T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİMOLÜN GLİOBLASTOMA HÜCRE HATTINDA $A\beta_{25-35}$ İLE OLUŞTURULAN ALZHEİMER MODELİ ÜZERİNDEKİ NÖROPROTEKTİF ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Beste BALBAL

ORCID: 0000-0003-1407-2497

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR

Ağustos 2024

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2022970185

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİMOLÜN GLİOBLASTOMA HÜCRE HATTINDA $A\beta_{25-35}$ İLE OLUŞTURULAN ALZHEİMER MODELİ ÜZERİNDEKİ NÖROPROTEKTİF ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Beste BALBAL

ORCID: 0000-0003-1407-2497

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ

ORCID: 0000-0001-7939-5153

Bu araştırma, DEU Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından TYL20243470 proje numarası ile desteklenmiştir.

İZMİR

Ağustos 2024

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

ETİK BEYAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum "Timolün glioblastoma hücre hattında $A\beta_{25-35}$ ile oluşturulan Alzheimer modeli üzerindeki nöroprotektif etkisinin araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarımı kabullendiğimi beyan ederim.

Beste BALBAL

22/07/2024

TEŞEKKÜR

Öncelikle Türkiye Cumhuriyeti'nin kurucusu Mustafa Kemal Atatürk'e, bilime verdiği önem ve kadınlara sunduğu tüm imkanlar için teşekkür ederim.

Bu araştırmanın gerçekleştirilmesinde her türlü alt yapıyı sunan ve destekleyen Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne ve akademik kadrosuna teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgisi ve deneyimleriyle yol gösteren, akademik kariyeriyle bana örnek olan, tez dönemim boyunca her koşulda, deneylerin her aşamasında desteğini hissettiren danışmanım Sayın **Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ**' a teşekkürlerimi ve şükranlarımı borç bilirim.

Deneysel çalışmalarımda desteğini esirgemeyen, Barış BİTMEZ' e, KIZILDAĞ Laboratuvar ekibinden Arş. Gör. Deniz Evrim KAVAK' a, Arş. Gör. Serap KURT' a, Khayala RASULOVA' ya, Dilan ULUKAYA' ya ve Serenay KARAKAŞ' a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında maddi manevi yanımda olduklarını hissettiren, aldığım kararlara sonsuz güvenen ve saygı duyan değerli ailem; Aysel BALBAL ve Selahattin BALBAL' a sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Yüksek Lisans Proje Programı tarafından desteklenen TYL20243470 numaralı proje ve TÜSEB A2-YL Yüksek Lisans Öğrencilerine Yönelik A2 Proje Destek Programı tarafından desteklenen 31758 numaralı proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Beste BALBAL

İZMİR – 2024

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR DİZİNİ i
ŞEKİLLER DİZİNİ ii
SİMGELER VE KISALTMALAR iv
ÖZET vii
ABSTRACT x
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar 4
2.2. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi 4
2.3. Alzheimer Hastalığının Risk Etmenleri 5
2.3.1. Yaşlanma 5
2.3.2. Genetik Faktörler 5
2.3.3. Metal İyonları 6
2.3.4. Kardiyovasküler Hastalıklar 6
2.4. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi 6
2.4.1. Amiloid Beta 7
2.4.2. Amiloid Hipotezi 8
2.4.3. Tau Hipotezi 10
2.4.4. Kolinerjik Hipotez 11
2.4.5. Metal Hipotezi 12
2.5. Aβ25-35 Peptit Fragmanı 13
2.6. Sinir Sistemi 13
2.7. Glioblastoma Multiform 14
2.8. Sodyum Bütirat 14
2.9. Hücre Ölümü 14
2.10. Timol 16
2.10.1. Timol' ün Hücre Ölümü Üzerine Etkisi 17
3. GEREÇ VE YÖNTEM 22
3.1. Araştırmanın Tipi 22
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı 22

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi 22
3.4. Çalışma Materyali 22
3.5. Araştırmanın Değişkenleri 22
3.6. Veri Toplama Araçları 22
3.6.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller 22
3.6.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları 22
3.6.1.2. Çalışmada Kullanılan Malzemeler ve Markalar 23
3.6.2. Kullanılan Metotlar 25
3.6.2.1. U-87 Hücre Hattının Uygun Şartlarda İnkübe Edilmesi 25
3.6.2.2. U-87 Hücre Hattının Pasajlanması ve Dondurulması 25
3.6.2.3. U-87 Hücresine Sodyum Bütirat ile Kolinerjik Nöron Karakteri Kazandırılması 26
3.6.2.3.1. Mikroskobik Olarak Doğrulanması 26
3.6.2.3.2. Western Blot Deneyi ile Doğrulanması 27
3.6.2.4. U-87 Hücresine $A\beta_{25-35}$ 'in Sitotoksik, Timol'ün Sitotoksik Etkisinin Araştırılması 28
3.6.2.4.1. $A\beta_{25-35}$ ve Timol Konsantrasyonlarının Belirlenmesi 28
3.6.2.4.2. Sitotoksisite Deneyi 28
3.6.2.5. $A\beta_{25-35}$ ile Oluşturulan AH Modelinde Timol'ün Nöroprotektif Etkisinin mRNA Düzeyinde Araştırılması 30
a) RNA İzolasyonu 30
b) cDNA Sentezi 31
c) RT-qPCR 32
d) Agaroz Jel Elektroforez 33
3.6.2.6. $A\beta_{25-35}$ ile Oluşturulan AH Modelinde Timol'ün Nöroprotektif Etkisinin Protein Düzeyinde Araştırılması 33
a) Protein İzolasyonu 33
b) Protein Miktar Tayini 34
c) Western Blot 34
3.7. Araştırma Planı 36
4. BULGULAR 37
4.2. Sitotoksisite Deney Bulguları 39
4.2.1. U-87 Hücresinde $A\beta_{25-35}$' in Sitotoksik Değerinin Hesaplanması 40

4.2.2. U-87 Hücresinde Timol'ün Prolifere Etki Değerinin Hesaplanması 41

4.2.3. U-87 Hücresinde $A\beta_{25-35}$ + Timol' ün Nöroprotektif Etki Değerinin Hesaplanması 42

4.3. $A\beta_{25-35}$ ile Oluşturulan AH Modelinde Timol' ün Nöroprotektif Etkisinin mRNA Düzeyinde Araştırılması 43

4.4. $A\beta_{25-35}$ ile Oluşturulan AH Modelinde Timol' ün Nöroprotektif Etkisinin Protein Düzeyinde Araştırılması 45

5. TARTIŞMA 47

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 51

7. KAYNAKÇA 52

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. MTT plate düzeneği..... 29
Tablo 2. MTT plate düzeneği..... 30
Tablo 3. cDNA Sentez Kiti Bileşenleri..... 31
Tablo 4. Primer Dizayn Bilgileri 32
Tablo 5. RT-qPCR Kit Bileşenleri ve Miktarları 32
Tablo 6. SDS-PAGE temelli Western blot için gerekli protein ve laemmli hacimleri 35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Sağlıklı ve Alzheimer hastalığı gerçekleşen insan beyni 7
Şekil 2. Aβ döngüsü: Aβ agregasyon türleri ve retrograd hareketi 8
Şekil 3. Amiloidojenik ve amiloidojenik olmayan yol 9
Şekil 4. Oligomerik Aβ ve fosforile Tau, nöronal toksisiteyi indükleyerek sinaptik kayıp ve işlev bozukluğuna neden olur 10
Şekil 5. AH' nin patogenezinde ve tedavisinde kolinerjik hipotezi 12
Şekil 6. AH patofizyolojisindeki hipotezlerin özeti 13
Şekil 7. Apoptozun moleküler mekanizması 15
Şekil 8. Timol' ün kimyasal yapısı 16
Şekil 9. Timol takviyesinin nöroprotektif etkisi 17
Şekil 10. Sağlıklı ve AH' li bireylerin beyinlerinde gerçekleşen intrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolağının moleküler mekanizması 18
Şekil 11. ACh konsantrasyonunun nöroprotektif etkisi 20
Şekil 12. Timol'ün mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve nöronal hücrelerdeki anti-apoptotik etkisinin temel mekanizması 21
Şekil 13. Kullanılan metotların şematize edilerek özetlenmesi 25
Şekil 14. Deney Grupları 26
Şekil 15. RT-qPCR için 6-well plate düzeneği 31
Şekil 16. Western blot deneyi için 6-well plate düzeneği 34
Şekil 17. Mikroskobik Görüntüler 38
Şekil 18. Kontrol ve Sodyum Bütirat grup dozları ile inkübe edilen U-87 hücresi üzerindeki kolinerjik nöron biyobelirteci olan ChAT' ın protein düzeyindeki ifade değişiminin Western Blot yöntemiyle incelenmesi 39
Şekil 19. U-87 hücre hattında 24 saat $A\beta_{25-35}$ dozlarının hücre canlılığı üzerine etkisi 40
Şekil 20. U-87 hücre hattında 48 saat $A\beta_{25-35}$ dozlarının hücre canlılığı üzerine etkisi 41
Şekil 21. U-87 hücre hattında 24 saat Timol dozlarının hücre canlılığı üzerine etkisi 42

Şekil 22. U-87 hücre hattında 24 saat $A\beta_{25-35}$ + Timol dozlarının olası koruyucu etkisi 43
Şekil 23. Kontrol, Timol, $A\beta_{25-35}$ ve $A\beta_{25-35}$ + Timol dozları ile 24 saat boyunca inkübe edilen D-U-87 hücresinde Bcl-2/Bax ve Cyt-c genlerinin RT-qPCR analizi 44
Şekil 24. RT-qPCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünlerin varlığının ve genlerin nükleotit uzunluğunun agaroz jel elektroforezi yöntemiyle gösterilmesi 45
Şekil 25. Kontrol, Timol, $A\beta_{25-35}$ ve $A\beta_{25-35}$ + Timol dozları ile 24 saat boyunca inkübe edilen D-U-87 hücresindeki etkisinin Bax ve Cyt-c antikorlarıyla Western Blot yöntemiyle incelenmesi 46

SİMGELER VE KISALTMALAR

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide: MTT

Adenozin trifosfat: ATP

Alzheimer hastalığı: AH

Amiloid beta: Aβ

Amiloid öncü protein: APP

AMPA reseptörü: AMPAR

Apolipoprotein E: ApoE

Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1: Apaf-1

APP intrasellüler domaini: AICD

Asetilkolin esteraz: AChE

Asetilkolin: ACh

B hücreli lenfome -2: BCL-2

Bazal ön beyin benzeri kolinerjik nöron: BFCN

Bazal ön beyin kolinerjik sistemi: BFCS

Bisinkoninik asit - Bicinchoninic acid: BCA

C-terminal fragmanı α: CTFα, C83

Çinko: Zn

Demir: Fe

Dimetil Sülfoksit: DMSO

Fetal Bovine Serum: FBS

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu - Real-time polymerase chain reaction: RT-qPCR

Glioblastoma multiform: GBM

İntraserebroventriküler: i.c.v.

Karbondioksit: CO_2

Kardiyovasküler hastalıklar - Cardiovascular disease: CVD

Kolin asetil transferaz: ChAT

Kolinerik nöron karakteri kazandırılmış U-87 hücresi: D-U-87 hücresi

Manganez: Mn

Mesajcı RNA: mRNA

Metallopeptidaz domain 10: ADAM10

Mikrogram: µg

Mikrolitre: µl

Mikromolar: µM

Miligram: mg

Milimetre: mm

Mililitre: ml

Milimolar: mM

Muskarinik asetilkolin reseptörü: mAChR

Nikotinik asetilkolin reseptörü: nAChR

N-metil-D-aspartat reseptörü: NMDAR

Nöral öncü hücre - Neural precursor cells: NPC

Nörofibril: NFT

Optik yoğunluğu: OD

Phosphate Buffer Saline: PBS

Presenilin-1: PSEN-1

Presenilin-2: PSEN-2

Programlanmış hücre ölümü - Programmed cell death: PCD

Reaktif oksijen türleri: ROT

Santigrat: ° C

Sitokrom c: Cyt-c

Sodyum bütirat: SB

Sodyum Dodesil Sülfat: SDS

Tümör nekroz faktör reseptörü: TNFR

Volt: V

β-APP parçalayıcı enzim-1: BACE1

TİMOLÜN GLİOBLASTOMA HÜCRE HATTINDA $A\beta_{25-35}$ İLE OLUŞTURULAN ALZHEİMER MODELİ ÜZERİNDEKİ NÖROPROTEKTİF ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

Beste BALBAL

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Nörodejeneratif hastalıklar, nöronal ölüm ile karakterizedir ve ilerlemiş yaş riskine bağlı hastalık grubunda bulunmaktadır. Yıllar içerisinde nüfusun yaşlanmasına bağlı olarak nörodejeneratif hastalıklardan etkilenen kişi sayısı artmakta olup tedavi edilmesinde güçlükler yaşanmaktadır. Nörodejeneratif hastalık olarak tanımlanan Alzheimer hastalığı (AH); dünyada yaklaşık 45 milyonu etkileyen demansın ve ölümün birincil sebebidir. AH, hücre dışı amiloid beta (Aβ) fibrillerinin beyin parankim ve damar duvarlarında toplanması sonucunda nöronlarda fosforile edilmiş Tau proteininin anormal birikmesiyle ilişkilidir. Beyinde apoptoz, intrinsik ve ekstrinsik yolak üzerinden tetiklenebilmekte olup birçok gen ailesinin aktivasyonu veya inhibisyonuyla ilişkilidir.

AH'li kişilerin beyinlerindeki birikimlere benzer şekilde sentetik $A\beta_{25-35}$, *in vitro* ortamda agregatların oluşmasına-toksik etki göstermesine neden olmaktadır.

Timol, renksiz kristal monoterpen fenoldür. Kekik türleri içerisindeki sekonder metabolitlerden birisidir. Yüzyıllardır geleneksel tıpta kullanılmıştır ve antioksidan, anti-inflamatuar, antibakteriyel, antitümör, serbest radikal süpürücü gibi farmakolojik özelliklere sahiptir. Lipofilik yapıya sahip olması sebebiyle kan beyin bariyerini geçip beyin dokusunda biriktiğinden iyon kanallarının ve nöronların işlevini olumlu yönde etkilemektedir.

Bu çalışmada $A\beta_{25-35}$ ile oluşturulan AH modelinde Timol'ün potansiyel nörokoruyucu etkisinin kolinerik nöron karakteri kazandırılmış U-87 hücresinde (D-U-87 hücresi) araştırılması amaçlandı.

Çalışma kapsamında U-87 hücresine Sodyum Bütirat (SB) ile kolinerjik nöron karakteri kazandırıldığının doğrulanması amacıyla kolinerjik nöron biyobelirteci olan ChAT' ın protein düzeyindeki ifade değişimi Western blot deneyi ile belirlendi. Protein seviyesinde, 2mM SB uygulaması, kontrol grubuna kıyasla ChAT oranında anlamlı kat değişimi göstererek kolinerjik nöron karakteri kazandırıldığı gözlemlendi ($p < 0,0001$). Kolinerik nöron karakteri kazandırılmış U-87 hücresinde (D-U-87 hücresi) oluşturulan AH modelinde intrinsik apoptoz yolağında görevli genlerdeki mRNA ve protein seviyesindeki ifade değişimleri incelendi. Bcl-2, Bax ve Cyt-c' nin mRNA seviyesindeki ifade değişimleri RT-qPCR deneyi ile belirlendi. mRNA seviyesinde 1μM $A\beta_{25-35}$ uygulaması, kontrol grubuna kıyasla anti-apoptotik Bcl-2/Bax oranında anlamlı kat değişimi göstererek apoptozu tetiklediği gözlemlendi ($p<0,0001$). mRNA seviyesinde 1μM $A\beta_{25-35}$ + 200μM Timol uygulaması, 1μM $A\beta_{25-35}$ grubuna kıyasla anti-apoptotik Bcl-2/Bax oranında anlamlı kat değişimi göstererek apoptozdan koruduğu gözlemlendi (p value 0,0014). mRNA seviyesinde 1μM $A\beta_{25-35}$ uygulaması, kontrol grubuna kıyasla apoptotik Cyt-c ekspresyonunda anlamlı kat değişimi göstererek apoptozu tetiklediği gözlemlendi ($p<0,0001$). Bax ve Cyt-c' nin protein düzeyindeki ifade değişimleri Western blot deneyi ile belirlendi. Protein seviyesinde 1μM $A\beta_{25-35}$ + 200μM Timol uygulaması, kontrol grubuna kıyasla pro-apoptotik Bax ekspresyonunda anlamlı kat değişimi göstererek Timol'ün anti-apoptotik etkisi belirlendi (p value 0,0004). Protein seviyesinde 1μM $A\beta_{25-35}$ + 200μM Timol uygulaması, 1μM $A\beta_{25-35}$ grubuna kıyasla pro-apoptotik Bax ekspresyonunda anlamlı kat değişimi göstererek Timol'ün anti-apoptotik etkisi belirlendi (p value 0,0070). Protein seviyesinde 200μM Timol uygulaması, kontrol grubuna kıyasla apoptotik Cyt-c ekspresyonunda anlamlı kat değişimi göstererek D-U-87 hücresini apoptozdan koruduğu saptandı ($p <0,0001$).

Yapılan çalışmalar sonrasında D-U-87 hücresinde $A\beta_{25-35}$' in intrinsik apoptoz yolağı üzerinden hücre canlılığını azalttığını gösterdik. $A\beta_{25-35}$' in doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığını ve devamında Timol uygulanmasıyla hücre canlılığında artış sağlayarak apoptozdan koruduğunu saptadık.

Anahtar kelimeler: Alzheimer hastalığı, Apoptoz, $A\beta_{25-35}$ fragmanı, Timol.

Tezin sayfa adedi: 81

Danışman: Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ

INVESTIGATION OF THE NEUROPROTECTIVE POTENTIAL OF THYMOL ON AN ALZHEIMER'S MODEL CREATED WITH $A\beta_{25-35}$ IN GLIOBLASTOMA CELL LINE

Master Thesis

Beste BALBAL

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Department of Medical Biology

ABSTRACT

Neurodegenerative diseases are characterized by neuronal death and are found in the disease group associated with advanced age risk. Over the years, due to the aging population, the number of individuals affected by neurodegenerative diseases is increasing, posing difficulties in treatment. Alzheimer's disease (AD), defined as a neurodegenerative disease, is the primary cause of dementia affecting approximately 45 million people worldwide and leading to death. AD is associated with abnormal accumulation of extracellular amyloid beta (Aβ) fibrils in brain parenchyma and vascular walls, resulting in phosphorylated Tau protein aggregation in neurons. Apoptosis in the brain can be triggered through intrinsic and extrinsic pathways and is associated with activation or inhibition of many gene families.

Similarly to accumulations in the brains of AD patients, synthetic $A\beta_{25-35}$ induces aggregation and exerts toxic effects *in vitro*.

Thymol is a colorless crystalline monoterpenoid phenol. It is one of the secondary metabolites found in thyme species. It has been used in traditional medicine for centuries and possesses pharmacological properties such as antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, antitumor, and free radical scavenging effects. Due to its lipophilic nature, it crosses the blood-brain barrier and accumulates in brain tissue, positively affecting the function of ion channels and neurons.

The aim of this study was to investigate the potential neuroprotective effect of Thymol in a model of Alzheimer's disease induced by $A\beta_{25-35}$ using differentiated U-87 cells (D-U-87 cells) with cholinergic neuron characteristics.

Within the scope of the study, confirmation of the acquisition of cholinergic neuron characteristics in U-87 cells through Sodium Butyrate (SB) was achieved by assessing the expression changes of the cholinergic neuron biomarker ChAT at the protein level using Western blot experiment. 2mM SB treathment significantly increased the protein level of ChAT ratio compared to the control, indicating the acquisition of cholinergic neuron characteristics ($p < 0.0001$). In differentiated U-87 cells with cholinergic neuron characteristics (D-U-87 cells), alterations in the expression of genes involved in the intrinsic apoptotic pathway were examined in the model of Alzheimer's disease (AD) induced in these cells. The expression changes of Bcl-2, Bax, and Cyt-c at the mRNA level were determined using RT-qPCR experiment. mRNA level, treatment of 1 µM $A\beta_{25-35}$ showed a significant increase in the anti-apoptotic Bcl-2/Bax ratio compared to the control group, indicating induction of apoptosis ($p < 0.0001$). Treatment of 1 µM $A\beta_{25-35}$ + 200 µM Thymol at the mRNA level showed a significant increase in the anti-apoptotic Bcl-2/Bax ratio compared to the 1 µM $A\beta_{25-35}$ group, indicating protection against apoptosis (p value 0.0014). Application of 1 µM $A\beta_{25-35}$ showed a significant increase in apoptotic Cyt-c expression compared to the control group at the mRNA level, indicating induction of apoptosis ($p < 0.0001$). The expression changes of Bax and Cyt-c at the protein level were determined using Western Blot experiment. Protein level, treatment of 1 µM $A\beta_{25-35}$ + 200 µM Thymol showed a significant decrease in pro-apoptotic Bax expression compared to the control group, confirming the anti-apoptotic effect of Thymol (p value 0.0004). Treatment of 1 µM $A\beta_{25-35}$ + 200 µM Thymol showed a significant decrease in pro-apoptotic Bax expression compared to the 1 µM $A\beta_{25-35}$ group, further confirming the anti-apoptotic effect of Thymol (p value 0.0070). Treatment of 200 µM Thymol at the protein level showed a significant decrease in apoptotic Cyt-c expression compared to the control group, indicating protection of D-U-87 cells from apoptosis ($p < 0.0001$).

After conducting the studies, we demonstrated that $A\beta_{25-35}$ reduces cell viability through the intrinsic apoptotic pathway in D-U-87 cells. We found that $A\beta_{25-35}$ decreases cell viability in a dose-dependent manner and subsequently observed that treatment with Thymol increases cell viability and protects against apoptosis.

Keywords: Alzheimer's disease, Apoptosis, $A\beta_{25-35}$ fragment, Thymol.

Thesis page number: 81

Supervisior: Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nörodejeneratif hastalıklar, merkezi sinir sistemi veya periferik sinir sistemindeki nöron kaybının gerçekleşmesiyle birlikte heterojen nörolojik bir bozukluktur. Alzheimer Hastalığı (AH), merkezi sinir sisteminde biliş ve hafızanın kötüleşmesiyle ilişkili olarak bunamaya yol açan ilerleyici nörodejeneratif hastalıktır. AH' nin patofizyolojisinde ayırt edici iki temel özellik bulunmaktadır; bunlar, amiloid beta (Aβ) proteininin hücre dışında birikmesiyle oluşan Aβ plakları ve hiperfosforile Tau proteini tarafından ortaya çıkan nörfibriler yumaklardır. Aβ proteini, beyin nöronları, vasküler kan hücreleri ve daha az ölçüde astrositler tarafından yaygın olarak eksprese olmaktadır. Aβ, lokalizasyon olarak nöronal sinapslarda yoğunlaşan transmembran Amiloid öncü proteininden (APP) meydana gelmekte olup APP' nin dört kDA' lık bir parçasıdır. Sentetik $A\beta_{25-35}$, AH' li kişilerin beyinlerindeki birikimlere benzer şekilde *in vitro* ortamda agregatların oluşmasına-toksik etki göstermesine neden olmuştur. AH, dünya genelinde yaklaşık 45 milyon bireyi etkileyen demansın birincil nedeni olup dünya çapında beşinci önde gelen ölüm sebebi olarak sıralanmaktadır ve tüm demans vakalarının % 60-70' ini oluşturmaktadır. Ayrıca AH, Global Burden of Disease Study' e göre önde gelen ölüm nedenleri arasında en hızlı artış gösteren hastalıklardan birisidir. Genel olarak, 65 yaş ve üzeri bireylerin yaklaşık % 10' unda görülmektedir. AH' nin bireylerde görülme sıklığı ve şiddeti nedeniyle, ilgili hastalığın tedavisine yönelik yeni terapötik hedeflerin/stratejilerin geliştirilmesi amacıyla ülkemizde ve dünyada birçok *in vitro/in vivo* araştırılmalar yapılmaktadır. Yapılan araştırmalar incelendiğinde, özellikle Aβ ve tau ile ilişkili moleküler düzeyde pek çok veri elde edilmiş olup amiloid hipotezi en yaygın kabul gören hipotez olarak ifade edilmektedir.

