olduğu bulundu (Şekil 4.9).



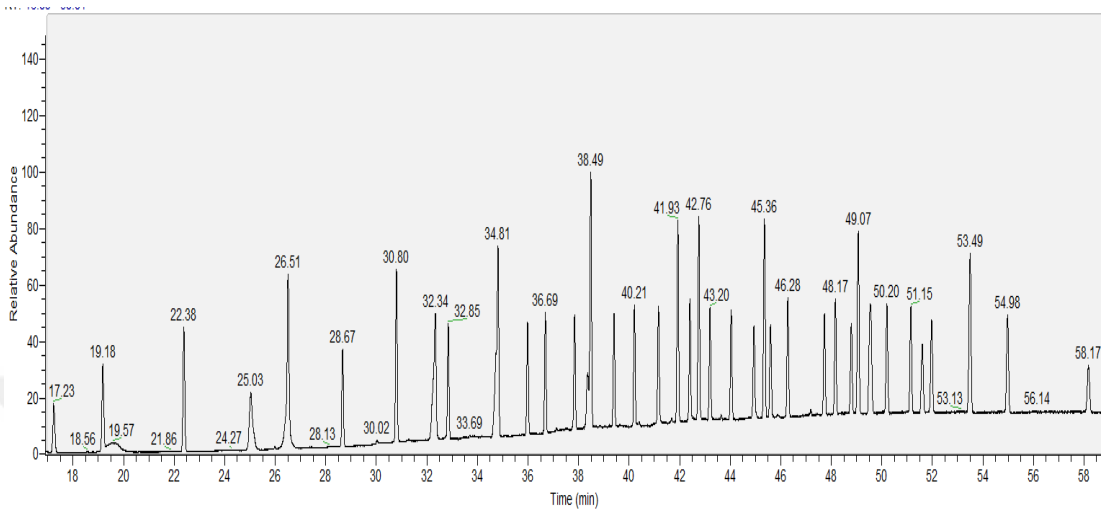
Şekil 4.9. İmmühohistokimyasal Iba-1 boyanma skorları. (***$p<0.001$ Kontrol grubuna göre, #$p<0.05$ AH grubuna göre kıyaslamayı göstermektedir. AH: Alzheimer Hastalık grubu, NS-A: 0.5 ml/kg, NS-B: 1 ml/kg, NS-C: 2 ml/kg Nigella sativa uygulanan gruplar, TK-A: 3 mg/kg, TK-B: 10 mg/kg, TK-C: 30 mg/kg Timokinon uygulanan gruplar)



Şekil 4.10. İmmünohistokimyasal Iba-1 boyamaları (40 x büyütme). (AH: Alzheimer Hastalık grubu, NS-A: 0.5 ml/kg, NS-B: 1 ml/kg, NS-C: 2 ml/kg Nigella sativa uygulanan gruplar, TK-A: 3 mg/kg, TK-B: 10 mg/kg, TK-C: 30 mg/kg Timokinon uygulanan gruplar)

4.5. GC-MS Analizlerinin Bulguları

İçeriği Tablo 4.4'te verilen yağ asidi standart karışımının GC-MS analizinden elde edilen kromatogramı Şekil 4.11'de verildi.



Şekil 4.11. Yağ asidi standart karışımının kromatogramı.

Tablo 4.4. Yağ asidi standart karışımı içeriği.

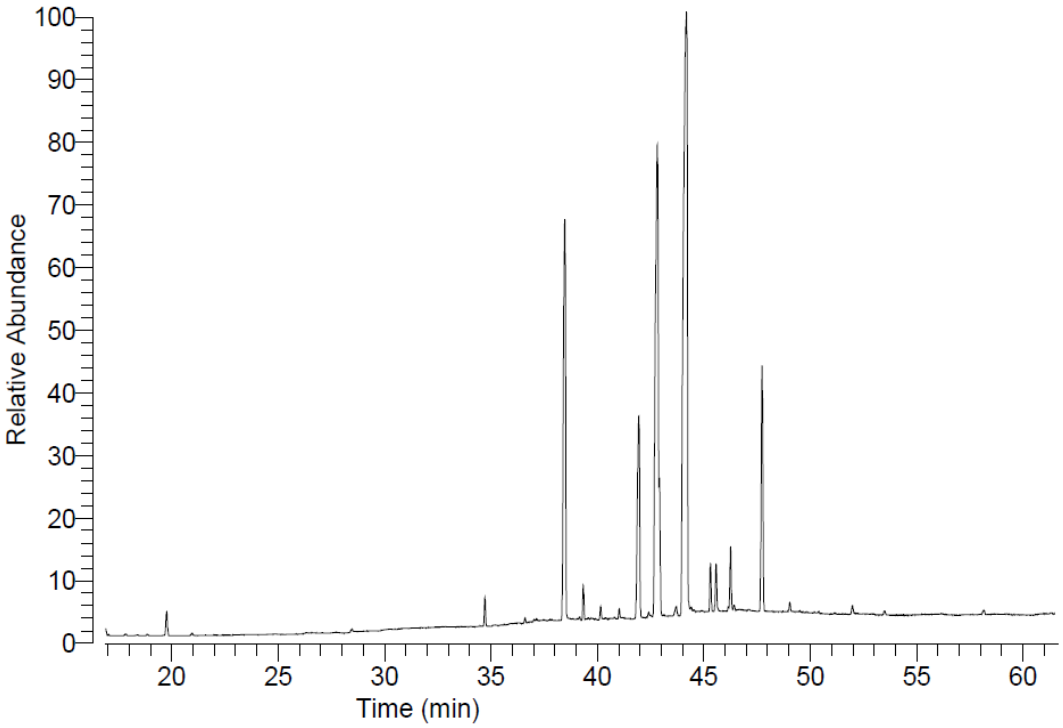
1	Metil butirat (400 µg/ml)	FA C4:0
2	Metil hekzanoat (400 µg/ml)	FA C6:0
3	Metil oktanoat (400 µg/ml)	FA C8:0
4	Metil dekanoat (400 µg/ml)	FA C10:0
5	Metil undekanoat (200 µg/ml)	FA C11:0
6	Metil dodekanoat (400 µg/ml)	FA C12:0
7	Metil tridekanoat (200 µg/ml)	FA C13:0
8	Metil miristat (400 µg/ml)	FA C14:0
9	Metil miristoleat (200 µg/ml)	FA C14:1
10	Metil pentadekanoat (200 µg/ml)	FA C15:0
11	Metil cis-10-pentadekenoat (200 µg/ml)	FA C15:1
12	Metil palmitat (600 µg/ml)	FA C16:0
13	Metil palmitoleat (200 µg/ml)	FA C16:1
14	Metil heptadekanoat (200 µg/ml)	FA C17:0
15	Metil cis-10-heptadekenoat (200 µg/ml)	FA C17:1
16	Metil stearat (400 µg/ml)	FA C18:0
17	Metil elaidat (200 µg/ml)	FA C18:1n9t
18	Metil oleat (400 µg/ml)	FA C18:1n9c
19	Metil linolelaidat (200 µg/ml)	FA C18:2n6t
20	Metil linoleat (200 µg/ml)	FA C18:2n6c
21	Metil gama-linolenat (200 µg/ml)	FA C18:3n6
22	Metil araşidat (400 µg/ml)	FA C20:0
23	Metil linolenat (200 µg/ml)	FA C18:3n3
24	cis-11-Eikosenoik asit metil esteri (200 µg/ml)	FA C20:1n9
25	cis-11,14-Eikosadienoik asit metil esteri (200 µg/ml)	FA C20:2
26	Metil heneikosanoat (200 µg/ml)	FA C21:0
27	Cis-8,11-14-Eikosatrienoik acid metil esteri (200 µg/ml)	FA C20:3n6
28	cis-11,14,17-Eikosatrienoik asit metil esteri (200 µg/ml)	FA C20:3n3
29	Metil behenat (400 µg/ml)	FA C22:0
30	Metil araşidonat (200 µg/ml)<	FA C20:4n6
31	Metil erukat (200 µg/ml)	FA C22:1n9
32	Metil trikosanoat (200 µg/ml)	FA C23:0
33	cis-5,8,11,14,17-Eikosapentaenoik asit metil esteri (200 µg/ml)	FA C20:5n3
34	cis-13,16-Dokosadienoik asit metil esteri (200 µg/ml)	FA C22:2
35	Metil tetrakosanoat (400 µg/ml) lignoserat	FA C24:0
36	Metil cis-15-tetrakosenoat (200 µg/ml) nervonat	FA C24:1n9
37	cis-4,7,10,13,16,19-Dokosahekzaenoik asit metil esteri (200 µg/ml),	FA C22:6n3

4.5.1. *Nigella sativa* Yağının Analizi

Nigella sativa sabit yağı %29 verimle elde edildi. NS yağında en çok bulunan yağ asidi linolenik asitti. Doymuş yağlardan en çok bulunan palmitik asit, tekli doymamış yağ asitlerinden en yüksek oranda bulunanı oleik asitti. Doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerine kıyaslandığında tüm yağ asit bileşiminin neredeyse yarısını çoklu doymamış yağ asitlerinin oluşturduğu bulundu (Tablo 4.5, Şekil 4.12).

Tablo 4.5. *Nigella sativa* yağı içeriğindeki yağ asitleri.

Yağ Asidi	**%**
C14:0 (miristik asit)	0.06
C16:0 (palmitik asit)	14.98
C18:0 (stearik asit)	7.81
C20:0 (araşidik asit)	0.91
C22:0 (behenik asit)	0.02
C24:0 (lignoserik asit)	0.01
Toplam Doymuş Yağ Asidi	23.79
C18:1n9 (oleik asit)	26.11
C20:1 (11-eikosenoik asit)	1.34
Toplam MUFA	27.45
C18:2n6 (linoleik asit)	40.47
C18:3n3 (α- linolenik asit)	0.98
C20:2n6 (11, 14- eikosadienoik asit)	7.28
C22:2 (dokosadienoik asit)	0.02
Toplam PUFA	48.76



Şekil 4.12. *Nigella sativa* yağı kromatogramı.

4.5.2. Serum Yağ Asidi Analizi

Ekstraksiyon sonrası metilleme yapılan yağ asitlerinin esterleşmiş formlarının analizi, 37 adet FAME içeren standart karışım sonuçları, Wiley ve Nist kütüphaneleri yardımıyla belirlendi. Sonuçlar, her bir yağ asidinin toplam yağ asidine göre yüzdesi olarak ifade edildi. Grupların yağ asit içerikleri ve ortalama değerleri Tablo 4.4'da verildi. Gruplar arasında bazı anlamlı farklar bulunsa da AH ile arasında Kontrol grupları arasında veya tedavi gruplarında doza bağlı olarak oluşan farklılıklar bulunmadı.

Tablo 4.6. Serum yağ asidi yüzdeleri (Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.).

