



**AMİLOİD BETA 1-42 İLE SH-SY5Y NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE
OLUŞTURULAN ALZHEİMER HASTALIĞI MODELİNDE PROBİYOTİK
KAYNAKLI EKZOPOLİSAKKARİTLERİN NÖROKORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Seda ŞİRİN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MART 2021

ETİK BEYAN

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

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

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

Seda ŞİRİN

29/03/2021

AMİLOİD BETA 1-42 İLE SH-SY5Y HÜCRELERİNDE OLUŞTURULAN
ALZHEİMER HASTALIĞI MODELİNDE PROBİYOTİK KAYNAKLI
EKZOPOLİSAKKARİTLERİN NÖROKORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI
(Doktora Tezi)

Seda ŞİRİN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mart 2021

ÖZET

Bu doktora tez çalışmasının amacı, amiloid beta ($A\beta$)₁₋₄₂ ile SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde oluşturulan Alzheimer hastalığı (AH) modelinde probiyotik kaynaklı (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 ve *Lactiplantibacillus plantarum* GD2) liyofilize ekzopolisakkarit (L-EPS)'lerin nörokoruyucu etkilerinin araştırılmasıdır. L-EPS'lerin miktarları belirlenmiş olup, karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. L-EPS'lerin antioksidan aktiviteleri ve $A\beta$ ₁₋₄₂ agregasyonu üzerine inhibitör etkileri saptanmıştır. $A\beta$ ₁₋₄₂ ile oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin hücre ölümüne karşı nörokoruyucu etkileri, asetilkolin esterase (AChE) ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri, total antioksidan seviyesi (TAS) ve total oksidan seviyesi (TOS) üzerine etkileri belirlenmiştir. L-EPS'lerin hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) miktarı üzerine baskılayıcı etkilerinin yanı sıra, anti-apoptotik etkileri ve mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) üzerine koruyucu etkileri saptanmıştır. L-EPS'lerin 14 farklı gen üzerine modülatör etkileri belirlenmiştir. Çalışmada kullandığımız L-EPS'lerin yüksek miktarda üretildiği saptanmıştır. L-EPS'lerin element yüzdeleri ve fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) spektrumları belirlenmiştir. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerine göre L-EPS'lerin yüzey morfolojileri pürüzlü ve gözenekli olarak farklılık göstermiştir. L-EPS'lerin X-ışını difraktometresi (XRD) desenlerine göre amorf karaktere sahip oldukları tespit edilmiştir. L-EPS'lerin antioksidan aktivite gösterdikleri belirlenmiştir ($p<0,05$). L-EPS'lerin hücre canlılığını, TAS'ı, antioksidan enzim aktivitelerini, MMP yüzdesini, *BCL2* ve protein kinaz B (*AKT/PKB*) genlerinin ekspresyon seviyelerini arttırdığı saptanmıştır ($p<0,05$). L-EPS'lerin AChE'ı, $A\beta$ ₁₋₄₂ agregasyonunu, TOS'u, hücre içi ROS miktarını, apoptotik hücre yüzdesini, *BCL2* associated X (*BAX*), kaspaz-3 (*CASP3*), kaspaz-7 (*CASP7*), kaspaz-8 (*CASP8*), kaspaz-9 (*CASP9*), sitokrom C (*CYCS*), hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1 (*ERK1*), hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 2 (*ERK2*), c-Jun N-Terminal kinaz (*JNK*), *JUN*, nüklear faktör- κ B (*NF- κ B/p65*) ve p38 mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (*p38 MAPK*) genlerinin ekspresyon seviyelerini azalttığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Elde edilen tüm sonuçlar incelendiğinde, B3 suşundan elde edilen L-EPS öne çıkmıştır. Ayrıca L-EPS'lerin sahip olduğu karakteristik yapısının ve yüzey morfolojisinin nöral koruyuculukta etkili olduğu gözlenmiştir. Etki mekanizması ortaya konmuş ve alternatiflerine göre etkisi yüksek olan L-EPS'lerin AH'nin önlenmesi ve tedavisinde yeni ilaç etken maddesi olma potansiyeli bulunmaktadır.

Bilim Kodu : 20309
Anahtar Kelimeler : Alzheimer hastalığı, amiloid beta 1-42, ekzopolisakkarit, laktik asit bakterileri, nörokoruyucu etki, SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri
Sayfa Adedi : 178
Danışman : Prof. Dr. Belma ASLİM

INVESTIGATION OF NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF PROBIOTIC DERIVED
EXOPOLYSACCHARIDES IN ALZHEIMER'S DISEASE MODEL GENERATED IN
SH-SY5Y NEUROBLASTOMA CELLS WITH AMYLOID BETA 1-42

(Ph. D. Thesis)

Seda ŞİRİN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

March 2021

ABSTRACT

The purpose of this doctorate thesis is to investigate the neuroprotective effects of probiotic-derived (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 and *Lactiplantibacillus plantarum* GD2) lyophilized exopolysaccharides (L-EPSs) in an Alzheimer's disease (AD) model formed by amyloid beta ($A\beta$)₁₋₄₂ in SH-SY5Y neuroblastoma cells. L-EPS quantities were determined, and their characterization was performed. The antioxidant activities of L-EPSs and their inhibitor effects on $A\beta$ ₁₋₄₂ aggregation were determined. In an AD model formed with $A\beta$ ₁₋₄₂, the neural protective effects of EPSs against cell death, effects on acetylcholine esterase (AChE) and antioxidant enzyme activities, and effects on total antioxidant status (TAS) and total oxidant status (TOS) were determined. In addition to the repressive effects of L-EPSs on the intracellular quantity of reactive oxygen species (ROS), their anti-apoptotic effects and effects on mitochondrial membrane potential (MMP) were also determined. The effects of L-EPSs on 14 different genes were determined. It was found that the L-EPSs used in the study were produced in high quantities. The elementary percentages and the fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectra of the EPSs were determined. According to the atomic force microscope (AFM) and scanning electron microscope (SEM) images, the surface morphologies of the L-EPSs showed differences as granular and porous. According to their X-ray diffractometer (XRD) patterns, the L-EPSs were found to have amorphous character. L-EPSs were shown to exert antioxidant activity ($p < 0.05$). L-EPSs were found to enhance cellular viability, TAS, antioxidant enzyme activities, MMP percentage, expression levels of the *BCL2* and protein kinase B (*AKT/PKB*) genes ($p < 0.05$). L-EPSs were found to reduce AChE, $A\beta$ ₁₋₄₂ aggregation, TOS, intracellular ROS quantity, apoptotic cell percentage, expression levels of the *BCL2* associated X (*BAX*), caspase-3 (*CASP3*), caspase-7 (*CASP7*), caspase-8 (*CASP8*), caspase-9 (*CASP9*), cytochrome C (*CYCS*), extracellular signal-regulated kinase 1 (*ERK1*), extracellular signal-regulated kinase 2 (*ERK2*), c-Jun N-Terminal kinase (*JNK*), *JUN*, nuclear factor- κ B (*NF- κ B/p65*), and p38 mitogen-activated protein kinase (*p38 MAPK*) genes ($p < 0.05$). A review of all findings obtained in the study revealed that the L-EPS derived from the B3 strain came to the fore. In addition, it has been observed that the characteristic structure and surface morphology of L-EPSs are effective in neural protection. L-EPSs, whose mechanism of action has been demonstrated and has a high effect compared to its alternatives, has the potential to be a new drug active ingredient in the prevention and treatment of AD.

Science Code : 20309

Key Words : Alzheimer's disease, amyloid beta 1-42, exopolysaccharide, lactic acid bacteria, neuroprotective effect, SH-SY5Y neuroblastoma cells

Page Number : 178

Supervisor : Prof. Dr. Belma ASLIM

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım için bana her türlü araştırma olanağını ve desteğini sağlayan ve her aşamada bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren değerli tez danışmanım Prof. Dr. Belma ASLİM'a, tezimin düzeltilmesinde bilgileriyle beni yönlendiren Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ, Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ, Doç. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN ve Doç. Dr. Serkan YAVUZ'a, Hacettepe Üniversitesi öğretim üyesi Doç. Dr. Zekiye Tuba TÜYLÜ KÜÇÜKKILINÇ'a, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Öğrenci İşleri personeli Doğan KARA'ya, Düzce Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi personeli Tuna DEMİR'e, Bartın Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı, Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi personeli Halil EŞGİN'e, Baran Medikal personeli Davut YOLCU'ya, Thorvacs Biyoteknoloji personeli Tamer KAHRAMAN'a, öneri ve içten yardımları ile desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Öğr. Gör. Serap NİĞDELİOĞLU DOLANBAY, Tuğçe BAŞER, Dr. Öğr. Üyesi Ümmügülsüm TÜKENMEZ EMRE, Meryem Nur ZEYDANLI, Dr. Öğr. Üyesi Fatma Gonca KOÇANCI'ya, ayrıca bugünlere gelmemde en sıkıntılı zamanlarda bile esirgemedikleri maddi, manevi desteklerini ve emeklerini asla ödeyemeyeceğim annem Lutfiye ŞİRİN, babam Şanser ŞİRİN ve teyzem Şefika KIRIMOĞLU başta olmak üzere canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu doktora tezi Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından 05/2018-19 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar	5
2.1.1. Nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde rol oynayan proteinler	5
2.2. Alzheimer Hastalığı (AH).....	6
2.2.1. AH'nin moleküler fizyopatolojisi	8
2.2.2. Nörotransmitterlerin AH fizyopatolojisindeki rolü.....	10
2.2.3. Oksidatif stresin AH'deki rolü	11
2.2.4. Apoptozun AH'deki rolü.....	13
2.2.5. Mitokondriyal hasarın AH'deki rolü.....	16
2.2.6. Protein kinaz B (AKT/PKB), mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) ve nükleer faktör- κ B (NF- κ B/p65)sinyal yollarının AH'deki rolü	17
2.2.7. AH'nin tanısı	21
2.2.8. AH'nin tedavisi	22
2.3. Probiyotikler	32
2.3.1. Probiyotiklerin AH'de kullanım potansiyelleri.....	33

	Sayfa
2.4. Laktik Asit Bakterileri.....	35
2.4.1. Laktik asit bakterilerinin AH'deki kullanım potansiyelleri	36
2.5. Polisakkaritler	36
2.5.1. Polisakkaritlerin AH'deki kullanım potansiyelleri	37
2.6. Ekzopolisakkarit (EPS)'ler	45
2.6.1. EPS'lerin kullanım avantajları	47
2.6.2. EPS'lerin AH'deki kullanım potansiyelleri	48
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	49
3.1. Gereç	49
3.1.1. Çalışmada kullanılan suşlar ve kültür ortamı	49
3.1.2. Çalışmada kullanılan hücre hattı ve hücre besi ortamı	50
3.2. Yöntem.....	50
3.2.1. Suşlardan ekzopolisakkarit (EPS)'lerin izolasyonu ve miktarlarının belirlenmesi.....	50
3.2.2. Liyofilize EPS (L-EPS)'lerin karakterizasyonu	51
3.2.3. L-EPS'lerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi	53
3.2.4. L-EPS'lerin amiloid β ($A\beta$) ₁₋₄₂ agregasyonu üzerine etkilerinin belirlenmesi	55
3.2.5. Hücre kültürünün hazırlanması ve uygulama gruplarının oluşturulması .	56
3.2.6. $A\beta$ ₁₋₄₂ ve L-EPS'lerin hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazolium bromid; tiazolil mavi) ile belirlenmesi	56
3.2.7. $A\beta$ ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan Alzheimer hastalığı (AH) modelinde L-EPS'lerin hücre ölümüne karşı koruyucu etkilerinin MTT ile belirlenmesi	57
3.2.8. $A\beta$ ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin asetilkolin esterase (AChE) enzim aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi	58

3.2.9. A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin total antioksidan seviyesi (TAS) üzerine etkilerinin belirlenmesi	60
3.2.10. A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin belirlenmesi	61
3.2.11. A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin total oksidan seviyesi (TOS) üzerine etkilerinin belirlenmesi	64
3.2.12. A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) miktarı üzerine etkilerinin belirlenmesi	65
3.2.13. A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin apoptoz üzerine etkilerinin belirlenmesi	65
3.2.14. A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkilerinin belirlenmesi	66
3.2.15. A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin protein kinaz B (AKT/PKB), nüklear faktör- κ B (NF- κ B/p65), mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) ve apoptoz sinyal yolları üzerine modülatör etkilerinin belirlenmesi	67
3.2.16. İstatistiksel analizler	70
4. DENEYSEL BULGULAR.....	71
4.1. Çalışmada Kullanılan Suşlar.....	71
4.2. Liyofilize EPS (L-EPS)'lerin Miktarlarının Belirlenmesi	71
4.3. L-EPS'lerin Karakterizasyonu.....	71
4.3.1. Elemental analiz	72
4.3.2. Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR)	72
4.3.3. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM).....	74
4.3.4. Taramalı elektron mikroskobu (SEM).....	75
4.3.5. X-ışını difraktometresi (XRD)	78