Nöronal ölüm; morfolojik ve biyokimyasal olarak farklılık gösteren nekroz veya apoptoz ile gerçekleşmektedir. Apoptoz; tip bir programlı hücre ölümü olarak tanımlanmakta ve memelilerde ekstrinsik (dışsal) ve intrinsik (içsel) yolak olmak üzere iki farklı yolla başlayan hücre ölümü türüdür.

Gliomalar, en yüksek insidansa ve mortaliteye sahip olan primer beyin tümörü olarak ifade edilmektedir. Glioblastoma multiform (GBM), derece IV tümör olup en sık görülen malign gliomadır. U-87MG hücresi; insan glioblastoma-astrositom hücre

hattıdır. U-87 hücresi; erkek GBM hastasının malign glioma dokusundan izole edilen epitel morfolojisine sahip hücrelerdir ve sinirbilim çalışmalarında kullanılmaktadır.

Timol, kekik türleri arasında en önemli besin bileşenlerindenir ve renksiz kristal monoterpen fenol olarak tanımlanmaktadır. Timol lipofilik yapısı nedeniyle, kan beyin bariyerini kolayca geçerek beyin dokusunda biriktiği için iyon kanallarının ve nöronların işlevine etki edebilir özelliğe sahiptir. Ayrıca asetilkolin esteraz inhibitör aktivitesinden dolayı AH tedavisi için yeni terapötik hedef olabileceği ifade edilmektedir.

Sodyum bütirat (SB), histon deasetilaz inhibitörüdür. SB, hücre proliferasyonunu inhibe etme, hücre döngüsünün durdurulmasını indükleme ve hücre farklılaşmasını destekleme özelliklerine sahiptir. U-87 hücrelerine kolinerjik nöron karakterinin kazandırılması bir diğer ifadeyle kolinerjik nörona farklılaşabilmesi için kullanılan bir inhibitördür.

Yapılan çalışmalarda AH' nin ilerlemesinde birçok sinyal molekülünün ilişkili olduğu ancak hastalığın altında yatan moleküler mekanizmaların ve görevli olan sinyal yolaklarının detaylı olarak tanımlanamadığı belirtilmektedir. Son yıllarda elde edilen veriler ışığında apoptozun; Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalıkları gibi farklı nörodejeneratif bozukluklarda nöronal ölüme neden olabileceği gösterilmiştir. Timol'ün, demans modelinde bilişsel aktiviteleri arttırdığı ancak bu durumu hangi mekanizma aracılığı ile gerçekleştirdiği tam olarak açıklanamamıştır.

Literatürdeki bu veriler ışığında çalışmamızda *in vitro* insan glioblastoma hücre hattı olan U-87 hücre hattına SB ile kolinerjik nöron karakteri kazandırıldıktan sonra $A\beta_{25-35}$ ile oluşturulan AH modelinde Timol'ün potansiyel nörokoruyucu etkisinin incelenmesi amaçlandı. Çalışma kapsamında U-87 hücresine SB ile kolinerjik nöron karakteri kazandırıldığının doğrulanması amacıyla kolinerjik nöron biyobelirteci olan ChAT' ın protein düzeyindeki ifade değişimi Western blot deneyi ile belirlendi. Kolinerik nöron karakteri kazandırılmış U-87 hücresinde (D-U-87 hücresi) oluşturulan AH modelinde intrinsik apoptoz yolağında görevli genlerdeki mRNA ve protein seviyesindeki ifade değişimleri incelendi. Bcl-2, Bax ve cyt-c' nin mRNA

seviyesindeki ifade değişimleri RT-qPCR deneyi ile belirlendi. Bax ve Cyt-c' nin protein düzeyindeki ifade değişimleri Western blot deneyi ile belirlendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar

Nörodejeneratif hastalıklar, nöronal ölüm ile karakterize olarak beyin fonksiyonlarının giderek azalmasına yol açan yaşa bağlı hastalık grubudur. Tedavi edilmesi güç olan bu hastalık grubu bilişsel bozulma ve/veya lokomotif fonksiyonların kaybını da içeren farklı klinik belirtilerle ilişkilidir. Dünya genelinde nüfusun yaşlanmasına bağlı olarak nörodejeneratif hastalıklardan etkilenen kişi sayısının artması nedeniyle sağlık sistemi üzerindeki yük artmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklarda yaşa bağlı gelişen demans terimi; AH, vasküler demans, frontotemporal demans, karışık demans ve Lewy cisimcikleri ile demans dahil olmak üzere bilişsel eksiklikler ile ilişkilendirilen bir dizi durumu tanımlamak için kullanılmaktadır (1). Nörodejeneratif hastalıkların etiyolojisinin ve patogenezinin karmaşık olması, süreç içerisinde tedavi amacıyla kullanılan ilaçların etkinliğinin sınırlı olmasına bağlanmaktadır. Nörodejeneratif hastalıkların risk faktörleri arasında yaşlanmanın yanı sıra, genetik faktörler ve çevresel etmenler de bulunmaktadır. Bu sebeple, hastalığa yol açan hücresel-moleküler mekanizmalar ve ilgili terapötik ajanları belirlemek amacıyla daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (2–5).

2.2. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi

AH, dünya genelinde yaklaşık 45 milyon kişiyi etkisi altına alan demansın birincil nedenidir ve demansın birincil ölüm sebebidir (6). Klinik olarak tanısı konulan AH prevalansı yaş ile doğru orantılı olarak artış göstermektedir. Ayrıca prevalans çalışmalarında AH' nin erkeklere kıyasla kadınlarda daha yüksek oranda görüldüğü tespit edilmiştir (7). Global Burden of Disease Study'e göre AH, önde gelen ölüm sebepleri içerisinde en hızlı artış gösteren hastalıklardan birisidir. AH, 65 yaş ve üzeri kişilerin yaklaşık % 10' unda görülmektedir (8). 2050 yılına kadar Doğu Asya ülkelerinde 36,5 milyon ve Avrupa'da 18,9 milyon demans hastası olması öngörülmektedir (9).

2.3. Alzheimer Hastalığının Risk Etmenleri

2.3.1. Yaşlanma

Yaşlanma, AH' nin en önemli risk faktörü olarak belirtilmektedir çünkü daha genç kişilerde AH görülme sıklığı düşüktür ve vakaların çoğunluğunu 60 yaş ve üzeri bireyler oluşturmaktadır (10,11). Yaşlanma sürecinde beyin ağırlığında ve hacminde azalma, NFT ve senil plak birikimi, ventriküllerde genişleme, spesifik alanlarda sinaps ve dendritlerde kayıp olur (12). Ayrıca bu süreçte kolesterol dishommeostazı, mitokondri disfonksiyonu, glikoz hipometabolizması, depresyon ve bilişsel fonksiyonlarda aksaklıklar gerçekleşebilir. Ancak ifade edilen bu durumlar sağlıklı bir yaşlılık sürecinde de ortaya çıkabildiğinden erken AH vakalarının ayırt edilmesinde güçlük yaşanabilmektedir (13,14).

2.3.2. Genetik Faktörler

AH riskinin %70' inin genetik faktörlerden kaynaklanabileceği öne sürülmektedir (15). Erken başlangıçlı AH, 60-65 yaşından önce ortaya çıkar ve otozomal dominant olarak kalıtılır. Otozomal dominant erken başlangıçlı AH' na, Presenilin-1 (PSEN-1), Presenilin-2 (PSEN-2) ve APP gen mutasyonları/kopyaları yol açabilir. Ancak geç başlangıçlı AH'de esas olarak, Apolipoprotein E (ApoE) genindeki polimorfizm sebep olur; özellikle de ε4allel varlığı ile ilişkilendirilmektedir (16,17).

PSEN-1, 14q24.2 kromozomunda konumludur ve oluşan mutasyonlar otozomal dominant erken başlangıçlı AH vakalarının % 70-80'ini kapsamaktadır. Ve günümüze kadar, AH ile bağlantılı 247 tane patojenik PSEN-1 mutasyonu belirlenmiştir (18,19). PSEN-1 geninde oluşan mutasyonlar, $A\beta_{42}$ ekspresyon düzeyinin artmasına, $A\beta_{40}$' ın ekspresyonunun azalmasına veya $A\beta_{42}$:$A\beta_{40}$ oranında artışa neden olur. Böylece beyin dokusunda Aβ birikimine yol açar (20,21).

PSEN-2, 1q31-q42 kromozomunda konumludur ve burada oluşan mutasyonlar AH vakalarının %5' ini oluşturmaktadır. Günümüze kadar PSEN-2 geninde 17 tane patojenik mutasyon tanımlanmıştır (19,22).

APP ise 21q21.3 kromozomunda konumludur ve erken başlangıçlı otozomal dominant AH' nin % 15' i ile bağlantılıdır. Ayrıca günümüze kadar 27 tane patojenik APP mutasyonu belirlenmiştir (19,22).

2.3.3. Metal İyonları

Metal iyonları, nöronal ölüm, oksidasyon, kalsiyum homeostazı süreçlerinde ve senil plakların oluşumunda görevlidir. Günlük yaşantımız boyunca AH için potansiyel risk barındıran eser elementlere maruz bırakılmaktayız. Bu eser elementlere örnek olarak, farklı kaynaklardan elde edilen alüminyum, demir, bakır ve kurşun örnek verilebilir (23). Özellikle alüminyum, AH' li bireylerin beyinlerinde yüksek oranda bulunan nörotoksin olduğundan AH epidemiyolojisi açısından önemlidir. Alüminyum, bilişsel işlev bozukluğuna, nörofibriler yumak oluşumuna, Aβ birikimine yol açar. Ayrıca nöronlarda apoptozu tetikleyerek nörodejenerasyona sebep olur (24,25).

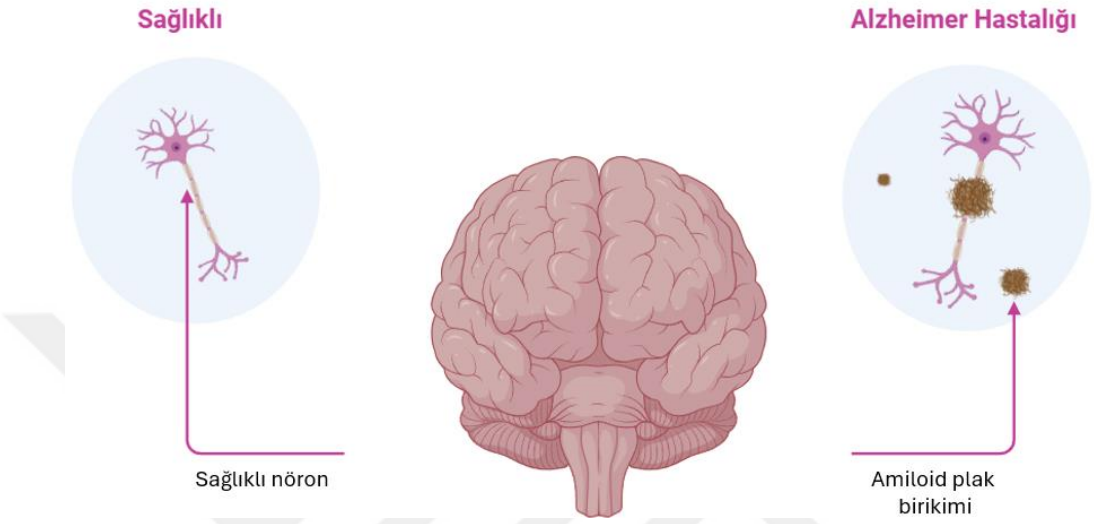
2.3.4. Kardiyovasküler Hastalıklar

Yaş artışıyla ortaya çıkan atriyal fibrilasyon, inme, koroner kalp hastalığı ve kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklar (cardiovascular disease, CVD), AH patolojisinin artışına yol açabilir. Kronik hipertansiyon nedenli tekrarlayan hipoksi iskemisi, Aβ üretimini ve birikimini indükler. Ayrıca CVD' nin neden olduğu serebral hipoperfüzyon da, nöronal hasarı hızlandırarak AH patolojisini ilerletir (26,27).

2.4. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi

AH' nin temel patolojik özellikleri; serebral korteks ve hipokampüste çok sayıda senil plakların birikmesi, spesifik beyin bölgelerinde işleyen nöronların ve sinapsların kaybı ve asetilkolin eksikliğidir (28). AH' nin klinik bulguları, kişinin yaşam kalitesinin zaman içerisinde kötüye gitmesine neden olan bilişsel fonksiyonların ve davranışsal becerilerinin kaybıyla karakterize edilmektedir. 1992 yılından günümüze kadar AH' nin etiyolojisi ve patogenezi amiloid kaskad hipotezi ile açıklanmıştır. Bu hipoteze göre, APP' den kaynaklanan patogenetik Aβ proteininin ve nörofibrillerin (NFT' lerin) birikmesini, hücre ölümünü ve bunlara bağlı olarak demans tetiklenir. Hücre dışı Aβ fibrillerinin beyin parankim ve damar duvarlarında toplanması sonucunda nöronlarda fosforile edilmiş Tau proteininin anormal birikimiyle

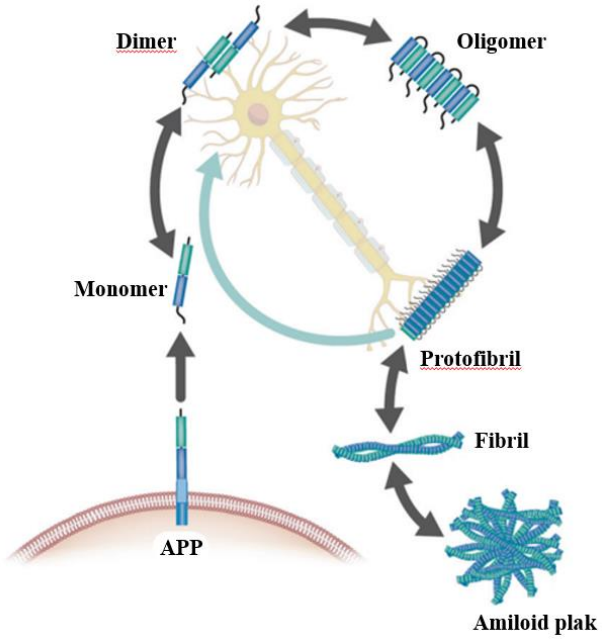
ilişkilendirilmektedir (29,30). Beyinde anormal Tau proteini ve Aβ birikmesinin, semptomların görülmesinden 10-20 yıl öncesinde başladığı tahmin edilmektedir. Hastalığın geriye kalan ortak özellikleri ise; sinaptik hasar, sinapslarda oluşan yapısal değişiklikler, sinaptik kayıp ve işlev bozukluklarıdır (31,32).



Şekil 1. Sağlıklı ve Alzheimer hastalığı gerçekleşen insan beyni (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

2.4.1. Amiloid Beta

Aβ proteini; beyin nöronları, vasküler kan hücreleri ve daha az ölçüde astrositler tarafından eksprese edilmektedir. Aβ, sinir büyümesi ve onarımı için nöronal membranda bulunan APP' nin β ve γ sekretazlar aracılığıyla bölünmesi sonucu oluşmaktadır. Oluşan Aβ, 38-43 aminoasit uzunluğunda peptittir ve 4 kDa büyüklüğündedir (33,34). Sağlıklı beyinde Aβ, nörogenez ve sinaptik plastisitede fizyolojik işleve sahiptir (35). APP' nin sekretazlar tarafından bölünmesi sonucu ilk olarak çözünür monomer formunda oluşan Aβ, AH için nöropatolojik özellik olan amiloid plak formuna dönüşene kadar geçen süreçte sırayla dimer, oligomer, profibril ve fibril olarak ara agregasyon durumunda bulunabilir. Ancak her bir aşamada retrograd hareket de olabilmektedir (Şekil 2) (9).

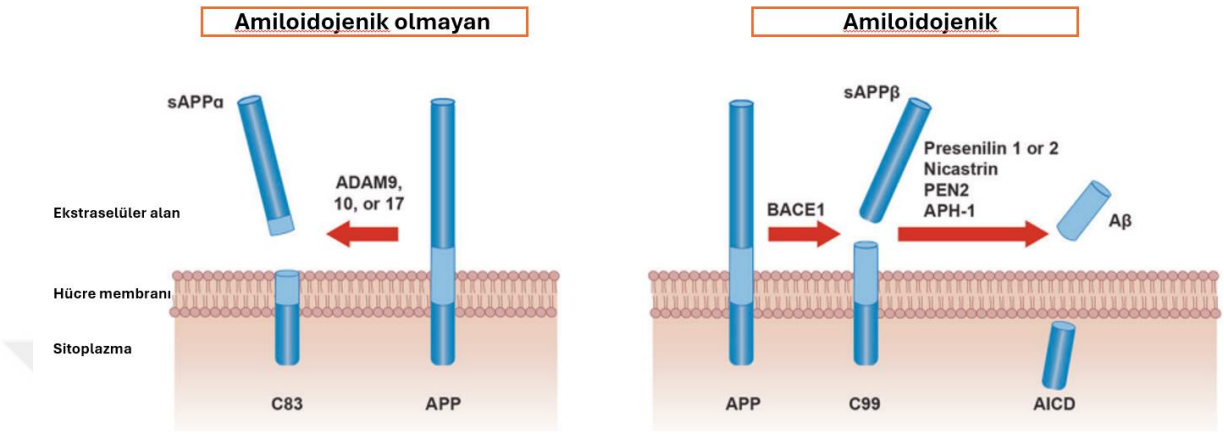


Şekil 2. Aβ döngüsü: Aβ agregasyon türleri ve retrograd hareketi (9).

2.4.2. Amiloid Hipotezi

Amiloid hipotezine göre Aβ peptitlerinin aşırı üretimi, AH' nin birincil nedeni olup etkilenen beyin bölgelerinde nöron kaybına ve sinaptik işlev bozukluğuna yol açar (33,34). APP; transmembran proteindir. Ve α, β ve γ sekretazların, amiloidojenik yol ve amiloidojenik olmayan (salgılayıcı) yol olmak üzere iki ana yolakta görev yapmasıyla ile parçalanır. AH olan kişilerde denge, amiloidojenik yola doğru kayar. APP, amiloidojenik yolda zara bağlı β ve γ sekretazların etki etmesiyle oluşur. Bu yolakta APP, Asp1 bölgesinde β-APP parçalayıcı enzim-1 (BACE1) β-Sekretaz tarafından membrana bağlı C-terminal fragmanı β (CTFβ, C99) ve N-terminal sAPPβ'ye ayrılır. CTFβ ise, γ-sekretazların aracılığıyla bölünür ve hücre dışı $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$ ve APP intrasellüler domaini (AICD) oluşturur. En yaygın iki Aβ türü olan $A\beta_{1-40}$ % 90 oranında oluşurken, $A\beta_{1-42}$ %10 oranında üretilir. Amiloidojenik olmayan yolakta ise APP, farklı biyolojik süreçlerde görevli bir metaloproteaz olan α-sekretaz (metallopeptidaz domain 10 (ADAM10)) ile bağlanır ve zara bağlı C-terminal fragmanı α (CTFα, C83) meydana gelir, daha sonra çözünür N-terminal fragmanı sAPPα serbest kalır. CTFα, nöronal düzenlemede görevli AICD oluşturmak amacıyla γ-sekretaz aracılığıyla bölünür (Şekil 3) (9,32,36–38). AH' li bireylerde Aβ birikimi dengesizdir ve önce amiloid oligomerleri, protofilamentleri, fibrilleri ve beynin

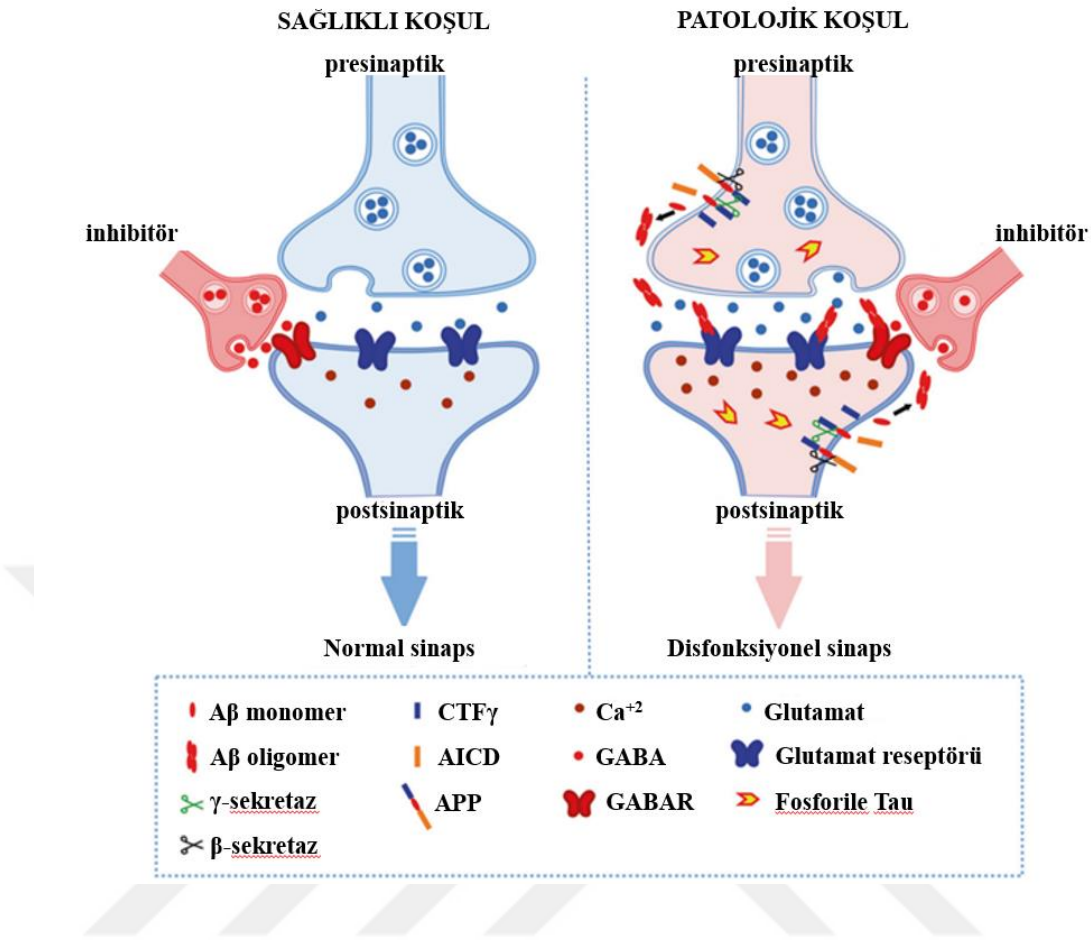
nöropilinde amiloid plakları oluşur. Çözünmemiş Aβ oligomerleri oluşan fibrillere/paklara kıyasla daha küçük ve dinamik yapıda olduklarından daha şiddetli nörolojik hasara yol açar (35,38).



Şekil 3. Amiloidojenik ve amiloidojenik olmayan yol (9).

Oluşan amiloid paklar, nöronal membranda bulunan N-metil-D-aspartat reseptörü (NMDAR); nikotinik asetilkolin reseptörü (nAChR), AMPA reseptörü (AMPAR) ve muskarinik asetilkolin reseptörünü (mAChR) bloke ederek sinaptik iletimin bozulmasına yol açar (39).

Oligomerik Aβ ve fosforile Tau, nöronal toksisiteyi indükleyerek sinaptik kayıp ve işlev bozukluğuna neden olur. Normal koşullarda (sağlıklı koşul), GABAerjik ve glutamaterjik nöronların görev aldığı inhibitör ve uyarıcı bağlantılar arasında denge bulunmaktadır. Patolojik durumda ise APP' nin Asp1 bölgesinde β-sekretaz tarafından fazla işlenmesi, monomer ve oligomer formdaki Aβ' nın artışına yol açar. Normal düzeyden fazla üretilen Aβ oligomerleri, glutamaterjik/GABAerjik arasındaki dengeyi bozarak Uzun süreli potansiyel artışı- iletiminin zayıflamasına neden olur ve nöronal aktivitede artış ile sonuçlanır. Ayrıca Aβ oligomerleri, Tau' nun aksondan somatodentritik bölgeye geçişine neden olarak Tau fosforilasyonunu arttırır, bu durum da nöronal toksisiteye ve sinaptik fonksiyon bozukluğuna yol açar (Şekil 4) (32).