Yağ asidi	**KONTROL**	**AH**	**NS-A**	**NS-B**	**NS-C**	**TK-A**	**TK-B**	**TK-C**
C14:0 (miristik asit)	0.22±0.02	0.20±0.02	0.20±0.02	0.16±0.03*	0.21±0.02	0.19±0.02	0.20±0.02	0.20±0.01
C15:0	0.06±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	0.06±0.01	0.04±0.01	0.07±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01
C16:0 (palmitik asit)	26.40±1.57	25.29±0.70	29.52±1.75	27.43±1.96	26.21±1.63	30.06±1.80	25.41±1.18	28.89±1.53
C17:0	0.07±0.01	0.07±0.02	0.08±0.01	0.06±0.01	0.07±0.01	0.08±0.01	0.06±0.01	0.07±0.01
C18:0 (stearik asit)	9.26±0.80	9.64±0.46	10.70±0.92	9.73±1.36	10.49±0.82	9.48±0.84	9.88±0.37	10.97±0.52
Toplam Doymuş Yağ Asidi	36.01±0.48	35.25±0.24	40.55±0.54	37.44±0.67	37.02±0.50	39.88±0.54	35.60±0.32	40.18±0.42
C16:1	0.15±0.02	0.14±0.02	0.17±0.02	0.16±0.02	0.17±0.04	0.21±0.03	0.17±0.02	0.20±0.02
C18:1n9 (oleik asit)	13.56±1.08	13.16±0.60	14.78±1.12	14.88±1.71	14.37±1.23	15.31±1.12	13.71±0.38	15.32±0.98
Toplam MUFA	13.71±0.55	13.30±0.31	14.95±0.57	15.08±0.86	14.54±0.64	15.52±0.57	13.88±0.20	15.52±0.50
C18:2n6 (linoleik asit)	34.77±0.82	35.93±1.36	31.98±1.74	32.31±0.69	32.25±0.39	31.51±0.29	32.26±0.66	30.88±0.88*#
C18:3n3 (α-linolenik asit)	1.09±0.06	0.74±0.17	0.97±0.15	0.83±0.08	1.10±0.21	1.38±0.24	1.22±0.16	1.33±0.18
C20:4n6	13.90±0.99	14.31±1.05	11.05±1.00	13.91±1.41	14.63±2.06	11.31±1.03	15.49±1.14	11.60±1.20
C20:5n3	0.16±0.03	0.15±0.02	0.17±0.02	0.14±0.03	0.15±0.03	0.15±0.03	0.16±0.02	0.18±0.02
C22:6n3	0.36±0.04	0.32±0.04	0.34±0.03	0.29±0.03	0.32±0.03	0.32±0.04	0.31±0.02	0.31±0.02
Toplam PUFA	50.28±0.39	51.45±0.53	44.51±0.59	47.48±0.45	48.45±0.54	44.67±0.33	50.52±0.40	44.30±0.46

(*$p<0.05$ Kontrol grubuna göre, #$p<0.05$ AH grubuna göre kıyaslamayı göstermektedir. AH: Alzheimer Hastalık grubu, NS-A: 0.5 ml/kg, NS-B: 1 ml/kg, NS-C: 2 ml/kg Nigella sativa uygulanan gruplar, TK-A: 3 mg/kg, TK-B: 10 mg/kg, TK-C: 30 mg/kg Timokinon uygulanan gruplar)

5. TARTIŞMA

Alzheimer hastalığı, ortalama yaşam süresinin uzaması ile bağlantılı olarak giderek daha fazla insanı ilgilendiren bir hastalık haline gelmiştir. Mevcut ilaç tedavileri, oluşum mekanizması henüz aydınlatılamamış olan hastalığın ilerlemesini önleme ve/veya oluşan patofizyolojik değişiklikleri geriletme noktasında tatmin edici sonuçlar ortaya koymadığı için AH hakkında yapılan araştırmaların sayısı hızla artmaktadır (120). Alzheimer'ın en önemli patolojik bulgularından biri olan amiloid plak oluşumu, toksik Aβ peptidlerinin birikiminin bir sonucudur (66). Ailesel AH türlerinde Aβ üretiminin artmasına sebep olan APP ve presenilin gen düzeyindeki farklılıklar (146), Aβ birkiminin AH'de nedensel bir rol oynadığı görüşünü desteklemektedir. Alzheimer'da beynin en fazla zarar gören bölgeleri hipokampal nöronlar ve serebral kortekstir (58). Alzheimer'da görülen diğer patolojik süreçleri de beraberinde getiren amiloid plak oluşumu hipokampüs içine Aβ peptid enjeksiyonu ile sağlanabilmektedir. Birçok çalışmada kemirgenlerde Aβ'nın hipokampüs içine enjeksiyonu ile AH modeli oluşturulduktan sonra hayvan dokularında biyokimyasal ve histolojik değişiklikler incelenerek ve davranış testleri yapılarak tıbbi bitkiler, bitki bileşenleri veya sentetik aday ilaç moleküllerinin AH patolojisini önleyici/tedavi edici etkileri araştırılmaktadır (6–9, 13, 15–17, 147, 148). Aβ peptidleri arasında $A\beta_{1-42}$, en toksik olan ve plaklarda en çok görülen form olma özelliğine sahiptir (118).

Kemirgenlerin hipokampüsüne Aβ enjeksiyonu ile kısa sürede belirginleşen ilerleyici bilişsel bozukluk oluştuğu çalışmalarda gösterilmiştir (149). Çoklu doz ile hipokampüs içine Aβ enjeksiyonları model oluşturmada kullanılabilmesine karşın, tek seferde 8-10 μg Aβ peptidlerinin bilateral verilmesi ile amiloid plak oluşumu ve beraberinde getirdiği patofizyolojik değişiklikler gözlenebilmektedir. Hipokampüs içine Aβ oligomeri uygulamasının giderek artan bilişsel işlev bozukluğu oluşturması, birçok çalışmada öğrenme deneyleri ile bilişsel işlev testleri uygulanmasına imkan sağlamıştır (7, 13, 150–152).

Hipokampüs içine PBS enjekte edilen kontrol grubu ile kıyaslandığında, $A\beta_{1-42}$ enjeksiyonu ile oluşturulan AH modelinde sıçanların beyninde oluşan mikroglial ve astroglial cevabın, bunama görülmeyen insanların dokularıyla kıyaslandığına

AH'li insanlardan izole edilen kortikal ve hipokampal dokulardaki değişime benzer olduğu belirtilmiştir. Sıçanlarda Aβ enjeksiyonu ile oluşturulan AH modelinde oluşan nöroenflamasyon, antienflamatuvar etkili maddeler araştırılırken bu yöntemin transgenik fare kullanımına karşı tercih edilmesinin nedenlerindendir (14). Transgenik sıçan ve fare modelleri, AH vakalarının çok azını ilgilendiren ailesel AH'yi taklit etmektedir (153). Beynin çeşitli bölgelerine Aβ enjeksiyonu ile oluşturulan modellerin nöroenflamasyona bağlı gelişen mikroglia cevabını değerlendirmede faydalı olduğu öne sürülmüştür (154).

Enflamasyon Aβ depolanması ve nöron kaybını artırarak bilişsel bozuklukları kolaylaştırdığından AH'nin ilerlemesinde önemli rol oynar. Alzheimer, mikroglia aktivasyonu ve ardından astrositlerin Aβ birikimlerinin meydana geldiği bölgelere intikalini indükleyen Aβ'ya karşı enflamatuvar cevap ile karakterizedir (155). Mikroglial aktivasyonun, Aβ fagositozu sağlamasına karşın IL-1, IL-6, IFN-γ, TNF-α, serbest radikaller gibi çeşitli pro-enflamatuvar moleküllerin salgılanmasını tetiklemesi nedeniyle AH patolojisinde iki yönlü rolü olduğu belirtilmiştir (156). IL-1β'nın aşırı ekspresyonlarının etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, muhtemelen Aβ plaklarının mikroglial fagositozunu artırarak AH'de nöroenflamasyonun koruyucu rolü olabileceği öne sürülmüştür (157). Buna karşılık kronik enflamasyonun, sinaptik bozulma ve nöronal hasara neden olarak AH'yi kötüleştireceği yaygın bir görüştür (3). Postmortem AH hastalarının beyinleri ve transgenik hayvanların beyinlerinde yapılan incelemelerde, IFN-γ, TNF-α, IL-1β ve IL-6'yı da içeren pro-enflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin arttığı gözlenmiştir (158). Beyinde birikmeye başlayan toksik Aβ'ya karşı tetiklenen enflamatuvar cevap sonucu daha fazla Aβ üretimi teşvik edilmekte ve hücreler kısır döngüye girmektedir. Bu döngünün bir yerde kırılması ile AH patogenezinin geriletilebileceği düşünülmektedir (149). Bu amaçla antienflamatuvar etkili molekül veya bitkilerin AH patolojisi üzerine etkilerini araştıran çalışmalarda, bu maddelerin AH bulgularını hafiflettiği ortaya konmuştur. Buradan yola çıkarak antienflamatuvar bileşiklerin bu ardışık tetiklemeleri azaltarak AH tedavisinde olumlu sonuçlar doğurabileceği öne sürülmüştür (7, 13, 15, 148, 149).

Antienflamatuvar olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuş NS ve timokinonun, enflamasyonla ilişkili birçok hastalığa karşı etkisi araştırılmaktadır (30,

159). Bu bilgiyi temel alarak NS yağı ve timokinonun Aβ-indüklü AH bulgularını, nöroenflamasyon şiddetini düşürerek hafifletebileceğini düşündük. Bir çalışmada NS sabit yağının sıçanlarda LD50 dozu 11.9, LD90 dozu 28.1 ml/kg olarak bulunmuştur (160). Sıçanlarda kronik toksisitenin değerlendirildiği bir çalışmada 12 hafta boyunca 2 ml/kg/gün NS yağı oral uygulamasının karaciğer enzimleri, glukoz, kolesterol, trigliserid seviyeleri ve kalp, karaciğer, böbrek ve pankreasta histopatolojik bir değişim oluşturmadığı ve güvenli olduğu gözlenmiştir (161). Timokinonun oral LD50 dozu bir çalışmada 794.3 mg/kg olarak bulunmuştur (162).

Biz çalışmamızda hipokampüs içine iki taraflı $A\beta_{1-42}$ enjeksiyonu ile AH oluşturulan sıçanlara 0.5 ml/kg, 1 ml/kg ve 2 ml/kg NS yağı ve 3 mg/kg, 10 mg/kg ve 30 mg/kg timokinon oral uygulamasının etkisini davranış testleri ile değerlendirdikten sonra, hayvanların hipokampüs dokularında IL-1β ve TNF-α düzeylerini, immünohistokimyasal Iba-1 ve GFAP boyamaları yardımıyla mikroglia ve astroglia aktivasyonu ile nöroenflamasyonu ve serum yağ asitleri düzeylerini inceledik.

Deney protokolümüze göre Aβ enjeksiyonundan 10 gün sonra sıçanlarda öğrenme ve bellek işlevlerini test etmek amacıyla yapılan pasif sakınma testinde, ilk gün karanlık bölmeye geçiş süreleri arasında gruplar arasında fark bulunmazken, AH grubundaki tüm sıçanların deneyin ikinci günü karanlık bölmeye geçtikleri gözlendi. AH grubunun karanlık bölmeye geçiş süreleri Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde düşük olduğu tespit edildi. Aβ enjeksiyonu ile oluşan öğrenme ve hafıza işlevlerindeki bu düşüşün, NS yağının 1 ve 2 ml/kg uygulandığı gruplar ile timokinonun her üç dozunun uygulandığı gruplarda anlamlı düzeyde düzeldiği görüldü. Bu sonuç timokinon ve NS yağının, Aβ'nın oluşturduğu bilişsel işlev bozulmasına karşı koruyucu veya tedavi edici etkisi olduğunu düşündürmektedir.