	Sayfa
4.4. L-EPS'lerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi	79
4.5. L-EPS'lerin Amiloid β ($A\beta$) ₁₋₄₂ Agregasyonu Üzerine İnhibitör Etkilerinin Belirlenmesi	81
4.6. MTT Yöntemi ile Belirlenen Sitotoksisite Sonuçları.....	83
4.7. $A\beta$ ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y Hücrelerinde Oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin Asetilkolin Esteraz (AChE) Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkilerinin Belirlenmesi	86
4.8. $A\beta$ ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y Hücrelerinde Oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Üzerine İndükleyici Etkilerinin Belirlenmesi	87
4.9. $A\beta$ ₁₋₄₂ ile Oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin Sodyum Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktiviteleri Üzerine İndükleyici Etkilerinin Belirlenmesi	89
4.10. $A\beta$ ₁₋₄₂ ile Oluşturulan AH Modelinde L-EPS'lerin Total Oksidan Seviyesi (TOS) Üzerine Baskılayıcı Etkilerinin Belirlenmesi	91
4.11. $A\beta$ ₁₋₄₂ ile Oluşturulan AH Modelinde L-EPS'lerin Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Miktarı Üzerine Baskılayıcı Etkilerinin Belirlenmesi	92
4.12. $A\beta$ ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y Hücrelerinde Oluşturulan AH Modelinde L-EPS'lerin Apoptoz Üzerine Baskılayıcı Etkilerinin Belirlenmesi.....	93
4.13. $A\beta$ ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y Hücrelerinde Oluşturulan AH Modelinde L-EPS'lerin Mitokondriyal Membran Potansiyeli Üzerine Koruyucu Etkilerinin Belirlenmesi	95
4.14. $A\beta$ ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y Hücrelerinde Oluşturulan AH Modelinde L-EPS'lerin Protein Kinaz B (AKT/PKB), Nüklear Faktör- κ B (NF- κ B/p65), Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinaz (MAPK) ve Apoptoz Sinyal Yolakları Üzerine Modülatör Etkilerinin Belirlenmesi	96
5. TARTIŞMA.....	101
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	139
KAYNAKLAR	145
ÖZGEÇMİŞ	177

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan suşlar ve izolasyon kaynakları	49
Çizelge 3.2. De Man Rogosa ve Sharpe broth besi ortamı içeriği	50
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primerler	69
Çizelge 4.1. Suşların ürettiği liyofilize hale getirilmiş EPS'lerin miktarları (mg/L).....	71
Çizelge 4.2. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin azot, karbon, hidrojen, kükürt ve oksijen yüzdeleri (%)	72
Çizelge 4.3. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin antioksidan aktivite sonuçları (%).....	80
Çizelge 4.4. A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin TAS üzerine indükleyici etkileri	88
Çizelge 4.5. A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin SOD enzim aktivitesi üzerine indükleyici etkileri	90
Çizelge 4.6. A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin CAT enzim aktivitesi üzerine indükleyici etkileri	90
Çizelge 4.7. A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin GPx enzim aktivitesi üzerine indükleyici etkileri	90
Çizelge 4.8. A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin TOS üzerine baskılayıcı etkileri	92
Çizelge 4.9. A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin AKT/PKB, NF- κ B/p65, MAPK ve apoptoz sinyal yollarında yer alan genlerin üzerine etkileri	100

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. AH'ye sebep olan genler ve bu genlerin fizyolojik fonksiyonları.....	7
Şekil 2.2. AH'nin moleküler fizyopatolojisi.....	9
Şekil 2.3. Amiloid prekürsör proteinin 2 farklı (amiloidojenik ve nonamiloidojenik) yolakla işlenmesi	10
Şekil 2.4. AH'nin kolinerjik hipotezi.....	11
Şekil 2.5. AH'de oksidatif stres hipotezi	13
Şekil 2.6. AH'nin amiloid kaskad hipotezi ve apoptoz	15
Şekil 2.7. AH'de apoptozun moleküler biyolojisi	16
Şekil 2.8. AH'de mitokondriyal hasar ve apoptozun moleküler biyolojisi.....	17
Şekil 2.9. AKT/PKB sinyal yolağının AH'deki rolü	18
Şekil 2.10. MAPK sinyal yolağının AH'deki rolü.....	19
Şekil 2.11. MAPK sinyal yolağının AH'deki rolü 2.....	20
Şekil 2.12. NF-κB/p65 sinyal yolağının AH'deki rolü	21
Şekil 2.13. Normal yaşlı yetişkin ve AH hastası kişilerde amiloid ve tau pozitron emisyon tomografisi tarama görüntüleri.....	22
Şekil 2.14. AH'nin kolinerjik hipotezine dayanan kolinesteraz inhibitörleri	23
Şekil 2.15. Lisanslı tedaviler.....	24
Şekil 2.16. AH'nin tau hipotezine dayanan mevcut tedavi stratejileri	25
Şekil 2.17. AH'nin amiloid kaskad hipotezine dayanan mevcut tedavi stratejileri	26
Şekil 2.18. AH'nin patogenezi (Nedensellik ağı)	27
Şekil 2.19. AH'de oksidatif stres hipotezine dayanan mevcut tedavi stratejileri	28
Şekil 2.20. AH'de kalsiyum hipotezine dayanan mevcut tedavi stratejileri	30
Şekil 2.21. AH ve nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar	31
Şekil 2.22. Probiyotik mikroorganizmaların AH'de olası etki mekanizmaları	33

Şekil	Sayfa
Şekil 2.23. <i>Lentinus edodes</i> 'den elde edilen polisakkaritin etki mekanizması.....	42
Şekil 2.24. <i>Ganoderma lucidum</i> 'dan elde edilen polisakkaritin etki mekanizması.....	43
Şekil 2.25. <i>Acorus tatarinowii</i> 'den elde edilen polisakkaritin etki mekanizması.....	44
Şekil 2.26. Laktik asit bakterilerinde Wzx/Wzy bağımlı EPS biyosentezinin basamakları	46
Şekil 3.1. Glikoz standart eğrisi.....	51
Şekil 3.2. Bovine serum albumin standart eğrisi	59
Şekil 3.3. SOD standart eğrisi.....	62
Şekil 3.4. Formaldehit standart eğrisi	63
Şekil 4.1. <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> B3 (A) ve <i>L. plantarum</i> GD2 (B) suşlarından elde edilen L-EPS'lerin FTIR spektrumları	73
Şekil 4.2. <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> B3 ve <i>L. plantarum</i> GD2 suşlarından elde edilen L-EPS'lerin AFM görüntüleri	74
Şekil 4.3. <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin SEM görüntüsü.....	76
Şekil 4.4. <i>L. plantarum</i> GD2 suşundan elde edilen L-EPS'nin SEM görüntüsü	77
Şekil 4.5. <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> B3 (A) ve <i>L. plantarum</i> GD2 (B) suşlarından elde edilen L-EPS'lerin XRD desenleri	78
Şekil 4.6. Suşlardan elde edilen farklı konsantrasyonlardaki L-EPS'lerin A β_{1-42} agregasyonu üzerine inhibitör etkileri.	81
Şekil 4.7. Suşlardan elde edilen farklı uygulama süreleri denenilen 1250 $\mu\text{g/mL}$ 'deki L- EPS'lerin A β_{1-42} agregasyonu üzerine inhibitör etkileri.....	82
Şekil 4.8. L-EPS'lerin A β_{1-42} agregasyonu üzerine inhibitör etkilerinin AFM görüntüleri.....	83
Şekil 4.9. A β_{1-42} 'nin hücre canlılığı üzerine sitotoksik etkisi	84
Şekil 4.10. L-EPS'lerin hücre canlılığı üzerine sitotoksik etkileri	85
Şekil 4.11. A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin hücre ölümüne karşı koruyucu etkileri	86

Şekil	Sayfa
Şekil 4.12. A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin AChE enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkileri	87
Şekil 4.13. A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin hücre içi ROS miktarı üzerine baskılayıcı etkileri	93
Şekil 4.14. A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin apoptoz üzerine baskılayıcı etkileri	94
Şekil 4.15. A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin mitokondriyal membran potansiyeli üzerine koruyucu etkileri	96
Şekil 4.16. A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin apoptoz sinyal yolağında rol oynayan genler üzerine modülatör etkileri	98
Şekil 4.17. A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin AKT/PKB, NF- κ B ve MAPK sinyal yollarında rol oynayan genler üzerine modülatör etkileri	99

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
α	Alfa
Å	Angström
β	Beta
>	Büyüktür
Δ	Delta
°	Derece
γ	Gama
κ	Kappa
<	Küçüktür
$\leq$	Küçük veya eşittir
°C	Santigrat derece
θ	Teta
%	Yüzde
cm ⁻¹	Santimetre ⁻¹
Da	Dalton
Dk	Dakika
g	Gram
g/L	Gram/litre
g/mol	Gram/mol
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
log/cfu/mL	Log/koloni oluşturan birim/mililitre
μM^{-1}	Mikro/molar ⁻¹
μg	Mikrogram
$\mu\text{g/mL}$	Mikrogram/mililitre
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre

Simgeler**Açıklamalar** **μM**

Mikromolar

 μmol hidrojen peroksit eşdeğeri/mg

Mikromol hidrojen peroksit eşdeğeri/miligram

 $\mu\text{mol/L}$

Mikromol/litre

 μmol troloks eşdeğeri/mg

Mikromol troloks eşdeğeri/miligram

M

Molar

mA

Miliamper

mg

Miligram

mg/L

Miligram/litre

mg/mL

Miligram/mililitre

mL

Mililitre

mL/L

Mililitre/litre

mm

Milimetre

mM

Milimolar

mmol/L

Milimol/litre

mol/L

Mol/litre

N/m

Newton/metre

nm

Nanometre

nM

Nanomolar

nmol/dk/mL

Nanomol/dakika/mililitre

nmol/mg

Nanomol/miligram

p

Olasılık

pH

Hidrojenin gücü

rpm

Dakikadaki devir sayısı

 s^{-1} Saniye⁻¹**₺**

Türk lirası

ton/cm²Ton/Santimetre²**U/mg**

Ünit/miligram

U/mL

Ünit/mililitre

Kısaltmalar**Açıklamalar**

Aβ	Amiloid β
AChE	Asetilkolin esteraz
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
AH	Alzheimer hastalığı
AKT/PKB	Protein kinaz B
BAX	BCL2 associated X
CASP2	Kaspaz-2
CASP3	Kaspaz-3
CASP6	Kaspaz-6
CASP7	Kaspaz-7
CASP8	Kaspaz-8
CASP9	Kaspaz-9
CASP10	Kaspaz-10
CASP11	Kaspaz-11
CAT	Katalaz
Ct	Döngü eşiği
CYCS	Sitokrom C
DCFDA	2',7'-diklorofluoresin diasetat, H2DCFDA
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EPS	Ekzopolisakkarit
ERK	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
ERK 1	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1
ERK 2	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 2
FTIR	Fourier transform infrared spektroskopisi
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GPx	Glutasyon peroksidaz
IIS	İnsülin/insülin benzeri büyüme faktörü-1
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
L-EPS	Liyofilize EPS
MAPK	Mitojen aktive protein kinaz
MAPKK	MAPK kinaz

Kısaltmalar**MAPKKK****MTT****NF- κ B/p65****OD****p38 MAPK****PI3K-AKT/PKB****RFU****ROS****SAPK****SD****SEM****SOD****TAS****TOS****XRD****Açıklamalar**

MAPKK kinaz

Tiazolil mavi

Nüklear faktör- κ B

Optik dansite, Ortalama değer

p38 mitojenle aktive edilmiş protein kinaz

Fosfatidilinositol 3 kinaz-AKT/Protein kinaz B

Bağıl floresan birimleri

Reaktif oksijen türleri

Stresle aktive olan protein kinazlar

Standart sapma

Taramalı elektron mikroskobu

Süperoksit dismutaz

Total antioksidan seviyesi

Total oksidan seviyesi

X-ışını difraktometresi

1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), sıklıkla hafif bilişsel bozukluk ile başlayan ve yavaş yavaş daha şiddetli hale gelip kişiyi fonksiyon göremez hale getiren demans ile karakterizedir. Diğer sık bulgular arasında konfüzyon, zayıf muhakeme, dil zorlukları, görsel şikayetler, ajitasyon, içe kapanma ve halüsinasyonlar bulunmaktadır (Bird, 2018: 235-9). AH'nin prevelansının yaşlı nüfusun artmasına paralel olarak arttığı bilinmektedir (Eroymak ve Yiğit, 2017). Şu anda, dünya genelinde 40 milyona yakın AH hastası olduğu bilinirken, 2050 yılında AH'na sahip hasta sayının 115,4 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Ülkemizde ise şu anda 600 bin ile 1 milyon arası AH hastası bulunmaktadır (İnternet 1). Türkiye'de AH'nin yıllık toplam maliyeti erken evrede 11.410,10 ₺, orta evrede 34.381,15 ₺ ve ileri evrede 61.268,67 ₺ olarak saptanmıştır (Eroymak ve Yiğit, 2017). AH, kolinerjik disfonksiyon, senil plaklar, nörofibriler yumak oluşumu, oksidatif stres, kronik nöroinflamasyon, nöral hasar ve sinaps kaybı ile karakterizedir (Tramutola, Lanzillotta, Perluigi ve Butterfield, 2017). AH'nin fizyopatolojisini açıklamaya çalışan birçok hipotez (amiloid kaskad, glutamaterjik, kolinerjik, oksidatif stres ve tau) bulunmakla birlikte, bu hipotezlerin hiçbiri hastalığın fizyopatolojisini tam olarak açıklayamamaktadır (Topçuoğlu ve Selekler, 1998). Amiloid kaskad hipotezine göre AH'ye sebebiyet veren senil plaklar distrofik nöritler tarafından çevrelenen, amiloid prekürsör proteinin ayrılma yan ürünü olan amiloid β ($A\beta$) peptidinin filamentöz kümelerinden meydana gelmektedir (Tramutola ve diğerleri, 2017). AH fizyopatolojisinde hem kolinerjik hem de glutamaterjik değişimin kanıtları mevcuttur. Kolinerjik nöronların kaybı gibi presinaptik kolinerjik eksiklikler AH'deki kolinerjik hipoteze vurgu yapmaktadır. Glutamaterjik hipotez, AH'deki bilişsel gerilemeyle N-metil-D-aspartat reseptörlerinin glutamat bakımından aşırı aktive edilmesi sonucu meydana gelen nöron hasarı arasında bir bağlantı kurmaktadır. Sinaptik boşlukta yer alan astroglial hücrelerindeki glutamatın geri alımındaki eksiklikler, öğrenme ve hafızada merkezi role sahip N-metil-D-aspartat reseptörlerinin kalıcı biçimde düşük düzeyde aktivasyonuna sebebiyet vermektedirler (Francis, 2005). Oksidatif stres hipotezine göre, ileri glikasyon son ürünleri, nitrasyon, lipid peroksidasyonu addüksiyon ürünleri, karbonil modifiye nörofilaman proteini ve serbest karboniller AH'ye sebebiyet vermektedir (Smith ve diğerleri, 2010). Literatürde $A\beta$ düzeylerinin artışı ile, AH'de hipokampus ve kortekste lipidlerden, proteinlerden ve nükleik asitlerden oluşan oksidasyon ürünlerinin artan düzeylerinin ilişkili olduğu bildirilmiştir (Cheignon ve diğerleri, 2018).