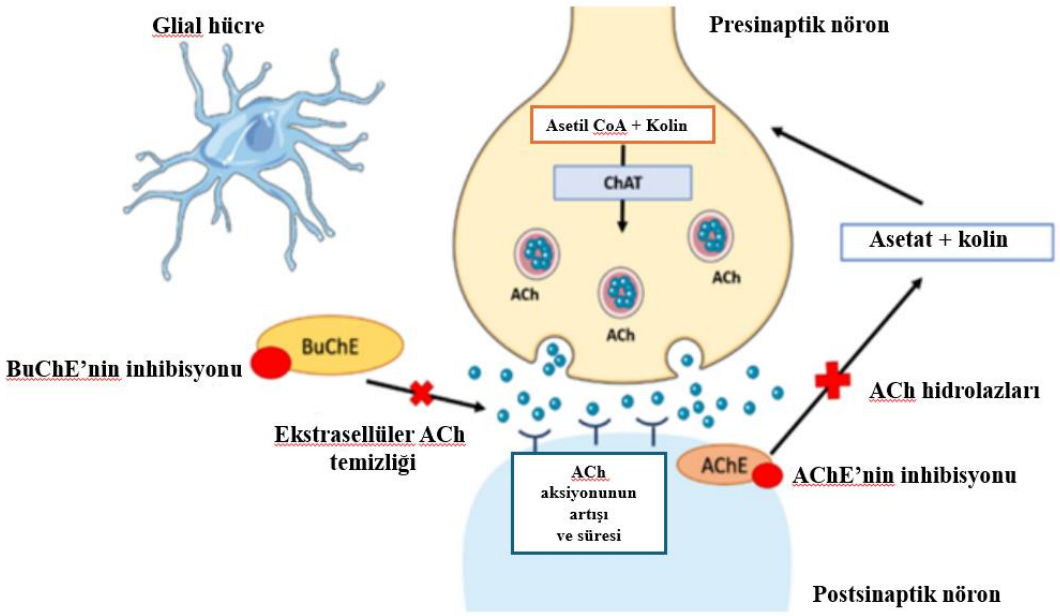
Şekil 4. Oligomerik Aβ ve fosforile Tau, nöronal toksisiteyi indükleyerek sinaptik kayıp ve işlev bozukluğuna neden olur (32).

2.4.3. Tau Hipotezi

Tau proteini, nöronlardaki hücresel ürünlerin taşınması amacıyla köprü oluşturan mikrotübüllerin stabilizasyonunda görevlidir. Nöron hücrelerinde ve az miktarda glial hücrelerde eksprese olan aksonal proteindir. Çekirdekte, plazma membranında, mitokondride, sinapslarda ve dendritlerde lokalize olmaktadır (40,41). Tau proteinini patolojik agregasyonu, nöroinflamasyona, sinaptik işlev bozukluğuna ve mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olur (42). Aβ' nın oluşturduğu reaktif oksijen türleri (ROT), Tau' nun hiperfosforile olmasına neden olur. Hiperfosforile olan Tau, mikrotübülden ayrılarak, mikrotübülün dengesinin bozulmasına ve hücre içerisindeki Tau proteininin oligomerizasyonuna neden olur. Tau' nun oligomerizasyonu sonucunda, NFT oluşarak nöronun apoptoza gitmesin yol açar (39).

2.4.4. Kolinerjik Hipotez

Beyinde asetilkolin (ACh); öğrenme, dikkat, duyusal bilgi ve hafıza gibi farklı fizyolojik olaylarda görevlidir (43). Bazal ön beyin kolinerjik sistemi (BFCS), prefrontal korteks, entorhinal korteks, hipokampüs ve amigdalaya projekte olmaktadır. BFCS, farklı nörotransmitterler üreten küçük çekirdeklerden oluşmaktadır. Asetilkolin sentez aşamasındaki son enzim olan kolin asetil transferazı (ChAT) barındıran yapılar arasında Meynert bazalis çekirdeği, dikey ve yatay diyagonal bant çekirdekleri medial septum ve genişletilmiş amigdala bölgeleri bulunmaktadır. Aβ'nın neden olduğu BFCS fonskiyon bozukluğu, AH'nin erken patofizyolojisidir (44,45). AH'de kolinerjik nöronların dejenerasyonu sonucunda, ChAT ekspresyon düzeyi azalır, kolinerjik atrofi, hafıza kaybı ve bilişsel işlev kaybı gerçekleşir. Bazal ön beyin kolinerjik nöronlarında meydana gelen kolinerjik sistemin fonksiyonunun bozukluğu, Aβ'dan kaynaklanmaktadır (44–46). ACh, uyarıcı nörotransmiterdir ve AH' li kişilerde bu sinyalin işlevi bozulmuştur. Bu nedenle ACh eksikliği, bilişsel işlevlerin süreç içerisinde ilerleyici ve kritik derecede kaybına neden olmaktadır (28). AH' de ACh aktivitesinde azalma olurken kolinerjik sinapslarda asetilkolinin fizyolojik rolünün sonlandırılmasında görevli olan Asetilkolin esteraz (AChE) enziminin düzeyinde artış olur. Bu enzimlerin aktivite düzeyinin değişmesi nedeniyle, AChE aktivasyonunun inhibe edilmesi, ACh düzeyinin fizyolojik seviyeye getirilmesini ve merkezi kolinerjik fonksiyonun iyileşmesini sağlar; bu sebeple AH' li kişilerde tedavi için kritik bir hedeftir (Şekil 5) (47).

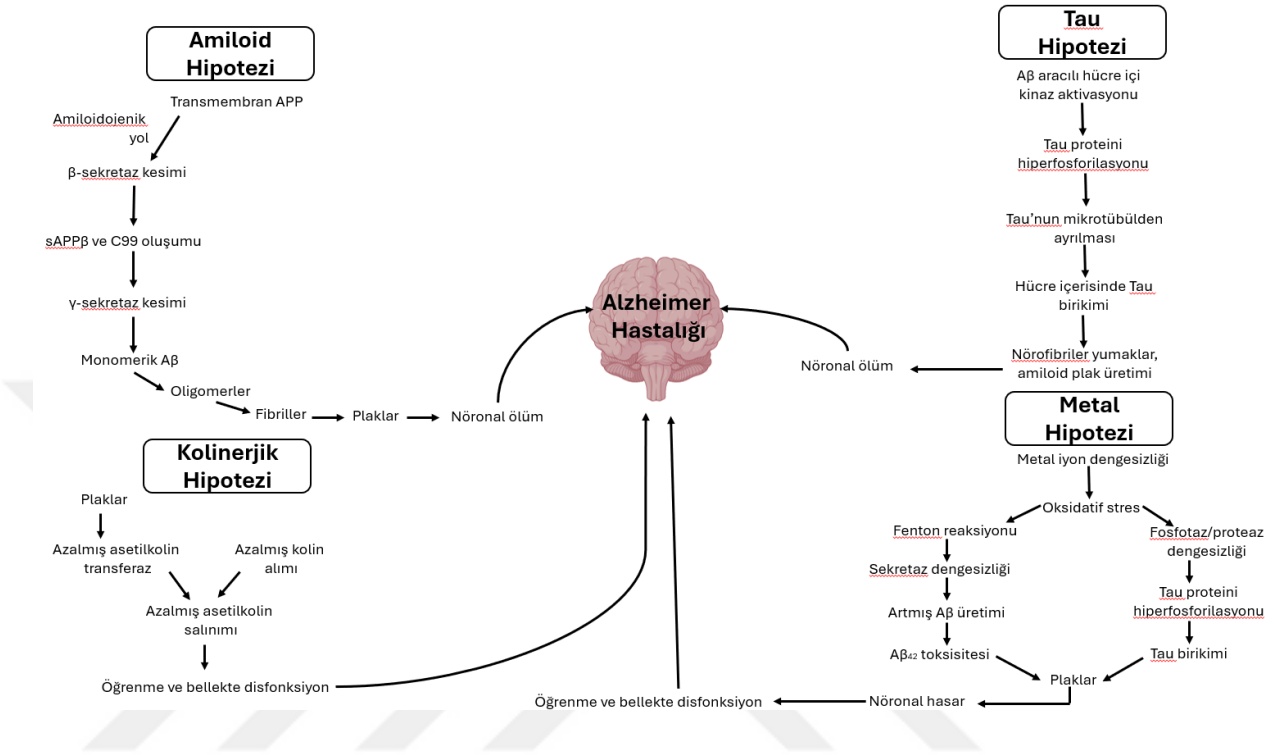


Şekil 5. AH' nin patogenezinde ve tedavisinde kolinerjik hipotezi (47).

2.4.5. Metal Hipotezi

AH' nin patogenezi ile ilişkili bir diğer hipotez ise geçiş metali iyonlarının homeostazıdır (48). Çinko (Zn), manganez (Mn) ve demir (Fe) AH patogenezi ile ilişkili geçiş metali iyonlarıdır (49–51). Zn; nörotransmisyon, nöronal sinyalleşme ve hafıza işlevi gibi süreçlerde görevlidir. Zn, redoks aktivitesine sahip olmamasına rağmen hücre dışı sıvı içerisinde fazla miktarda bulunur. Ve bu durum nörotoksisitenin artmasına neden olduğundan AH gibi nörodejeneratif hastalıklar ile bağlantılıdır. Ayrıca Zn, AChE aktivitesinin artışına, glutatyon, süperoksit dismutaz ve katalaz enziminin aktivitesinin azalmasına neden olur (28,52). Mn; bilişsel işlev ve beyin gelişimi gibi hayati süreçlerde gereklidir. Ancak, bazal ganglionlarda, frontal lobda, olfaktör bulbda ve beyincikte birikir. Beyin içerisinde Mn'nin yarı ömrü ve eliminasyonu diğer organlara kıyasla yavaştır ve bu nedenle farklı bölgelerde birikimi sonucunda nörotoksik etkiye yol açar. AH' de de Mn homeostazı bozulduğundan Aβ birikimini indükler (50,53,54). Fe, endojen metal iyonudur ve beyinde birçok fizyolojik aktivitede görevlidir. Temel olarak ferritin, laktoferrin, transferrin ve transferrin reseptörü, hepsidin ve ferroportin gibi demir düzenlenmesinde görevli proteinlere bağladır. Ancak Fe dengesizliği durumunda, AH' de nöronal ölümün ilk

sebeplerinden biri olur. Bununla birlikte Fe, amiloid kümelerinde birikir ve beta amiloid peptidin toksisitesini yükselterek amiloid plak agregasyon oluşumunu indükler (49,55,56).



Şekil 6. AH patofizyolojisindeki hipotezlerin özeti (41).

2.5. Aβ25-35 Peptit Fragmanı

AH'li kişilerin beyinlerindeki birikimlere benzer şekilde sentetik $A\beta_{25-35}$, *in vitro* ortamda agregatların oluşmasına-toksik etki göstermesine neden olmuştur (57).

2.6. Sinir Sistemi

2.6.1. Nöron

Nöronlar arasında doğru iletişimin sağlanabilmesi için sinapslara ihtiyaç duyulmaktadır. Sinapslar, nöronlar arasındaki elektriksel ve kimyasal sinyallerin iletilmesini sağlar. Bu ileti, farklı nörotransmitterların bulunduğu keseciklerin salgılandığı presinaptik alanda başlar. Sinapslar, dinamik formdadır ancak sayılarını, yapılarını ve işlevlerini değiştirerek nöronlar arasındaki sinaptik bağlantıların güçlenmesine veya zayıflamasına neden olur. Aβ ve Tau, sinaptik fonksiyon bozukluğuna ve nörodejenerasyona neden olur. Bu nedenle, sinaptik kayıp ve işlev

bozukluğu AH ile ilişkilendirilmiştir (32). Özetle AH' deki sinaptik kaybın sebebinin daha iyi anlaşılması ve tanımlanması, yeni terapötik hedeflerin bulunması açısından önem arz etmektedir.

Kolinerjik sistemin bir parçası olan ve ACh kullanımıyla karakterize edilen bazal ön beyin benzeri kolinerjik nöronlar (BFCN'ler), dejenere olan ilk nöron tipidir (58). Bazal ön beyin kolinerjik sinyali; öğrenme ve hafıza süreçlerindeki kortikal ve hipokampal devre dinamiklerinin modülasyonunda görevlidir. Ve bu sinyalin işlevini gerçekleştirememesi sonucunda AH'de bilişsel gerilemeye yol açmaktadır (59).

2.7. Glioblastoma Multiform

Glioblastoma multiform (GBM, malign glioma) en yaygın ve agresif primer beyin tümörü olup malign merkezi sinir sistemi tümörlerinin % 48,6' sını oluşturmaktadır (60). U-87MG hücresi; insan glioblastoma-astrositom hücre hattıdır (61). U-87 hücresi; erkek GBM hastasının malign glioma dokusundan izole edilen epitel morfolojisine sahip hücrelerdir. U-87 hücre hattı, sinirbilim ve immünoloji çalışmalarında kullanılmaktadır (62).

2.8. Sodyum Bütirat

Sodyum bütirat (SB), histon deasetilaz inhibitörüdür. SB, hücre proliferasyonunu inhibe etme, hücre döngüsünün durdurulmasını indükleme ve hücre farklılaşmasını destekleme özelliklerine sahiptir. U-87 hücrelerine kolinerjik nöron karakterinin kazandırılması bir diğer ifadeyle kolinerjik nörona farklılaşabilmesi için kullanılan bir inhibitördür (63).

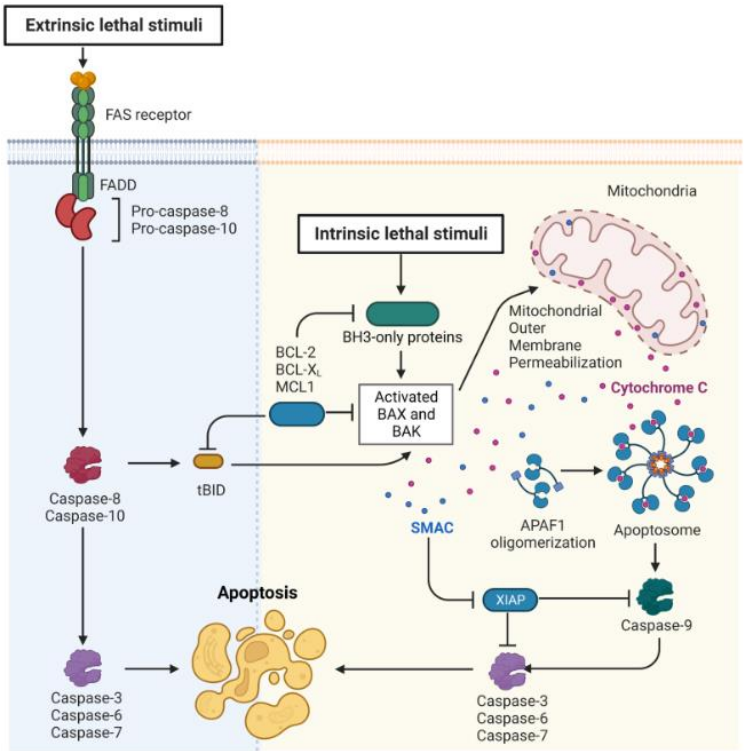
2.9. Hücre Ölümü

Hücre ölüm tipleri; apoptoz, nekroz, otofaji, nekroptoz, ferroptoz ve piroptoz olmak üzere 6 çeşittir (64).

Programlanmış hücre ölümü - Programmed cell death (PCD), doku homeostazının sağlıklı olarak devam ettirilmesi, çok hücreli organizmalarda hasarlı, enfekte veya eskimiş hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması için gereklidir. İlk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından PCD süreci 'apoptoz' kelimesi kullanılarak ifade

edilmiştir (64). Morfolojik olarak hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmantasyonu, hücre içi organellerle apoptotik cisimcikler oluşturma ile karakterizedir (65). Nöral öncü hücreler (Neural precursor cells, NPC'ler), farklılaşmış post-mitotik nöronlar ve glial hücreler dahil olmak üzere farklı hücre popülasyonlarını etkiler. Sadece doğru boyut ve şekle sahip olan, aksonları ve nöritleri ile uygun bağlantıları kurmuş hücrelerin hayatta kalmasını sağlar (64).

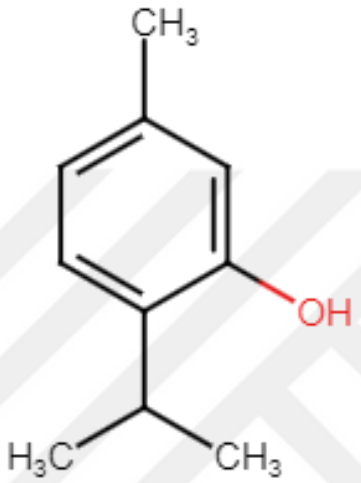
Apoptoz süreci intrinsik ve ekstrinsik yol olmak üzere iki farklı şekilde aktive olur. İntrinsik yolak, mitokondriyal yolaktır ve anti ve pro – apoptotik B hücreli lenfome -2 (BCL-2) gen ailesi tarafından düzenlenmektedir (64,65). Sağlıklı hücrelerde intrinsik yolakta, anti-apoptotik proteinler (BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BCL-W ve A1/BFL1), hücre ölümü proteinleri olan BAX ve BAK' ın temel efektörlerini engelleyerek hücrenin hayatta kalmasını sağlar (66). Ekstrinsik yolak ise ölüm reseptörlerinin görev aldığı yoldur ve tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) süper ailesi üyelerinin spesifik ligandlarla bağlanması sonucunda aktive olur (Şekil 7) (64).



Şekil 7. Apoptozun moleküler mekanizması.

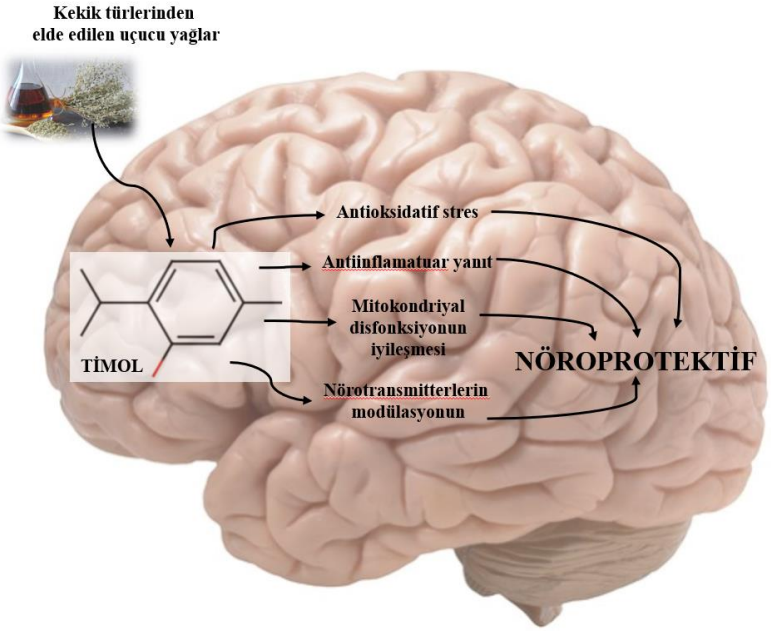
2.10. Timol

Timol'ün, kimyasal olarak isimlendirilmesi 2-izopropil-5-metilfenoldür. Timol, renksiz kristal monoterpen fenoldür. Kekik türleri içerisindeki sekonder metabolitlerden birisidir. Yüzyıllardır geleneksel tıpta kullanılmıştır ve antioksidan, anti-inflamatuar, antibakteriyel, antitümör, serbest radikal süpürücü gibi farmakolojik özelliklere sahiptir (67).



Şekil 8. Timol' ün kimyasal yapısı (68).

Timol, lipofilik yapıya sahip olması sebebiyle kan beyin bariyerini geçip beyin dokusunda biriktiğinden iyon kanallarının ve nöronların işlevini olumlu yönde etkiler (69). Sitokinlerin ve kemokinlerin toplanmasını engellediği, serbest radikalleri ortamdan uzaklaştırdığı ve metal iyonlarının şelasyonunu arttırdığı için antioksidan özelliğe sahiptir. Ayrıca Timol'ün AChE inhibitör aktivitesinden dolayı AH tedavisi için yeni terapötik hedef olabileceği ifade edilmektedir (67).



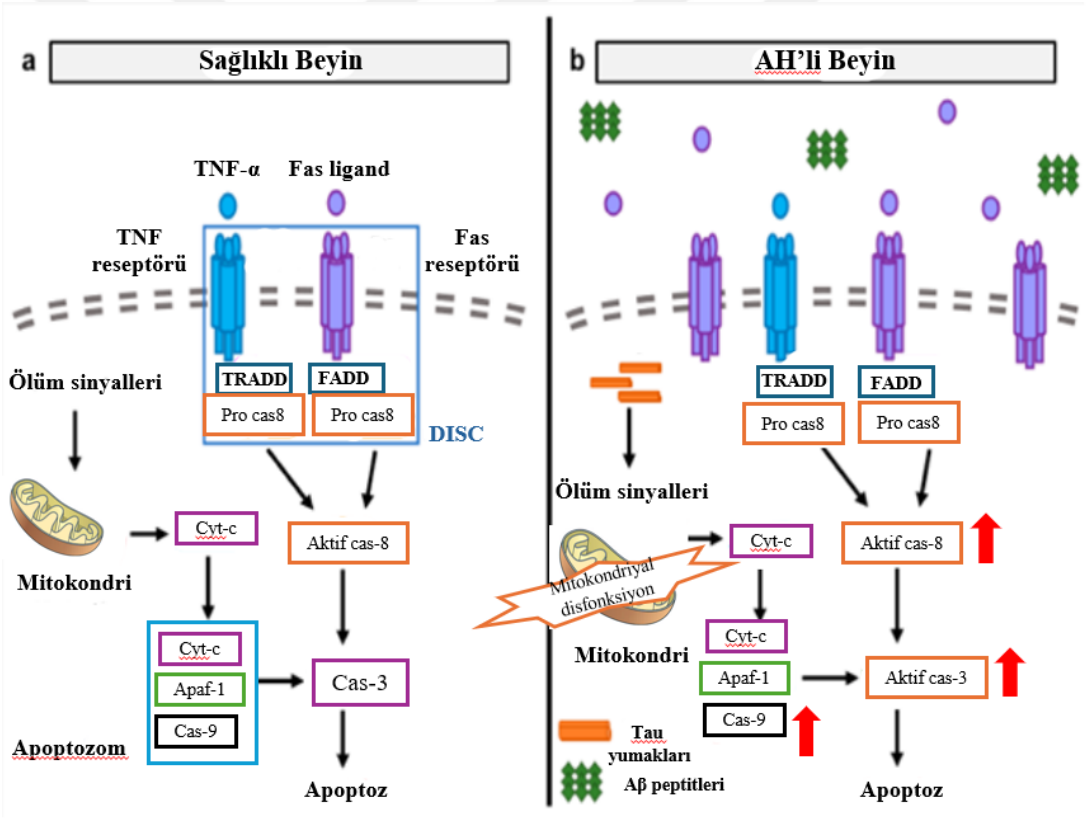
Şekil 9. Timol takviyesinin nöroprotektif etkisi (33).

2.10.1. Timol' ün Hücre Ölümü Üzerine Etkisi

Ökaryotik hücrelerde mitokondri, birincil enerji üreticidir ve nöronların hayatta kalması-işlevini gerçekleştirilebilmesi için önemlidir. Çünkü nöronlar, uzun aksonları ve sinaptik bağlantıları nedeniyle fazla miktarda ATP'ye ihtiyaç duyar. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun oluşması durumunda ise enerjinin tükenmesine, aşırı ROT üretimine ve mitokondriden pro-apoptotik faktörlerin (Bak, Bax, Bad) salınmasına neden olarak nöronal apoptoz ve nörodejenerasyon ile süreç sonlanır (70–74).