Pasif sakınma testi bittikten sonraki gün hayvanların uzaysal hafıza ve öğrenme işlevlerini test etmek amacıyla yapılan Morris Su Tankı deneyinde sıçanların etrafa yerleştirilen işaretler yardımıyla platformun yerini öğrenme ve referans belleğini kullanarak platformu bulabilme kabiliyetleri ölçüldü. AH grubundaki sıçanların alıştırma testlerinde platformu bulmak için daha uzun zaman harcamaları ve platformun kaldırıldığı prob testinde önceden platformun bulunduğu kadranda kontrol grubuna göre anlamlı derecede az zaman harcamaları, Aβ

uygulaması ile bilişsel işlevlerde bozulma oluştuğunu doğruladı. Aβ uygulaması ile oluşan bu bozulma, NS yağının 1 ve 2 ml/kg dozları ile timokinonun her üç dozunun uygulandığı gruplarda AH grubuna göre anlamlı ölçüde düzeldi. NS yağının en düşük dozda verildiği grupta da düzelme gözlendi fakat anlamlı ölçüde değildi. Sıçanlara Aβ uygulanması ile oluşturulan AH modelinde genisteinin etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada genistein uygulanması ile gerileyen bilişsel fonksiyon bozukluğu pasif sakınma testi ile doğrulanmıştır. (17). Bizim çalışmamızda da Aβ'nın yol açtığı bilişsel gerilemenin düzeldiği pasif sakıma testi ile doğrulanmıştır.

Hipokampüs içine $A\beta_{1-42}$ enjeksiyonu sonrası gelişen nöroenflamasyon şiddetini ölçmek için immünohistokimyasal Iba-1 (mikroglia için) ve GFAP (astrositler için) boyamalarının yararlı olacağı belirtilmiş ve çalışmalarda kullanılmıştır (14).

Alzheimer'da mikroglial aktivasyonun beyinde enflamatuvar cevap artışına katkı sağlayan TNF-α, IL-1, ve IL-6'yı da içeren sitokin, kemokin, büyüme faktörlerinin salgılanması ve kompleman yolunun aktivasyonu gibi birçok değişikliğe neden olduğu ifade edilmiştir (99). Mikroglial hücreler aktive edildiğinde, toplanmaları nöronları da içeren çevre hücrelere karşı toksik olabilen çok sayıda enflamatuvar faktörü eksprese eder. Mikrogliaların Aβ'nın çeşitli formlarına maruz kalmasının nörotoksik enflamatuvar ürünlerin oluşumu için ortam hazırladığı *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir (163). Biz çalışmamızda mikroglial aktivasyonu araştırmak amacıyla sıçanların hipokampüs kesitlerini mikroglial aktivasyon belirteci olan Anti-Iba1 ile boyadık. Kontrol grubunda aktive olmuş mikroglia sayısı AH grubuna göre anlamlı düzeyde daha az bulunurken, NS yağı 1 ml/kg ve 2 ml/kg dozlarında ve timokinonun her üç dozunda Aβ indüklü mikroglial aktivasyon artışını anlamlı düzeyde engellendiği bulundu. Zerdeçalın etken maddelerinden kurkuminin Aβ indüklü mikroglial enflamatuvar cevabı *in vitro* olarak azalttığı, mikroglianın TNF-α, IL-1β ve IL-6 üretimini mRNA ve protein düzeyinde azalttığı gösterilmiştir (164). Chen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Aβ uygulaması sonrası Anti-CD11b ile yapılan immünohistokimyasal incelemede bizim çalışmamıza benzer şekilde mikroglia aktivitesinde artış gözlendiği ortaya konmuştur (149).

Aktive olmuş mikroglialar dinlenme halindeki dallanmış morfolojisinden, ameboid şekle benzetilen aktive olmuş morfolojiye geçer (75). Mikroglial hücreler sağlıklı bir beyinde dallanmış bir morfolojiye sahiptir ve CD11b, Iba1 ve MHC II gibi birçok hücre yüzey belirteci eksprese eder (165, 166). Mikrogliozisin değerlendirilmesinde optik yoğunluğun dikkate alınması sağlıklı sonuç vermediği öne sürülmektedir (167).

Astrositler MSS'de en fazla bulunan hücreler olup sinaptogenez, kan beyin bariyeri oluşumu ve korunması, iyon dengesi, homeostazın korunması ve glutamatın döngüsünü de içeren birçok fizyolojik göreve sahiptir (74). Alzheimer hastalarının beyinlerinde yapılan post-mortem incelemelerde ise hipertrofi ve reaktif astrositler bulunduğu gözlenmiştir (168). Aktif astrositlerin amiloid plakların çevresinde daha yoğun bulunduğu gözlenmiştir (169). Normal beyinlerde BACE1 ekspresyonu sadece nöronlarla sınırlı iken kronik stres veya AH durumunda astrositlerin BACE1 ekspresyonu yapmaya başlaması ile AH patolojisine katkı sağladığı gösterilmiştir (170). Çeşitli transgenik fare AH modellerinde yapılan araştırmalarda BACE1'in astrositlerde eksprese edilebildiği anlaşılmıştır (171, 172). Dolayısıyla astrosit aktivitesinin AH bulgularını artıracağı düşünülmektedir. Reaktif astrositlerin nöronları destekleyici görevlerini yerine getiremeyerek onları eksitotoksisite ve oksidatif strese karşı savunmasız bıraktığı düşünülmektedir (173). Astrositlere özgü ara filament proteinlerden birisi olan GFAP'ın ekspresyonu astrosit aktivitesine bağlı olarak arttığı için bu proteinin ekspresyonu astrogliosis belirteci olarak kullanılmaktadır (168). Alzheimer patolojisinin aydınlatılma veya tedavisinde kullanılabilecek bileşikler keşfetme amacıyla yapılan birçok çalışmada astrogliosis bulguları değerlendirilmiş ve AH modelinde artan astroglial aktivasyonun azaltılmasının bilişsel işlevleri olumlu etkilediği bulunmuştur (149, 174). Bizim çalışmamızda da astrogliosisi değerlendirmek için Anti-GFAP antikoru ile işaretlenen sıçan hipokampüs kesitlerinde yapılan histolojik incelemelerde, NS yağı ve timokinon uygulamasının Aβ uygulaması ile artan astoglial aktivasyonu hafiflettiği bulunmuştur.

Astrositler agregasyona uğramış Aβ ile uyarıldığında, IL-1β ve TNF-α'yı da içeren proenflamatuvar sitokinler ve reaktif oksijen türleri üretirler. Bu sitokinler AH'de bilişsel işlev bozukluğunun nedensel faktörleri olabilir. Ek olarak, IL-1β ve

TNF-α'ya karşı sekonder enflamatuvar değişiklikler astrosit aktivasyonuna yol açar, bu sitokinlerin uzun süreli etkisi nöronların canlılığını sürdürebilmesine zarar verir (74). Nöroenflamatuvar cevapta artış gösteren enflamatuvar sitokinlerden TNF-α ve IL-1β düzeylerinin hipokampüse Aβ enjeksiyonu ile arttığını, NS yağı ve timokinon uygulamasının ise bu artışı azalttığını bulduk. Daha önce yapılan çalışmalarda da benzer şekilde Aβ enjeksiyonu ile oluşturulan hayvan modellerinde enflamatuvar cevabı baskılayan TGF-β1 uygulaması (149), *Angelica sinensis* bitkisinin uygulanması (15) ile beyinde TNF-α, IL-1β'yı da içeren proenflamatuvar sitokinlerin azaldığı bulunmuştur. Aβ'nin sıçan beynine enjeksiyonu, proenflamatuvar tepkiyi ortaya çıkarmak için bir uyarıcı görevi görür. Aβ birikiminin hastalık patolojisine katkıda bulunduğu spesifik mekanizmalar iyi anlaşılmamış olsa da peptid birikimi, beyindeki bağışıklık yanıtlarına aracılık eden yerleşik efektör hücreler olan mikroglia için kemotaktik ve aktive edici uyaran konumundadır (175).

Nigella sativa ve timokinonun etkilerinin incelendiği çalışmalarda oksidatif stres ve artmış enflamatuvar tepki ile ilişkili birçok hastalık modelinde NS ve timokinonun düzenleyici etkileri olduğu ortaya konmuştur. Kardiyomiyopati modeli oluşturulurken timokinonun artmış IL-2 düzeyini düşürdüğü, azalmış GSH, CAT, SOD, GPx, GR, GST düzeyini artırdığı bulunmuştur (136). Yine hepatotoksisite modeli oluşturulan sıçanlarda bir çalışmada NS'nın ROS oluşumunu baskılayarak antioksidan etki gösterdiği, bir diğerinde ise GST, GPx azalması ve MDA artışını azalttığı ortaya konmuştur (20, 26). Birçok çalışma ile NS ve timokinonun antioksidan, immünmodülatör ve antienflamatuvar etkinlikleri bulunduğu ortaya konmuştur (122).

Davranış deneyleri ile biyokimyasal ve histolojik incelemeler dikkate alındığında, hipokampüs içine Aβ uygulaması ile sıçanların hipokampüsünde astrogliosis ve mikrogliosis artışı ve bunları doğrular nitelikte TNF-α ve IL-1β sitokinlerinin artmış seviyeleri Aβ peptidine karşı beyinde enflamatuvar cevap oluştuğunu göstermektedir. Bu aşırı enflamatuvar cevabın Aβ-indüklü patolojiyi iyileştirmek yerine uzaysal öğrenme ve referans hafızada belirgin gerilemeye yol açtığı davranış testleri ile ortaya konmuştur. Antienflamatuvar etkinliği bilinen NS ve timokinon enflamatuvar cevabı hafifletmiş ve buna paralel olarak hafıza ve bilişsel işlevlerde iyileşme sağlamıştır. Timokinon, NS'nin etkili ve farmakolojik

çalışmalarda en çok yer alan bileşeni olmasına rağmen, NS yağı ile oluşan etkide başka bileşikler de rol oynuyor olabilir.

Yapılan araştırmalar AH bulgularının ortaya çıkmasının, hastalıkla ilgili patofizyolojik değişimlerden çok daha sonra olduğu göstermiştir. Dolayısıyla erken evrede hastalık gelişimine işaret edecek biyobelirteç arayışlarına önem verilmektedir. Bu amaçla hastalığı erken evrede teşhis etmeye yarar sağlayacak biyobelirteç araştırmaları devam etmektedir (176–180). Yağ asitlerinin hücre membran yapısına katılması başta olmak üzere canlı vücudunda önemli birçok fizyolojik olayda rol alması hastalığa yol açan mekanizmaların moleküler düzeyde anlaşılması ve hastalıkla ilişkilendirilmesi açısından önemlidir (181).

Beyin omurilik sıvısındaki Aβ ve tau düzeyleri AH'nin teşhisi için kullanılsa da numune toplanmasının girişim gerektirmesi, bu belirteçlerin klinik kullanımını sınırlar. Sadece lomber ponksiyonla toplanan BOS, yaşlı hastalarda yapılması zor olan ve çoklu örneklerin toplanmasını engelleyen bir girişimdir. Manyetik Rezonans Görüntüleme ve Pozitron Emisyon Tomografisi gibi nörogörüntüleme yaklaşımları da etkili prognostik araçlardır. Ancak her zaman ulaşılabilir olamayacak kadar pahalı ve erken teşhis amacıyla tarama için rutinde kullanımdan uzaktır. Nörogörüntüleme tekniklerinin kullanılması ve BOS'tan örnek alınması çok sayıda AH adayı hastanın taranması için ideal birinci basamak yaklaşımlar değildir (178). Bu nedenle, klinik öncesi ve erken evrede tanı koymak için kullanılabilecek, AH'yi diğer nörodejeneratif hastalıklardan kaynaklanan bilişsel bozulmadan ayırabilecek yeni, özgün ve hassas biyobelirteçlerin belirlenmesine ihtiyaç vardır.