Tau hipotezine göre, kümelenmiş hiperfosforile tau proteinlerinden nörofibriler yumaklar oluşmaktadır. Tau, mikrotübül stabilize edici bir protein olup, hiperfosforile olduğunda mikrotübüllerden ayrılarak nöronların yapısal bütünlüğünün bozulmasına ve sonuçta nöron içi trafiğin sekteye uğramasına yol açmaktadır (Tramutola ve diğerleri, 2017). Bu zamana kadar AH için hipotezleri temel alarak uygulanan tedaviler şunları kapsamaktadır: Antikor aşılama ve immünizasyon tedavileri; gen tedavisi; β -sekretaz inhibitörleri, γ -sekretaz inhibitörleri ve modülatörleri ve kolinesteraz inhibitörleri gibi enzim tabanlı tedaviler; N-metil-D-aspartat reseptör antagonistleri, α -amino-3-hidroksi-l-metil-4-izoksazolepropiyonik 5 asit reseptör modülatörleri, peroksizom proliferatör aktive reseptör agonistleri, M1 muskarinik agonistleri, ileri glikasyon son ürünü ile ilişkili mekanizmalar ve nikotin asetilkolin reseptör agonistleri gibi reseptör tabanlı tedaviler; antioksidanlar ve anti-inflamatuvar ve nörokoruyucu yaklaşımlar gibi redoks stresi tabanlı tedaviler; ve tau ilişkili tedaviler. Dahası, kolesterol biyosentezini hedefleyen ajanlar, astrosit modüle edici ajanlar, homosistein düşürücü stratejiler ve kaspaz inhibitörleri gibi diğer başka tedaviler de tasarlanmıştır. Yukarıda sayılan tedavilerin çoğu klinik çalışmalardan da geçmiştir ancak sonuçlar şu ana dek başarılı olmaktan uzaktır. Şu an günümüzde varolan tüm tedaviler içinde ticari olarak yalnızca iki ilaç sınıfı mevcuttur: Kolinesteraz inhibitörleri ve N-metil-D-aspartat reseptör antagonisti. Kolinesteraz inhibitörleri ve N-metil-D-aspartat antagonisti AH'yi tam anlamıyla tedavi etmemekte olup, AH'nin sadece semptomlarının düzelmesini sağlamaktadır (İnternet 2; Kamat ve diğerleri, 2016). Ek olarak, bu ilaçların bağırsak mikrobiyotasının bileşimini değiştirerek disbiyozu neden olma ihtimali bulunmaktadır. Disbiyozis, nörodejeneratif sürecin sürdürülmesine, bu ilaçların terapötik etkilerinin önlenmesine veya azaltılmasına katkıda bulunmaktadır (Hort, Valis ve Angelucci, 2020). Bu nedenle, probiyotik mikroorganizmalarla sağlıklı bağırsak mikrobiyotasının restorasyonu, AH'nin önlenmesi ve yönetimi için yeni bir yaklaşım sağlayabilmektedir. Buna ilaveten, AH'nin çok nedenli doğasını anlamak için geliştirilen, "bir molekül-çoklu hedef" uygulamasına dayalı yeni bir yaklaşım son zamanlarda bilim insanlarının geniş biçimde ilgisini çekmektedir. Çok hedefli ajanlar, AH için tipik olan kilit patolojilerle savaşmanın bir yolu olarak çoklu reseptörleri hedef alma kabiliyetini kombine etmektedirler (Simunkova ve diğerleri, 2019). "Bir molekül-çoklu hedef" uygulamasına probiyotik mikroorganizmalar olan laktik asit bakterilerinden elde edilen ekzopolisakkarit (EPS)'ler örnek olarak verilebilir. Literatürde, EPS'lerin antioksidan, antitümör, antikoagülan, antivirüs, antiradyasyon, antikanser ve immünoregülatör özellikleri gösterilmiş olup (Li ve diğerleri, 2014a; Wang, Zhao, Tian, Yang ve Yang, 2015a; Wang,

Zhao, Yang, Zhao ve Yang, 2015b; Zhang ve diğerleri, 2013), EPS'lerin AH'de kullanım potansiyellerini ortaya koyan bir çalışma yapılmamıştır. Ancak, AH'de farklı organizmalardan (alg, bitki, mantar ve yosun) elde edilen polisakkaritlerin etkileri ile ilgili A β , tau proteinlerini, kolinerjik nörotransmitteri, oksidatif stresi, anti-apoptozu, kalsiyum kanalını ve diğer olası mekanizmaları hedefleyen çalışmalar yapılmıştır (Huang ve diğerleri, 2001; Li, An ve Li, 2013a; Su, Chen ve Zhang, 2013; Wang ve diğerleri, 2014b; Yu ve diğerleri, 2004; Zhong ve Wang, 2015). EPS'lerin sahip olduğu geniş faydalı biyolojik özellikler ve polisakkaritlerin AH'de çok hedefli ajan olarak çeşitli çalışmalarda kullanılması sonucunda, EPS'lerin AH'de sağlıklı gıdalar ve tedavi edici ajanlar olarak potansiyel nütrisyonel ve farmasötik yararları olacağını düşündürmektedir (Xu ve diğerleri, 2019a). Yukarıda bahsi geçen bilgilerden yola çıkarak literatürdeki eksikliklerin giderilmesine yönelik aşağıdaki hedefler belirlenmiştir.

Bu doktora tez çalışmasında;

- 1) Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan, yoğurt ve sağlıklı bebek gaitasından izole edilmiş suşlar içerisinde, kapsamlı taramalarla öne çıkan 2 suşdan (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 ve *Lactiplantibacillus plantarum* GD2) EPS'lerin izolasyonu ve miktarlarının belirlenmesi,
- 2) EPS'lerin içerdiği azot, karbon, hidrojen, kükürt ve oksijen yüzdelerinin belirlenmesi, fonksiyonel gruplarının tespit edilmesi, yüzeylerinin üç boyutlu görüntülenmesi ve kristalografik özelliklerinin belirlenmesi,
- 3) Yapılan karakterizasyon çalışmaları ile EPS'lerin sahip oldukları yapısal özellik ve EPS'lerin gösterdikleri biyolojik aktivite arasındaki ilişkinin ortaya konulması,
- 4) EPS'lerin antioksidan aktivitelerinin ve A β ₁₋₄₂ agregasyonu üzerine inhibitör etkilerinin belirlenmesi,
- 5) A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde EPS'lerin artan asetilkolin esterase (AChE) enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkisinin ve artan total oksidan seviyesi (TOS) üzerine baskılayıcı etkisinin belirlenmesi,

6) A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde EPS'lerin azalan total antioksidan seviyesi (TAS) ve sodyum dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktiviteleri üzerine indükleyici etkisinin belirlenmesi,

7) A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde EPS'lerin artan hücre içi ROS miktarı ve apoptoz oranı üzerine baskılayıcı etkisinin ve azalan mitokondriyal membran potansiyeli üzerine koruyucu etkisinin belirlenmesi,

8) EPS'lerin A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde protein kinaz B (AKT/PKB), nüklear faktör- κ B (NF- κ B/p65), hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK), c-Jun N-terminal kinaz (JNK), p38 mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (p38 MAPK) ile ilişkili mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) ve apoptoz yolları üzerindeki modölatör etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Yukarıda belirtilen hedefler doğrultusunda, bu doktora tez çalışmasında “Bir molekül-çoklu hedef” uygulaması göz önüne alınarak bu mantıkta çalışan çok hedefli EPS'lerin bulunması amaçlanmıştır. EPS'lerin AH modelinde anti-amiloid, anti-oksidatif, anti-apoptotik özellikleri ile AKT/PKB, NF- κ B/p65 ve MAPK yolları üzerinden birden çok hedef üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu sayede EPS'lerin potansiyel nütrisyonel ve farmasötik yararları da göz önüne alındığında, AH tedavisine yönelik gıda ve ilaç endüstrisinde potansiyel kullanımının önü açılacak ve bu çalışma tüm bu üretimler için bir örnek teşkil edecektir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar

Nörodejeneratif hastalıklar, beyin ve periferik organlarda değişmiş fizikokimyasal özellikler gösteren proteinlerin depolanması ile ilişkili olup, ilerleyici nöron kaybı ile karakterize bozukluklardır (Kovacs, 2018: 301-7). En yaygın nörodejeneratif hastalıklar amiloidozlar, tauopatiler, α -sinükleinopatiler ve transaktivasyon yanıtı-DNA bağlayıcı protein 43 kDa proteinopatilerdir (Dugger ve Dickson, 2017). Nörodejeneratif hastalıkların moleküler sınıflandırması protein tabanlı olup, bu moleküler sınıflandırma nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde proteinlerin rolüne işaret etmektedir (Kovacs, 2018: 301-7).

2.1.1. Nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde rol oynayan proteinler

Nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde en sık yer alan proteinler; amiloid β ($A\beta$), prion protein, tau, α -sinüklein, transaktivasyon yanıtı-DNA bağlayıcı protein 43 kDa ve kaynaşık (fused-in) sarkom proteinidir (Kovacs, 2018: 301-7).

$A\beta$, prion proteini ve amiloid Bri proteinleri, amiloidozlar olarak adlandırılan geniş sayıda hastalıkta rol oynamaktadır. $A\beta$, Alzheimer hastalığı (AH)'nin tanımlayıcı özelliklerinden biridir. Ailesel ve sporadik Creutzfeldt-Jakob hastalığı, Gerstmann-Sträussler-Scheinker hastalığındaki prion proteini ve ailesel Britanya ve Danimarka demanslarındaki amiloid Bri gibi diğer amiloid tiplerinin depolandığı hastalıklardır (Dugger ve Dickson, 2017).

Mikrotübül ilişkili tau proteini, günümüzde tauopatiler olarak adlandırılan geniş sayıda hastalıkta rol oynamaktadır. Nöronlar ve glial hücrelerde hücre içi fibriler depoları oluşturan proteinlerden biridir (Arendt, Stieler ve Holzer, 2016). Tauopatilere; AH, kromozom 17'ye bağlı parkinsonizmle birlikte frontal demans, kronik travmatik ensefalopati, progresif supranükleer palsi, kortikobazal dejenerasyon, Pick hastalığı, primer yaş ilişkili tauopati, arjirofilik tanecik hastalığı ve yaşlanmaya bağlı tau astrogliopatinin dahil olduğu heterojen bir grup hastalıkta rastlanılmaktadır (Dugger ve Dickson, 2017; Kneynsberg, Combs, Christensen, Morfini ve Kanaan, 2017).

Sinüklein ailesi 3 üyeden oluşmaktadır: α -, β - ve γ -sinüklein. α - ve β -sinüklein, sinir terminallerinde yoğunlaşırken, γ -sinüklein sinir hücrelerinde mevcuttur (Goedert, 2001). α -sinükleinopatiler, sinir sisteminde anormal α -sinüklein birikiminden kaynaklanmaktadır. α -sinükleinopatilere; Parkinson hastalığı, Lewy cisimciği demansı, çoklu sistem atrofisi ve saf otonom yetmezliğinin dahil olduğu bir grup hastalıkta rastlanılmaktadır (Coon, Cutsforth Gregory ve Benarroch, 2018).

Sağlıklı hücredeki yerleşimi nükleusta olan transaktivasyon yanıtı-DNA bağlayıcı protein 43 kDa, DNA/RNA bağlayıcı, heterojen ribonükleer protein A/B ailesine ait bir proteindir ve birçok görevi vardır. mRNA'ya ve DNA'ya bağlanabilen transaktivasyon yanıtı-DNA bağlayıcı protein 43 kDa, RNA metabolizmasının farklı aşamalarını nükleus ile sitoplazma arasında iletişim kurarak düzenlemektedir (Lahut, Özeş, Ağar ve Başak, 2012). Transaktivasyon yanıtı-DNA bağlayıcı protein 43 kDa, frontotemporal demans, amiyotrofik lateral skleroz, frontotemporal lobar dejenerasyonu, primer lateral skleroz ve progresif müsküler atrofide bulunan patolojik nöronal inklüzyonların ana protein bileşenlerinden biridir (Dugger ve Dickson, 2017; Handley ve diğerleri, 2017).