Beyinde apoptoz iki farklı yol ile tetiklenir; birisi mitokondrinin eşlik ettiği intrinsik yol, diğeri ise ölüm reseptörleri olarak adlandırılan TNF-α ve Fas reseptörlerinin aracılık ettiği ekstrinsik yoldur. Sağlıklı beyinde intrinsik yolağın aktivasyonu; kaspaz-9' un, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1'e (Apaf-1) ve sitokrom c' ye (Cyt-c) bağlanmasıyla gerçekleşir. Mitokondriyal porlardan salınan cyt-c, APAF-1' in konformasyonel değişikliğini indükleyerek kaspaz-9 ile birleşmesine neden olur ve "apoptozom" olarak tanımlanan fonksiyonel kompleks meydana gelir. Böylece, aktive olan kaspaz-9, kaspaz-3' ün aktivasyonunu tetikleyerek apoptoza yol açar. Ekstrinsik yolda ise başlangıç kaspazı olan Kaspaz-8, ölüm reseptörlerinin oligomerizasyonu ve ardından adaptör proteinlerin toplanmasıyla aktive edilerek

DISC'i oluşturur. Aktive olan kaspaz-9 ve 8, daha sonra uygulayıcı kaspaz-3'ün aktivasyonunu tetikleyerek sinir hücrelerinde apoptoza yol açar (Şekil 10a). AH'li beyinde ise apoptoz süreci uygun bir şekilde düzenlenmemektedir. Ölüm sinyalleri, mitokondriyal porlardan Cyt-c' nin salınmasına yol açar. Cyt-c ve Apaf-1, kaspaz-9'a bağlanarak aktivasyonunu arttırır ve aktif kaspaz-9, mitokondriyal disfonksiyona yol açar. Daha sonra kaspaz-9, kaspaz-3' ün aktivasyonunu sağlayıp ekspresyonunu arttırır. Böylece AH' li beyindeki astrositlerin ve nöronların apoptozunda artışa neden olur. Ekstrinsik yolakta ise başlangıç kaspazı olan kaspaz-8, nöronlarda eksprese olan Fas reseptörlerini uyararak aktive olur ve kaspaz-8' in ekspresyonu artar. Devamında kaspaz-3' ün aktivasyonunu sağlayıp ekspresyonunu arttırarak astrositlerin ve nöronların apoptozunda artışa neden olur (Şekil 10b) (65).



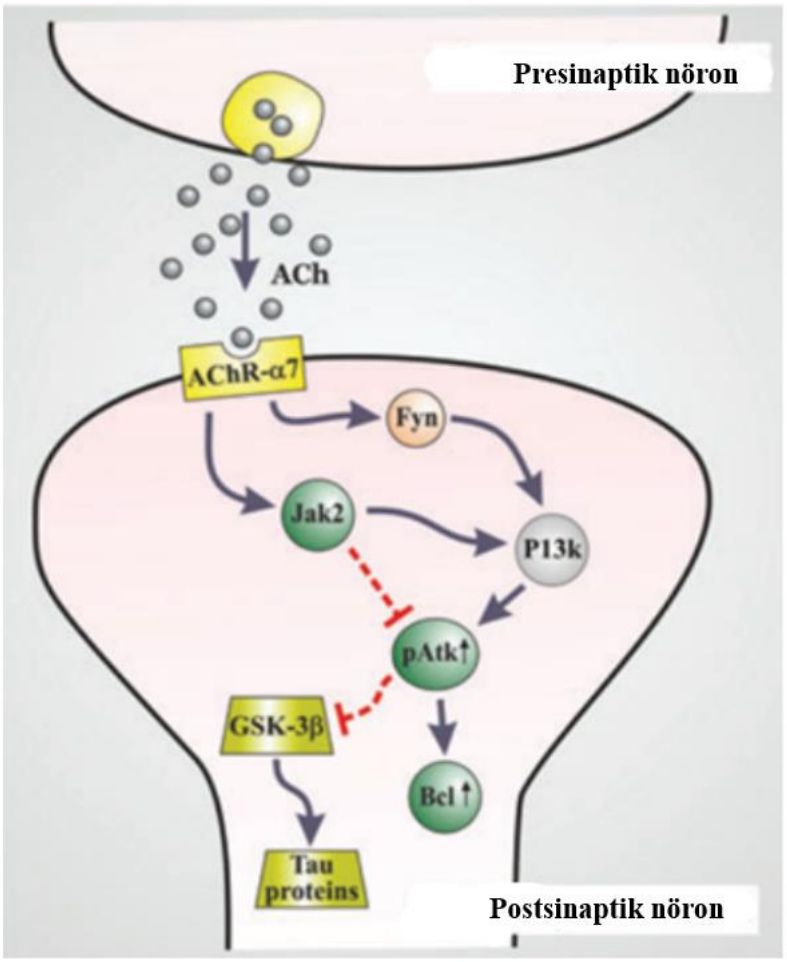
Şekil 10. Sağlıklı ve AH' li bireylerin beyinlerinde gerçekleşen intrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolağının moleküler mekanizması (65).

Aβ oligomerleri membran geçirgenliğine sahip oldukları için mitokondriye yakın lokalize olarak mitokondriyal membrana zarar verir ve pro-apoptotik yolaktaki BCL-2 ailesi proteinlerini (Bax, Bad, Bak) yukarı regüle eder. Böylece Cyt-c' nin

membrandan salınmasına yol açar ve intrinsik yolaktaki bir dizi proteinin aktivasyonuna/inhibisyonuna neden olarak nöronal apoptozu tetikler. Özetle, normal beyinden farklı olarak AH' li beyinde anormal Aβ ve Tau birikiminin neden olduğu nöronal hücre ölümü, sinaptik kayıp ve bilişsel bozukluğa yol açar (65,75–78).

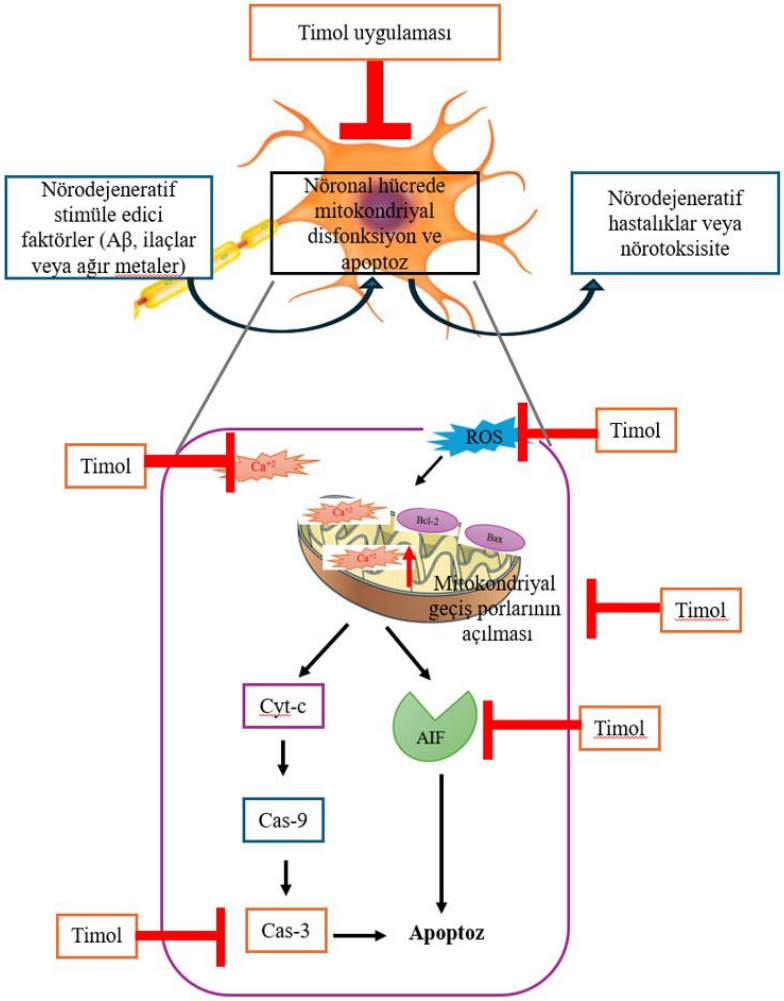
In vivo intraserebroventriküler (i.c.v.) $A\beta_{25-35}$ uygulandığında korteks, hipokampüs ve medial septumdaki ChAT aktivitesini azalttığı ama bazal ön beyinde ekspresyonunu değiştirmediği ifade edilmiştir. Aβ kaynaklı beynin farklı bölgelerinde farklı ChAT aktivitesinin görülmesinin, uygulanan $A\beta_{25-35}$' in enjeksiyon şekli, süresi ve dozundan kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır (44).

Güncel olarak AH'li kişilere uygulanan farmakolojik tedavi yaklaşımı, ACh konsantrasyonunu arttırma ve onu parçalayan AChE'yi inhibe etme potansiyeline sahip ilaçların kullanılmasıdır. ACh konsantrasyonunun arttırılması, bilişsel işlevlerin iyileşmesini sağlamaktadır. Ayrıca, AChE'nin inhibe edilmesi, prefrontal neokorteksteve hipokampüste α7nACh reseptörünü upregüle ederek nöroprotektif etki gösterir. Bu mekanizma, glutamaterjik aktivitenin düzenlenmesi yanı sıra anti-apoptotik yolaktaki Bcl-2 ve Bcl-xL' in ekspresyonunu arttırır (Şekil 11) (79).



Şekil 11. ACh konsantrasyonunun nöroprotektif etkisi (79).

Geleneksel tıpta farklı bitkilerin, bilişsel işlevi düzenlediği ve depresyonu hafiflettiği böylece AH tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Timol ve türevlerinin (karvakrol, timokinon), AChE' nin inhibitörü olabileceği ancak AH tedavisi dahil birçok nörodejeneratif hastalık için daha fazla araştırmanın yapılması gerektiği ifade edilmektedir (80). *In vivo* nörodejeneratif hastalık modellerinde Timol tedavisinin; mitokondriyal disfonksiyonu iyileştirdiği, Aβ proteininin üretimini engellediği, anti-apoptotik etki ettiği gösterilmiştir (67,71,81,82). Timol' ün mitokondriyal disfonksiyonu düzenlemesi; mitokondri üzerindeki porlardan geçişi kontrol etmesiyle, mitokondriyal Ca^{+2} düzeyini ve pro-apoptotik yolağı etkilemesiyle ilişkilidir (Şekil 12) (33).



Şekil 12. Timol'ün mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve nöronal hücrelerdeki anti-apoptotik etkisinin temel mekanizması (33).

Özetle, AH'de zarar gören nöronların, özellikle de hafıza ve öğrenme sürecinde görevli olan kolinerjik nöronların, mitokondriyal mekanizmalar üzerinden hasarını azaltabilmek için tedavilerin uygulanması AH'nin ilerlemesini önleyebilir (83).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Deneysel, kontrollü bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Temel Bilimler Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan laboratuvarlarda gerçekleştirildi.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Bu araştırmada insan glioblastoma hücresi olan U-87 hücre hattı kullanıldı.

3.4. Çalışma Materyali

Bu araştırmada kullanılan U-87 hücre hattı ATCC' den temin edildi.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişken ChAT, Bcl-2, Bax ve Cyt-c gen ifadeleri; Bağımsız değişken $A\beta_{25-35}$ ve Timol olarak kabul edildi.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller

Araştırma kapsamında kullanılan cihazlar, sarf malzemeler, diğer malzemeler markalarıyla aşağıda belirtildi.

3.6.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları

Çalışmada Kullanılan Cihaz	**Markası**
Laminar Akışlı Biyogüvenlik Kabini	Nuve LN 090
Karbondioksit İnkübatör	Nuve EC 160
Inverted Mikroskop	Olympus CKX41
Su Banyosu	Nüve NB9
Otomatik Pipet Seti	Eppendorf ve Thermo Scientific
Mikroplate Okuyucu	Thermo Scientific

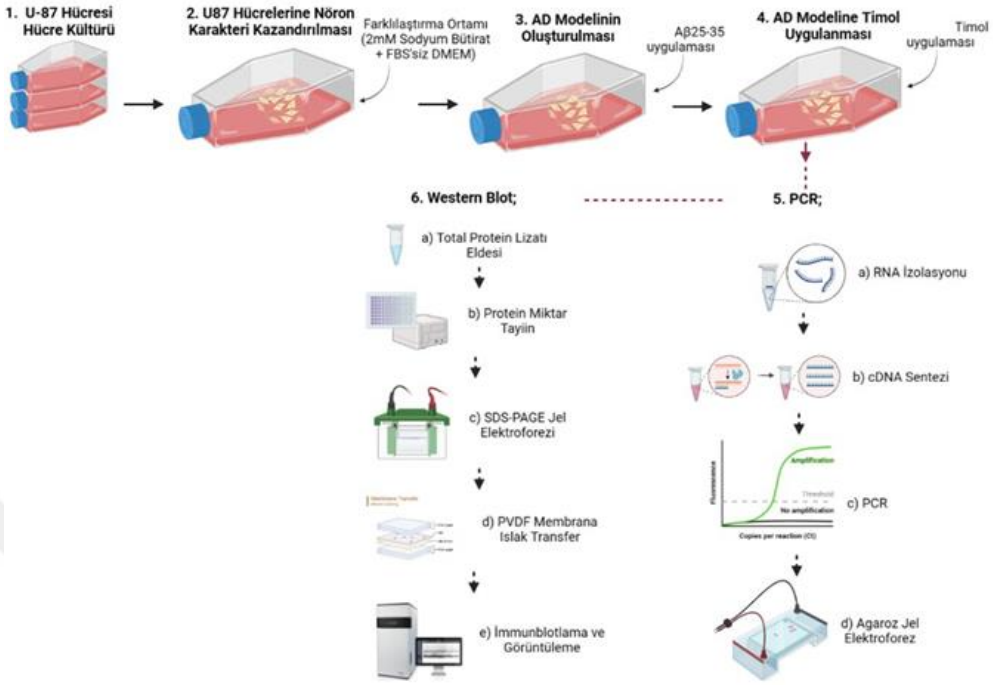
Thermal Cycler	Eppendorf Mastercycler Nexus Sx1
Real Time PCR Cihazı	Roche LightCycler 480, 96well plate
Görüntüleme Cihazı	Vilber E-Box, Vilber Infinity
Vorteks	Labnet
Manyetik Karıştırıcı	WiseStir
Hassas Elektronik Tartı	Swiss Quality
4°C Buzdolabı	Beko
-20°C Derin Dondurucu	Beko, Uğur
-80°C Derin Dondurucu	Hettich Freezer
Ph Metre	Hanna HI 221
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore
Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad
Trans-Blot Turbo Transfer Sistemi	Bio-Rad
Soğutmalı Santrifüj	Eppendorf
Santrifüj	Eppendorf, Hettich Zentrıfugen
Isı Bloğu	Major Science

3.6.1.2. Çalışmada Kullanılan Malzemeler ve Markalar

Çalışmada Kullanılan Malzeme	**Markası**
Penisilin/Streptomisin	Gibco™
Tripsin-EDTA (0.25%)	Gibco™
Dmem- Dulbecco's Modified Eagle Medium with L-Glutamine	Gibco™
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco™
Filtre Kapaklı T-25 ve T-75 Hücre Kültürü Flaskları	LabSelect
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich
10X Phosphate Buffer Saline (PBS)	Gibco™
96 ve 6 Well Kültür Plateleri	Labselect
Serolojik Pipet 5 mL ,10 mL ve 25 mL	Labselect

15 mL'lik ve 50 mL'lik Santrifüj Tüpleri	Labselect
Kryojenik Vial	Biosharp
PCR Tüpü (Isolab)	Isolab
RT-qPCR 96 well plate	Roche LightCycler 480 için uyumlu 96 well plate
Trizol Reagent	Invitrogen
cDNA Sentez Kiti	Applied Biosystems™ High-Capacity Rna-To-cDNA™ Kit
SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems™ PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix
Bcl-2, Bax, Cyt-c ve β-aktin RT-qPCR primerleri	Oligomer
MTT	Sigma-Aldrich
BCA Protein Assay Kiti	Thermo Scientific Pierce
Tgx Stain-Free Fast Cast Acrylamid Jel	Bio-Rad
ECL Görüntüleme Solüsyonu	Bio-Rad
Transfer Pack (0.2 µm PVDF)	Bio-Rad, Transblot Turbo
Protein Marker	Thermo Scientific PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder
xTractor buffer	Takara
Bax, Cyt-c, ChAT, Gapdh ve β-aktin primer antikorları	ProteinTech
Anti-mouse ve anti-rabbit sekonder antikorları	ProteinTech
Sodyum Bütirat (SB)	Stemcell
$A\beta_{25-35}$ fragmanı	Sigma Aldrich
Absolute EtOH	Sigma Aldrich
Timol	Sigma Aldrich

3.6.2. Kullanılan Metotlar



Şekil 13. Kullanılan metotların şematize edilerek özetlenmesi (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

3.6.2.1. U-87 Hücre Hattının Uygun Şartlarda İnkübe Edilmesi

U-87 hücresi, %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM (with L-glutamine) besiyeri (besin ortamı) kullanılarak çoğaltıldı. Hücreler, 37 ºC, %5' lik CO_2 'li nemli ortamda (NUVE EC 160) tutuldu.

3.6.2.2. U-87 Hücre Hattının Pasajlanması ve Dondurulması

Hücreler invert mikroskopta incelenip konfluensi oranı belirlendi. Konfluensi oranı eğer %70 ve üzeri ise pasaj yapıldı. Pasaj protokolü özetle şu şekildedir;

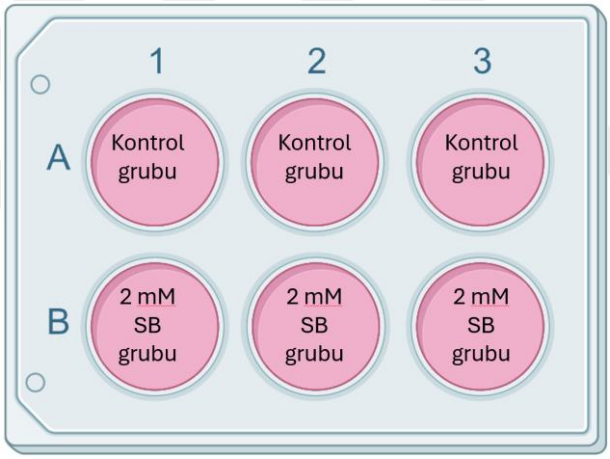
Flask içerisindeki ortam aspire edildi. T25 flask için 1ml 1X PBS flaska eklendi (T75 flask için 3ml 1X PBS) ve yüzey yıkandıktan sonra sıvı uzaklaştırıldı. T25 flask için 1ml Tripsin-EDTA flaska eklendi (T75 flask için 2ml Tripsin-EDTA) ve yüzeyde gezdirilip 37°C'de 3-5 dakika arası bekletildi. Süre sonunda flasktaki hücreler, invert mikroskopta incelendi ve hücrelerin yuvarlak morfoloijye dönüşüp yüzeyden ayrıldığı görüldü. Flasktaki tripsin-EDTA' yı inakitve etmek amacıyla 2katı miktarda besin

ortamı eklendi ve hücre içeren besin ortamı 15ml' lik falkona aktarıldı. Hücreler 150xg' de 6 dakika santrifüj yapıldı ve $1x10^6$ hücre/ml oranında seyreltilerek pasajları gerçekleştirildi.

İleride yapılacak deneyler amacıyla hücrelerin saklanması için santrifüj sonrasında $2x10^6$ hücre, %70 DMEM (wtih L-glutamine), %20 FBS ve %10 DMSO içerisinde 2 saat -20 ºC' de bekletildikten sonra -80 ºC' de muhafaza edildi.

3.6.2.3. U-87 Hücresine Sodyum Bütirat ile Kolinerjik Nöron Karakteri Kazandırılması

Yapılan literatür taraması sonucunda U-87 hücresinde SB (Stemcell katalog no 72242) dozu için 2 mM uygulanmasına karar verildi. SB çözücüsü olarak 1x PBS kullanıldı (63).



Şekil 14. Deney Grupları (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

3.6.2.3.1. Mikroskobik Olarak Doğrulanması

Kuyu başına $5x10^4$ U-87 hücresi %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM (with L-glutamine) kullanılarak 6-well platelere ekildi ve 37 ºC, %5' lik CO_2 'li ortamda 24 saat inkübe edildi. Süre sonunda kuyulardaki sıvı aspire edildi. SB grubuna FBS içermeyen DMEM, kontrol grubuna ise %10 FBS'li DMEM eklendi. 2mM SB ve kontrol grubu olarak 48 saat süreyle 37 ºC, %5' lik CO_2 'li ortamda inkübe edildi. 48 saat sonunda invert mikroskopta gözlem yapılıp 10x ve 20x'de fotoğraflandı.

3.6.2.3.2. Western Blot Deneyi ile Doğrulanması

Kuyu başına $2x10^5$ U-87 hücresi %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM (with L-glutamine) kullanılarak 6-well platelere ekildi ve 37 ºC, %5' lik CO_2 'li ortamda 24 saat inkübe edildi. Süre sonunda kuyulardaki sıvı aspire edildi. SB grubuna FBS içermeyen DMEM, kontrol grubuna ise %10 FBS'li DMEM eklendi. 2mM SB ve kontrol grubu olarak 48 saat süreyle 37 ºC, %5' lik CO_2 'li ortamda inkübe edildi. 48 saat sonunda hücreler hücre kazıyıcı kullanılarak yüzeyden kaldırıldı ve 15 ml'lik falkonlara aktarıldı. Hücreler +4°C' de 3000 xg 5 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonucunda sıvı faz uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi için tüplere 4 ml 1X PBS eklenerek +4°C' de 3000 xg 5 dakika santrifüj edildi ve sıvı faz uzaklaştırıldı (bu aşama 2 defa tekrar edildi). Yeniden +4°C' de 3000 xg 5 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonucunda sıvı faz aspire edildi. Pellet yoğunluğuna göre (150 µL) xTractor buffer (Takara katalog no: 635671) eklenip kısa bir vorteks yapıldı. Oda sıcaklığında 1 dakika hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. +4°C' de 12000 xg 20 dakika santrifüj edildi ve sıvı faz yeni bir ependorfa aktarıldı. Toplam protein miktarı BCA protein assay kiti (Thermo Scientific Pierce) kullanılarak ölçüldü. Ölçüm sonrası gerekli protein miktarları 4X ve 2X Laemmli Buffer içirisinde hazırlandı ve 95°C' de 5 dakika ısı bloğunda ısıtıldı. Eşit miktar (20µg) olacak şekilde hazırlanan proteinlerin, jelde ayrımı TGX Stain-Free™ Precast Gels Any (Bio-Rad) ile Mini Protean Tetra Cell apparatus sistemi (Bio-Rad) kullanılarak jele yükleme yapıldı. 200V' da 25 dakika SDS running buffer içerisinde proteinler yürütüldü. Daha sonra proteinlerin, jelden transferi yapıldı. Trnasfer aşamasında, Trans blot turbo (Bio-Rad) hızlı tranfer sistemi aracılığıyla PVDF membrana aktarıldı. Membranlar %5' lik yağsız süt tozuyla (1X PBS-Tween içerisinde hazırlanmış) çalkalayıcı üzerinde 1 saat oda sıcaklığında bloke edildi. Kolinerjik nöron biyobelirteci olan ChAT antikoru (ProteinTech katalog no 20747-1-AP) ile çalkalayıcıda oda sıcaklığında 2 saat muamele edildi. Membran, 25 ml 1X PBS-Tween ile önce 15 dakika boyunca, daha sonra 3 defa 5 dakika olarak yıkandıktan sonra 1/10000 oranında 1X PBS-Tween içerinde hazırlanmış sekonder antikor (Sekonder antikor anti-rabbit (ProteinTech katalog no SA00001-2)) ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. Membran, 25 ml 1X PBS-Tween ile önce 15 dakika boyunca, daha sonra 3 defa 5 dakika olarak tekrardan yıkandı. Son olarak Enhanced Chemiluminiscent (ECL, Bio-Rad) metoduna göre görüntüleme cihazı

INFINITY (Vilber) kullanılarak görüntülendi. Eşit yükleme kontrolü olarak β-actin antikoru (ProteinTech katalog no 66009-1-Ig) kullanıldı. İstatistiksel analizleri yapmak için ImageJ yazılımı kullanıldı.