Klinik çalışmalar ve AH modeli oluşturulan hayvanlar kullanılarak biyobelirteç arayışında metabolomik araştırmalar devam etmektedir (176). En karmaşık lipid kategorilerinden birini oluşturan yağ asitlerinin AH patofizyolojisine epigenetik düzeyde katkı sağlayabileceği belirtilmiştir. Dokosahekzaenoik asit (DHA), birçok hastalıkta yararlı etkileri araştırılan bir yağ asididir (182). Epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar, DHA eksikliği ile AH gelişme riskinin arttığını göstermiştir. Transgenik farelerin kullanıldığı bir çalışmada DHA'dan zengin diyetle beslenmenin farelerde Aβ üretimi ve birikimini ayrıca buna bağlı olarak oluşan toksik etkileri azalttığı ortaya konmuştur (183). Yine transgenik farelerin kullanıldığı bir çalışmada kolesterolden zengin Batı diyetiyle veya

DHA'dan zengin (%0.5) diyetle beslenen farelerde Aβ birikimi ve serebral kan akım hacmi incelenmiştir. Batı diyetiyle beslenen hayvanların aksine DHA ile beslenen hayvanlarda Aβ birikiminin azaldığı ve serebral kan hacminin artığı bulunmuştur (184).

Alzheimer gelişme riski ve yağ asit düzeylerinin ilişkisini inceleyen birkaç çalışma yapılmasına rağmen birbiriyle çelişkili sonuçlar ortaya konmuştur. Bu çalışmalardan birinde ortalama dokuz yıl takip edilen ileri yaştaki hastalarda plazma fosfatidilkolin DHA düzeyleri ölçülerek AH ve diğer bunama türlerinin görülmesiyle ilişkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda fosfatidilkolin DHA düzeylerinin yüksek olmasının bunamanın tüm çeşitlerinin görülme riskini neredeyse yarı yarıya azalttığı sonucuna varılmıştır (185). Yaşlı bir grubun 4 yıl takibi ile yapılan bir çalışmada EPA konsantrasyon artışının bunama riskini azaltabileceği, n-6/n-3 oranının ve AA/DHA oranının artmasının ise bu riski artırabileceği öne sürülmüştür (186). Bu çalışmalardan sonra yayınlanan bir kohort çalışmasında Alzheimer hastaları ve sağlıklı gönüllülerin kan n-3 yağ asitlerinin düzeyleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmaya göre toplam n-3 veya DHA ve EPA düzeyleri ile AH ve diğer bunama türleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (187). Bir başka çalışmada DHA, EPA ve toplam n-3 düzeyi artışının AH gelişiminde koruyucu etkinliğini araştırmak için serum kolesterol esterlerinin AH ve diğer bunama türlerinde değişimleri incelenmiştir. AH'li bireylerde, bunama görülmeyenlere göre miristik (C14:0), palmitik (C16:0), stearik (C18:0) ve oleik (C18:1) asit oranının azalmış, linoleik asit (C18:2n-6) oranının arttığı bulunmuştur. Bu çalışmada n-3 yağ asitlerinin bunamaya karşı koruyucu etkisi olduğunu gösterecek anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (188). Alzheimer, Hafif Bilişsel Bozukluk gelişenler ve sağlıklı gönüllülerin serumlarında yağ asit kompozisyonunun değerlendirildiği bir araştırmada serotik asit (C26:0) düzeyinin sağlıklı gönüllülerde anlamlı derecede yüksek, araşidik asit (C20:0) seviyelerinin ise hasta gruplarında sağlıklı gruba göre yüksek olduğu olduğu bulunurken tekli doymamış yağ asitlerinden vaksenik (C18:1n9) ve erüsik asit (C22:1n9) düzeylerinin hasta gruplarında sağlıklılara göre yüksek, çoklu doğmamış yağ asitlerinden linoleik asidin (C18:2n6) AH grubunda düşük olduğu bulunmuştur (182). Takviye n-3 alımının bilişsel foksiyonlara etkisini incelemek amacıyla yaşa bağlı makular dejenerasyon hastalığına sahip yaş ortalaması 73 olan gönüllülere 5 yıl boyunca günlük 1 g n-3 yağ asidi veya plasebo verilmiştir. Plaseboya karşı n-3

takviyesi alanların bilişsel işlevlerinde bir farklılık gözlenmemiştir (189). Daha küçük bir randomize kontrollü çalışmada ise bilişsel yönden sağlıklı, yaşları 50-75 arasında değişen gönüllülere 26 hafta boyunca günlük 2.2 g n-3 takviyesi veya plasebo verilmiştir. Önceki çalışmanın aksine bu çalışmada n-3 takviyesinin hafızayı olumlu yönde etkilediği bulunmuştur (190).

Bizim çalışmamızda davranış testlerinde NS yağı alan grupların Timokinon alan gruplardan daha iyi performans göstermesinde n-3 yağ asitlerinin katkısı olabilir. Yağ asitlerinin yanı sıra NS'nin vitaminler, mineraller ve birçok farmasötik aktif bileşenden oluşan zengin içeriği de bu iyileşmeye katkı sağlamış olabilir. Serum lipid düzeyinde görülen değişiklikler AH hastalık modeli ile ilişkili değişimleri yansıtabileceği gibi beslenme ile de ilişkilendirilebilir. Ancak hayvanların NS yağı ile son beslenmelerinin üzerinden yedi gün geçtikten sonra kanlarının toplanması nedeniyle serbest yağ asitlerinin konsantrasyonu normal sıçan yemi ile beslenmeye bağlı olarak kontrol grubu ile benzer çıkmış olabilir. Serum yağ asit düzeylerinin beyindeki yağ asitlerinin durumunu ne derecede yansıttığı bilinmemektedir.

Çalışmamızda $A\beta_{1-42}$'nin bilateral hipokampüs içine enjeksiyonu ile AH modeli oluşturulan sıçanların bilişsel işlevlerindeki düşüş Pasif Sakınma ve Morris Su Tankı davranış testleri ile gösterilmiştir. Aynı zamanda hayvanların hipokampüslerinde $A\beta_{1-42}$ enjeksiyonunu takiben mikroglia ve astroglia aktivitesindeki artış immünohistokimyasal incelemelerle ortaya konmuş ve bu bağışıklık hücrelerinin aktivitelerine paralel olarak IL-1β ve TNF-α sitokin düzeylerindeki artış olduğu belirlenmiştir. Oral NS yağının 0.5 ml/kg dozunda uygulanması ile AH patolojisinde anlamlı düzeyde gerileme gözlenmezken 1 ve 2 ml/kg dozları ve timokinonun 3, 10 ve 30 mg/kg dozları uygulanan gruplarda enflamatuvar cevabın baskılandığını gösteren biyokimyasal ve histolojik değişimler, hayvanların davranış testleri ile ortaya konan öğrenme ve hafıza kabiliyetleri ile uyum göstermektedir. Dolayısıyla $A\beta_{1-42}$ uygulamasıyla, mikroglia ve astrogliaların aktivasyonu ile belirginleşen bilişsel işlevlerdeki düşüş, antienflamatuvar etkili *Nigella sativa* veya Timokinon uygulamaları ile baskılanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız sonucunda sıçanlarda hipokampüs içine $A\beta_{1-42}$ enjeksiyonu ile oluşturulan Alzheimer hastalık modelinde mide sondası ile soğuk sıkım *Nigella sativa* yağı veya timokinon ile beslenmenin hipokampüste proenflamatuvar TNF-α ve IL1-β artışını, astroglial ve mikroglial hücre aktivasyonunu azalttığı ve davranış testleri ile değerlendirilen öğrenme ve hafıza işlevlerindeki düşüşe karşı iyileştirici etkisi bulunduğu ortaya konmuştur.

Nigella sativa yağı çok sayıda etkin madde içerdiği için hangi etkin maddelerin bu etkiye katkı sağladığının belirlenmesi amacıyla daha ayrıntılı araştırma yapılması gerekmektedir.

Alzheimer hayvan modelleri ile oluşturulan nörodejenerasyon ilerleyici nitelikte olduğundan uzun vadeli değişimleri incelemek için çalışma süreleri uzatılabilir.

7. KAYNAKÇA

1. Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update, *Pharmacological Reports*, 2015, 67(2):195–203.

2. Barage SH, Sonawane KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease, *Neuropeptides*, 2015, 52:1–18.

3. Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, Ma D. Neuroinflammation : The role and consequences, *Neuroscience Research*, 2014, 79:1–12.

4. Lim GP, Yang F, Chu T, Chen P, Beech W, Teter B, Tran T, Ubeda O, Ashe KH, Frautschy SA, Cole GM. Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2000, 20(15):5709–5714.

5. Richardson RL, Kim EM, Shephard RA, Gardiner T, Cleary J, O'Hare E. Behavioural and histopathological analyses of ibuprofen treatment on the effect of aggregated Abeta(1-42) injections in the rat, *Brain research*, 2002, 954(1):1–10.

6. Ji ZH, Xu ZQ, Zhao H, Yu XY. Neuroprotective effect and mechanism of daucosterol palmitate in ameliorating learning and memory impairment in a rat model of Alzheimer's disease, *Steroids*, 2017, 119:31–35.

7. Soodi M, Saeidnia S, Sharifzadeh M, Hajimehdipoor H, Dashti A, Sepand MR, Moradi S. Satureja bachtiarica ameliorate beta-amyloid induced memory impairment, oxidative stress and cholinergic deficit in animal model of Alzheimer's disease, *Metabolic Brain Disease*, 2016, 31(2):395–404.

8. Mokhtari Z, Baluchnejadmojarad T, Nikbakht F, Mansouri M, Roghani M. Riluzole ameliorates learning and memory deficits in Aβ25-35-induced rat model of Alzheimer's disease and is independent of cholinoceptor activation, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2017, 87:135–144.

9. Sharma S, Verma S, Kapoor M, Saini A, Nehru B. Alzheimer's disease like pathology induced six weeks after aggregated amyloid-beta injection in rats: increased oxidative stress and impaired long-term memory with anxiety-like behavior, *Neurological Research*, 2016, 38(9):838–850.

10. Narwal S, Saini DR, Kumari K, Narwal S, Singh G, Singh Negi R, Sarin R V. Behavior & Pharmacological Animal Models for the Evaluation of Learning & Memory Condition, *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 2(2):121–129.

11. Vorhees C V, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory, *Nature Protocols*, 2006, 1(2):848–858.

12. Wang X, Wu J, Yu C, Tang Y, Liu J, Chen H, Jin B, Mei Q, Cao S, Qin D. Lychee seed saponins improve cognitive function and prevent neuronal injury via inhibiting neuronal apoptosis in a rat model of Alzheimer's disease, *Nutrients*, 2017, 9(2):1–17.

13. Asadbegi M, Yaghmaei P, Salehi I, Komaki A, Ebrahim-Habibi A. Investigation of thymol effect on learning and memory impairment induced by intrahippocampal injection of amyloid beta peptide in high fat diet- fed rats, *Metabolic Brain Disease*, 2017, 32(3):827–839.

14. McLarnon JG. Correlated inflammatory responses and neurodegeneration in peptide-injected animal models of Alzheimer's disease, *BioMed Research International*, 2014, 2014. doi:10.1155/2014/923670.