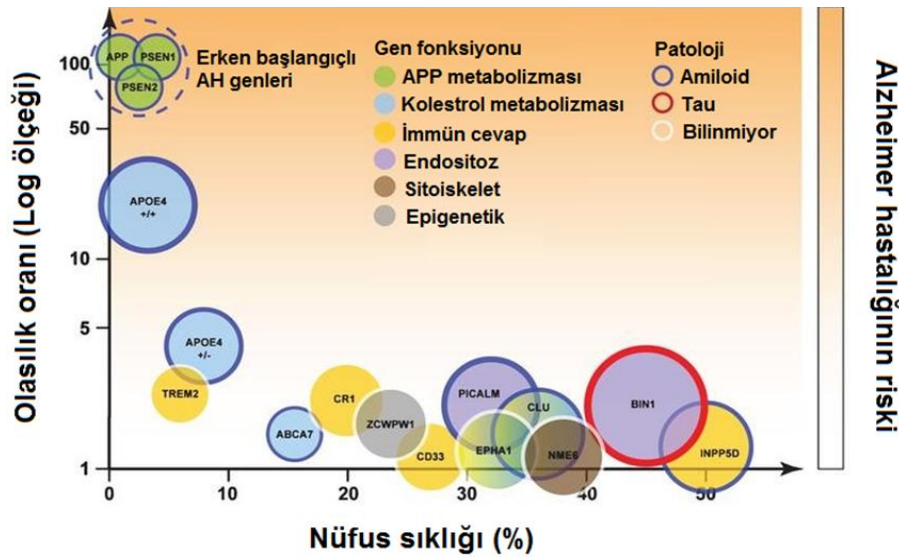
2.2. Alzheimer Hastalığı (AH)

AH, sıklıkla hafif bilişsel bozukluk ile başlayan ve yavaş yavaş daha şiddetli hale gelip kişiyi fonksiyon göremez hale getiren demans ile karakterizedir. Diğer sık bulgular arasında konfüzyon, zayıf muhakeme, dil zorlukları, görsel şikayetler, ajitasyon, içe kapanma ve halüsinasyonlar bulunmaktadır (Bird, 2018: 235-9).

Mevcut araştırmalar AH'nin üç evresi olduğunu ortaya koymaktadır: Preklinik AH, AH'ye bağlı hafif bilişsel bozukluk ve AH'ye bağlı demans. Son iki evrede değişen derecelerde semptomlar mevcuttur (Alzheimer Birliği, 2019).

AH genellikle başlangıç yaşına göre sınıflandırılmaktadır. Bu hastalığa yakalanan kişilerin büyük çoğunluğu (>%95) 65 yaş üzerinde olup (geç başlangıçlı AH), %1-5'i tipik olarak geç 40'lar ya da erken 50'lerde başlayan daha erken bir başlangıç göstermektedirler (erken başlangıçlı AH). Erken başlangıçlı AH ve geç başlangıçlı AH'yi klinik olarak birbirlerinden ayırt etmek imkansızdır. Erken başlangıçlı AH, geç başlangıçlı AH'ye göre daha ciddi olup, daha hızlı ilerlemektedir. AH'nin iki formu farklı genetik epidemiyolojik

paternler ile ilgilidir (Reitz, Brayne ve Mayeux, 2011). Günümüzde AH'nin genetik epidemiyolojisinde yer aldığı düşünülen 4 lokus bulunmaktadır. 21. kromozomda amiloid prekürsör protein, 14. kromozomda presenilin 1, 1. kromozomda presenilin 2 genleri erken başlangıçlı AH ile ilişkili iken, 19. kromozomdaki apolipoprotein E4 geç başlangıçlı AH'den sorumludur (Özpak, Pazarbaşı ve Keser, 2017). Geç başlangıçlı AH ile klusterin, fosfatidilinositol bağlayıcı klatrin birleştirme proteini ve kompleman komponenti (3b/4b) reseptör 1 genleri arasında da güçlü bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (Koçancı, 2018). AH için genetik risk faktörleri ve bunların fizyolojik işlevdeki genel rolleri Şekil 2.1'de verilmiştir. Yüksek riskli genler, hastalığın şiddetinin artması ve daha erken başlangıç yaşı ile ilişkilidir, düşük riskli genetik faktörler ile başlangıç yaşı gecikmektedir ve hastalık şiddeti daha azdır. Her dairenin alanı, her genin popülasyonuna atfedilebilir fraksiyonu ile orantılıdır. Daha büyük daire çapına sahip genler, popülasyon içinde daha fazla AH etkisine sahiptir (Robinson, Lee ve Hane, 2017).



Şekil 2.1. AH'ye sebep olan genler ve bu genlerin fizyolojik fonksiyonları. ABCA7: ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı A7; APOE4: Apolipoprotein E4; APP: Amiloid prekürsör protein; BIN1: Köprüleme entegratörü 1; CD33: Sialik asit bağlayıcı Ig benzeri lektin 3; PICALM: Fosfatidilinositol bağlayıcı klatrin birleştirme proteini; CLU: Klusterin, CR1: Kompleman reseptör tipi 1; EPHA1: EPH reseptörü A1; INPP5D: İnositol polifosfat-5-fosfataz D; NME6: NME/NM23 nükleosit difosfat kinaz 6; PSEN1: Presenilin 1; PSEN2: Presenilin 2; TREM2: Miyeloid hücrelerde eksprese edilen tetikleyici reseptör 2; ZCWPW1: Çinko parmak CW-tip PWWP domain içeren 1 (Robinson ve diğerleri, 2017)

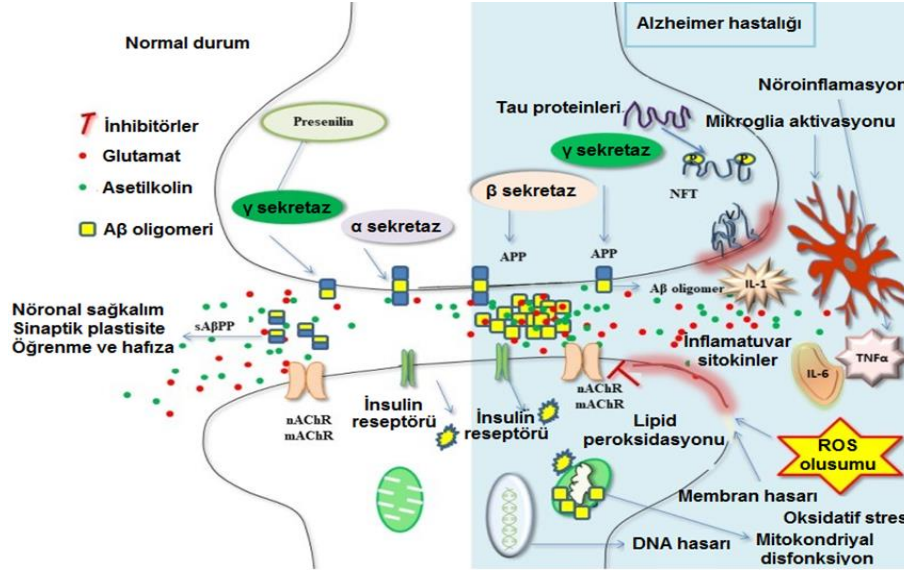
AH'nin prevalansının yaşlı nüfusun artmasına paralel olarak arttığı bilinmektedir (Eroymak ve Yiğit, 2017). Şu anda, dünya genelinde 40 milyona yakın AH hastası olduğu bilinirken, 2050 yılında AH'na sahip hasta sayının 115,4 milyona ulaşacağı tahmin

edilmektedir. Ülkemizde ise şu anda 600 bin ile 1 milyon arası AH hastası bulunmaktadır (İnternet 1). Türkiye İstatistik Kurumu ölüm nedeni verilerine göre, AH kaynaklı ölümlerin sayısı 2014 yılında 10 bin 236 iken, bu sayı 2018 yılında 13 bin 767'ye artmıştır. AH kaynaklı ölümlerin oranı 2014 yılında %3,9 iken, bu oran 2018 yılında %4,6'ya artmıştır. AH kaynaklı ölümlerin oranı cinsiyetlere göre değerlendirildiğinde, her iki cinsiyette de artış olduğu saptanmıştır. AH kaynaklı ölüm oranı 2014 yılında erkeklerde %3,1, kadınlarda %4,6 iken, bu oranlar 2018 yılında erkeklerde %3,5'e, kadınlarda ise %5,7'ye artmıştır (İnternet 3).

AH'nin maliyeti; hastalıktan korunma, tanı, tedavi ve hastalıkla başa çıkmak için oluşan tüm maliyetleri içermektedir. Hastalığın toplam maliyeti içerisindeki doğrudan maliyetler; hastane masraflarını, sunulan tıbbi hizmetleri, ilaçları, sosyal bakım hizmetlerini ve kurumsal bakım hizmeti sunan kişi ve kurumlara yapılan ödemeleri içermektedir. Hastalığın dolaylı maliyetleri ise hasta ve aile üyeleri tarafından yaşanan gelir kaybı ile sosyal kayıplar ve yapılan cepten ödemeleri içermektedir. Türkiye'de AH'nin yıllık toplam maliyeti erken evrede 11.410,10 ₺, orta evrede 34.381,15 ₺ ve ileri evrede 61.268,67 ₺ olarak saptanmıştır (Eroymak ve Yiğit, 2017).

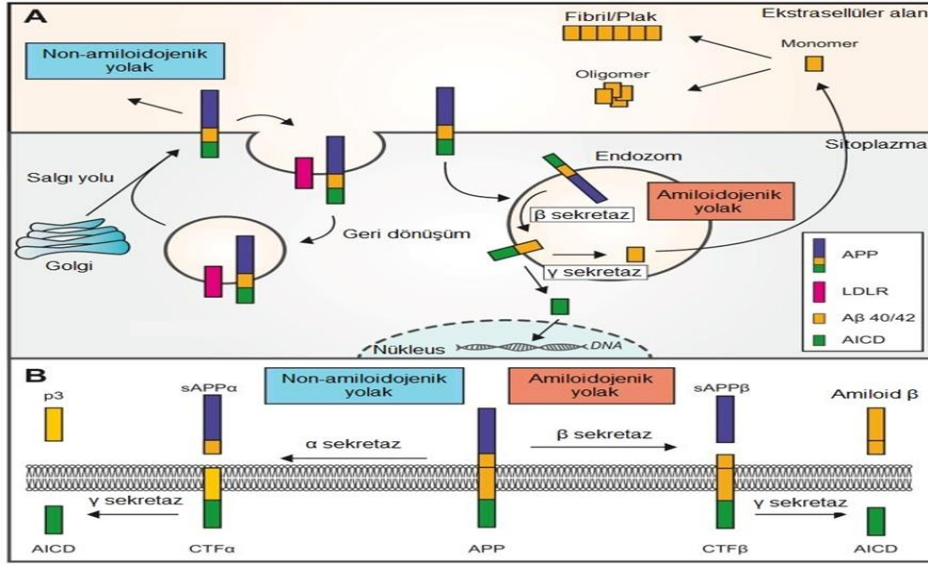
2.2.1 AH'nin moleküler fizyopatolojisi

Patolojik olarak AH, kolinerjik nöron kaybı, amiloid prekürsör proteininin anormal işlenmesine bağlı olarak A β proteininin hücre dışı birikimi, hiperfosforile tau proteininden hücre içi nörofibriler yumakların oluşumu, glioz ve nöron kaybı ile karakterizedir. Ayrıca, A β 'nin hücre dışı birikimlerinin ve nörofibriler yumaklarının hücre içi oluşumu oksidatif stres, eksitotoksisite, nöroinflamasyon ve nörotransmitter eksikliklerinde önemli rol oynamaktadır (Kumar, Kumar, Keegan ve Deshmukh, 2018; Tramutola ve diğerleri, 2017) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. AH'nin moleküler fizyopatolojisi. Aβ oligomeri: Amiloid β oligomeri; APP: Amiloid prekürsör protein; DNA: Deoksiribonükleik asit; IL-1: İnterlökin-1; IL-6: İnterlökin-6; mAChR: Muskarinik asetilkolin reseptörü; nAChR: Nikotinik asetilkolin reseptörü; NFT: Nörofibriler yumaklar; ROS: Reaktif oksijen türleri; sAβPP: Çözülebilir APP β; TNFα: Tümör nekrozis faktör α (Kumar ve diğerleri, 2018)

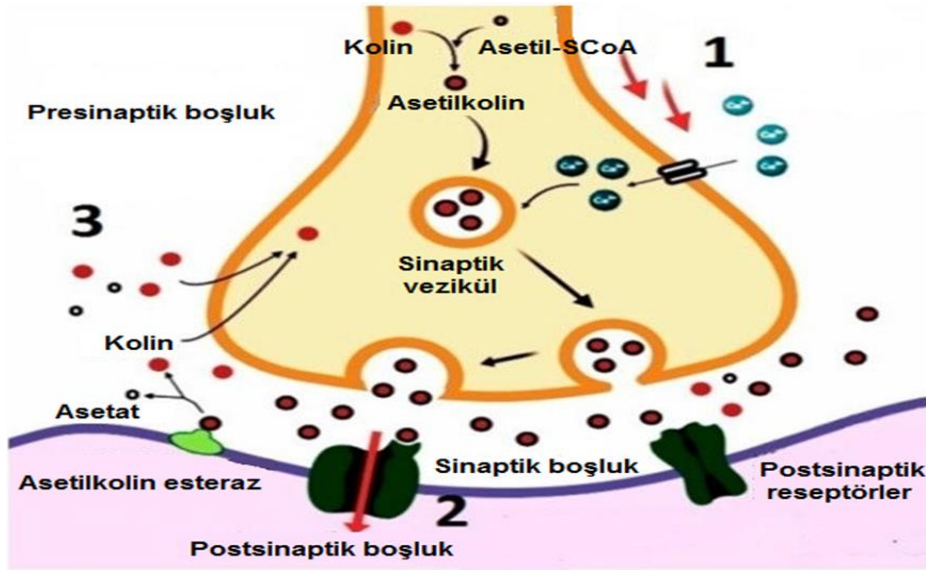
Nonamiloidojenik yolakta, amiloid prekürsör protein ilk olarak α-sekretaz tarafından bölünmektedir. Amiloid prekürsör proteininden, çözülebilir amiloid prekürsör protein α ve zara bağlı hücre içi C-terminal parçası α oluşmaktadır. Daha sonra, C-terminal parçası α, 3 kDa peptit ve amiloid prekürsör protein hücre içi alanını oluşturmak için γ-sekretaz tarafından bir defa daha bölünmektedir. Amiloidojenik yolakta ise, β-sekretazın ürünleri, çözülebilir amiloid prekürsör protein β ve C-terminal parçası β'dır. İkinci adım ise, C-terminal parçası β'dan Aβ ve amiloid prekürsör protein hücre içi alanını serbest bırakmaktadır (Şekil 2.3) (LaFerla, Green ve Oddo, 2007; Zhou, Sun, Ma ve Liu, 2018).