3.6.2.4. U-87 Hücresine $A\beta_{25-35}$'in Sitotoksik, Timol'ün Sitotoksik Etkisinin Araştırılması

3.6.2.4.1. $A\beta_{25-35}$ ve Timol Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Yapılan literatür taraması sonucunda; $A\beta_{25-35}$ (Sigma Aldrich katalog no A4559) için konsantrasyonların 1µM, 2.5µM, 5µM, 10µM, 20µM ve 40µM uygulanmasına karar verildi. Ticari olarak alınan $A\beta_{25-35}$ çözücüsü olarak steril ampul su kullanıldı ve 1mM ana stok olacak şekilde hazırlanarak alikotlanıp -20ºC' de muhafaza edildi. Her deney öncesinde gerekli hacim yeni bir ependorfa aktarılıp 37 ºC' de 7 gün boyunca inkübe edilerek fibrile olması sağlandı.

Timol (Sigma Aldrich katalog no T0501) için konsantrasyonların 10µM, 50µM, 100µM, 200µM, 400µM, 800µM ve 1000µM uygulanmasına karar verildi. Ticari olarak alınan Timol çözücüsü olarak absolute %70 EtOH kullanıldı ve 75mM ana stok olacak şekilde her deney öncesinde taze olarak hazırlandı.

3.6.2.4.2. Sitotoksisite Deneyi

U-87 hücresinden yeterli sayıda hücre elde edebilmek için %10 FBS ve %l penisilin/streptomisin içeren DMEM (with L-glutamine) besiyeri ile T75 flasklarda çoğaltıldı. Flasklar, 37 ºC, %5' lik CO_2 'li inkübatörde tutuldu. Flaskta yeterli konfluensi oranına ulaşıldığında 96-well platede her bir kuyuya $1x10^4$ hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 37°C, %5' lik CO_2 'li ortamda hücreler 24 saat inkübe edildi. Bir sonraki gün hücrelere, Tablo 1'deki belirtilen konsantrasyonlarda $A\beta_{25-35}$ ve Timol ayrı ayrı olarak kuyulara eklenerek 24 ve 48 saat 37 ºC, %5' lik CO_2 'li nemli inkübatörde inkübe edildi. 24 ve 48 saat sonra MTT deneyi gerçekleştirildi. Her bir kuyuya 10µl (5mg/ml) MTT (MTT çözücüsü olarak 1X soğuk PBS kullanıldı) solüsyonu eklendi ve hücreler 37 ºC, %5' lik CO_2 'li nemli inkübatörde 3 saat inkübe edildi. 3 saat sonunda, kuyulardaki sıvılar aspire edildi ve 100µl DMSO eklenerek 20 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıya konuldu. 20 dakika sonra kuyuların optik

yoğunluğu (OD), plate okuyucu aracılığıyla 540 nm dalga boyunca ölçüm alındı. Tüm deneyler üç kez, üç tekrarlı olarak yapıldı. Veriler ortalama değer ± standart sapma olarak ifade edildi. Tüm veriler, değer anlamlılığını hesaplamak için T testi kullanılarak Graphpad Prism 8 programı ile analiz edildi. $p < 0.05$ değerleri istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Sadece $A\beta_{25-35}$ uygulanarak AH oluşturulan dozlardan anlamlı 2 dozu (2,5 µM ve 1 µM) seçilerek Timol' ün 10µM, 50µM, 100µM, 200µM ve 400µM dozları ile kombine hali 24 saat olarak U-87 hücrelerine uygulandı. Ve Tablo 2' deki düzende MTT deneyi tekrar edildi. Tüm deneyler üç kez, üç tekrarlı olarak yapıldı. Veriler ortalama değer ± standart sapma olarak gösterildi. Tüm veriler, değer anlamlılığını hesaplamak için T testi kullanılarak Graphpad Prism 8 programı ile analiz edildi.

Tablo 1. MTT plate düzeneği

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
A	$A\beta_{25-35}$ ÇÖZÜCÜ KONTROL	$A\beta_{25-35}$ ÇÖZÜCÜ KONTROL	$A\beta_{25-35}$ ÇÖZÜCÜ KONTROL	TİMOL ÇÖZÜCÜ KONTROL	TİMOL ÇÖZÜCÜ KONTROL	TİMOL ÇÖZÜCÜ KONTROL
B	40 µM Aβ	40 µM Aβ	40 µM Aβ	1000 µM TİMOL	1000 µM TİMOL	1000 µM TİMOL
C	20 µM Aβ	20 µM Aβ	20 µM Aβ	800 µM TİMOL	800 µM TİMOL	800 µM TİMOL
D	10 µM Aβ	10 µM Aβ	10 µM Aβ	400 µM TİMOL	400 µM TİMOL	400 µM TİMOL
E	5 µM Aβ	5 µM Aβ	5 µM Aβ	200 µM TİMOL	200 µM TİMOL	200 µM TİMOL
F	2,5 µM Aβ	2,5 µM Aβ	2,5 µM Aβ	100 µM TİMOL	100 µM TİMOL	100 µM TİMOL
G	1 µM Aβ	1 µM Aβ	1 µM Aβ	50 µM TİMOL	50 µM TİMOL	50 µM TİMOL
H	POZİTİF KONTROL	POZİTİF KONTROL	POZİTİF KONTROL	10 µM TİMOL	10 µM TİMOL	10 µM TİMOL

Tablo 2. MTT plate düzeneği

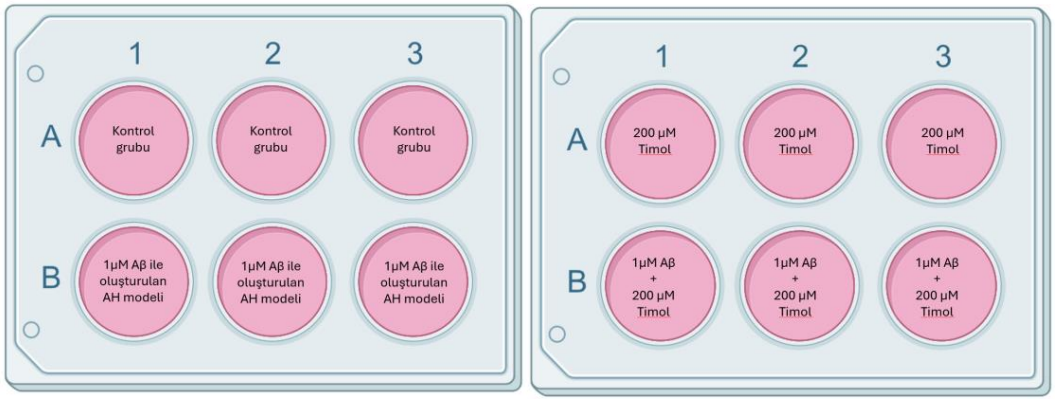
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	$A\beta_{25-35}$ ÇÖZÜCÜ KONTROL	$A\beta_{25-35}$ ÇÖZÜCÜ KONTROL	$A\beta_{25-35}$ ÇÖZÜCÜ KONTROL	KOMBİNE ÇÖZÜCÜ KONTROL	KOMBİNE ÇÖZÜCÜ KONTROL	KOMBİNE ÇÖZÜCÜ KONTROL			
B	2,5 µM Aβ	2,5 µM Aβ	2,5 µM Aβ	2,5 µM Aβ + 400 µM TİMOL	2,5 µM Aβ + 400 µM TİMOL	2,5 µM Aβ + 400 µM TİMOL	1 µM Aβ + 400 µM TİMOL	1 µM Aβ + 400 µM TİMOL	1 µM Aβ + 400 µM TİMOL
C	1 µM Aβ	1 µM Aβ	1 µM Aβ	2,5 µM Aβ + 200 µM TİMOL	2,5 µM Aβ + 200 µM TİMOL	2,5 µM Aβ + 200 µM TİMOL	1 µM Aβ + 200 µM TİMOL	1 µM Aβ + 200 µM TİMOL	1 µM Aβ + 200 µM TİMOL
D				2,5 µM Aβ + 100 µM TİMOL	2,5 µM Aβ + 100 µM TİMOL	2,5 µM Aβ + 100 µM TİMOL	1 µM Aβ + 100 µM TİMOL	1 µM Aβ + 100 µM TİMOL	1 µM Aβ + 100 µM TİMOL
E				2,5 µM Aβ + 50 µM TİMOL	2,5 µM Aβ + 50 µM TİMOL	2,5 µM Aβ + 50 µM TİMOL	1 µM Aβ + 50 µM TİMOL	1 µM Aβ + 50 µM TİMOL	1µM Aβ + 50 µM TİMOL
F	POZİTİF KONTROL	POZİTİF KONTROL	POZİTİF KONTROL	2,5 µM Aβ + 10 µM TİMOL	2,5 µM Aβ + 10 µM TİMOL	2,5 µM Aβ + 10 µM TİMOL	1 µM Aβ + 10 µM TİMOL	1 µM Aβ + 10 µM TİMOL	1 µM Aβ + 10 µM TİMOL

3.6.2.5. $A\beta_{25-35}$ ile Oluşturulan AH Modelinde Timol' ün Nöroprotektif Etkisinin mRNA Düzeyinde Araştırılması

D-U-87 hücresinde $A\beta_{25-35}$ ile oluşturulan AH modelinde Timol uygulamasının mRNA düzeyinde nöroprotektif etkisi RT-qPCR deneyi yapılarak araştırıldı.

a) RNA İzolasyonu

$3x10^4$ U-87 hücresi 6-well plate'e ekildi ve 37 ºC, %5' lik CO_2 'li ortamda 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kuyulardaki sıvı aspire edildi. U-87 hücresine kolinerjik nöron karakteri kazandırılması için tüm kuyulara FBS içermeyen DMEM içerisinde 2 mM SB uygulandı ve 48 saat boyunca 37 ºC, %5' lik CO_2 'li nemli ortamda inkübe edildi.48 saat sonunda ilgili kuyulara MTT deneyinde belirlenen sitotoksik $A\beta_{25-35}$ (1 µM), nöroprotektif etki için seçilen Timol dozu (200 µM) uygulanıp 37 ºC, %5' lik CO_2 'li ortamda 24 saat inkübe edildi (Şekil 15).



Şekil 15. RT-qPCR için 6-well plate düzeneği (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

İnkübasyon sonucunda hücreler hücre kazıyıcı kullanılarak yüzeyden kaldırıldı ve falkonlara aktarıldı. Hücreler 4600 rpm'de 15dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonucunda sıvı faz aspire edildi. Yıkamak için falkonlara 7ml 1X PBS eklenerek 4600 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve sıvı faz aspire edildi. Devamında RNA izolasyonu, Trizol (Invitrogen™ katalog no: 15596018) kullanılarak ve protokole uyularak gerçekleştirildi.

b) cDNA Sentezi

Ortalama 0.5 - 2 µg RNA örnekleriyle, cDNA sentez kiti (Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits katalog no: 4368814) kullanılarak ve protokole uyularak cDNA elde edildi. Tablo 3' teki oranlarda karışım hazırlanıp pipetlendi ve spinlendi. Reaksiyon 25°C' de 10 dakika, 37°C' de 120 dakika ve 85°C' de 5 dakika inkübe edilerek durduruldu ve 4°C' de tutuldu.

Tablo 3. cDNA Sentez Kiti Bileşenleri

Bileşenler	**Bir örnek için bileşen hacimleri**
10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10X RT Random Primers	2 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1 µl
Nuclease-free H2O	4,2 µl
RNA sample	2000 ng olacak şekilde
Toplam Hacim	**20 µl**

c) RT-qPCR

İntrinsik apoptoz yolağında görevli genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için Real Time PCR (RT-qPCR) yöntemi (Roche LightCycler 480 cihazı ile) kullanıldı. RT-qPCR primerleri (Bcl-2, Bax, Cyt-c ve β-aktin) Tablo 4' deki sekansları belirtildiği şekilde ilgili firmadan satın alındı.

Tablo 4. Primer Dizayn Bilgileri

BCL-2	İleri: 5'-ACCTGACGCCCTTCAC-3' Geri: 5'-AGGTACTCAGTCATCCAC-3'	184 bp
BAX	İleri: 5'-AAGAAGCTGAGCGAGT-3' Geri: 5'-GCCCATGATGGTTCTG-3'	104 bp
Cyt-c	İleri: 5'-TGGGTGATGTTGAGAAAGG-3' Geri: 5'-TTTGTTCCAGGGATGTACT-3'	237 bp
β-aktin	İleri: 5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3' Geri: 5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'	135 bp

Saflığı ve miktarı belirlenen total RNA' nın RT-qPCR reaksiyonunda; hedef genler Bcl-2, Bax, Cyt-c ve hedef genin ifade profilinin normalizasyonunda β-aktin referans gen (housekeeping) olarak kullanıldı. RT-qPCR reaksiyon kiti (Applied Biosystems™ PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix katalog no: A25742) kullanılarak ve protokole uyularak gerçekleştirildi (Roche LightCycler 480 cihazında, kullanılan kitin optimizasyonu laboratuvar ekibi tarafından önceden gerçekleştirildi).

Tablo 5. RT-qPCR Kit Bileşenleri ve Miktarları

Bileşenler	**Bir örnek için bileşen hacimleri**
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (2X)	5 µl
İleri yönlü primer + geri yönlü primer	0,5 µl + 0,5 µl
Nuclease-Free Water	2,5 µl
cDNA template	1,5 µl
Toplam Hacim	**10 µl**

Her grup için tüm genler 3 tekrarlı olarak 3 defa çalışıldı. Hedef genlerin Ct değerleri ile referans β-aktin geninin Ct değerinin karşılaştırılması için hesaplamalar

yapıldı. RT-qPCR analizi sonunda Ct verilerine göre ΔCt ve ΔΔCt formülü ile hesaplandı ve kat değişimleri saptandı.

d) Agaroz Jel Elektroforez

Konsantrasyonları belirlenen RNA örnekleri kullanılarak kurulan RT-qPCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünlerin varlığını ve genlerin nükleotit uzunluğunu (bp) doğrulamak amacıyla agaroz jel elektoroforezi yapıldı.

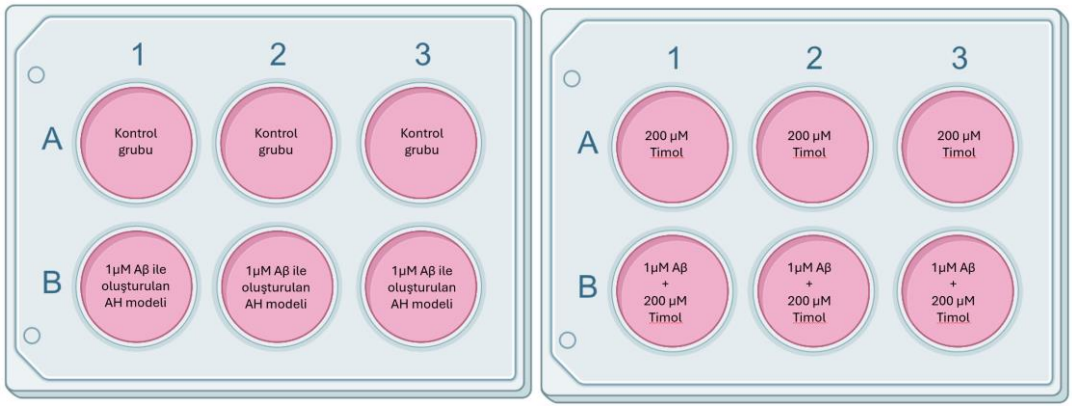
1.25 gram agaroz tartılarak üzerine 50 ml 1X TAE tamponu eklendi (%2.5'luk agaroz jel) ve agaroz mikrodalgada çözdürüldü. Erlen el yakmayacak hale gelene kadar (yaklaşık 55-60°C'ye) soğutuldu. Ve içerisine 4 µl etidyum bromür (10 mg/ml) eklendi. Hazırlanan jel, yatay jel tankına döküldü ve taraklar yerleştirilip oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika jelin polimerize olması beklendi. Jel polimerize olduktan sonra taraklar çıkartılıp tank içerisine jelin yüzeyini 2-3 mm geçecek seviyede 1X TAE eklendi. RT-qPCR ürününün 10 µl'si ve 2 µl Loading Dye (6X'lik) iyice karıştırılıp kuyucuklara sırasıyla yüklendi. Jele yüklenen bu RT-qPCR ürünleri 120 V'da 50 dakika yürütüldü. Süre sonunda jel görüntüleme sisteminde görüntü alındı.

3.6.2.6. $A\beta_{25-35}$ ile Oluşturulan AH Modelinde Timol' ün Nöroprotektif Etkisinin Protein Düzeyinde Araştırılması

D-U-87 hücresinde $A\beta_{25-35}$ ile oluşturulan AH modelinde Timol uygulamasının protein düzeyinde nöroprotektif etkisi SDS-PAGE temelli Western blot deneyi yapılarak araştırıldı.

a) Protein İzolasyonu

$3x10^4$ U-87 hücresi 6-well plate'e ekildi ve 37 ºC, %5' lik CO_2 'li ortamda 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kuyulardaki sıvı aspire edildi. U-87 hücresine kolinerjik nöron karakteri kazandırılması için tüm kuyulara FBS içermeyen DMEM içerisinde 2 mM SB uygulandı ve 48 saat boyunca 37 ºC, %5' lik CO_2 'li ortamda inkübe edildi.48 saat sonunda ilgili kuyulara MTT deneyinde belirlenen sitotoksik $A\beta_{25-35}$ (1 µM), nöroprotektif etki için seçilen Timol dozu (200 µM) uygulanıp 37 ºC, %5' lik CO_2 'li nemli ortamda 24 saat inkübe edildi (Şekil 16).



Şekil 16. Western blot deneyi için 6-well plate düzeneği (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

İnkübasyon sonucunda hücreler hücre kazıyıcı kullanılarak yüzeyden kaldırıldı ve 15 ml'lik tüplere aktarıldı. Hücreler +4°C' de 3000 xg 5 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonucunda sıvı faz aspire edildi. Yıkama işlemi için tüplere 4 ml 1X PBS eklenerek +4°C' de 3000 xg 5 dakika santrifüj edildi ve sıvı faz uzaklaştırıldı (bu aşama 2 defa tekrar edildi). Yeniden +4°C' de 3000 xg 5 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonucunda sıvı faz uzaklaştırıldı. Pellet yoğunluğuna göre (60 µL) xTractor buffer (Takara katalog no: 635671) eklenip kısa bir vorteks yapıldı. Oda sıcaklığında 1 dakika hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. +4°C' de 12000 xg 20 dakika santrifüj edildi ve sıvı faz yeni bir ependorfa aktarıldı.

b) Protein Miktar Tayini

Toplam protein miktarı BCA protein assay kiti (Thermo Scientific Pierce™ BCA Protein Assay Kit katalog no: 23227) kullanılarak ölçüldü.

c) Western Blot

Ölçüm sonrası gerekli protein miktarları 4X ve 2X Laemmli Buffer içinde hazırlandı ve 95°C' de 5 dakika ısı bloğunda ısıtıldı. Eşit miktar (20µg) olacak şekilde hazırlanan proteinlerin, jelde ayrımı TGX Stain-Free™ Precast Gels Any kD (Bio-Rad) ile Mini Protean Tetra Cell apparatus sistemi (Bio-Rad) kullanılarak jele yükleme yapıldı (protein marker olarak Thermo Scientific PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder katalog no: 26619 kullanıldı). 200V' da 25 dakika SDS running buffer içerisinde proteinler yürütüldü. Daha sonra proteinlerin, jelden transferi yapıldı.

Trnasfer aşamasında, Trans blot turbo (Bio-Rad) hızlı tranfer sistemi aracılığıyla PVDF membrana aktarıldı. Membranlar %5' lik yağsız süt tozuyla (1X PBS-Tween içerisinde hazırlanmış) çalkalayıcı üzerinde 1 saat oda sıcaklığında bloke edildi. Primer antikorlar [ProteinTech; Bax (kat. no 60267-1-Ig) ve Cyt-c (kat. no 66264-1-Ig) ile çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 2 saat muamele edildi. Membran, 25 ml 1X PBS-Tween ile önce 15 dakika boyunca, daha sonra 3 defa 5 dakika olarak yıkandıktan sonra 1/10000 oranında 1X PBS-Tween içerinde hazırlanmış primer antikora uygun sekonder antikor [Sekonder antikor anti-rabbit (ProteinTech katalog no SA00001-2) veya anti-mouse (ProteinTech katalog no SA00001-1)] ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Membran, 25 ml 1X PBS-Tween ile önce 15 dakika boyunca, daha sonra 3 defa 5 dakika olarak tekrardan yıkandı. Son olarak Enhanced Chemiluminiscent (ECL, Bio-Rad) metoduna göre görüntüleme cihazı INFINITY (Vilber) kullanılarak görüntülendi. Eşit yükleme kontrolü olarak β-actin antikoru (ProteinTech katalog no 66009-1-Ig) kullanıldı. İstatistiksel analizleri yapmak için ImageJ yazılımı kullanıldı.

Tablo 6. SDS-PAGE temelli Western blot için gerekli protein ve laemmli hacimleri

	µg/ml	Kullanılan Protein Hacmi	Kullanılan Laemmli Hacmi		Total Hacim
			Laemmli	Hacmi	
Kontrol	2522,273	7,92 µl	4x	2,64 µl	10,56 µl
Timol	2126,818	9,40 µl	4x	3,13 µl	12,53 µl
$A\beta_{25-35}$	3049,545	6,55 µl	2x	6,55 µl	13,1 µl
$A\beta_{25-35}$ + Timol	3560,909	5,61 µl	2x	5,61 µl	11,22 µl

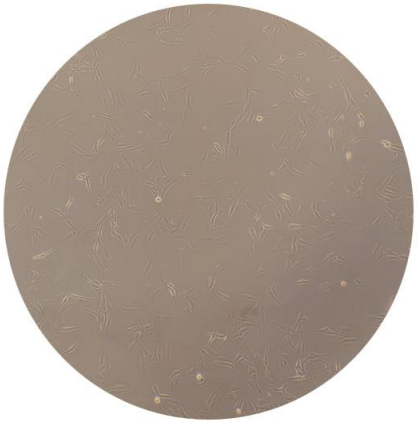
3.7. Araştırma Planı

İş Paketi Adı	Kasım 2023	Aralık 2023	Ocak 2024	Şubat 2024	Mart 2024	Nisan 204	Mayıs 2024	Haziran 2024	Temmuz 2024	Ağustos 2024
U-87 Hücre Kültürü	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
U-87 Hücrelerinin Nöron Karakterini Kazanması		X	X	X	X	X	X	X	X	X
U-87 Hücrelerinin Kolinerjik Nöron Karakterini Kazanmasının Mikroskobik ve Western Blot ile Doğrulanması		X	X	X						
$A\beta_{25-35}$ ve Timol Konsantrasyonlarının Belirlenmesi ve Sitotoksisite Deneyi			X	X	X					
RT-qPCR						X	X	X	X	X
Western Blot							X	X	X	X

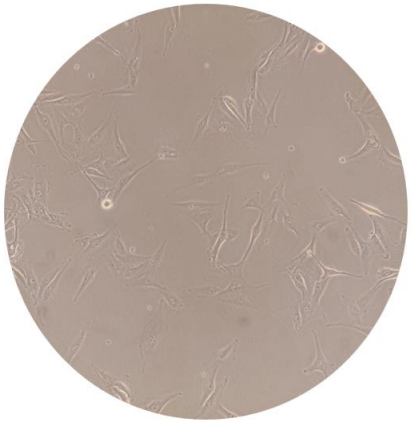
4. BULGULAR

4.1. U-87 Hücrelerinin Kolinerjik Nöron Karakterini Kazanmasının Mikroskobik Görüntüleri ve Western Blot Bulguları

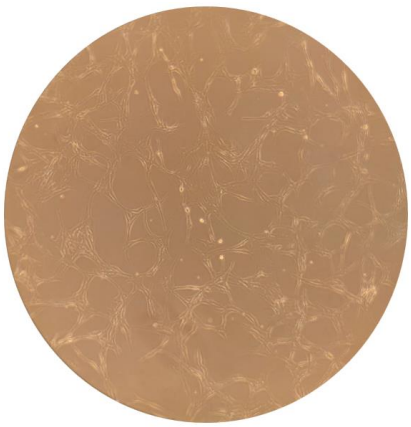
Çalışmamızda, U-87 hücresine 2 mM SB ile kolinerijk nöron karakteri kazandırıldı. SB uygulamasından 24 ve 48 saat sonra 10x ve 20x' de fotoğrafları invert mikroskop kullanılarak çekildi.