15. Duan MH, Wang LN, Jiang YH, Pei YY, Guan DD, Qiu ZD. Angelica sinensis reduced Aβ-induced memory impairment in rats, *Journal of Drug Targeting*, 2016, 24(4):340–347.

16. Kiasalari Z, Heydarifard R, Khalili M, Afshin-majd S. Ellagic acid ameliorates learning and memory deficits in a rat model of Alzheimer ' s disease : an exploration of underlying mechanisms, *Psychopharmacology*, 2017. doi:10.1007/s00213-017-4589-6.

17. Bagheri M, Joghataei MT, Mohseni S, Roghani M. Genistein ameliorates learning and memory deficits in amyloid β(1-40) rat model of Alzheimer's disease, *Neurobiology of Learning and Memory*, 2011, 95(3):270–276.

18. Abdel-Zaher AO, Farghaly HSM, Farrag MMY, Abdel-Rahman MS, Abdel-Wahab BA. A potential mechanism for the ameliorative effect of thymoquinone on pentylenetetrazole-induced kindling and cognitive impairments in mice, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2017, 88:553–561.

19. Abulfadl YS, El-Maraghy NN, Ahmed AE, Nofal S, Abdel-Mottaleb Y, Badary OA. Thymoquinone alleviates the experimentally induced Alzheimer's disease inflammation by modulation of TLRs signaling, *Human and Experimental Toxicology*, 2018, :1–13.

20. Adam GO, Rahman M, Lee S, Kim G, Kang H, Kim J, Kim S. Hepatoprotective effects of Nigella sativa seed extract against acetaminophen-induced oxidative stress, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2016, 9(3):221–227.

21. Alhebshi AH, Gotoh M, Suzuki I. Thymoquinone protects cultured rat primary neurons against amyloid β-induced neurotoxicity, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 433(4):362–367.

22. Bin Sayeed MS, Asaduzzaman M, Morshed H, Hossain MM, Kadir MF, Rahman MR. The effect of Nigella sativa Linn. seed on memory, attention and cognition in healthy human volunteers, *Journal of Ethnopharmacology*, 2013, 148(3):780–786.

23. Darakhshan S, Bidmeshki Pour A, Hosseinzadeh Colagar A, Sisakhtnezhad S. Thymoquinone and its therapeutic potentials, *Pharmacological Research*, 2015, 95–96:138–158.

24. Balbaa M, El-Zeftawy M, Ghareeb D, Taha N, Mandour AW. Nigella sativa Relieves the Altered Insulin Receptor Signaling in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Fed with a High-Fat Diet, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 2016:1–16.

25. El-Marasy SA, El-Shenawy SM, El-Khatib AS, El-Shabrawy OA, Kenawy SA. Effect of Nigella sativa and wheat germ oils on scopolamine-induced memory impairment in rats, *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 2012, 50(2):81–88.

26. El-far AH, Korshom MA, Mandour AA, El-bessoumy AA, El-sayed YS. Hepatoprotective ef fi cacy of Nigella sativa seeds dietary supplementation against lead acetate-induced oxidative damage in rabbit – Purification and characterization of glutathione peroxidase, *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 2017, 89:711–718.

27. Gholamnezhad Z, Havakhah S, Boskabady MH. Preclinical and clinical effects of Nigella sativa and its constituent, thymoquinone: A review, *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, 190:372–386.

28. Gülşen I, Ak H, Çölçimen N, Alp HH, Akyol ME, Demir I, Atalay T, Balahroğlu R, Rağbetli M. Neuroprotective Effects of Thymoquinone on the Hippocampus in a Rat Model of Traumatic Brain Injury, *World Neurosurgery*, 2016, 86:243–249.

29. Hobbenaghi R, Javanbakht J, Sadeghzadeh S, Kheradmand D, Abdi FS, Jaberi MH. Neuroprotective effects of Nigella sativa extract on cell death in hippocampal neurons following experimental global cerebral ischemia-reperfusion injury in rats, *Journal of the Neurological Sciences*, 2014, 337(1–2):74–79.

30. Kassab RB, El-Hennamy RE. The role of thymoquinone as a potent antioxidant in ameliorating the neurotoxic effect of sodium arsenate in female rat, *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2017, 4(3):160–167.

31. Hane FT, Lee BY, Leonenko Z. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 1: Pathology, *Journal of Alzheimer's Disease*, 2017, 57(1):1–28.

32. Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde, *Allgemeine Zeitschrift fur Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin*, 1907, 64:146–148.

33. Alzheimer's Association. 2019 Alzheimer's disease facts and figures, *Alzheimer's & Dementia*, 2019, 15(3):321–387.

34. Katzman R. The prevalence and malignancy of alzheimer disease: A major killer, *Archives of Neurology*, 1976, 33(4):217–218.

35. Talwar P, Sinha J, Grover S, Rawat C, Kushwaha S, Agarwal R, Taneja V, Kukreti R. Dissecting Complex and Multifactorial Nature of Alzheimer's Disease Pathogenesis: a Clinical, Genomic, and Systems Biology Perspective, *Molecular Neurobiology*, 2016, 53(7):4833–4864.

36. Gurvit H, Emre M, Tinaz S, Bilgic B, Hanagasi H, Sahin H, Gurol E, Kvaloy JT, Harmanci H. The Prevalence of Dementia in an Urban Turkish Population, *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementiasr*, 2008, 23(1):67–76.

37. TÜİK. İstatistiklerle Yaşlılar, 2015, 2016. http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=24644. 20 Mart 2018.

38. TÜİK. İstatistiklerle Yaşlılar, 2018, 2019. http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=30699 20 Mayıs 2019.

39. Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA. Alzheimer disease in the United States (2010–2050) estimated using the 2010 census, *Neurology*, 2013, 80(19):1778–1783.

40. Alzheimer's Disease International. Policy Brief for Heads of Government: The Global Impact of Dementia 2013 – 2050, 2013.

41. Sosa-Ortiz AL, Acosta-Castillo I, Prince MJ. Epidemiology of Dementias and Alzheimer's Disease, *Archives of Medical Research*, 2012, 43(8):600–608.

42. Robinson M, Lee BY, Hane FT. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology, *Journal of Alzheimer's Disease*, 2017, 57(2):317–330.

43. Kocahan S, Doğan Z. Mechanisms of Alzheimer's Disease Pathogenesis and Prevention: The Brain, Neural Pathology, N-methyl-D-aspartate Receptors,

Tau Protein and Other Risk Factors., *Clinical psychopharmacology and neuroscience : the official scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology*, 2017, 15(1):1–8.

44. Goate A, Chartier-Harlin M-C, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L *et al.* Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease, *Nature*, 1991, 349:704.

45. Campion D, Flaman J-M, Brice A, Hannequin D, Dubois B, Martin C *et al.* Mutations of the presenilin I gene in families with early-onset Alzheimer's disease, *Human Molecular Genetics*, 1995, 4(12):2373–2377.

46. Sherrington R, Froelich S, Sorbi S, Campion D, Chi H, Rogaeva EA *et al.* Alzheimer's Disease Associated with Mutations in Presenilin 2 is Rare and Variably Penetrant, *Human Molecular Genetics*, 1996, 5(7):985–988.

47. Ridge PG, Ebbert MTW, Kauwe JSK. Genetics of Alzheimer's Disease, *BioMed Research International*, 2013, 2013:254954.

48. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium., *JAMA*, 1997, 278(16):1349–1356.

49. Lautenschlager NT, Cupples LA, Rao VS, Auerbach SA, Becker R, Burke J *et al.* Risk of dementia among relatives of Alzheimer's disease patients in the MIRAGE study: What is in store for the oldest old?, *Neurology*, 1996, 46(3):641–650.

50. Saul A, Wirths O. Endogenous Apolipoprotein E (ApoE) Fragmentation Is Linked to Amyloid Pathology in Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease, *Molecular Neurobiology*, 2017, 54(1):319–327.

51. Ward A, Crean S, Mercaldi CJ, Collins JM, Boyd D, Cook MN, Arrighi HM. Prevalence of apolipoprotein E4 genotype and homozygotes (APOE e4/4) among patients diagnosed with Alzheimer's disease: a systematic review and

meta-analysis., *Neuroepidemiology*, 2012, 38(1):1–17.

52. Cuyvers E, Sleegers K. Genetic variations underlying Alzheimer's disease: evidence from genome-wide association studies and beyond., *The Lancet Neurology*, 2016, 15(8):857–868.

53. Rao JS, Keleshian VL, Klein S, Rapoport SI. Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer's disease and bipolar disorder patients., *Translational psychiatry*, 2012, 2:e132.

54. Lu X, Wang L, Yu C, Yu D, Yu G. Histone Acetylation Modifiers in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2015, 9(June). doi:10.3389/fncel.2015.00226.

55. McKhann G, Knopman DS, Chertkow H, Hymann B, Jack CR, Kawas C, Klunk W, Koroshetz W, Manly J, Mayeux R, Mohs R, Morris J, Rossor M, Scheltens P, Carrillo M, Weintrub S, Phelphs C. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging- Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease, *Alzheimers Dementia*, 2011, 7(3):263–269.

56. Hane FT, Robinson M, Lee BY, Bai O, Leonenko Z, Albert MS. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 3: Diagnosis and Treatment, *Journal of Alzheimer's Disease*, 2017, 57(3):645–665.

57. Kulic L, Unschuld PG. Recent advances in cerebrospinal fluid biomarkers for the detection of preclinical Alzheimer's disease, *Current Opinion in Neurology*, 2016, 29(6):749–755.

58. Kozlov S, Afonin A, Evsyukov I, Bondarenko A. Alzheimer's disease: As it was in the beginning, *Reviews in the Neurosciences*, 2017, 28(8):825–843.

59. Burns A, Jacoby R, Levy R. Psychiatric Phenomena in Alzheimer's Disease. I: Disorders of Thought Content, *British Journal of Psychiatry*, 1990, 157(1):72–76.

60. Burns A, Iliffe S. Alzheimer's disease., *British Medical Journal*, 2009,

338:467–471.

61. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1984, 120(3):885–890.

62. Zhao Y, Zhao B. Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013:316523.

63. Hesse L, Beher D, Masters CL, Multhaup G. The beta A4 amyloid precursor protein binding to copper., *FEBS letters*, 1994, 349(1):109–116.

64. Barrett PJ, Song Y, Van Horn WD, Hustedt EJ, Schafer JM, Hadziselimovic A, Beel AJ, Sanders CR. The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol., *Science (New York, NY)*, 2012, 336(6085):1168–1171.

65. Saitoh T, Sundsmo M, Roch JM, Kimura N, Cole G, Schubert D, Oltersdorf T, Schenk DB. Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts., *Cell*, 1989, 58(4):615–622.

66. Sun X, Chen WD, Wang YD. β-Amyloid: The key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Frontiers in Pharmacology*, 2015, 6(SEP):1–9.

67. Lu J-X, Qiang W, Yau W-M, Schwieters CD, Meredith SC, Tycko R. Molecular structure of β-amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue, *Cell*, 2013, 154(6):1257-1268.

68. Calsolaro V, Edison P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions, *Alzheimer's and Dementia*, 2016, 12(6):719–732.

69. Haruhiko A, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM *et al.* Inflammation and Alzheimer 's disease, *Neurobiology of Aging*, 2000, 21:383–421.

70. Šimi G. Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer ' s Disease and Other Tauopathies , and Possible Neuroprotective Strategies,

Biomolecules, 2016, 6(6):1–28.