Şekil 2.3. Amiloid prekürsör proteininin 2 farklı (amiloidojenik ve nonamiloidojenik) yolakla işlenmesi. A β 40/42: Amiloid β 40/42; AICD: Amiloid prekürsör protein hücre içi alanı; APP: Amiloid prekürsör protein; CTF α : C-terminal parçası α ; CTF β : C-terminal parçası β ; LDLR: Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörleri; p3; 3 kDa peptit; sAPP α : Çözülebilir amiloid prekürsör protein α ; sAPP β : Çözülebilir amiloid prekürsör protein β (Zhou ve diğerleri, 2018)

2.2.2. Nörotransmitterlerin AH fizyopatolojisindeki rolü

Kolinesterazlar, kolin esterlerini hidrolize eden yaygın bir serin hidrolaz sınıfındırlar. Omurgalılarda iki ayrı gen tarafından kodlanan, asetilkolin esterase (AChE) ve bütirilkolin esterase adında iki kolinesteraz formu vardır (Talesa, 2001). Asetilkolin salım seyrinin şematik gösterimi Şekil 2.4'de verilmiştir. Kalsiyum akışına ve ardından sinaptik veziküllerin membran kenetlenmesine neden olan aksiyon potansiyeli zarda bulunmaktadır. Asetilkolin, postsinaptik hücrede dereceli bir depolarizasyonu başlatan reseptörlere bağlanmaktadır. AChE, asetilkolinin parçalanmasını katalize etmektedir ve kolin molekülleri presinaptik nöron tarafından yeniden emilmektedir (Stanciu ve diğerleri, 2020).



Şekil 2.4. AH'nin kolinerjik hipotezi (Stanciu ve diğerleri, 2020)

AH hastalarının beyinlerinde bulunan nörotransmitter değişimlerinden birisi, kolinerjik marker kolin asetiltransferazın kaybıdır (Talesa, 2001). AH etiyolojisinde hem kolinerjik hem de glutamaterjik değişimin kanıtları mevcuttur. Asetilkolin hafızanın işlenmesi ve öğrenme için gerekli bir nörotransmitter olup, AH'li hastalarda hem konsantrasyonu hem de fonksiyonu azalmaktadır. Kolinerjik nöronların kaybı gibi presinaptik kolinerjik eksiklikler AH'deki kolinerjik hipoteze vurgu yapmaktadır. Glutamaterjik hipotez, AH'deki bilişsel gerilemeyle N-metil-D-aspartat reseptörlerinin glutamat bakımından aşırı aktive edilmesi sonucu meydana gelen nöron hasarı arasında bir bağlantı kurmaktadır. Sinaptik boşlukta yer alan astroglial hücrelerindeki glutamatın geri alımındaki eksiklikler, öğrenme ve hafızada merkezi role sahip N-metil-D-aspartat reseptörlerinin kalıcı biçimde düşük düzeyde aktivasyonuna sebebiyet vermektedirler (Francis, 2005).

2.2.3 Oksidatif stresin AH'deki rolü

Normal koşullarda oksijen radikallerinin yol açtığı stres, birbirini destekleyen etkin bir dizi antioksidan sistem tarafından dengede tutulmaktadır (Örneğin hidrojen peroksidin katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) tarafından eş zamanlı metabolizması). Patolojik koşullar altında oksidan antioksidan dengesi, primer veya sekonder nedenlere bağlı olarak değişmektedir (Huang, Zhang ve Chen, 2016). Reaktif oksijen üretimi hücrel antioksidan sistemlerini aşarsa oksidatif denge bozularak oksidatif stres meydana gelmektedir. Oksidatif stres AH'nin erken dönemlerinde meydana gelmektedir. Artan A β ₁₋₄₀ ve A β ₁₋₄₂

düzeylerinin, AH'de hipokampus ve kortekste lipitlerden, proteinlerden ve nükleik asitlerden oluşan oksidasyon ürünlerinin artan düzeyleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu durum oksidatif stresin AH patogenezindeki A β varlığı ile ilişkili rolünü desteklemektedir. Hastalığın erken evrelerinde redoks proteomiklerinin okside olan proteinlerin tanınmasına izin verdiği, A β 'dan zengin beyin bölgelerinde protein ve lipid peroksidasyonunun gözlemlendiği doğrulanmıştır (Cheignon ve diğerleri, 2018). AH'de mevcut olan oksidatif stres, ileri glikasyon son ürünleri, nitrasyon, lipid peroksidasyonu addüksiyon ürünleri, karbonil modifiye nörofilaman proteini ve serbest karbonilleri içermektedir (Smith ve diğerleri, 2010).

Oksidatif stresin lipitler üzerine etkisi

Lipid peroksidasyonu, lipidlerin reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından serbest radikal zincirleme reaksiyon mekanizması yoluyla lipid peroksidasyon ürünlerini meydana getirdiği bir süreçtir. AH'de incelenen lipid peroksidasyon ürünleri 4-hidroksinonal, malondialdehit ve 2-propenal (akrolein)'in dahil olduğu reaktif aldehitler, F2-izoprostanlar ve F4-nöroprostanların dahil olduğu kimyasal ve metabolik olarak stabil izoprostanoidlerdir. AH hastalarında 4-hidroksinonal düzeylerinin hipokampus, entorinal korteks, temporal korteks, amigdala, parahipokampal girus, ventrikül sıvısı ve plazmada anlamlı olarak yükseldiği bildirilmiştir (Persson, Popescu, Cedazo Minguez, 2014). AH hastalarının hipokampus, priform korteks, temporal korteks, oksipital korteksleri ve eritrositlerinde malondialdehit artışı gösterilmiştir. α , β -ansatüre aldehitlerin en reaktif olanı akroleinin AH hastalarının hipokampus/parahipokampal girus, amigdala, süperior ve orta temporal giruslar ve serebellumunda yükseldiği bulunmuştur. AH hastalarının frontal/temporal kutupları, serebrospinal sıvı, idrar ve plazmasında F2-izoprostanların ve F4-nöroprostanların anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir (Wang ve diğerleri, 2014a).

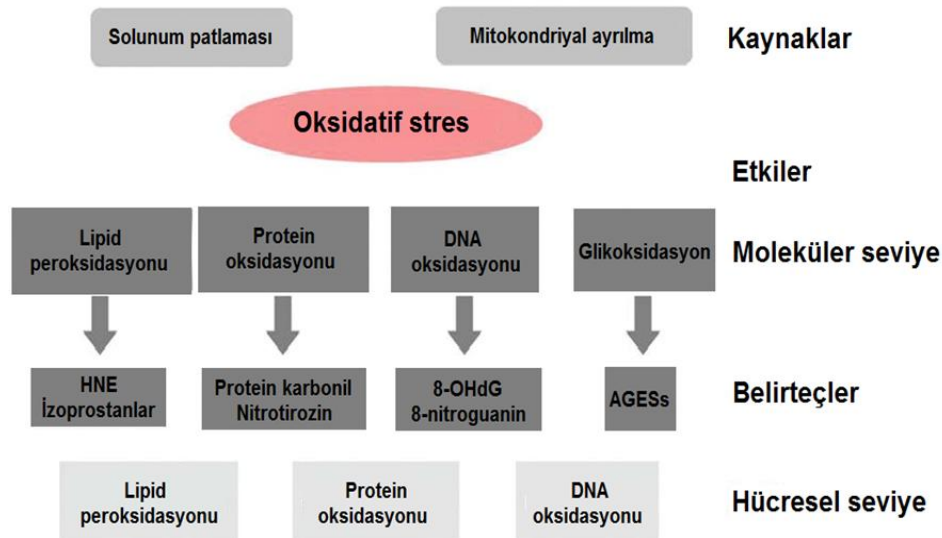
Oksidatif stresin proteinler üzerine etkisi

AH hastalarının beyinde protein oksidasyonunun belirteçleri olan protein karbonilleri ve 3-nitrotirozin bulunmaktadır (Butterfield, 2004). Karbonil türevleri, bazı amino asit rezidülerinin yan zincirlerinin ROS aracılığıyla oksidasyonu sonucunda oluşmaktadır. Karbonil türevleri, glikasyon, glikoksidasyon ve lipid peroksidasyon ürünleri ile reaksiyona girerek de proteinlerin yapısına katılabilmektedirler. Protein karbonilleri AH'de

artmakta olup, protein karbonil oluşumu ile histopatolojik belirteçler arasında bölgesel serebral eşleşmeler bulunmaktadır (Aksenov, Aksenova, Butterfield, Geddes ve Markesbery, 2001). Bir diğer ana protein oksidatif modifikasyonu olan 3-nitrotrozin, peroksinitritin tirozin rezidüleri ile etkileşiminin son ürünüdür. AH'de çeşitli beyin bölgelerinde ve serebrospinal sıvıda anlamlı şekilde arttığı bulunmuştur (Wang ve diğerleri, 2014a).

Oksidatif stresin DNA üzerine etkisi

AH'li beyindeki nükleer ve mitokondriyal DNA'da oksidatif stresin belirteçleri bulunmaktadır. Oksidatif stres DNA bazlarının hidroksilasyonu ile sonuçlanmaktadır. Oksidatif stresin en belirgin olan biyobelirteci 8-hidroksi-2'-deoksiguanozindir. AH hastalarının serebral korteksindeki mitokondriyal DNA'da 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin seviyeleri artarken, nükleer DNA'da 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin seviyeleri artmamıştır (Lovell ve Markesbery, 2001) (Şekil 2.5).

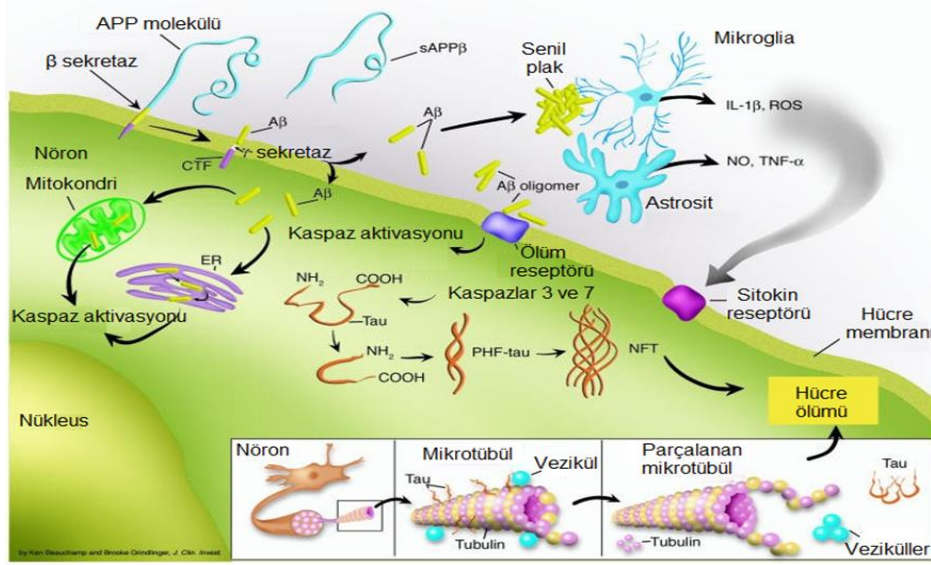


Şekil 2.5. AH'de oksidatif stres hipotezi. 8-OHdG: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin; AGEs: Gelişmiş glikasyon son ürünleri; HNE: 4-hidroksinonal (Kaur, Kaur ve Kaur, 2016)