KONTROL (10X)



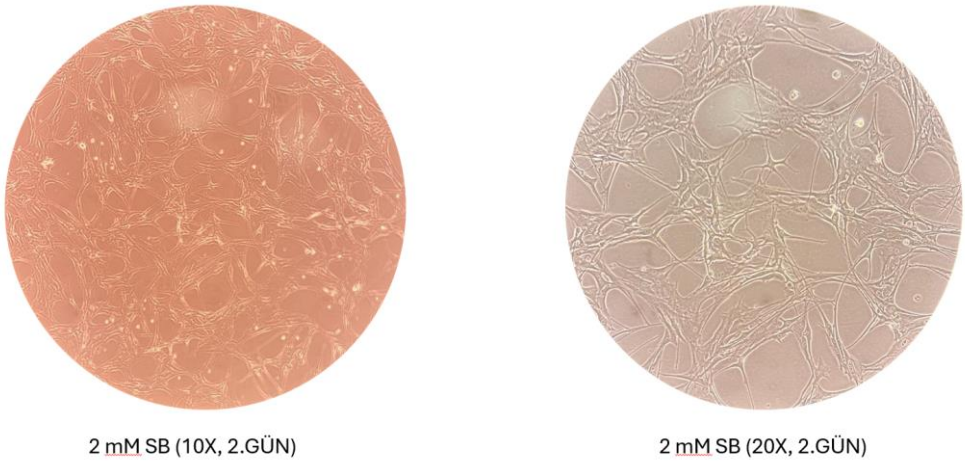
KONTROL (20X)



2 mM SB (10X, 1.GÜN)



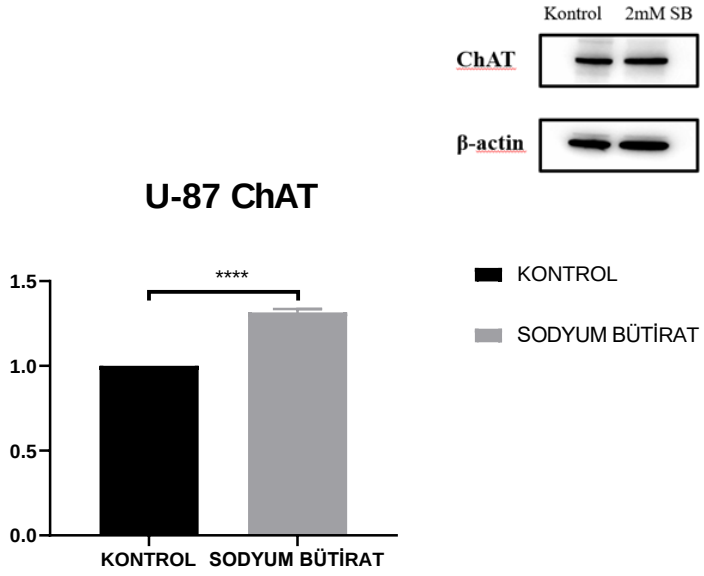
2 mM SB (20X, 1.GÜN)



Şekil 17. Mikroskobik Görüntüler

U-87 hücresine SB ile kolinerjik nöron karakteri kazandırıldığının doğrulanması amacıyla kolinerjik nöron biyobelirteci olan ChAT' ın protein düzeyindeki ifade değişimi Western blot deneyi ile analiz edildi.

Kontrol ve SB grup dozlarıyla inkübe edilen U-87 hücresinin ChAT protein ekspresyon seviyesi Şekil 18'de gösterildi. Protein seviyesinde, 2mM SB uygulaması, kontrol grubuna kıyasla ChAT oranında anlamlı kat değişimi göstererek kolinerjik nöron karakteri kazandırıldığı gözlemlendi.



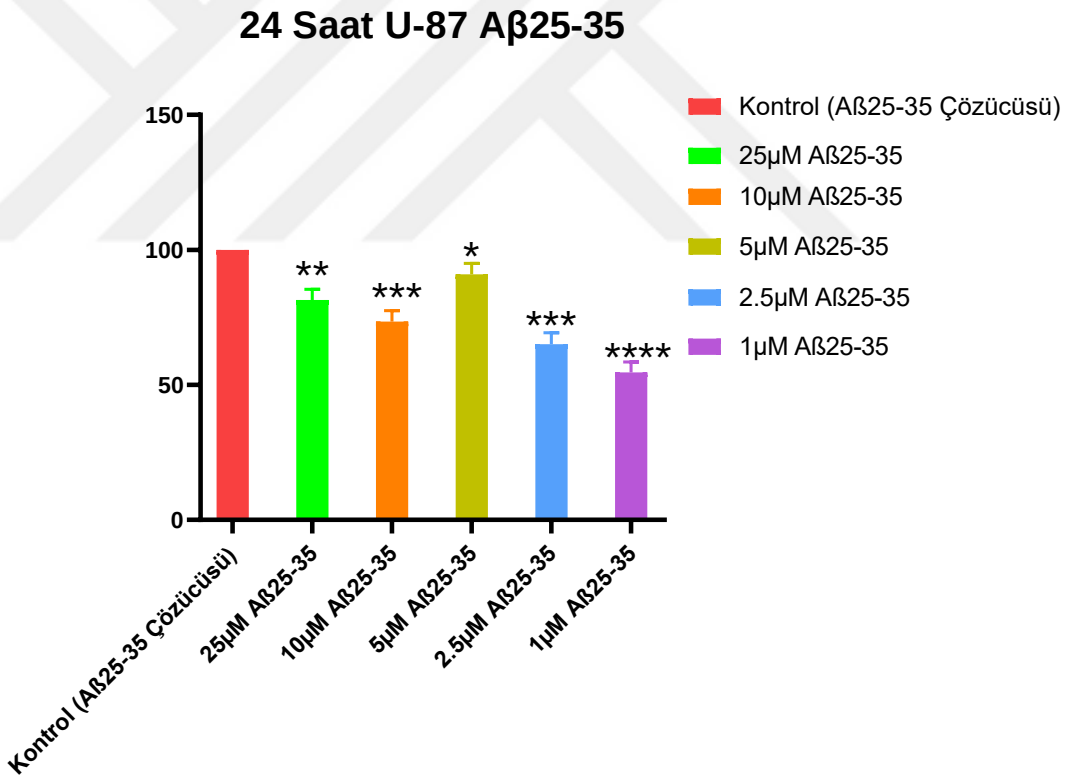
Şekil 18. Kontrol ve Sodyum Bütirat grup dozları ile inkübe edilen U-87 hücresi üzerindeki kolinerjik nöron biyobelirteci olan ChAT' ın protein düzeyindeki ifade değişiminin Western Blot yöntemiyle incelenmesi. **** p <0,0001. Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama ± standart sapma (n = 3) gösterildi.

4.2. Sitotoksisite Deney Bulguları

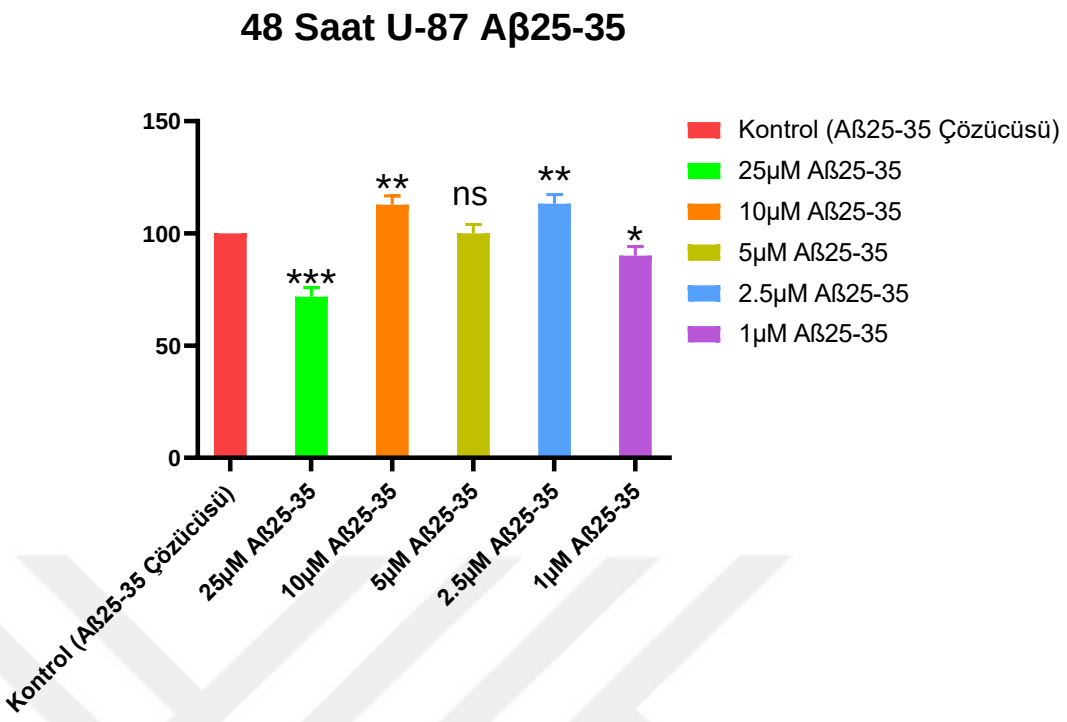
$A\beta_{25-35}$, Timol, $A\beta_{25-35}$ + Timol ve kontrol gruplarının U-87 hücresindeki etkileri araştırıldı. U-87 hücresinde $A\beta_{25-35}$' in sitotoksik, Timol'ün prolifere etkisi ve $A\beta_{25-35}$' in sitotoksik dozu üzerinde Timol' ün potansiyel nöroprotektif etkisi araştırıldı. 98 well plate'e ekilen U-87 hücresine Kontrol, $A\beta_{25-35}$ (1µM, 2.5µM, 5µM, 10µM, 20µM ve 40µM), Timol (10µM, 50µM, 100µM, 200µM ve 400µM), $A\beta_{25-35}$ + Timol (2.5µM + 10µM, 2.5µM + 50µM, 2.5µM + 100µM, 2.5µM + 200µM ve 2.5µM + 400µM; 1µM + 10µM, 1µM + 50µM, 1µM + 100µM, 1µM + 200µM ve 1µM + 400µM) ve kontrol gruplarının etkisini saptamak için belirtilen konsantrasyonlarda 24 saat olarak sitotoksisite deneyi gerçekleştirildi. $A\beta_{25-35}$, Timol, $A\beta_{25-35}$ + Timol gruplarının etkisi MTT deneyi ile belirlendi. Her grup 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Elde edilen veirler Graphpad Prism 8.2. yazılımı aracılığıyla Student t-testi kullanılarak doza bağımlı hücre canlılığını ifade eden grafikler oluşturuldu.

4.2.1. U-87 Hücresinde Aβ25-35' in Sitotoksik Değerinin Hesaplanması

U-87 hücresinde Aβ25-35'in MTT sonuçları doza ve süreye bağımlı olarak hücre canlılığında artış olduğunu gösterdi. İnkübasyonun 24.saatinde 2.5µM Aβ25-35 uygulanan grubun hücre canlılığı % 62,62 iken, 48.saatte %113,27' ye yükseldi. 1µM Aβ25-35 uygulanan grubun hücre canlılığı ise % 58,52 iken, 48.saatte %90,09' a yükseldi. 24 saat Aβ25-35' in hücre canlılığı üzerindeki etkisi Şekil 19' da, 48 saat Aβ25-35' in hücre canlılığı üzerindeki etkisi ise Şekil 20' de gösterildi. Genel olarak belirtilen dozlarda Aβ25-35 uygulamasının doz ve süreye bağlı olarak hücre canlılığında artış göstermesi nedeniyle 24 saatteki 2.5µM ve 1µM Aβ25-35 dozu seçilerek Timol' ün olası koruyucu etkisi için MTT deneyi tekrar edildi.



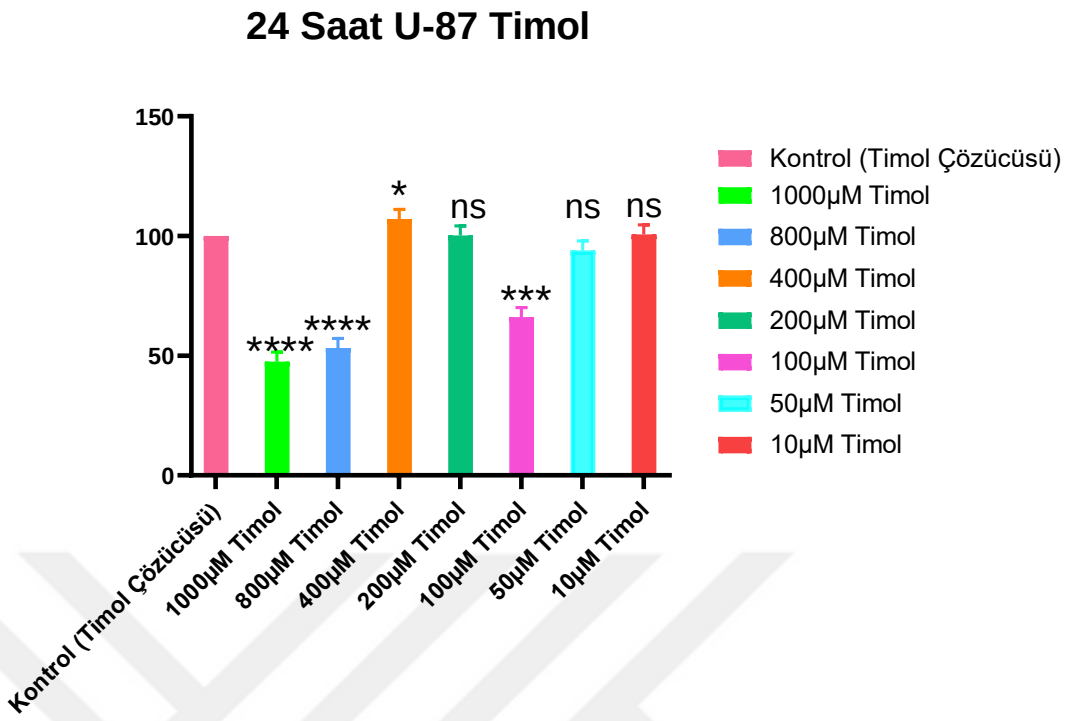
Şekil 19. U-87 hücre hattında 24 saat Aβ25-35 dozlarının hücre canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 20. U-87 hücre hattında 48 saat $A\beta_{25\text{-}35}$ dozlarının hücre canlılığı üzerine etkisi.

4.2.2. U-87 Hücresinde Timol'ün Prolifere Etki Değerinin Hesaplanması

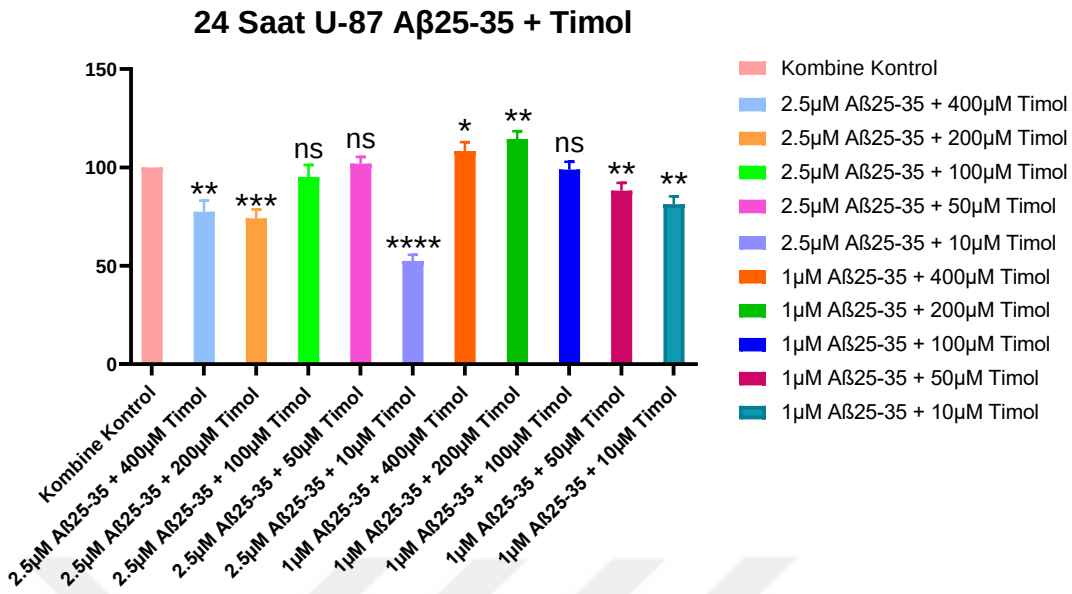
U-87 hücresinde Timol'ün 10µM, 50µM, 100µM, 200µM, 400µM, 800 µM ve 1000µM konsantrasyonları uygulanarak prolifere etkisi araştırıldı. Timol'ün hücre canlılığı üzerindeki prolifere etkisi Şekil 21' de gösterildi. U-87 hücresine 1000µM ve 800µM Timol uygulaması hücre canlılığını sırasıyla %47,48 ve %53,24'e düşürdü. Bu nedenle 10µM, 50µM, 100µM, 200µM ve 400µM Timol dozları ile 2.5µM ve 1µM $A\beta_{25\text{-}35}$ ile kombinasyonu şeklinde MTT deneyi tekrar edildi.



Şekil 21. U-87 hücre hattında 24 saat Timol dozlarının hücre canlılığı üzerine etkisi.

4.2.3. U-87 Hücresinde $A\beta_{25-35}$ + Timol' ün Nöroprotektif Etki Değerinin Hesaplanması

U-87 hücresinde 2.5µM ve 1µM $A\beta_{25-35}$ dozları ile Timol' ün 10µM, 50µM, 100µM, 200µM ve 400µM dozlarının 24 saat olarak kombinasyonu uygulanmış ve Timol'ün olası koruyucu etkisi araştırıldı. Kombine kontrol grubuna kıyasla 2.5µM $A\beta_{25-35}$ ve 200µM Timol grubunda canlılık %74,42 iken, 1µM $A\beta_{25-35}$ ve 200µM Timol grubunda canlılık %114,41 olarak artış gösterdi. U-87 hücresinde 2.5µM ve 1µM $A\beta_{25-35}$ dozları üzerinde Timol' ün nöroprotektif etkisi Şekil 22' de gösterildi. Elde edilen sonuçlara göre ileri çalışmalar için 1µM $A\beta_{25-35}$ dozu AH modeli oluşturmak amacıyla seçilmiş olup, oluşturulan modelde Timol' ün olası koruyucu etkisi için 200µM dozu seçildi.



Şekil 22. U-87 hücre hattında 24 saat $A\beta_{25\text{-}35}$ + Timol dozlarının olası koruyucu etkisi.

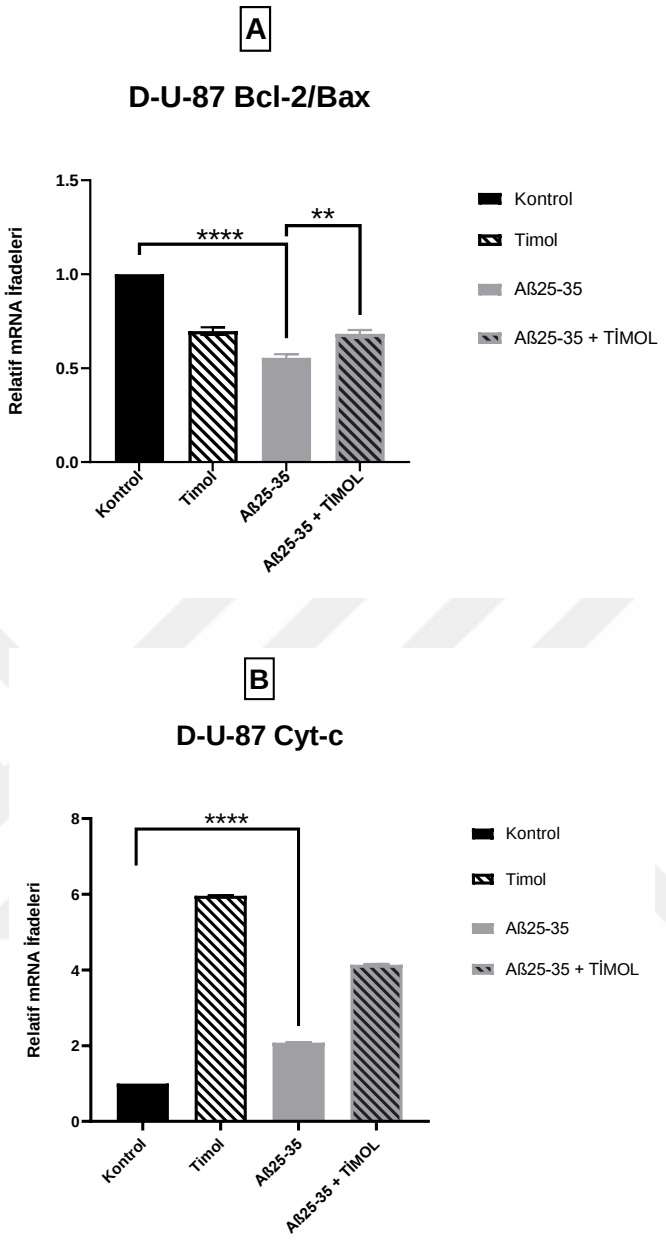
4.3. $A\beta_{25\text{-}35}$ ile Oluşturulan AH Modelinde Timol' ün Nöroprotektif Etkisinin mRNA Düzeyinde Araştırılması

Çalışmamızın RT-qPCR kısmında Bcl-2, Bax, Cyt-c gen ekspresyonlarının; Kontrol, Timol, $A\beta_{25\text{-}35}$ ve $A\beta_{25\text{-}35}$ + Timol grupları varlığındaki değişimleri araştırıldı.

Kontrol, Timol, $A\beta_{25\text{-}35}$ ve $A\beta_{25\text{-}35}$ + Timol grup dozlarıyla muamele edilen D-U-87 hücresinin Bcl-2, Bax ve Cyt-c gen ekspresyon seviyeleri Şekil 23' de gösterildi.

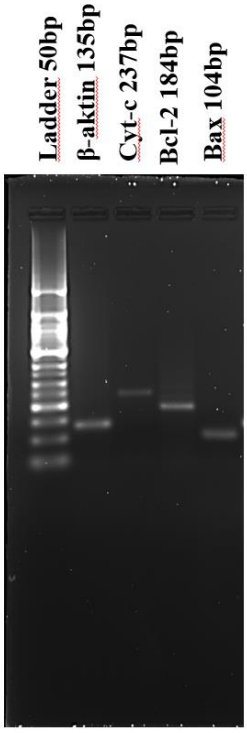
Anti-apoptotik Bcl-2/Bax gen ekspresyonu kontrole göre, Timol grubunda anlamlı bir artış göstermezken; kontrole göre, $A\beta_{25\text{-}35}$ grubunda anlamlı bir azalma gösterdi. Böylece D-U-87 hücresinde $A\beta_{25\text{-}35}$' in mRNA seviyesinde apoptotik etki gösterdiği belirlendi. Ayrıca $A\beta_{25\text{-}35}$ grubuna göre, $A\beta_{25\text{-}35}$ + Timol grubunda anlamlı bir artış gösterdi. Böylece Timol' ün, D-U-87 hücresinde oluşturulan AH modelinde anti-apoptotik etki gösterdiği mRNA düzeyinde belirlendi.