71. Eikelenboom P, Veerhuis R, Scheper W, Rozemuller AJM, van Gool WA, Hoozemans JJM. The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease, *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 2006, 113(11):1685–1695.

72. Fillit H, Ding W, Buee L, Kalman J, Altstiel L, Lawlor B, Wolf-Klein G. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease, *Neuroscience Letters*, 1991, 129(2):318–320.

73. Strauss S, Bauer J, Ganter U, Jonas U, Berger M, Volk B. Detection of interleukin-6 and α2-macroglobulin immunoreactivity in cortex and hippocampus of Alzheimer's disease patients, *Laboratory Investigation*, 1992, 66(2):223–230.

74. Morales I, Guzman-Martinez L, Cerda-Troncoso C, Farias GA, Maccioni RB. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches., *Frontiers in cellular neuroscience*, 2014, 8:112.

75. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS, *Trends Neurosci*, 1996, 19:312–318.

76. Hanisch U-K, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain., *Nature neuroscience*, 2007, 10(11):1387–1394.

77. Liu B, Hong J. Role of Microglia in Inflammation-Mediated Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Strategies for Therapeutic Intervention, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2003, 304(1):1–7.

78. Guo J-T, Yu J, Grass D, De Beer FC, Kindy MS. Inflammation-dependent cerebral deposition of serum amyloid A protein in a mouse model of amyloidosis, *Journal of Neuroscience*, 2002, 22(14):5900–5909.

79. Burguillos MA, Deierborg T, Kavanagh E, Persson A, Hajji N, Garcia-Quintanilla A, Cano J, Brundin P, Englund E, Venero JL, Joseph B. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity, *Nature*, 2011, 472(7343):319-324.

80. Zhang C, Wang Y, Wang D, Zhang J, Zhang F. NSAID exposure and risk of Alzheimer's disease: An updated meta-analysis from cohort studies, *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2018, 10(MAR):1–9.

81. Leoutsakos J-MS, Muthen BO, Breitner JCS, Lyketsos CG. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug treatments on cognitive decline vary by phase of pre-clinical Alzheimer disease: findings from the randomized controlled Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial, *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 2012, 27(4):364–374.

82. Magi S, Castaldo P, Macrì ML, Maiolino M, Matteucci A, Bastioli G, Gratteri S, Amoroso S, Lariccia V. Intracellular Calcium Dysregulation : Implications for Alzheimer ' s Disease, *BioMed Research International*, 2016, 2016:1-14.

83. Popugaeva E, Pchitskaya E, Bezprozvanny I. Dysregulation of neuronal calcium homeostasis in Alzheimer's disease – A therapeutic opportunity?, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 483(4):998–1004.

84. Sanabria-Castro A, Alvarado-Echeverría I, Monge-Bonilla C. Molecular pathogenesis of alzheimer's disease: An update, *Annals of Neurosciences*, 2017, 24(1):46–54.

85. Berridge MJ. Dysregulation of neural calcium signaling in Alzheimer disease, bipolar disorder and schizophrenia, *Prion*, 2013, 7(1):2–13.

86. Kar S, Issa AM, Seto D, Auld DS, Collier B, Quirion R. Amyloid β-peptide inhibits high-affinity choline uptake and acetylcholine release in rat hippocampal slices, *Journal of Neurochemistry*, 1998, 70(5):2179–2187.

87. Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal

forebrain., *Science (New York, NY)*, 1982, 215(4537):1237–1239.

88. Nordberg A, Alafuzoff I, Winblad B. Nicotinic and muscarinic subtypes in the human brain: changes with aging and dementia., *Journal of neuroscience research*, 1992, 31(1):103–111.

89. Wilcock GK, Esiri MM, Bowen DM, Smith CCT. Alzheimer's disease: Correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities, *Journal of the Neurological Sciences*, 1982, 57(2):407–417.

90. Sims NR, Bowen DM, Allen SJ, Smith CCT, Neary D, Thomas DJ, Davison AN. Presynaptic Cholinergic Dysfunction in Patients with Dementia, *Journal of Neurochemistry*, 1983, 40(2):503–509.

91. Rylett RJ, Ball MJ, Colhoun EH. Evidence for high affinity choline transport in synaptosomes prepared from hippocampus and neocortex of patients with Alzheimer's disease, *Brain Research*, 1983, 289(1):169–175.

92. Nilsson L, Nordberg A, Hardy J, Wester P, Winblad B. Physostigmine restores3H-acetylcholine efflux from Alzheimer brain slices to normal level, *Journal of Neural Transmission*, 1986, 67(3):275–285.

93. Bartus RT, Dean RL 3rd, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction., *Science (New York, NY)*, 1982, 217(4558):408–414.

94. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis, *Science*, 1992, 256(5054):184–185.

95. Selkoe DJ. The molecular pathology of Alzheimer's disease, *Neuron*, 1991, 6(4):487–498.

96. Hardy J. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal, *Journal of Neurochemistry*, 2009, 110:1129–1134.

97. Atwood CS, Martins RN, Smith MA, Perry G. Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid-β peptide and associated proteins,

Peptides, 2002, 23:1343–1350.

98. Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH. Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression., *Human molecular genetics*, 2006, 15(9):1437–1449.

99. Prokop S, Miller KR, Heppner FL. Microglia actions in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathologica*, 2013, 126:461–477.

100. Prà ID, Chiarini A, Gui L, Chakravarthy B, Pacchiana R, Gardenal E, Whitfield JF. Do Astrocytes Collaborate with Neurons in Spreading the "Infectious" Aβ and Tau Drivers of Alzheimer's Disease?, *The Neuroscientist*, 2015, 21(1):9–29.

101. Pollock NJ, Mirra SS, Binder LI, Hansen LA, Wood JG. Filamentous aggregates in Pick's disease, progressive supranuclear palsy, and Alzheimer's disease share antigenic determinants with microtubule-associated protein, tau., *The Lancet*, 1986, 328(8517):1211.

102. Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, Van der Flier WM. Alzheimer's disease, *The Lancet*, 2016, 388(10043):505–517.

103. Özkan S, Özbabalık D. Alzheimer Hastalığı'nda Nonfarmakolojik Tedavi Yaklaşımları, *Turkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics*, 2009, 2(1):75–80.

104. Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, Du Yan S, Hamm K, Xu F, Parisi M, LaRue B, Hu HW, Spijkers P, Guo H, Song X, Lenting PJ, Van Nostrand WE, Zlokovic B V. LRP/amyloid β-peptide interaction mediates differential brain efflux of Aβ isoforms, *Neuron*, 2004, 43(3):333–344.

105. Sagare A, Deane R, Bell RD, Johnson B, Hamm K, Pendu R, Marky A, Lenting PJ, Wu Z, Zarcone T, Goate A, Mayo K, Perlmutter D, Coma M, Zhong Z, Zlokovic B V. Clearance of amyloid-β by circulating lipoprotein receptors, *Nature Medicine*, 2007, 13(9):1029–1031.

106. Sabbagh MN, Agro A, Bell J, Aisen PS, Schweizer E, Galasko D. PF-04494700, an Oral Inhibitor of Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE), in Alzheimer Disease, *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, 2011, 25(3):206–212.

107. Galasko D, Bell J, Mancuso JY, Kupiec JW, Sabbagh MN, van Dyck C, Thomas RG, Aisen PS. Clinical trial of an inhibitor of RAGE-Aβ interactions in Alzheimer disease., *Neurology*, 2014, 82(17):1536–42.

108. Burstein AH, Grimes I, Galasko DR, Aisen PS, Sabbagh M, Mjalli AM. Effect of TTP488 in patients with mild to moderate Alzheimer's disease, *BMC Neurol*, 2014, 14:12.

109. vTv Therapeutics. Evaluation of the Efficacy and Safety of Azeliragon (TTP488) in Patients With Mild Alzheimer's Disease (STEADFAST). https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02080364?term=azeliragon&rank=3. 20 Mayıs 2019.

110. Burstein AH, Sabbagh M, Andrews R, Valcarce C, Dunn I, Altstiel L, Altstiel L. Development of Azeliragon, an Oral Small Molecule Antagonist of the Receptor for Advanced Glycation Endproducts, for the Potential Slowing of Loss of Cognition in Mild Alzheimer's Disease, *J Prev Alz Dis*, 2018, 55(22):149–154.

111. Coric V, Van Dyck CH, Salloway S, Andreasen N, Brody M, Richter RW *et al.* Safety and tolerability of the γ-secretase inhibitor avagacestat in a phase 2 study of mild to moderate Alzheimer disease, *Archives of Neurology*, 2012, 69(11):1430–1440.

112. Doody RS, Raman R, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, Kieburtz K, He F, Sun X, Thomas RG, Aisen PS, Siemers E, Sethuraman G, Mohs R. A Phase 3 Trial of Semagacestat for Treatment of Alzheimer's Disease, *New England Journal of Medicine*, 2013, 369(4):341–350.

113. Eli Lilly and Company. Study of LY2886721 in Mild Cognitive Impairment Due to Alzheimer's Disease or Mild Alzheimer's Disease. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01561430. 20 Mayıs 2019.

114. Tobias E, Paloma G-O, J. LJ, Jesús A, Félix H. Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3β overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert, *Journal of Neurochemistry*, 2006, 99(6):1445–1455.

115. Licht-Murava A, Paz R, Vaks L, Avrahami L, Plotkin B, Eisenstein M, Eldar-Finkelman H. A unique type of GSK-3 inhibitor brings new opportunities to the clinic, *Science Signaling*, 2016, 9(454):ra110-ra110.

116. Chen Q, Du Y, Zhang K, Liang Z, Li J, Yu H, Ren R, Feng J, Jin Z, Li F, Sun J, Zhou M, He Q, Sun X, Zhang H, Tian M, Ling D. Tau-Targeted Multifunctional Nanocomposite for Combinational Therapy of Alzheimer's Disease, *ACS Nano*, 2018, 12(2):1321–1338.

117. Domenico F Di, Barone E, Perluigi M, Butterfield DA, Di F, Barone E, Perluigi M, Allan D, Domenico F Di, Barone E. Strategy to reduce free radical species in Alzheimer's disease : an update of selected antioxidants, *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2015, 15(1):19–40.

118. Tomita T. Aberrant proteolytic processing and therapeutic strategies in Alzheimer disease, *Advances in Biological Regulation*, 2017, 64(2016):33–38.

119. Egan MF, Kost J, Tariot PN, Aisen PS, Cummings JL, Vellas B, Sur C, Mukai Y, Voss T, Furtek C, Mahoney E, Harper Mozley L, Vandenberghe R, Mo Y, Michelson D. Randomized Trial of Verubecestat for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease, *New England Journal of Medicine*, 2018, 378(18):1691–1703.

120. Khoury R, Patel K, Gold J, Hinds S, Grossberg GT. Recent Progress in the Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease, *Drugs and Aging*, 2017, 34(11):811–820.

121. Uras ŞS., *Nigella sativa L. (Ranunculaceae)* Bitkisi Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar, Sağlık Bilimleri Enstitüsü/ Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi, Mersin: Mersin Üniversitesi, 2009.

122. Kooti W, Hasanzadeh-noohi Z, Sharafi-ahvazi N1, Asadi-samani M, Ashtary-larky D. Phytochemistry , pharmacology , and therapeutic uses of black seed (Nigella sativa), *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2016, 14(10):732–745.

123. Baytop T. *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi*, 2. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri: İstanbul, 1999:189-190.