2.2.4. Apoptozun AH'deki rolü

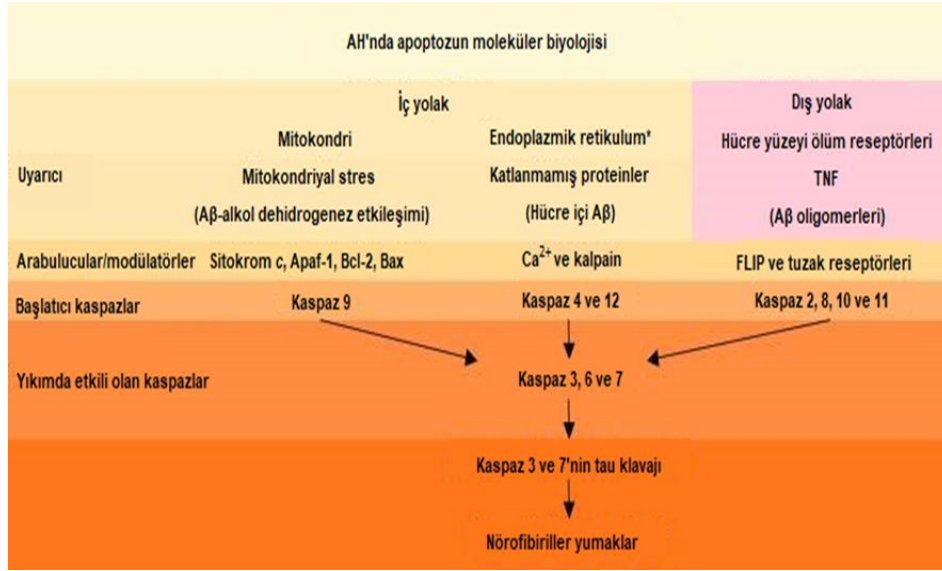
AH'de patogeneziyle ilgili ana hipotezler amiloid ve tau hipotezleridir. Amiloid hipotezi, senil plak oluşumu, sonucunda nöronal dejenerasyon ve demansa yol açan beyinde A β

üretimi ve giderilmesi arasındaki bir dengesizliğe dayanmaktadır. Tau hipotezi ise hiperfosforile tau'nun kümeleşmesi ve kümeleşme sonucunda nörofibriler yumak oluşturması üzerine kuruludur. Hücre içi nörofibriler yumaklar, mikrotübüler fonksiyonu bozarak nöronal dejenerasyon ve hücre ölümüne yol açabilmektedirler. Klinik olarak AH ilerleyici bilişsel bozulma ve duygusal bozukluklar ile karakterize olup, bunlar hipokampus ve amigdala gibi limbik yapılar ve ilişkili serebral korteks yapılarında sinaptik dejenerasyon ve nöron ölümü ile ilişkilidir (Lee ve diğerleri, 2012). AH hastalarının beyinde apoptotik ölümün 5 tip kanıtı bulunmaktadır: 1) Terminal deoksitransferaz aracılı deoksiüridin trifosfat parça uç işaretlemesi (TUNEL ya da *in situ* uç işaretlemesi) teknikleri ile parçalanmış DNA'nın *in situ* tespiti; 2) Nöronal nekroz olmaksızın düzensiz nöron kaybı; 3) Proapoptotik moleküllerin artan ekspresyonu; 4) A β 'nin *in vitro* apoptoz uyarıcı etkisini gösteren deneysel veriler ve/veya AH ilişkili genetik mutasyonları içeren nöronların apoptoza artan yatkınlıkları; ve 5) AH hastalarının beyinde aktive kaspazların ve/veya bunların ayrılmış substratlarının tespiti (Roth, 2001). Hücre dışı A β oligomerleri, hücre yüzeyi ölüm reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla kaspazları aktive edebilmekte olup, alternatif olarak, hücre içi A β , endoplazmik retikulum stresini veya mitokondriyal stresi içeren bir süreç yoluyla da kaspazları aktive edebilmektedir. Kaspaz aktivasyonunun sonuçlarından biri, eşleştirilmiş sarmal filamanların karakteristik özelliklerinde yapısal değişikliklere yol açan tau'nun bölünmesidir. Aşamalı tau birikimi sitoskeletal bozulmaya, aksoplazmik ve dendritik taşınmanın başarısızlığına ve ardından nöronal ölümle sonuçlanan trofik destek kaybına yol açmaktadır. Senil plaklardaki hücre dışı amiloid birikintileri ayrıca reaktif glial değişiklikleri ve nöroinflamasyonu tetiklemektedir. Bu durum da ROS, nitrik oksit, tümör nekrozis- α ve interlökin-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimi yoluyla nöronal kayba katkıda bulunabilmektedir (Dickson, 2004; Golde, 2003; Rissman ve diğerleri, 2004) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. AH'nin amiloid kaskad hipotezi ve apoptoz. Aβ: Amiloid β; APP: Amiloid prekürsör protein; COOH: Karboksil; CTF: C-terminal parçası; IL-1β: İnterlökin-1β; NFT: Nörofibriler yumak; NH₂: Amino; NO: Nitrik oksit; PHF: Eşleştirilmiş sarman filaman; ROS: Reaktif oksijen türleri; sAPPβ: Çözülebilir amiloid prekürsör protein β; TNF-α: Tümör nekrozis faktör-α (Dickson, 2004)

AH patogenezinde hücreSEL apoptoza giden, intrinsik ve ekstrinsik olarak adlandırılan iki ana yolak bulunmaktadır. Ekstrinsik yolak, tümör nekroz faktör reseptörü gibi, tuzak reseptörler ve Fas-ilişkili ölüm domain-benzeri interlökin-1β-çevirici enzim inhibitör proteinleri tarafından regüle edilen hücre yüzeyi ölüm reseptörleri yoluyla sinyal gönderimini içermektedir. Akış aşağı (downstream) kaspazların [(örneğin kaspaz-2 (*CASP2*) ve kaspaz-8 (*CASP8*)] aktivasyon paterni, ekstrinsik yolağın Aβ aracılı apoptotik süreçlerde yer aldığını desteklemektedir. Alternatif olarak endoplazmik retikulumda üretilen hücre içi Aβ endoplazmik retikulum stresine yol açabilmektedir ya da Aβ'nın bir mitokondriyal alkol dehidrogenaza bağlanması mitokondriyal strese yol açabilmektedir. İntrinsik yolağa her iki giriş de akış aşağı apoptotik mekanizmaları harekete geçirebilmekte olup, aktive edilmiş efektör kaspaz-3 (*CASP3*) ve kaspaz-7 (*CASP7*) tau proteinini ayırabilmekte ve nörofibriler yumakların oluşumunu kolaylaştırabilmektedir (Dickson, 2004; Migheli, Cavalla, Marino ve Schiffer, 1994; Schultz ve Harrington, 2003) (Şekil 2.7). Aβ'nın nöronları ölüme duyarlılaştırma mekanizması membran lipid peroksidasyonunu içermektedir. Bu durum, iyon motif ATPazların, glikoz ve glutamat taşıyıcılarının fonksiyonlarını bozarak, membran depolarizasyonuna, ATP tükenişine, aşırı kalsiyumun içe akışına ve mitokondriyal disfonksiyona yol açmaktadır (Mattson, 2000).

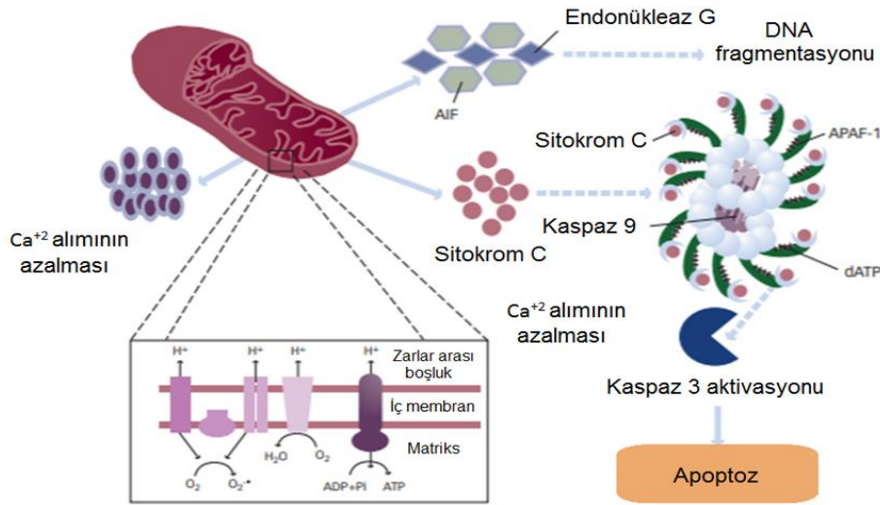


Şekil 2.7. AH'de apoptozun moleküler biyolojisi. Aβ: Amiloid β; Apaf-1: Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1; Bax: Bcl-2 ilişkili X; Bcl-2: B hücreli lenfoma; Ca²⁺: Kalsiyum; FLIP: Flice inhibe edici protein; TNF: Tümör nekrozis faktör. Yıldız işareti (*) Aβ'nın olası eylem yerlerini göstermektedir (Dickson, 2004)

2.2.5. Mitokondriyal hasarın AH'deki rolü

Mitokondriyal hasar ve sinaptik disfonksiyon AH'nin ilerlemesi ve patogenezinde gerçekleşen erken olaylardır. Mitokondri membranına yerleşen Aβ, serbest radikaller oluşturarak mitokondriyal disfonksiyonu başlatmaktan sorumludur (Manczak, Kandimalla, Fry, Sesaki ve Reddy, 2016). Süperoksit radikalleri mitokondriyal elektron taşıma zinciri kompleksleri 1 ve 3 ve α-ketoglutarat dehidrogenazın dahil olduğu trikarboksilik asit siklusunun bileşenlerinde üretilmektedirler. Buna ek olarak, süperoksit radikalleri dış mitokondriyal membranda da üretilmektedir. Mitokondriyal matriks, iç ve dış mitokondriyal membranlardan salınan hidrojen peroksit ve süperoksit radikalleri sitoplazmaya taşınıp en sonunda sitoplazmik proteinlerin oksidasyonuna yol açabilmektedir. AH'de 3 mitokondriyal enzimin (pirüvat dehidrogenaz kompleksi, α-ketoglutarat dehidrogenaz kompleksi ve sitokrom oksidaz) azalan seviyeleri bildirilmiştir (Reddy ve Beal, 2008). Presekans proteazı, Aβ türlerini mitokondride yıkmaktadır. Mitokondriyal Aβ'yı yıkma kapasitesine sahip olan prep peptidazom ise Aβ'nın mitokondri ve AH'deki mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkisine yönelik daha fazla kanıt sağlamıştır. AH hastalarının beyin dokusundaki mitokondriyal yapıyı ve mutant amiloid prekürsör proteinini eksprese eden nöronal hücreleri analiz eden çalışmalar, Aβ'nın mitokondrileri parçaladığını ve nöronlarda yapısal değişiklikler oluşturduğunu

bulmuşlardır (Manczak ve diğerleri, 2016). Yapısı bozulmuş mitokondri apoptoz indüksiyonuna sebebiyet veren birkaç proapoptotik faktörü salgılamaktadır. Bu faktörler, apoptozu oluşturmak için sitozolik faktörlerle birleşerek apoptozu doğrudan tetikleyebilmektedir. Bazı mitokondriyal proapoptotik proteinler ise DNA fragmentasyonunu indüklemek için çekirdeğe yer değiştirmektedirler. Tüm bu mitokondriyal değişiklikler, hücre dejenerasyonuna ve ölümüne katkıda bulunmaktadır (Hengartner, 2000; Moreira, 2010; Rizzuto, Bernardi ve Pozzan, 2000) (Şekil 2.8).

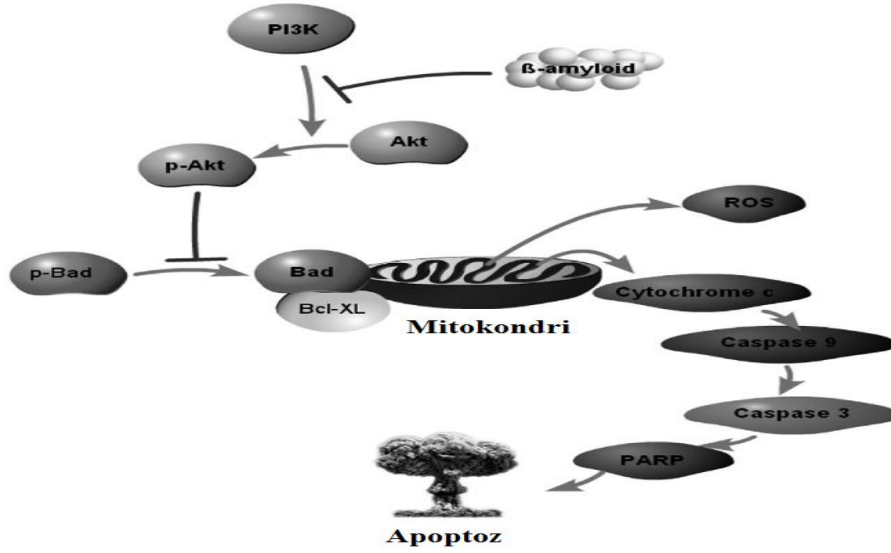


Şekil 2.8. AH'de mitokondriyal hasar ve apoptozun moleküler biyolojisi. ADP: Adenozin difosfat; AIF: Apoptoz indükleyen faktör; APAF-1: Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1; ATP: Adenozin trifosfat; Ca^{2+} : Kalsiyum; dATP: 2'-deoksiadenozin 5'-trifosfat; H^+ : Hidrojen; H_2O : Su; O_2 : Oksijen; $O_2^{\cdot -}$: Süperoksit radikali; Pi: Fosfor (Moreria, 2010)

2.2.6. Protein kinaz B (AKT/PKB), mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) ve nüklear faktör- κ B (NF- κ B/p65) sinyal yollarının AH'deki rolü