Apoptotik Cyt-c gen ekspresyonu kontrole göre, $A\beta_{25\text{-}35}$ grubunda anlamlı bir artış gösterdi. Böylece D-U-87 hücresinde $A\beta_{25\text{-}35}$ uygulamasının apoptozu tetiklediği mRNA düzeyinde belirlendi.



Şekil 23. Kontrol, Timol, $A\beta_{25-35}$ ve $A\beta_{25-35}$ + Timol dozları ile 24 saat boyunca inkübe edilen D-U-87 hücresinde Bcl-2/Bax ve Cyt-c genlerinin RT-qPCR analizi: (A) Bcl-2/Bax, ve (B) Cyt-c. **** p <0,0001, **p value 0,0014. Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama ± standart sapma (n = 3) gösterildi.

RT-qPCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünlerin varlığı ve genlerin nükleotit uzunluğu, %2.5'luk agaroz jel elektroforezine yüklenerek Şekil 24' de gösterildi.



Şekil 24. RT-qPCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünlerin varlığının ve genlerin nükleotit uzunluğunun agaroz jel elektroforezi yöntemiyle gösterilmesi.

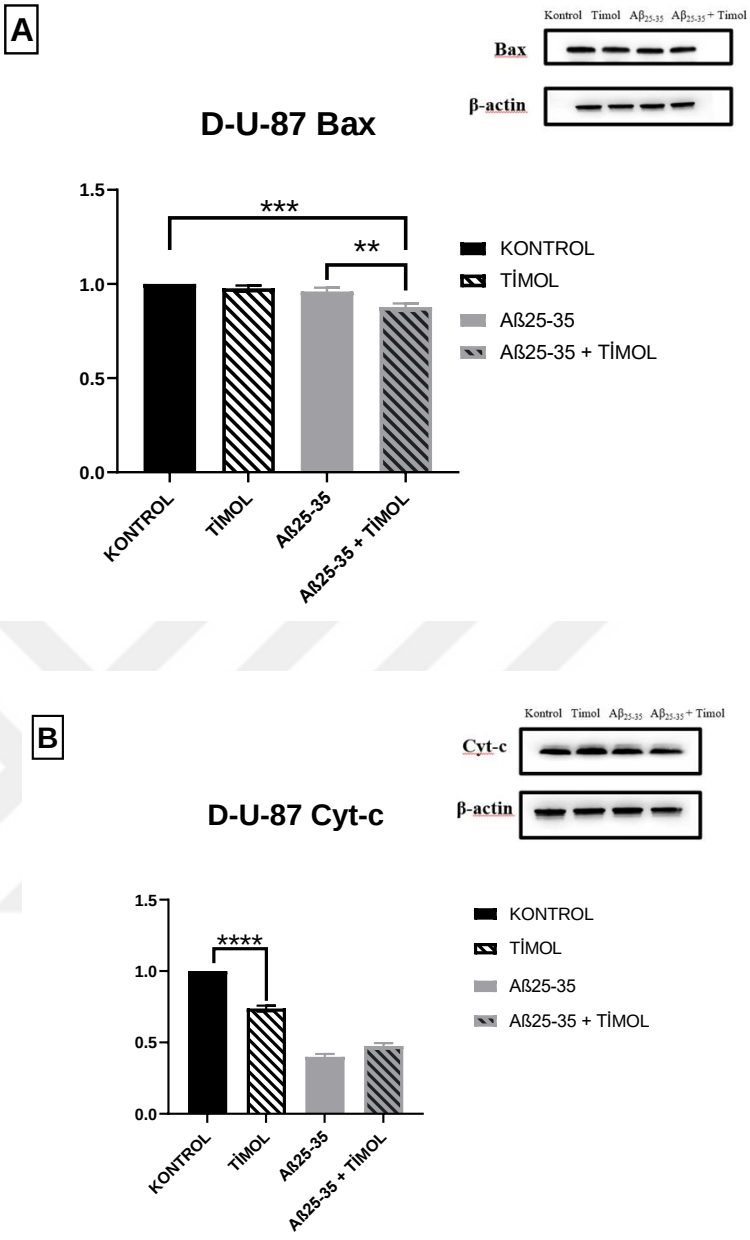
4.4. $A\beta_{25-35}$ ile Oluşturulan AH Modelinde Timol' ün Nöroprotektif Etkisinin Protein Düzeyinde Araştırılması

Çalışmamızın RT-qPCR kısmında Bcl-2, Bax, Cyt-c gen ekspresyonlarının; Kontrol, Timol, $A\beta_{25-35}$ ve $A\beta_{25-35}$ + Timol grupları varlığındaki değişimleri araştırıldı.

Kontrol, Timol, $A\beta_{25-35}$ ve $A\beta_{25-35}$ + Timol dozlarıyla inkübe edilen D-U-87 hücresinin Bax ve Cyt-c gen ekspresyon seviyeleri Şekil 25' de gösterildi.

Apoptotik Bax protein ekspresyon düzeyinin kontrole göre, $A\beta_{25-35}$ + Timol grubunda anlamlı bir azalma göstererek Timol'ün protein düzeyinde anti-apoptotik etkisi belirlendi. $A\beta_{25-35}$ grubuna kıyasla, $A\beta_{25-35}$ + Timol grubunda anlamlı bir azalma göstererek Timol'ün protein düzeyinde anti-apoptotik etki gösterdiği bulundu.

Apoptotik Cyt-c protein ekspresyon düzeyinin kontrole göre, Timol grubunda anlamlı bir azalma göstererek protein düzeyinde D-U-87 hücresini apoptozdan koruduğu belirlendi.



Şekil 25. Kontrol, Timol, $A\beta_{25-35}$ ve $A\beta_{25-35}$ + Timol dozları ile 24 saat boyunca inkübe edilen D-U-87 hücresindeki etkisinin Bax ve Cyt-c antikorlarıyla Western Blot yöntemiyle incelenmesi: (A) Bax, ve (B) Cyt-c. **** p <0,0001, *** p value 0,0004, ** p value 0,0070. Tüm istatistiksel analizler Student-t testi kullanılarak yapıldı. Ortalama ± standart sapma (n = 3) gösterildi.

5. TARTIŞMA

AH, dünya genelinde yaklaşık 45 milyon kişiyi etkisi altına alan demansın birincil nedeni olup aynı zamanda demansın birincil ölüm sebebidir (6). AH' nin patofizyolojisinde ayırt edici iki temel özellik bulunmaktadır; bunlar, Aβ proteininin hücre dışında birikmesiyle oluşan Aβ plakları ve hiperfosforile Tau proteini tarafından ortaya çıkan nörfibriler yumaklardır (39). Sentetik $A\beta_{25-35}$, AH' li kişilerin beyinlerindeki birikimlere benzer şekilde *in vitro* hücre kültürü ortamında da agregatların oluşmasına-toksik etki göstermesine sebep olmaktadır (57). Timol, kekik türleri içerisindeki sekonder metabolitlerden birisidir ve renksiz kristal monoterpen fenoldür. Timol, yüzyıllardır geleneksel tıpta kullanılmış olup; antioksidan, anti-inflamatuar, antibakteriyel, antitümör, serbest radikal süpürücü gibi farmakolojik etkiye sahiptir (67). SB, hücre proliferasyonunu inhibe etme, hücre döngüsünün durdurulmasını indükleme ve hücre farklılaşmasını destekleme özelliklerine sahiptir. U-87 hücrelerine kolinerjik nöron karakterinin kazandırılması için kullanılan bir histon deasetilaz inhibitörüdür (63).

Çalışmamızda *in vitro* insan glioblastoma hücre hattı olan U-87MG hücresinde SB ile kolinerjik nöron karakteri kazandırıldıktan sonra $A\beta_{25-35}$ ile oluşturulan AH modelinde Timol' ün potansiyel koruyucu etkisi araştırıldı. Timol, lipofilik yapıya sahip olması sebebiyle kan beyin bariyerini geçip beyin dokusunda biriktiğinden iyon kanallarının ve nöronların işlevini olumlu yönde etkilemektedir (69). Ayrıca Timol'ün AChE inhibitör aktivitesinden dolayı AH tedavisi için yeni terapötik hedef olabileceği ifade edilmektedir (67).

In vitro U-87 hücresinde AH modelinin mimik edilebilmesi için ilgili hücreye nöron karakteri kazandırılması gerektiği için bu çalışmamızda Liu ve arkadaşlarının yapmış olduğu şekilde histon deasetilaz inhibitörü olan SB kullanarak kolinerjik nöron karakteri kazandırdık. Kolinerjik nöron karakteri kazandırdığımızı mikroskobik olarak göstermenin yanı sıra kolinerjik nöron biyobelirteci ChAT proteinin düzeyini Western Blot yöntemiyle doğruladık. Yaptığımız çalışmada kontrol grubuna kıyasla SB uygulanan grupta ChAT protein düzeyi anlamlı kat değişimi gösterdi. Elde ettiğimiz ChAT protein seviyesi sonuçları literatür ile uyumlu olup, Liu ve ekibi tarafından da elde edilmiştir (63).

U-87 hücresine $A\beta_{25-35}$ uygulanmasıyla, doz ve süreyle ters orantılı olarak hücre canlılığının azaldığını bulduk. Ayrıca çalışmamızda, U-87 hücresine 24 saat uygulanan 1µM $A\beta_{25-35}$' in hücre canlılığını % 58,52' ye düşürdüğünü; 48 saatte ise %90,09' a arttırdığını gösterdik. U-87 hücresinde $A\beta_{25-35}$ dozuna ve süreye bağlı olarak hücre canlılığında artış görülmesini, en agresif primer beyin tümörü (60) olma özelliğine dayandırdık. Cholia ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise U-87 hücresine uygulanan $A\beta_{25-35}$' in doza bağlı olarak hücre proliferasyonunda azalmaya yol açtığı ancak süreye bağlı olarak hücre proliferasyonunu tetiklediği görülmektedir. 24 saat 10µM $A\beta_{25-35}$ dozunun ise sitotoksik olmayan etki gösterdiği ifade edilmiştir (84). Yapılan bir diğer çalışmada ise U-87 hücresine $A\beta_{1-42}$'nın 0.1-50µM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat uygulanması sonrasında 1 µM üzeri dozlarda hücre canlılığını inhibe ettiği gösterilmiştir. Ancak 24 saatte 0.1 µM'da hücre proliferasyonunu desteklediği; 48 saatte ise hücre canlılığını inhibe ettiği ifade edilmiştir (85). Park ve arkadaşları, insan nöroblastoma hücre hattında (SH-SY5Y) 25µM $A\beta_{25-35}$'in hücre canlılığını 24 saatte % 63,76'ya düşürdüğü ifade edilmiştir (86). Yaptığımız MTT çalışmaları ve literatür taraması sonucunda Aβ peptit fragmanlarının, U-87 hücrelerinin proliferasyonu/inhibisyonu üzerindeki etkilerinin karmaşık olduğunu göstermiştir.

U-87 hücresinde Timol'ün 10µM, 50µM, 100µM, 200µM, 400µM, 800 µM ve 1000µM konsantrasyonları 24 saat uygulanarak hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi araştırıldı. U-87 hücresine 1000µM ve 800µM Timol uygulaması hücre canlılığını sırasıyla %47,48 ve %53,24'e düşürürken; 400µM, 200µM Timol uygulaması hücre proliferasyonunu desteklemiştir. Seraj ve ekibi tarafından yapılan çalışmada U-87 hücresine 24 saat farklı dozlarda (31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 ve 1500 µM) anti-kanser özelliği nedeniyle Timol uygulanmış ve hücre canlılığı üzerindeki etkisi incelenmiş; doza bağlı olarak canlılığı azalttığı ifade edilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada IC50 değeri olarak 230 µM belirlenmiştir (87).

U-87 hücresinde 2.5µM ve 1µM $A\beta_{25-35}$ dozları ile Timol' ün 10µM, 50µM, 100µM, 200µM ve 400µM dozlarının 24 saat olarak kombinasyonu uygulanmış ve Timol'ün olası koruyucu etkisi araştırılmıştır. Kombine kontrol grubuna kıyasla 2.5µM $A\beta_{25-35}$ + 200µM Timol grubunda hücre canlılığı % 74,42 iken, 1µM $A\beta_{25-35}$ +

200μM Timol grubunda canlılık %114,41 olarak artış göstermiştir. Böylece mRNA ve protein düzeyindeki çalışmalar için 1μM $A\beta_{25-35}$ dozu ile AH modeli oluşturulmuş ve Timol' ün potansiyel nörokoruyucu etkisi için 200μM dozu seçilmiştir.

Kontrol, Timol, $A\beta_{25-35}$ ve $A\beta_{25-35}$ + Timol grup dozlarıyla muamele edilen D-U-87 hücresinin Bcl-2, Bax ve Cyt-c gen ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Anti-apoptotik Bcl-2/Bax gen ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla, $A\beta_{25-35}$ grubunda Bax'ın mRNA düzeyinde artması nedeniyle anlamlı bir azalma görülmüştür. Ayrıca $A\beta_{25-35}$ grubuna göre, $A\beta_{25-35}$ + Timol grubunda anlamlı bir artış olmuştur. Böylece mRNA düzeyinde D-U-87 hücre hattında $A\beta_{25-35}$, mRNA seviyesinde apoptotik etki; Timol ise, oluşturulan AH modelinde anti-apoptotik etki göstermiştir. U-87 hücre hattında, 1μM $A\beta_{25-35}$ uygulanan dozda, pro-apoptotik Bax'ın mRNA ekspresyonunun artışı, apoptozu intrinsik yolak aracılığı ile indüklemiştir. Yapılan bir çalışmada, elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde, SH-SY5Y hücresinde kontrol grubuna kıyasla, 24 saat 10μM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grupta mRNA düzeyinde apoptotik Bax'ın artışı ve anti-apoptotik Bcl-2'nin azalması nedeniyle $A\beta_{1-42}$'nin apoptozu intrinsik yolak üzerinden tetiklediği gösterilmiştir (88).

Apoptotik Cyt-c gen ekspresyonu kontrol grubuna göre, $A\beta_{25-35}$ grubunda anlamlı bir artış göstermiş; böylece $A\beta_{25-35}$ uygulamasının apoptozu tetiklediği mRNA düzeyinde belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara benzer bir şekilde, SH-SY5Y hücresinde kontrol grubuna kıyasla, 24 saat 10μM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grupta mRNA düzeyinde apoptotik Cyt-c'nin ekspresyonu artmış ve böylece mitokondriyal yolak üzerinden $A\beta_{1-42}$'nin apoptozu tetiklediği ifade edilmiştir (88).

Özetle yapmış olduğumuz mRNA düzeyindeki gen ekspresyonu çalışmaları ve literatür taraması sonucunda Aβ peptit fragmanlarının apoptozu intrinsik yolak aracılığıyla indüklediğini ifade etmektedir.

Pro-apoptotik Bax'ın protein düzeyinde ekspresyonu kontrol grubuna göre, $A\beta_{25-35}$ + Timol grubunda anlamlı bir azalma gösterdiği ayrıca, $A\beta_{25-35}$ grubuna kıyasla, $A\beta_{25-35}$ + Timol grubunda da anlamlı bir azalma göstererek Timol'ün protein düzeyinde anti-apoptotik etki gösterdiği bulundu. Yapılan bir çalışmada SH-SY5Y hücrelerine 24 saat 10μM $A\beta_{1-42}$ uygulanan grupta, kontrol grubuna kıyasla protein

düzeyinde anti-apoptotik Bcl-2/Bax oranında anlamlı bir azalma gösterdiği ve böylece $A\beta_{1-42}$'nin apoptozu indüklediği ifade edilmiştir (89). Liu ve ekibi tarafından yapılan çalışmada, SH-SY5Y hücrelerine 24 saat 40μM $A\beta_{25-35}$ uygulanan grupta, kontrole kıyasla protein düzeyinde anti-apoptotik Bcl-2/Bax oranı azalmış, apoptotik Cyt-c ekspresyonu artmıştır (90). Yapmış olduğumuz çalışmada apoptotik Cyt-c protein ekspresyon düzeyinin kontrole göre, Timol uygulanan grupta anlamlı bir azalma sağladığı ve protein düzeyinde U-87 hücresini apoptozdan koruduğu saptandı.

Beyinde apoptoz farklı mekanizmalar üzerinden tetiklenebilmekte olup karmaşık bir süreci içerisinde barındırmaktadır. Günümüze kadar olan çalışmalarda iki ana apoptotik yolak tanımlanmıştır; bunlar intrinsik yolak olan mitokondriyal yol ve ekstrinsik yolak olan ölüm reseptörü yoludur. Ancak artık iki yolağın birbiri ile ilişkili olabildiği ve birbirini tetikleyerek apoptozu indüklediği görülmektedir (64,65). Nöronlar, sinaptik bağlantıları için fazla miktarda ATP'ye gereksinim duyarlar. Ancak AH'de mitokondriyal disfonksiyon tetiklendiği için ortamdaki enerjinin tükenmesine, aşırı ROT üretimine mitokondriden pro-apoptotik genlerin salınmasına neden olarak nöronal apoptoza neden olur. *In vitro* AH modelinin mimik edilmesi için kullanılan sentetik Aβ peptit fragmanlarının farklı yolaklar üzerinden nöronal apoptoza yol açtığı bilinmektedir (71,73,74). AH'li kişilerde AChE'yi inhibe edebilme potansiyeli olan farmakolojik yaklaşımlar araştırılmaktadır. Ancak AChE' nin inhibe edilme mekanizması oldukça karmaşık olup, PI3K/AKT/mTOR hücre sinyal yolağı ve intrinsik apoptoz yolağını içermektedir. Bu nedenle AChE inhibitörü olabileceği düşünülen kekik ve türevlerinin (Timol, Karvakrol) nörodejeneratif hastalıklardaki mekanizmasının belirlenebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (79,80). Ek olarak kekik ve türevlerinin antioksidatif stres, antiinflamatuar yanıt, mitokondriyal disfonksiyonun iyileştirilmesi ve nörotransmitterların modülasyonu gibi birçok özelliği olması sebebiyle farklı mekanizmalar üzerinden nöroprotektif etki gösterebilmektedir (33). Ayrıca, aktive olmuş astrositlerin, nöronların Aβ maruziyetini azaltabilmek amacıyla Aβ'yı içselleştirdiği ve degrede ettiği ifade edilmiştir (61). Bu nedenle glioblastoma-astrositom hücre hattı olan U-87 hücresine SB ile kolinerjik nöron karakteri kazandırılmasıyla astrositin aktive olmasının tetiklenmiş olabileceği ve Aβ'yi degrede edebileceği saptanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaşa bağlı hastalık grubunda bulunan ve nöronal ölüm ile karakterize edilen nörodejeneratif hastalıkların tedavi edilmesi güçtür. Ve dünya genelinde yıllar içerisinde nüfusun yaşlanmasına bağlı olarak nörodejeneratif hastalıklardan etkilenen kişi sayısı artmaktadır. Nörodejeneratif hastalık olarak tanımlanan AH; dünyada yaklaşık 45 milyonu etkileyen demansın ve ölümün birincil sebebidir. AH, beyinde Aβ ve Tau proteininin birikmesi ile karakterizedir. Beyinde apoptoz, intrinsik ve ekstrinsik yolak üzerinden tetiklenebilmekte olup birçok gen ailesinin aktivasyonu veya inhibisyonuyla ilişkilidir. Ayrıca AH modelinin mimik edilmesi için kullanılan sentetik Aβ peptit fragmanlarının farklı yolaklar üzerinden nöronal apoptoza neden olmaktadır. Timol vb. kekik türevlerinin; antioksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyonun iyileştirilmesi ve nörotransmitterların modülasyonu gibi farklı mekanizmalar üzerinden nöroprotektif etki gösterebildiğinden daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Ek olarak farklı Aβ peptit fragmanlarının D-U-87 hücresindeki paternlerinin gösterilebilmesi ve buna bağlı olarak hücre spesifik tedavilerin göz önüne alınabilmesi gerekmektedir. Bunun yanı sıra D-U-87 hücresinde oluşturulan AH modellerinde kekik ve türevlerinin tedavideki rolünün araştırılması, ilgili etken maddelerin anti-apoptotik ve pro-apoptotik mRNA-protein düzeyindeki ekspresyonlarının belirlenebilmesi ileriki çalışmalar için ön veri sağlayacaktır. Aβ uygulamasının farklılaştırılmış (nöron karakteri kazandırılmış) U-87 hücrelerindeki moleküler mekanizmalara etkisi ilk kez araştırılarak sunulmuş olup, bu bulgular gelecekteki çalışmalara ışık tutacaktır. Bir sonraki çalışmamızda farklı Aβ peptit fragmanlarının D-U-87 hücresindeki paternlerini gösterip, kekik ve türevlerinin tedavideki rolünün tam olarak ifade edilebilmesi için mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sunmayı hedefliyoruz.

7. KAYNAKÇA

1. Slanzi A, Iannoto G, Rossi B, Zenaro E, Constantin G. In vitro Models of Neurodegenerative Diseases. Front Cell Dev Biol. 13 Mayıs 2020;8:328.

2. Cummings JL, Morstorf T, Zhong K. Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. Alzheimers Res Ther. 2014;6(4):37.

3. Schneider LS, Mangialasche F, Andreasen N, Feldman H, Giacobini E, Jones R, vd. Clinical trials and late-stage drug development for A lzheimer's disease: an appraisal from 1984 to 2014. J Intern Med. Mart 2014;275(3):251-83.

4. Pfeuffer S, Ruck T, Kleinschnitz C, Wiendl H, Meuth SG. Failed, interrupted and inconclusive trials on relapsing multiple sclerosis treatment: update 2010–2015. Expert Rev Neurother. 02 Haziran 2016;16(6):689-700.

5. Anderson RM, Hadjichrysanthou C, Evans S, Wong MM. Why do so many clinical trials of therapies for Alzheimer's disease fail? The Lancet. Kasım 2017;390(10110):2327-9.

6. Ma SL, Ng HK, Baum L, Pang JCS, Chiu HFK, Woo J, vd. Low-density lipoprotein receptor-related protein 8 (apolipoprotein E receptor 2) gene polymorphisms in Alzheimer's disease. Neurosci Lett. Kasım 2002;332(3):216-8.

7. Beam CR, Kaneshiro C, Jang JY, Reynolds CA, Pedersen NL, Gatz M. Differences Between Women and Men in Incidence Rates of Dementia and Alzheimer's Disease. J Alzheimers Dis. 24 Temmuz 2018;64(4):1077-83.

8. Calabrò M, Rinaldi C, Santoro G, Crisafulli C, Department of Biomedical and Dental Sciences and Morphofunctional Imaging, University of Messina, Italy. The biological pathways of Alzheimer disease: a review. AIMS Neurosci. 2021;8(1):86-132.

9. Hampel H, Hardy J, Blennow K, Chen C, Perry G, Kim SH, vd. The Amyloid-β Pathway in Alzheimer's Disease. Mol Psychiatry. Ekim 2021;26(10):5481-503.

10. Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, vd. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. Nat Rev Neurol. Ekim 2019;15(10):565-81.

11. Rabinovici GD. Late-onset Alzheimer Disease. Contin Lifelong Learn Neurol. Şubat 2019;25(1):14-33.

12. A. Armstrong R. Review article What causes alzheimer's disease? Folia Neuropathol. 2013;3:169-88.

13. Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. J Alzheimers Dis. 19 Nisan 2017;57(4):1105-21.

14. BiTmez B, Çevreli B, Kaşikçi E. Effect of thymol on oxidative stress and reelin signaling pathway in Alzheimer's disease model. Turk J Biol. 27 Şubat 2024;48(1):70-9.

15. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. Molecules. 08 Aralık 2020;25(24):5789.