124. Takruri HRH, Dameh MAF. Study of the nutritional value of black cumin seeds (Nigella sativa L), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1998, 76(3):404–410.

125. Armutcu F, Arslan SO, Coskun O, Gelir E, Celik IL, Sayan H, Gurel A. The protective effect of thymoquinone on ethanol-induced acute gastric damage in the rat, *Nutrition Research*, 2005, 25(7):673–680.

126. Rizk FH, Ibrahim MAA, Abd-Elsalam MM, Soliman NA, Abd-Elsalam SM. Gastroprotective Effects of Montelukast and Nigella Sativa Oil against Corticosteroids- Induced Gastric Damage: Much More Than Antiasthmatic Drugs, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2017, 95(6):714–720.

127. Magdy M-A, Hanan E-A, Nabila E-M. Thymoquinone: Novel gastroprotective mechanisms, *European Journal of Pharmacology*, 2012, 697(1):126–131.

128. Periasamy VS, Athinarayanan J, Alshatwi AA. Anticancer activity of an ultrasonic nanoemulsion formulation of Nigella sativa L. essential oil on human breast cancer cells, *Ultrasonics Sonochemistry*, 2016, 31:449–455.

129. Farooqui Z, Shahid F, Khan AA, Khan F. Oral administration of Nigella sativa oil and thymoquinone attenuates long term cisplatin treatment induced toxicity and oxidative damage in rat kidney, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2017, 96(December):912–923.

130. Sapmaz HI, Sarsılmaz M, Gödekmerdan A, Ögetürk M, Taş U, Köse E. Effects of formaldehyde inhalation on humoral immunity and protective effect of Nigella sativa oil, *Toxicology and Industrial Health*, 2016, 32(9):1564–

1569.

131. Aslam H, Shahzad M, Shabbir A, Irshad S. Immunomodulatory effect of thymoquinone on atopic dermatitis., *Molecular immunology*, 2018, 101:276–283.

132. Arjumand S, Shahzad M, Shabbir A, Yousaf MZ. Thymoquinone attenuates rheumatoid arthritis by downregulating TLR2, TLR4, TNF-α IL-1, and NFκB expression levels, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2019, 111(October 2018):958–963.

133. Bouhlel A, Bejaoui M, Ben Mosbah I, Hadj Abdallah N, Ribault C, Viel R, Hentati H, Corlu A, Ben Abdennebi H. Thymoquinone protects rat liver after partial hepatectomy under ischaemia/reperfusion through oxidative stress and endoplasmic reticulum stress prevention, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2018, 45(9):943–951.

134. Hadi V, Kheirouri S, Alizadeh M, Khabbazi A, Hosseini H. Effects of Nigella sativa oil extract on inflammatory cytokine response and oxidative stress status in patients with rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial, *Original Research Article*, 2014, 6(1):34–43.

135. Özcan N, Timokinon'un Deneysel Astım Modelinde Antiastmatik Etkisinin Araştırılması, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi, Zonguldak: Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, 2006.

136. Alam MF, Khan G, Safhi MM, Alshahrani S, Siddiqui R, Sivagurunathan Moni S, Anwer T. Thymoquinone Ameliorates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Swiss Albino Mice by Modulating Oxidative Damage and Cellular Inflammation, *Cardiology Research and Practice*, 2018, 2018:1–6.

137. Farooqui Z, Ahmed F, Rizwan S, Shahid F, Ahmed A, Khan F. Protective effect of Nigella sativa oil on cisplatin induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney, *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 2017, 85:7–15.

138. Shahdaat M, Sayeed B, Shams T, Fahim S, Rahman R, Mostofa AGM, Fahim M. Nigella sativa L . seeds modulate mood , anxiety and cognition in healthy

adolescent males, *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 152(1):156–162.

139. Seghatoleslam M, Alipour F, Shafieian R, Hassanzadeh Z, Edalatmanesh MA, Sadeghnia HR, Hosseini M. The effects of Nigella sativa on neural damage after pentylenetetrazole induced seizures in rats, *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2016, 6(3):262–268.

140. Firdaus F, Zafeer MF, Waseem M, Ullah R, Ahmad M, Afzal M. Thymoquinone alleviates arsenic induced hippocampal toxicity and mitochondrial dysfunction by modulating mPTP in Wistar rats, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2018, 102(March):1152–1160.

141. Fouad IA, Sharaf NM, Abdelghany RM, El Sayed NSED. Neuromodulatory Effect of Thymoquinone in Attenuating Glutamate-Mediated Neurotoxicity Targeting the Amyloidogenic and Apoptotic Pathways, *Frontiers in Neurology*, 2018, 9(April):1–12.

142. Ebrahimi SS, Oryan S, Izadpanah E, Hassanzadeh K. Thymoquinone exerts neuroprotective effect in animal model of Parkinson's disease, *Toxicology Letters*, 2017, 276:108–114.

143. Shao YY, Li B, Huang YM, Luo Q, Xie YM, Chen YH. Thymoquinone attenuates brain injury via an antioxidative pathway in a status epilepticus rat model, *Translational Neuroscience*, 2017, 8(1):9–14.

144. Taka E, Mazzio EA, Goodman CB, Redmon N, Flores-Rozas H, Reams R, Darling-Reed S, Soliman KFA. Anti-inflammatory effects of thymoquinone in activated BV-2 microglial cells, *Journal of Neuroimmunology*, 2015, 286(5):5–12.

145. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd ed. New York, Academic Press: 1996.

146. Ridge PG, Ebbert MTW, Kauwe JSK. Genetics of Alzheimer's Disease, *BioMed Research International*, 2013, 2013:1–13.

147. Cetin F, Dincer S. The effect of intrahippocampal beta amyloid (1-42) peptide

injection on oxidant and antioxidant status in rat brain, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007, 1100:510–517.

148. Lu B-L, Li J, Zhou J, Li W-W, Wu H-F. Tanshinone IIA decreases the levels of inflammation induced by Aβ1–42 in brain tissues of Alzheimer's disease model rats, *NeuroReport*, 2016, 27(12):883–893.

149. Chen JH, Ke KF, Lu JH, Qiu YH, Peng YP. Protection of TGF-β1 against neuroinflammation and neurodegeneration in Aβ1-42-induced alzheimer's disease model rats, *PLoS ONE*, 2015, 10(2):1–19.

150. Li Y, Xu J, Xu P, Song S, Liu P, Chi T, Ji X, Jin G, Qiu S, Hou Y, Zheng C, Wang L, Meng D, Zou L. Xanthoceras sorbifolia extracts ameliorate dendritic spine deficiency and cognitive decline via upregulation of BDNF expression in a rat model of Alzheimer's disease, *Neuroscience Letters*, 2016, 629:208–214.

151. Yeon J, Hong J, Lee K, Yeon HY, Seong H. Phytoceramide ameliorates ß-amyloid protein-induced memory impairment and neuronal death in mice, *Archives of Pharmacal Research*, 2017, 40(6):760–771.

152. Cioanca O, Hritcu L, Mihasan M, Hancianu M. Cognitive-enhancing and antioxidant activities of inhaled coriander volatile oil in amyloid β(1-42) rat model of Alzheimer's disease, *Physiology and Behavior*, 2013, 120:193–202.

153. Drummond E, Wisniewski T. Alzheimer's disease: experimental models and reality, *Acta Neuropathologica*, 2017, 133(2):155–175.

154. McLarnon JG, Ryu JK. Relevance of Aβ1-42 Intrahippocampal Injection as An Animal Model of Inflamed Alzheimer's Disease Brain, *Current Alzheimer Research*, 2008, 5(5):475–480.

155. Sastre M, Klockgether T, Heneka MT. Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms., *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 2006, 24(2–3):167–176.

156. Cai Z, Hussain MD, Yan L-J. Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease, *International Journal of Neuroscience*, 2014, 124(5):307–321.

157. Shaftel SS, Kyrkanides S, Olschowka JA, Miller JNH, Johnson RE, O'Banion MK. Sustained hippocampal IL-1β overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology, *Journal of Clinical Investigation*, 2007, 117(6):1595–1604.

158. Mandrekar S, Landreth GE. Microglia and Inflammation in Alzheimer's Disease, *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2010, 9(2):156–167.

159. Noor NA, Fahmy HM, Mohammed FF, Elsayed AA, Radwan NM. Nigella sativa amliorates inflammation and demyelination in the experimental autoimmune encephalomyelitis-induced Wistar rats, *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2015, 8(6):6269–6286.

160. Hanefi Ö, Mustafa Ö, Abdurrahman Ö, Ebubekir C, Zabit Y. Determination of lethal doses of volatile and fixed oils of several plants, *Eastern Journal of Medicine*, 2004, 9(1):4–6.

161. Zaoui A, Cherrah Y, Mahassini N, Alaoui K, Amarouch H, Hassar M. Acute and chronic toxicity of Nigella sativa fixed oil, *Phytomedicine*, 2002, 9(1):69–74.

162. Al-Ali A, Alkhawajah AA, Randhawa MA, Shaikh NA. Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of Nigella sativa, in mice and rats., *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad : JAMC*, 2008, 20(2):25–27.

163. Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE. beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2001, 21(4):1179–1188.

164. Shi X, Zheng Z, Li J, Xiao Z, Qi W, Zhang A, Wu Q, Fang Y. Curcumin

inhibits Aβ-induced microglial inflammatory responses in vitro: Involvement of ERK1/2 and p38 signaling pathways, *Neuroscience Letters*, 2015, 594:105–110.

165. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1, *Brain research Molecular brain research*, 1998, 57(1):1–9.

166. Perry VH, Hume DA, Gordon S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain, *Neuroscience*, 1985, 15(2):313–326.

167. Hovens IB, Nyakas C, Schoemaker RG. Original Article A novel method for evaluating microglial activation using ionized calcium-binding adaptor protein-1 staining : cell body to cell size ratio, *Neuroimmunol Neuroinflammation*, 2014, 1(2):82–88.

168. Verkhratsky A, Olabarria M, Noristani HN, Yeh CY, Rodriguez JJ. Astrocytes in Alzheimer's Disease, *Neurotherapeutics*, 2010, 7(4):399–412.

169. Nagele RG, D'Andrea MR, Lee H, Venkataraman V, Wang H-Y. Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains, *Brain research*, 2003, 971(2):197–209.

170. Rossner S, Lange-Dohna C, Zeitschel U, Perez-Polo JR. Alzheimer's disease β-secretase BACE1 is not a neuron-specific enzyme, *Journal of Neurochemistry*, 2005, 92:226–234.

171. Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Dewachter I, Walter J, Klockgether T, Van Leuven F. Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice, *Journal of neuroinflammation*, 2005, 2:22.

172. Rossner S, Apelt J, Schliebs R, Perez-Polo JR, Bigl V. Neuronal and glial beta-secretase (BACE) protein expression in transgenic Tg2576 mice with amyloid plaque pathology, *Journal of neuroscience research*, 2001, 64(5):437–446.

173. Steele ML, Robinson SR. Reactive astrocytes give neurons less support: Implications for Alzheimer's disease, *Neurobiology of Aging*, 2012, 33(2):423.e1-423.e13.

174. Hu C, Wang P, Zhang S, Ren L, Lv Y, Yin R, Bi J. Neuroprotective effect of melatonin on soluble Aβ1–42-induced cortical neurodegeneration via Reelin–Dab1 signaling pathway, *Neurological Research*, 2017, 39(7):621–631.