Fosfatidilinositol 3 kinaz-AKT/Protein kinaz B (PI3K-AKT/PKB) sinyali, hücre sağ kalımını artırmanın sağlandığı önemli hücre içi sinyal yollarından birisidir. AKT/PKB, hücre dışı sinyallerle aktive edilen PI3K'nın bir alt akış protein kinazıdır (Gao ve diğerleri, 2008). Artan kanıtlar PI3K-AKT/PKB sinyal yolağının A β maruziyetinden doğrudan etkilendiğini ve AH sahip beyinlerde değiştiğini göstermektedir (Bhaskar ve diğerleri, 2009). A β , PI3K-AKT/PKB'yi inaktive etmektedir. Bu durum, BAD proapoptotik proteinin fosforilasyonuna yol açarak, BAD'ın sitoplazmadan mitokondriye translokasyonuna neden olmaktadır. BAD'ın translokasyonu, mitokondriyal membran potansiyelinin azalmasına yol açmaktadır. Bunun sonucunda, PI3K-AKT/PKB/BAD/BCL-

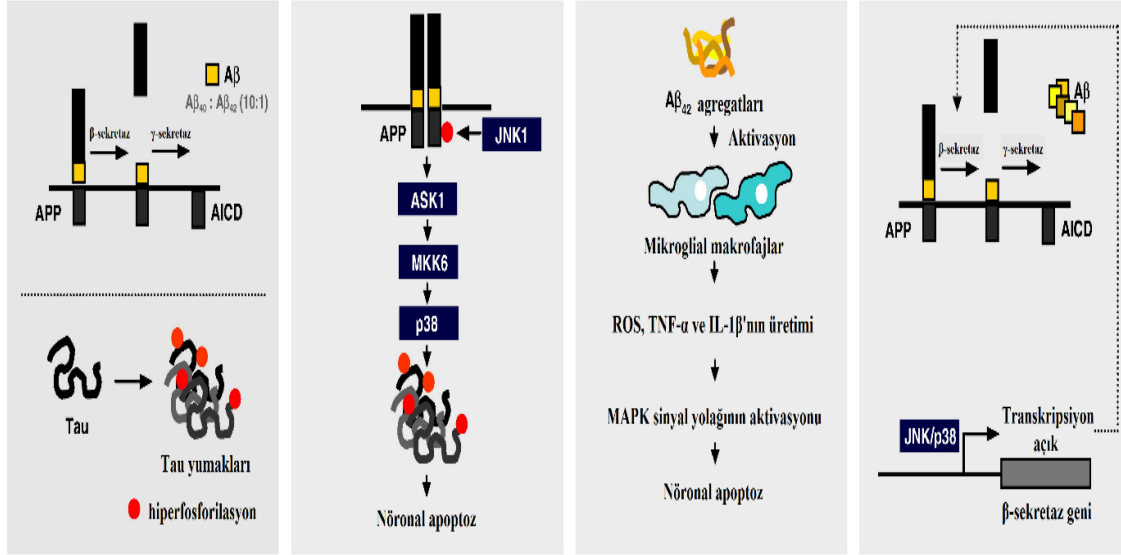
XL aracılı mitokondriyal apoptotik yol indüklenmektedir (Zeng ve diğerleri, 2011) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. AKT/PKB sinyal yolağının AH'deki rolü. Akt: Protein kinaz B; Bad: Bcl-2 ile ilişkili hücre ölümü agonisti; Bcl-XL: B hücreli lenfoma-XL; p-Akt: Fosforile protein kinaz B; PARP: Poli ADP riboz polimeraz; p-Bad: Fosforile Bcl2 ile ilişkili hücre ölümü agonisti; PI3K: Fosfatidilinositol 3 kinaz; ROS: Reaktif oksijen türleri (Zeng ve diğerleri, 2011)

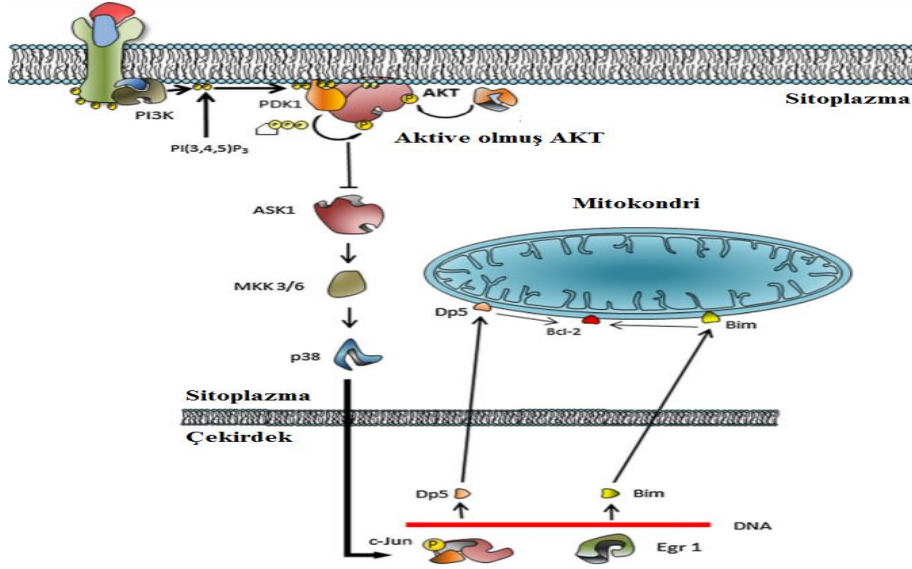
Mitojen aktive edilmiş protein kinaz (MAPK)'ler, çeşitli hücrel aktivitelere rol oynayan bir grup serin-treonin kinazdır ve 3 ana alt gruba ayrılır; hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK), c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38 mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (p38 MAPK). MAPK'ların ayrıca amiloid prekürsör protein metabolizması ve A β üretiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Amiloid prekürsör protein, 10:1 oranında amiloidojenik A β proteinleri A β ₁₋₄₀ ve A β ₁₋₄₂'yi üretmek için β - ve γ -sekretazlar ile sırayla kesilmektedir (Ghasemi ve diğerleri, 2014). JNK ve p38 MAPK sinyalleşme kaskadlarının aktivasyonu β -sekretaz geninin transkripsiyonunu arttırmaktadır (Kim ve Choi, 2010). Proteinin A β kısmı tarafından aracılık edilen amiloid prekürsör protein dimerizasyonu apoptoz sinyali düzenlenmiş kinaz-1-MKK6-p38 MAPK kaskadını aktive eder, bu da nörofibriler yumakların oluşumuna yol açan tau proteinini fosforillemektedir (Kim ve Choi, 2010) AH sahip hastalarda bulunan nörofibriler yumaklar, ERK, JNK ve p38 MAPK dahil olmak üzere çeşitli kinazlar tarafından hiperfosforile edilmiş mikrotübül ile ilişkili tau proteinini içermektedir (Ghasemi ve diğerleri, 2014). A β agregatları, ROS, tümör nekroz faktör- α ve interlökin-1 β gibi pro-enflamatuvar sitokinleri üreten mikrogial makrofajları aktive eder, bunlar birlikte nöronal ölümün indüksiyonunun altında yatan

MAPK sinyalleşme kaskadlarının aktivasyonunu tetiklemektedir (Kim ve Choi, 2010) (Şekil 2.10).



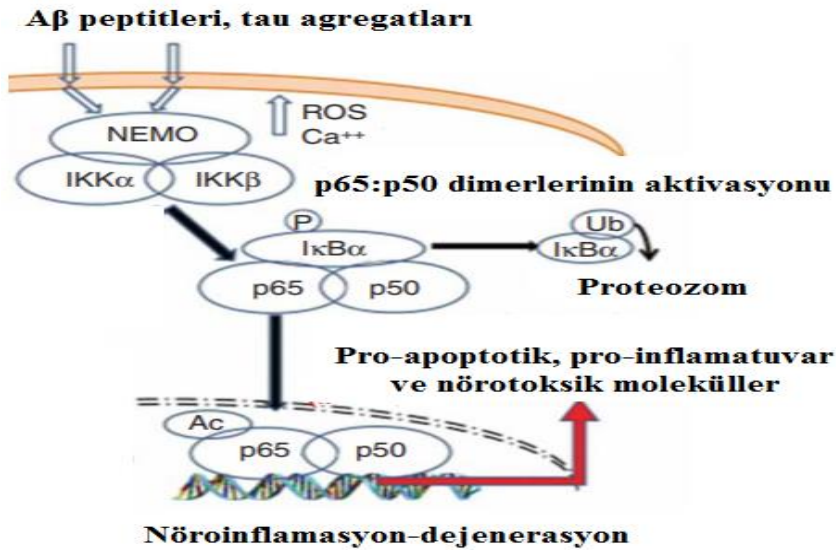
Şekil 2.10. MAPK sinyal yolağının AH'deki rolü. Aβ: Amiloid β; Aβ₄₀: Amiloid β₄₀; Aβ₄₂: Amiloid β₄₂; AICD: Amiloid prekürsör protein hücre içi alanı; APP: Amiloid prekürsör protein; ASK1: Apoptoz sinyali düzenlenmiş kinaz 1; IL-1β; İnterlökin-1β; JNK1: c-Jun N-terminal kinaz 1; MAPK: Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz; ROS: Reaktif oksijen türleri; TNF-α: Tümör nekrozis faktör-α (Kim ve Choi, 2010)

Apoptoz sinyali düzenlenmiş kinaz-1, Ser83 rezidüsünden AKT/PKB tarafından fosforilasyonu inaktive edilen bir serin/treonin MAPK kinaz (MAPKK) kinazdır (MAPKK kinaz, MAPKKK). Apoptoz sinyali düzenlenmiş kinaz-1'in aşağı akım hedefleri arasında MAPKK'lar MKK4/7 ve MKK3/6 yer almaktadır. Sonuç olarak, bu MAPKK'lar CJUN'u, yani ERK½, JNK ve p38 MAPK'yi aktive edebilen üç MAPK'nin indüklenmesine yol açmakta olup, ikinci moleküller, sırayla, CJUN, JUNB ve ATF2 gibi hücre ölümü için gerekli olan çeşitli transkripsiyon faktörlerini fosforile etmektedir. Ayrıca, DP5/HRK, BIM, BID, BAD, PUMA ve NOXA gibi sadece-BH3 proteinleri, apoptozun kritik başlatıcılarıdır. CJUN yolağının aktivasyonu, nöronal hücre ölümünde anahtar rol oynayan DP5 ve BIM dahil olmak üzere birçok genin yukarı regülasyonunu sağlamaktadır. Bu durum kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (De La Torre ve diğerleri, 2013; Yarza, Vela, Solas ve Ramirez, 2016) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. MAPK sinyal yolağının AH'deki rolü 2. AKT: Protein kinaz B; ASK1: Apoptoz sinyali düzenlenmiş kinaz 1; Bcl-2: B hücreli lenfoma; Bim: Bcl-2-benzer protein 11; PDK1: Piruvat dehidrogenaz kinaz 1; PI(3,4,5)P₃: Fosfor; PI3K: Fosfatidilinositol 3 kinaz; MKK 3/6: MAPK kinaz 3/6 (De La Torre ve diğerleri, 2013)

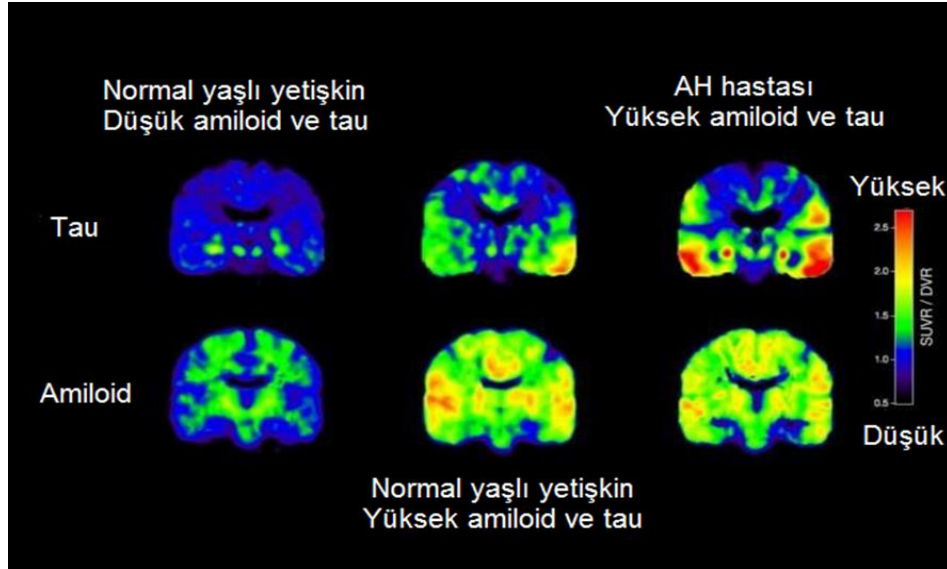
Memeli nükleer faktör- κ B (NF- κ B)/p65 ailesi, yapısal olarak ilgili 5 proteinden oluşmaktadır: c-Rel, RelA/p65, RelB, p50 ve p52 (Huang ve diğerleri, 2012). A β ile stimülasyon, hücre içi kalsiyum ve oksidatif stresi arttırmakta olup, IKK proteinlerinin fosforilasyonuna, I κ B α 'nın ubiquitinasyonuna ve p50:p65 NF- κ B/p65 heterodimer aktivasyonuna yol açmaktadır. Çekirdeğe translokasyon sonrasında proinflamatuvar genler (interlökin-12 ve interlökin-17 gibi), proapoptotik genler (kaspazlar ve Bcl-2 ilişkili X (BAX) gibi) ve nörotoksik faktörlerin (glutamat ve uyarılmış nitrik oksit sentaz gibi) transaktivasyonunu indüklemektedir. Aktif p65:p50 dimerlerindeki artış, nöroinflamasyon ve nörodejenerasyona yol açan proapoptotik ve eksitotoksik faktörlerin gelişmiş transaktivasyonuna yol açmaktadır (Srinivasan ve Lahiri, 2015) (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. NF-κB/p65 sinyal yolağının AH'deki rolü. Aβ: Amiloid β; Ca⁺⁺: Kalsiyum; IKKα: IκB kinaz α; IKKβ: IκB kinaz β; NEMO: NF-κB/p65 temel modülatör; P: Fosfor; ROS: Reaktif oksijen türleri; Ub: Ubikitinasyon (Srinivasan ve Lahiri, 2015)

2.2.7. AH'nin tanısı

Nöropsikolojik ve bilişsel testler yardımıyla AH'nin tanısı konulabilmektedir. Bu testler, AH'ye sahip hastanın problem çözme, zihinsel işlevsellik, dikkat, dil becerileri ve sayma gibi bir takım zihinsel yeteneklerini değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Genetik testler, AH'nin herhangi bir gen mutasyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığını tespit etmek için yapılmaktadır. Diğer tarama yöntemleri ise, beyinin zihinsel aktivitelerini gösteren pozitron emisyon tomografisi (Şekil 2.13), manyetik rezonans görüntüleme ve beyni ayrıntılı görüntüleyen bilgisayarlı tomografidir (İnternet 4).