16. Giau VV, Bagyinszky E, Youn YC, An SSA, Kim S. APP, PSEN1, and PSEN2 Mutations in Asian Patients with Early-Onset Alzheimer Disease. Int J Mol Sci. 25 Eylül 2019;20(19):4757.

17. Yamazaki Y, Zhao N, Caulfield TR, Liu CC, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. Nat Rev Neurol. Eylül 2019;15(9):501-18.

18. Dai MH, Zheng H, Zeng LD, Zhang Y. The genes associated with early-onset Alzheimer's disease. Oncotarget. 13 Mart 2018;9(19):15132-43.

19. Wan K, Ma ZJ, Zhou X, Zhang YM, Yu XF, You MZ, vd. A Novel Probable Pathogenic PSEN2 Mutation p.Phe369Ser Associated With Early-Onset Alzheimer's Disease in a Chinese Han Family: A Case Report. Front Aging Neurosci. 21 Temmuz 2021;13:710075.

20. Pimenova AA, Goate AM. Novel presenilin 1 and 2 double knock-out cell line for in vitro validation of PSEN1 and PSEN2 mutations. Neurobiol Dis. Mayıs 2020;138:104785.

21. Roda A, Serra-Mir G, Montoliu-Gaya L, Tiessler L, Villegas S. Amyloid-beta peptide and tau protein crosstalk in Alzheimer's disease. Neural Regen Res. 2022;17(8):1666.

22. Silva MVF, Loures CDMG, Alves LCV, De Souza LC, Borges KBG, Carvalho MDG. Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. J Biomed Sci. Aralık 2019;26(1):33.

23. A. Armstrong R. Risk factors for Alzheimer's disease. Folia Neuropathol. 2019;57(2):87-105.

24. Campdelacreu J. Parkinson's disease and Alzheimer disease: environmental risk factors. Neurol Engl Ed. Kasım 2014;29(9):541-9.

25. Jisheng Nie. Exposure to Aluminum in Daily Life and Alzheimer's Disease. 99 s.

26. De Bruijn RF, Ikram MA. Cardiovascular risk factors and future risk of Alzheimer's disease. BMC Med. Aralık 2014;12(1):130.

27. Johansen MC, Langton-Frost N, Gottesman RF. The Role of Cardiovascular Disease in Cognitive Impairment. Curr Geriatr Rep. Mart 2020;9(1):1-9.

28. Chen ZR, Huang JB, Yang SL, Hong FF. Role of Cholinergic Signaling in Alzheimer's Disease. Molecules. 10 Mart 2022;27(6):1816.

29. Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, De Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, vd. Alzheimer's disease. The Lancet. Temmuz 2016;388(10043):505-17.

30. Thomas L, Florio T, Perez-Castro C. Extracellular Vesicles Loaded miRNAs as Potential Modulators Shared Between Glioblastoma, and Parkinson's and Alzheimer's Diseases. Front Cell Neurosci. 04 Kasım 2020;14:590034.

31. Šimić G, Španić E, Langer Horvat L, Hof PR. Blood-brain barrier and innate immunity in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Içinde: Progress in Molecular Biology and Translational Science [Internet]. Elsevier; 2019 [a.yer 21 Temmuz 2024]. s. 99-145. Erişim adresi: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877117319300936

32. Peng L, Bestard-Lorigados I, Song W. The synapse as a treatment avenue for Alzheimer's Disease. Mol Psychiatry. Temmuz 2022;27(7):2940-9.

33. Peng X, Zhang X, Sharma G, Dai C. Thymol as a Potential Neuroprotective Agent: Mechanisms, Efficacy, and Future Prospects. J Agric Food Chem. 03 Nisan 2024;72(13):6803-14.

34. Yuksel M, Tacal O. Trafficking and proteolytic processing of amyloid precursor protein and secretases in Alzheimer's disease development: An up-to-date review. Eur J Pharmacol. Ağustos 2019;856:172415.

35. Picone P, Nuzzo D, Giacomazza D, Di Carlo M. β-Amyloid Peptide: the Cell Compartment Multi-faceted Interaction in Alzheimer's Disease. Neurotox Res. Şubat 2020;37(2):250-63.

36. Chen G fang, Xu T hai, Yan Y, Zhou Y ren, Jiang Y, Melcher K, vd. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. Acta Pharmacol Sin. Eylül 2017;38(9):1205-35.

37. Liu X, Liu Y, Ji S. Secretases Related to Amyloid Precursor Protein Processing. Membranes. 15 Aralık 2021;11(12):983.

38. Wu T, Lin D, Cheng Y, Jiang S, Riaz MW, Fu N, vd. Amyloid Cascade Hypothesis for the Treatment of Alzheimer's Disease: Progress and Challenges. Aging Dis. 2022;13(6):1745.

39. Bitmez B, Balbal B. Alzheimer ve Parkinson Hastalıklarında Bor İçeren Bileşiklerin Nörokoruyucu Etkisi. J Boron [Internet]. 14 Şubat 2024 [a.yer 21 Temmuz 2024]; Erişim adresi: https://dergipark.org.tr/tr/doi/10.30728/boron.1408368

40. Brunello CA, Merezhko M, Uronen RL, Huttunen HJ. Mechanisms of secretion and spreading of pathological tau protein. Cell Mol Life Sci. Mayıs 2020;77(9):1721-44.

41. Narayanan SE, Rehuman NA, Harilal S, Vincent A, Rajamma RG, Behl T, vd. Molecular mechanism of zinc neurotoxicity in Alzheimer's disease. Environ Sci Pollut Res. Aralık 2020;27(35):43542-52.

42. Rawat P, Sehar U, Bisht J, Selman A, Culberson J, Reddy PH. Phosphorylated Tau in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies. Int J Mol Sci. 25 Ekim 2022;23(21):12841.

43. Mineur YS, Picciotto MR. The role of acetylcholine in negative encoding bias: Too much of a good thing? Eur J Neurosci. Ocak 2021;53(1):114-25.

44. Majdi A, Sadigh-Eteghad S, Rahigh Aghsan S, Farajdokht F, Vatandoust SM, Namvaran A, vd. Amyloid-β, tau, and the cholinergic system in Alzheimer's disease: seeking direction in a tangle of clues. Rev Neurosci. 26 Mayıs 2020;31(4):391-413.

45. Berry AS, Harrison TM. New perspectives on the basal forebrain cholinergic system in Alzheimer's disease. Neurosci Biobehav Rev. Temmuz 2023;150:105192.

46. Pepeu G, Grazia Giovannini M. The fate of the brain cholinergic neurons in neurodegenerative diseases. Brain Res. Eylül 2017;1670:173-84.

47. Lai Shi Min S, Liew SY, Chear NJY, Goh BH, Tan WN, Khaw KY. Plant Terpenoids as the Promising Source of Cholinesterase Inhibitors for Anti-AD Therapy. Biology. 14 Şubat 2022;11(2):307.

48. Liu Y, Nguyen M, Robert A, Meunier B. Metal Ions in Alzheimer's Disease: A Key Role or Not? Acc Chem Res. 16 Temmuz 2019;52(7):2026-35.

49. Yan-Zhong Chang AT. Brain Iron Metabolism and CNS Diseases. 1 s.

50. Balachandran RC, Mukhopadhyay S, McBride D, Veevers J, Harrison FE, Aschner M, vd. Brain manganese and the balance between essential roles and neurotoxicity. J Biol Chem. Mayıs 2020;295(19):6312-29.

51. Li Z, Liu Y, Wei R, Yong VW, Xue M. The Important Role of Zinc in Neurological Diseases. Biomolecules. 23 Aralık 2022;13(1):28.

52. Huat TJ, Camats-Perna J, Newcombe EA, Valmas N, Kitazawa M, Medeiros R. Metal Toxicity Links to Alzheimer's Disease and Neuroinflammation. J Mol Biol. Nisan 2019;431(9):1843-68.

53. Martins AC, Gubert P, Villas Boas GR, Meirelles Paes M, Santamaría A, Lee E, vd. Manganese-induced neurodegenerative diseases and possible therapeutic approaches. Expert Rev Neurother. 01 Kasım 2020;20(11):1109-21.

54. Budinger D, Barral S, Soo AKS, Kurian MA. The role of manganese dysregulation in neurological disease: emerging evidence. Lancet Neurol. Kasım 2021;20(11):956-68.

55. Gong NJ, Dibb R, Bulk M, Van Der Weerd L, Liu C. Imaging beta amyloid aggregation and iron accumulation in Alzheimer's disease using quantitative susceptibility mapping MRI. NeuroImage. Mayıs 2019;191:176-85.

56. Viktorinova A, Durfinova M. Mini-Review: Is iron-mediated cell death (ferroptosis) an identical factor contributing to the pathogenesis of some neurodegenerative diseases? Neurosci Lett. Şubat 2021;745:135627.

57. Wiatrak B, Piasny J, Kuźniarski A, Gąsiorowski K. Interactions of Amyloid-β with Membrane Proteins. Int J Mol Sci. 04 Haziran 2021;22(11):6075.

58. Muñoz SS, Engel M, Balez R, Do-Ha D, Cabral-da-Silva MC, Hernández D, vd. A Simple Differentiation Protocol for Generation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Basal Forebrain-Like Cholinergic Neurons for Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia Disease Modeling. Cells. 02 Eylül 2020;9(9):2018.

59. Ballinger EC, Ananth M, Talmage DA, Role LW. Basal Forebrain Cholinergic Circuits and Signaling in Cognition and Cognitive Decline. Neuron. Eylül 2016;91(6):1199-218.

60. Grochans S, Cybulska AM, Simińska D, Korbecki J, Kojder K, Chlubek D, vd. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme–Literature Review. Cancers. 13 Mayıs 2022;14(10):2412.

61. Maresca B, Spagnuolo MS, Cigliano L. Haptoglobin Modulates Beta-Amyloid Uptake by U-87 MG Astrocyte Cell Line. J Mol Neurosci. Mayıs 2015;56(1):35-47.

62. ATCC. https://www.atcc.org/products/htb-14.

63. Liu H, Xia J, Wang T, Li W, Song Y, Tan G. Differentiation of human glioblastoma U87 cells into cholinergic neuron. Neurosci Lett. Haziran 2019;704:1-7.

64. Moujalled D, Strasser A, Liddell JR. Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases. Cell Death Differ. Temmuz 2021;28(7):2029-44.

65. Choi SB, Kwon S, Kim JH, Ahn NH, Lee JH, Yang SH. The Molecular Mechanisms of Neuroinflammation in Alzheimer's Disease, the Consequence of Neural Cell Death. Int J Mol Sci. 21 Temmuz 2023;24(14):11757.

66. Kelly GL, Strasser A. Toward Targeting Antiapoptotic MCL-1 for Cancer Therapy. Annu Rev Cancer Biol. 09 Mart 2020;4(1):299-313.

67. Nagoor Meeran MF, Javed H, Al Taee H, Azimullah S, Ojha SK. Pharmacological Properties and Molecular Mechanisms of Thymol: Prospects for Its Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development. Front Pharmacol. 26 Haziran 2017;8:380.

68. Salehi B, Mishra AP, Shukla I, Sharifi-Rad M, Contreras MDM, Segura-Carretero A, vd. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. Phytother Res. Eylül 2018;32(9):1688-706.

69. Zolfaghari Z, Vatanparast J. Thymol provokes burst of action potentials in neurons of snail Caucasotachea atrolabiata. Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol. Şubat 2020;228:108654.

70. Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. Biochem J. 15 Ocak 2012;441(2):523-40.

71. Monzio Compagnoni G, Di Fonzo A, Corti S, Comi GP, Bresolin N, Masliah E. The Role of Mitochondria in Neurodegenerative Diseases: the Lesson from Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. Mol Neurobiol. Temmuz 2020;57(7):2959-80.

72. Phadwal K, Vrahnas C, Ganley IG, MacRae VE. Mitochondrial Dysfunction: Cause or Consequence of Vascular Calcification? Front Cell Dev Biol. 16 Mart 2021;9:611922.

73. Bonora M, Giorgi C, Pinton P. Molecular mechanisms and consequences of mitochondrial permeability transition. Nat Rev Mol Cell Biol. Nisan 2022;23(4):266-85.

74. Tian E, Sharma G, Dai C. Neuroprotective Properties of Berberine: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. Antioxidants. 19 Ekim 2023;12(10):1883.

75. Siddappaji KK, Gopal S, Department of Studies in Microbiology, University of Mysore, Mysuru, 570006, Karnataka, India. Molecular mechanisms in Alzheimer's disease and the impact of physical exercise with advancements in therapeutic approaches. AIMS Neurosci. 2021;8(3):357-89.

76. Sharma H, Yang H, Sharma N, An SSA. Trachyspermum ammi Bioactives Promote Neuroprotection by Inhibiting Acetylcholinesterase, Aβ-Oligomerization/Fibrilization, and Mitigating Oxidative Stress In Vitro. Antioxidants. 20 Aralık 2023;13(1):9.

77. Wu Z, Li W, Zhu H, Li X, Zhou Y, Chen Q, vd. Identification of cuproptosis-related subtypes and the development of a prognostic model in glioma. Front Genet. 01 Mart 2023;14:1124439.

78. Kumari S, Dhapola R, Reddy DH. Apoptosis in Alzheimer's disease: insight into the signaling pathways and therapeutic avenues. Apoptosis. Ağustos 2023;28(7-8):943-57.

79. Martorana A, Esposito Z, Koch G. Beyond the Cholinergic Hypothesis: Do Current Drugs Work in Alzheimer's Disease? CNS Neurosci Ther. Ağustos 2010;16(4):235-45.

80. Asadbegi (Hamedi) M, Komaki A, Amiri P, Asaad Karimi S, Yaghmaei P, Ebrahim-Habibi A, vd. Learning and Memory Impairment Induced by Amyloid Beta Peptide and Effects of Thymol on Hippocampal Synaptic Plasticity in Rats Fed a High-Fat Diet That Received Amyloid Beta. Içinde: D. Burman D, editör. Hippocampus - More than Just Memory [Internet]. IntechOpen; 2023 [a.yer 21 Temmuz 2024]. Erişim adresi: https://www.intechopen.com/chapters/86335

81. Asadbegi M, Komaki A, Salehi I, Yaghmaei P, Ebrahim-Habibi A, Shahidi S, vd. Effects of thymol on amyloid-β-induced impairments in hippocampal synaptic plasticity in rats fed a high-fat diet. Brain Res Bull. Mart 2018;137:338-50.

82. Hamdan AME, Alharthi FHJ, Alanazi AH, El-Emam SZ, Zaghlool SS, Metwally K, vd. Neuroprotective Effects of Phytochemicals against Aluminum Chloride-Induced Alzheimer's Disease through ApoE4/LRP1, Wnt3/β-Catenin/GSK3β, and TLR4/NLRP3 Pathways with Physical and Mental Activities in a Rat Model. Pharmaceuticals. 17 Ağustos 2022;15(8):1008.

83. Qian K, Bao X, Li Y, Wang P, Guo Q, Yang P, vd. Cholinergic Neuron Targeting Nanosystem Delivering Hybrid Peptide for Combinatorial Mitochondrial Therapy in Alzheimer's Disease. ACS Nano. 26 Temmuz 2022;16(7):11455-72.

84. Cholia RP, Dhiman M, Kumar R, Mantha AK. Oxidative stress stimulates invasive potential in rat C6 and human U-87 MG glioblastoma cells via activation and cross-talk between PKM2, ENPP2 and APE1 enzymes. Metab Brain Dis. Ağustos 2018;33(4):1307-26.

85. Yao Y, Huang J, Chen Y, Hu H, Tang X, Li X. Effects and mechanism of amyloid β1-42 on mitochondria in astrocytes. Mol Med Rep [İnternet]. 16 Mart 2018 [a.yer 21 Temmuz 2024]; Erişim adresi: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2018.8761

86. Park HS, Pang QQ, Kim YS, Kim JH, Cho EJ. Neuroprotective Effect of Membrane-Free Stem Cell Extract against Amyloid Beta 25–35-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells. Appl Sci. 03 Mart 2021;11(5):2219.

87. Qoorchi Moheb Seraj F, Heravi-Faz N, Soltani A, Ahmadi SS, Shahbeiki F, Talebpour A, vd. Thymol has anticancer effects in U-87 human malignant glioblastoma cells. Mol Biol Rep. Ekim 2022;49(10):9623-32.

88. Sirin S, Aslim B. Characterization of lactic acid bacteria derived exopolysaccharides for use as a defined neuroprotective agent against amyloid beta1–42-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. Sci Rep. 15 Mayıs 2020;10(1):8124.

89. Li Y, Liu Q, Sun J, Wang J, Liu X, Gao J. Mitochondrial protective mechanism of simvastatin protects against amyloidï¿½β peptide-induced injury in SH-SY5Y cells. Int J Mol Med [İnternet]. 05 Şubat 2018 [a.yer 21 Temmuz 2024]; Erişim adresi: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2018.3456

90. Liu XY, Wang LX, Chen Z, Liu LB. Liraglutide prevents beta-amyloid-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells via a PI3K-dependent signaling pathway. Neurol Res. 02 Nisan 2016;38(4):313-9.

EK – 1

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Prof.Dr Sefa Kızıldağ

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**
AÇIK ADRES	**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR**
TELEFON	**0 232 412 22 54-0 232 412 22 58**
FAKS	**0 232 412 22 43**
E-POSTA	**goaek@deu.edu.tr**

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	8310-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☒ DOKTORA ☐	
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Timolün Glioblastoma Hücre Hattında Aβ25-35 ile Oluşturulan Alzheimer Modeli Üzerindeki Nöroprotektif Etkisinin Araştırılması**	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr Sefa Kızıldağ Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.	
	TEZ SAHİBİNİ ADI SOYADI	Beste Balbal	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ☐

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2023/29-18	Tarih:20.09.2023
	Prof.Dr Sefa Kızıldağ'ın sorumlusu olduğu **"Timolün Glioblastoma Hücre Hattında Aβ25-35 ile Oluşturulan Alzheimer Modeli Üzerindeki Nöroprotektif Etkisinin Araştırılması"** isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın mevcut haliyle etik yönden uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Mehmet Birhan Yılmaz (Başkan)	Kardiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Şükran Köse (Başkan Yardımcısı)	Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan	Moleküler Tıp	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Suna Asilsoy	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Aylin Özgen Alpaydın	Göğüs Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Özgür Er	Endodonti A.D.	Diş Hekimliği Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Hatice Şimşek Keskin	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Scher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoğlu Aksay	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Meryem Öztürk Haney	Halk Sağlığı Hemşireliği	Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Şule Özbilgin	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	DEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç Dr Tolga Şahin	Spor Yönetim Bilimleri	Necat Hepkon Spor Bilimleri Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒	
Dr.Öğr.Üyesi Gamze Tuna	Tıbbi Biyokimya	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Kadın	E ☐	H ☒	

EK -2



BESTE BALBAL

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

09 Şubat 2023 - Şu Anda (1 yıl 6 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK (YL) (TEZLİ)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.25 / 4.0

21 Ekim 2019 - 08 Haziran 2021 (1 yıl 8 ay)
Ön Lisans, Açıköğretim, ANADOLU ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
AÇIKÖĞRETİM FAKÜLTESİ, İŞ SAĞLIĞI VE GÜVENLİĞİ PR. (AÇIKÖĞRETİM)
Diploma Numarası: 2021-139233
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.02 / 4.0

15 Eylül 2017 - 09 Temmuz 2021 (3 yıl 10 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
MÜHENDİSLİK VE DOĞA BİLİMLERİ FAKÜLTESİ, MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PR. (ÜCRETLİ)
Diploma Numarası: 02-00748
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.04 / 4.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

Temmuz 2019 - Ağustos 2019 (2 ay) (Tam Zamanlı)
STAJYER, GENETİK TANI MERKEZİ

Temmuz 2019 - Ağustos 2019 (2 ay) (Tam Zamanlı)
STAJYER, ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ MÜHENDİSLİK VE DOĞA BİLİMLERİ FAKÜLTESİ MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ

Temmuz 2018 - Temmuz 2018 (1 ay) (Tam Zamanlı)
STAJYER, TEKNOPARK İSTANBUL A.Ş.

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: Orta, Yazma: Orta, Konuşma: Orta)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Temel Tıp Bilimleri -- Tıbbi Biyoloji

Tarımsal Bilimler -- Ziraat -- Tarla Bitkileri -- Biyoteknoloji ve Genetik -- Moleküler Genetik

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Dahili Tıp Bilimleri -- Tıbbi Genetik

Tarımsal Bilimler -- Ziraat -- Tarla Bitkileri -- Biyoteknoloji ve Genetik -- Sitogenetik

Anahtar Kelimeler

Moleküler Biyoloji Ve Genetik

Hücre Moleküler Biyolojisi

Moleküler Biyoloji

Moleküler Biyoloji Teknikleri

Kardiyovasküler Sistem

Kalp ve Damar Hastalıkları

Kardiyovasküler İlaçlar

Hücre Kültürü Teknikleri

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

B. BİTMEZ & B. BALBAL, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarında bor içeren bileşiklerin nörokoruyucu etkisi, Journal of Boron, 2024, 1408368, 9, 1, 42-51.

D. E. KAVAK, B. BALBAL, B. BİTMEZ, E. S. KAŞIKÇI & S. KIZILDAĞ, In vitro investigation of the neuroprotective potential of boric acid in a rotenone-induced parkinson, The Injector, 2023, 2822-4272, 2, 3, 26.

B. BALBAL, B. BİTMEZ, İ. G. ALBAYRAK, S. KUŞOĞLU GÜLTEKİN, E. AKALIN, K. SALİHLER, M. KARTAL & B. ATASEVER ARSLAN, EFFECTS OF VACCINIUM MYRTILLUS L. EXTRACT ON TNF-?-INDUCED INFLAMMATION THROUGH HUMAN PARAOXONASES, Revue Roumaine de Chimie, 2023, 2023,68(10?12),583?587, 68, 10-12, 583-587.

Bildiriler

D. E. KAVAK, B. BALBAL, B. BİTMEZ, E. S. KAŞIKÇI & S. KIZILDAĞ, Borik Asidin Rotenon İle Oluşturulan Parkinson Hastalık Modeli Üzerindeki Nöroprotektif Etkisinin İn Vitro Araştırılması, Özet Bildiri, 18.Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 26 Ekim 2023, 29 Ekim 2023.

Projeler

TEMEL ARAŞTIRMA, ARAŞTIRMACI, Ratlarda Deneysel Laminektomi Sonrası Oluşan Epidural Fibrozis Üzerine Nintedanibin Etkilerinin Araştırılması, Yürütülen Kuruluş: Dokuz Eylül Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), Destek Alınan Kuruluş: Dokuz Eylül Üniversitesi BAP-Güdümlü Proje (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

TEMEL ARAŞTIRMA, ARAŞTIRMACI, SARSASAPOGENİNİN VE 5-FLUOROURASİL KOMBİNASYONUNUN KOLOREKTAL KANSERDEKİ POTANSİYEL ANTİTÜMORAL ETKİLERİNİN INVITRO VE INVIVO OLARAK İNCELENMESİ, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ ADEP (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

TEMEL ARAŞTIRMA, PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ, Timolün Aß25-35 Kaynaklı Nörotoksisite Oluşturulmuş in vitro Glioblastoma Hücre Modelindeki Etkilerinin Araştırılması, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: TÜSEB (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

TEMEL ARAŞTIRMA, BURSİYER, Timolün Glioblastoma Hücre Hattında A2535 ile Oluşturulan Alzheimer Modeli Üzerindeki Nöroprotektif Etkisinin Araştırılması, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL BAP (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

TEMEL ARAŞTIRMA, PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ, İn vitro ateroskleroz modellemesinde Vaccinium myrtillus l. ekstresinin atero koruyucu etkisinin araştırılması, Yürütülen Kuruluş: MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PR. (%75 BURSLU), Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK BAŞKANLIK (Yurt İçi) , 01 Ekim 2020, 01 Haziran 2021.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

BİDEB Destekleri

BESTE BALBAL, Araştırma Burs ve Destekleri Müdürlüğü, 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı, Destek Sona Erdi, 2020 - 1.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Görev	ARDEB	BİDEB	BİLİM TOPLUM	UİDB	TEYDEB	Toplam
Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Moderatorlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Raportörlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
Katılmadığı Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0