175. Smits HA, Rijsmus A, van Loon JH, Wat JWY, Verhoef J, Boven LA, Nottet HSLM. Amyloid-beta-induced chemokine production in primary human macrophages and astrocytes., *Journal of neuroimmunology*, 2002, 127(1–2):160–168.

176. El Moutawakil B, Slassi I, Nadifi S, El Kadmiri N, Said N. Biomarkers for Alzheimer Disease: Classical and Novel Candidates' Review, *Neuroscience*, 2017, 370:181–190.

177. Leung YY, Toledo JB, Nefedov A, Polikar R, Raghavan N, Xie SX *et al.* Identifying amyloid pathology-related cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease in a multicohort study, *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring*, 2015, 1(3):339–348.

178. Olazarán J, Gil-De-Gómez L, Rodríguez-Martín A, Valentí-Soler M, Frades-Payo B, Marín-Muñoz J *et al.* A blood-based, 7-metabolite signature for the early diagnosis of Alzheimer's disease, *Journal of Alzheimer's Disease*, 2015, 45(4):1157–1173.

179. Baird AL, Westwood S, Lovestone S. Blood-based proteomic biomarkers of Alzheimer's disease pathology, *Frontiers in Neurology*, 2015, 6(NOV). doi:10.3389/fneur.2015.00236.

180. Wellington H, Keshavan A, Toombs J, Rohrer JD, Weston P, Foiani M, Schott JM, Zetterberg H, Heslegrave A, Lashley T, Foti SC, Murray CE. Molecular biomarkers of Alzheimer's disease: progress and prospects, *Disease Models & Mechanisms*, 2018, 11(5):1-9.

181. De Carvalho CCCR, Caramujo MJ. The various roles of fatty acids,

Molecules, 2018, 23(10):2583.

182. Iuliano L, Pacelli A, Ciacciarelli M, Zerbinati C, Fagioli S, Piras F, Orfei MD, Bossù P, Pazzelli F, Serviddio G, Caltagirone C, Spalletta G. Plasma Fatty Acid Lipidomics in Amnestic Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease, *Journal of Alzheimer's Disease*, 2013, 36(3):545–553.

183. Lim GP, Calon F, Morihara T, Yang F, Teter B, Ubeda O, Salem NJ, Frautschy SA, Cole GM. A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2005, 25(12):3032–3040.

184. Hooijmans CR, Rutters F, Dederen PJ, Gambarota G, Veltien A, van Groen T, Broersen LM, Lutjohann D, Heerschap A, Tanila H, Kiliaan AJ. Changes in cerebral blood volume and amyloid pathology in aged Alzheimer APP/PS1 mice on a docosahexaenoic acid (DHA) diet or cholesterol enriched Typical Western Diet (TWD), *Neurobiology of disease*, 2007, 28(1):16–29.

185. Schaefer EJ, Bongard V, Beiser AS, Lamon-Fava S, Robins SJ, Au R, Tucker KL, Kyle DJ, Wilson PWF, Wolf PA. Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: the Framingham Heart Study, *Archives of neurology*, 2006, 63(11):1545–1550.

186. Samieri C, Feart C, Letenneur L, Dartigues J-F, Peres K, Auriacombe S, Peuchant E, Delcourt C, Barberger-Gateau P. Low plasma eicosapentaenoic acid and depressive symptomatology are independent predictors of dementia risk, *The American journal of clinical nutrition*, 2008, 88(3):714–721.

187. Kroger E, Verreault R, Carmichael P-H, Lindsay J, Julien P, Dewailly E, Ayotte P, Laurin D. Omega-3 fatty acids and risk of dementia: the Canadian Study of Health and Aging, *The American journal of clinical nutrition*, 2009, 90(1):184–192.

188. Rönnemaa E, Zethelius B, Vessby B, Lannfelt L, Byberg L, Kilander L. Serum fatty-acid composition and the risk of Alzheimers disease: A

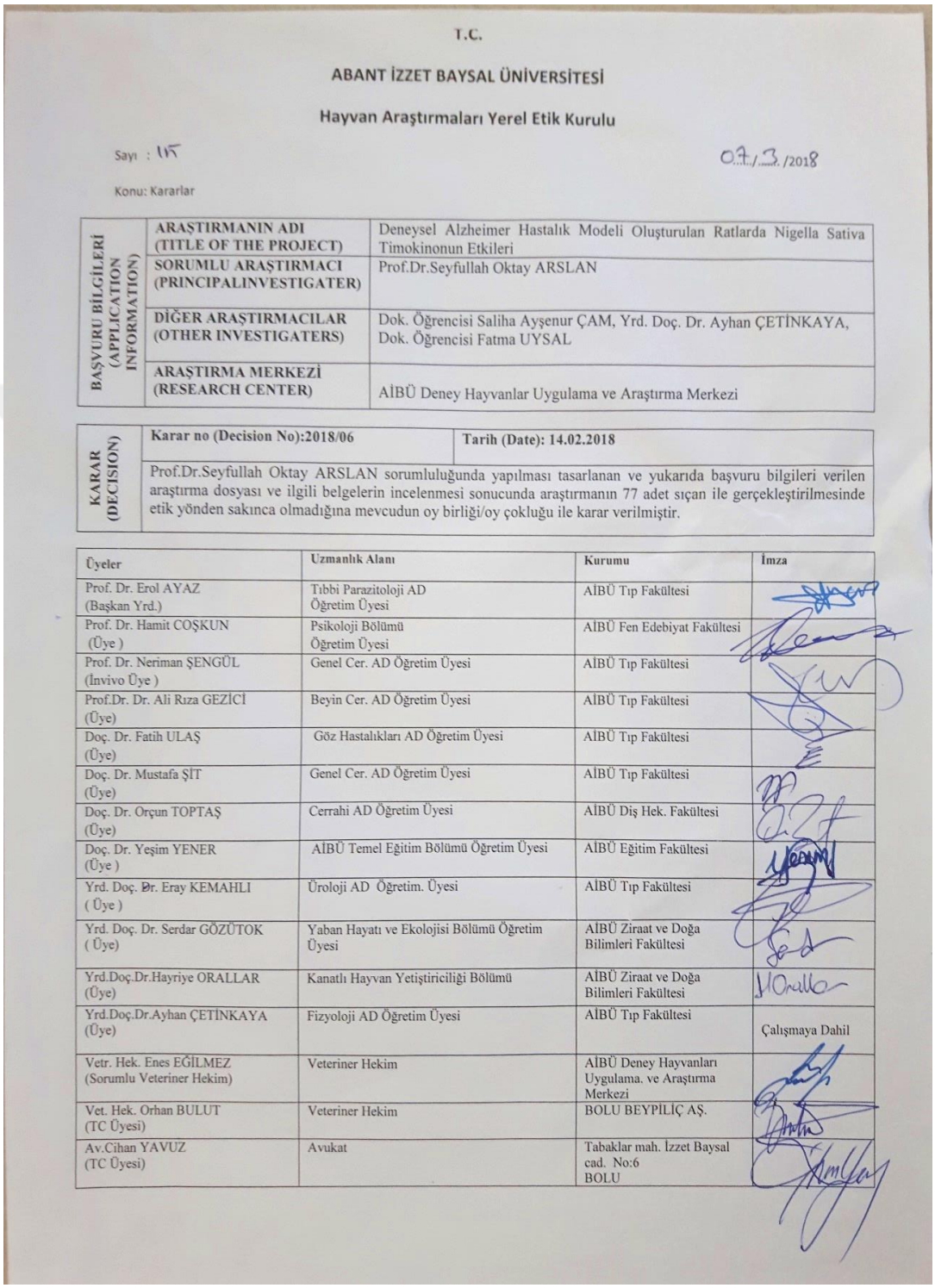
longitudinal population-based study, *European Journal of Clinical Nutrition*, 2012, 66(8):885–890.

189. Chew EY, Clemons TE, Agron E, Launer LJ, Grodstein F, Bernstein PS. Effect of Omega-3 Fatty Acids, Lutein/Zeaxanthin, or Other Nutrient Supplementation on Cognitive Function: The AREDS2 Randomized Clinical Trial, *JAMA*, 2015, 314(8):791–801.

190. Kulzow N, Witte AV, Kerti L, Grittner U, Schuchardt JP, Hahn A, Floel A. Impact of Omega-3 Fatty Acid Supplementation on Memory Functions in Healthy Older Adults, *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 2016, 51(3):713–725.

8. EKLER

Ek-1. Etik Kurul Onay Belgesi



T.C.

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu

Sayı : 15 07/3/2018

Konu: Kararlar

BAŞVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)		
	ARAŞTIRMANIN ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Deneysel Alzheimer Hastalık Modeli Oluşturulan Ratlarda Nigella Sativa Timokinonun Etkileri
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (PRINCIPALINVESTIGATER)	Prof.Dr.Seyfullah Oktay ARSLAN
	DİĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER INVESTIGATERS)	Dok. Öğrencisi Saliha Ayşenur ÇAM, Yrd. Doç. Dr. Ayhan ÇETİNKAYA, Dok. Öğrencisi Fatma UYSAL
	ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER)	AİBÜ Deney Hayvanlar Uygulama ve Araştırma Merkezi

KARAR (DECISION)		
	Karar no (Decision No):2018/06	Tarih (Date): 14.02.2018
	Prof.Dr.Seyfullah Oktay ARSLAN sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgelerin incelenmesi sonucunda araştırmanın 77 adet sıçan ile gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

Üyeler	Uzmanlık Alanı	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Erol AYAZ (Başkan Yrd.)	Tıbbi Parazitoloji AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Hamit COŞKUN (Üye)	Psikoloji Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Fen Edebiyat Fakültesi	
Prof. Dr. Neriman ŞENGÜL (İnvivo Üye)	Genel Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof.Dr. Dr. Ali Rıza GEZİCİ (Üye)	Beyin Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Fatih ULAŞ (Üye)	Göz Hastalıkları AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Mustafa ŞİT (Üye)	Genel Cer. AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Orçun TOPTAŞ (Üye)	Cerrahi AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Diş Hek. Fakültesi	
Doç. Dr. Yeşim YENER (Üye)	AİBÜ Temel Eğitim Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Eğitim Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Eray KEMAHLI (Üye)	Üroloji AD Öğretim. Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Serdar GÖZÜTOK (Üye)	Yaban Hayatı ve Ekolojisi Bölümü Öğretim Üyesi	AİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Yrd.Doç.Dr.Hayriye ORALLAR (Üye)	Kanatlı Hayvan Yetiştiriciliği Bölümü	AİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Yrd.Doç.Dr.Ayhan ÇETİNKAYA (Üye)	Fizyoloji AD Öğretim Üyesi	AİBÜ Tıp Fakültesi	Çalışmaya Dahil
Vetr. Hek. Enes EĞİLMEZ (Sorumlu Veteriner Hekim)	Veteriner Hekim	AİBÜ Deney Hayvanları Uygulama. ve Araştırma Merkezi	
Vet. Hek. Orhan BULUT (TC Üyesi)	Veteriner Hekim	BOLU BEYPİLİÇ AŞ.	
Av.Cihan YAVUZ (TC Üyesi)	Avukat	Tabaklar mah. İzzet Baysal cad. No:6 BOLU	

Ek-2. Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Saliha Ayşenur ÇAM
Doğum yeri	: Çankaya
Adres	: Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Bilkent/Ankara
Tel	: 0312 324 15 55
Faks	: 0312 324 15 05
E-mail	: aysenurcam@gmail.com
EĞİTİM	
Lisans	: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: İyi seviye
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	