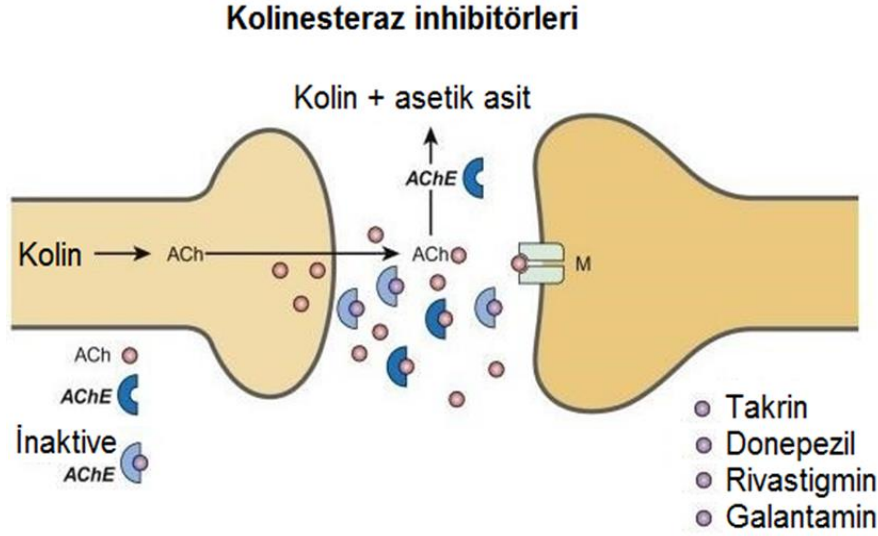
Şekil 2.13. Normal yaşı yetişkin ve AH hastası kişilerde amiloid ve tau pozitron emisyon tomografisi tarama görüntüleri (İnternet 5)

2.2.8. AH'nin tedavisi

Nörotransmisyonun modülasyonu

Kolinesteraz inhibitörleri

Kolinesteraz inhibitörleri, şu ana dek AH'nin bilişsel ve fonksiyonel semptomlarının tedavisinde etkinliği kanıtlanmış tek bileşik sınıfıdır. Kolinesteraz inhibitörleri, AChE'yi inhibe ederek asetilkolinin yıkımını önleyerek ve nöronal sinapstaki asetilkolin miktarını artırarak kolinerjik sinapslardaki etkisini uzatarak etkinlik göstermektedirler (İnternet 2). Kolinesteraz inhibitörlerinin dört tanesi hafif orta AH tedavisinde onaylanmıştır. Bunlar takrin (bir aminoakridin), donepezil (bir benzilpiperidin), rivastigmin (bir karbamat) ve galantamindir (bir tersiyer alkaloid) (Liston ve diğerleri, 2004) (Şekil 2.14).



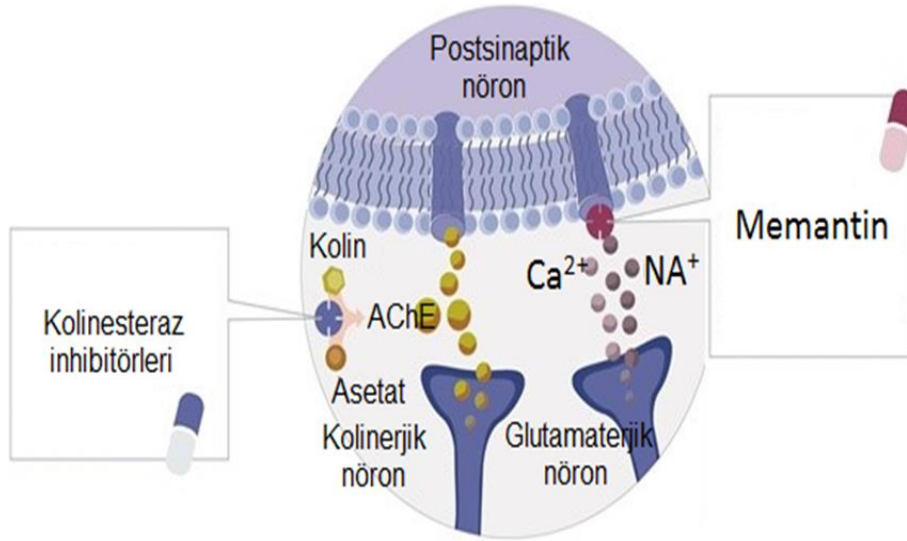
Şekil 2.14. AH'nin kolinerjik hipotezine dayanan kolinesteraz inhibitörleri. ACh: Asetilkolin; AChE: Asetilkolin esteraz (İnternet 6)

Takrinin yüksek oranda hepatotoksik etkisi sebebiyle kullanımı tama yakın bırakılmıştır. İkinci kuşak olarak adlandırılan diğer kolinesteraz inhibitörlerinin toksik etkileri takrine göre daha düşük oranlardadır. Bulantı, kusma, kas krampları, bradikardi, senkop, ishal, kilo kaybı, uykusuzluk ve yorgunluk, kolinesteraz inhibitörleriyle ilgili bildirilen en sık yan etkilerdir (Ülger ve Arıoğlu, 2007).

N-metil-D-aspartat antagonizmi

Glutamat aracılı eksitotoksisitenin, kalsiyum aşırı yüklemesi ve mitokondriyal disfonksiyon ile sonuçlandığı bilinmektedir. Bu durum, yüksek seviyede oksidan üretimi ve nöronal apoptoza yol açarak hücrelere zararlı olabilen nitrik oksit oluşumunun artmasına sebebiyet vermektedir. Memantin, 2003 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından orta ağır AH tedavisi için onaylanmış olup, hafif orta AH'de bilişsel yeteneklere fayda sağlamaktadır. Memantin, etkisini postsinaptik N-metil-D-aspartat reseptörlerini bloke ederek dolayısı ile aşırı glutamaterjik aktiviteyi engelleyerek göstermekte olup, glikojen sentaz kinaz 3β aktivitesinde azalma yoluyla tau fosforilasyonunu düzenleyerek nöronları da koruyabilmektedir. Yarışmacı olmayan glutamaterjik N-metil-D-aspartat reseptör antagonisti tek başına ya da bir kolinesteraz inhibitörü ile birlikte verilebilmektedir (Mavioğlu, 2007; Mendiola Precoma, Berumen, Padilla ve Garcia Alcocer, 2016) (Şekil 2.15). Kolinesteraz inhibitörleri ve N-metil-D-aspartat antagonisti AH'yi tam anlamıyla

tedavi etmemekte olup, AH'nin sadece semptomlarının düzelmesini sağlamaktadır (İnternet 2).



Şekil 2.15. Lisanslı tedaviler. AChE: Asetilkolin esteraz; Ca^{2+} : Kalsiyum (İnternet 7)

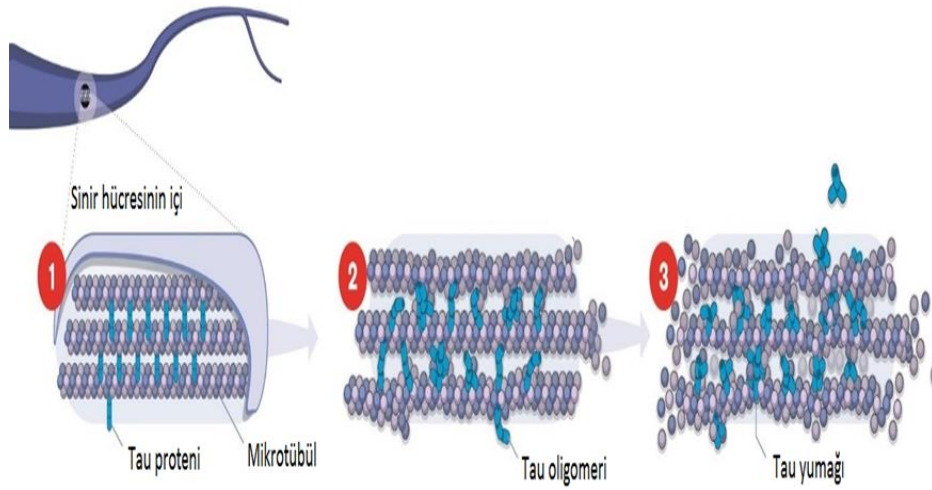
Gama-aminobütirik asiterjik, serotonin reseptör, histaminerjik ve adenozin reseptör modülasyonu

Gama-aminobütirik asit, serotonin, histamin ve adenozin gibi çeşitli reseptörler AH'nin fizyolojik ilerlemesinde aktif olarak yer almaktadırlar. Bu nedenle, özellikle AH'nin ilerlemesinde yer alan farklı reseptörleri hedefleyebilecek yeni ajanların araştırılması ve geliştirilmesi önem taşımaktadır (Shahnawaz Khan, Amjad Kamal ve Tabrez, 2017). AH'nin tedavisinde bu ajanların kullanılabilmesi için güncel araştırmalar halen devam etmektedir (Kandimalla ve Reddy, 2017; Xu, Zhao, Han ve Zhang, 2020).

Tau tabanlı tedaviler

Sağlıklı nöronun içinde paralel uzanan mikrotübüller, hücrenin beslenme ve iletilecek temel materyallerine yönelik taşıma sistemini sağlamaktadır. Tau proteini, mikrotübüller için iskele görevi görmektedir ve onları yerinde tutmaktadır. Tau'nun hiperfosforilasyonu, tau oligomerlerinin oluşumuna yol açmaktadır. Bu tau oligomerleri, diğer moleküllerle bir araya gelerek tau yumaklarını oluşturmaktadır. Tau yumakları, mikrotübüllerin aralığını ve aksonal taşınmayı bozarak akson terminallerinin ve dendritlerin beslenmesini etkileyerek sonunda hücre ölümüne yol açmaktadır (İnternet 7) (Şekil 2.16). Tau yumaklarındaki

heliks şeklinde bükülü hiperfosforile tau oligomerlerinin oluşumunun önlenmesi bu tedavinin hedeflerinden biridir. Tau proteinlerinin hiperfosforilasyonunda da yer alan siklik bağımlı kinaz 5 de olası bir ilaç hedefi olarak düşünülmektedir. Çok sayıda molekülün tau yumaklarının inhibitörleri olduğu gösterilmiş olup, klinik çalışmalar halen devam etmektedir (Mendiola Precoma ve diğerleri, 2016; Pradeepkiran ve Reddy, 2019).

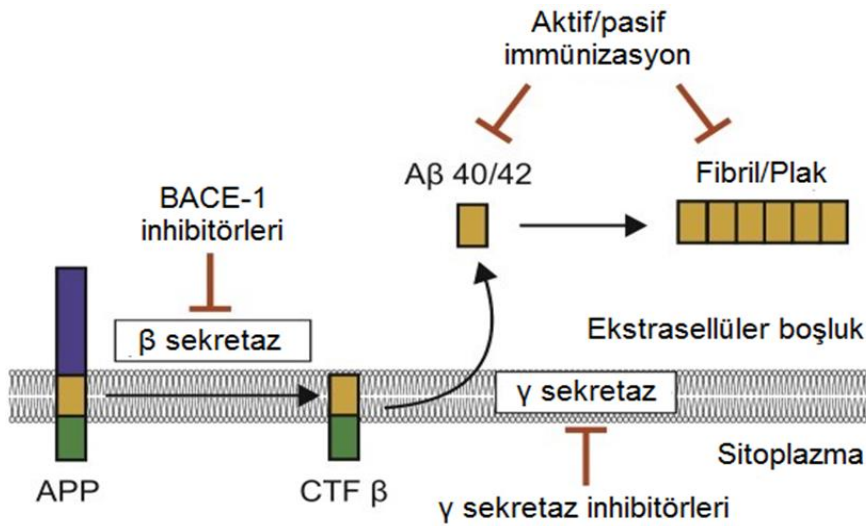


Şekil 2.16. AH'nin tau hipotezine dayanan mevcut tedavi stratejileri (İnternet 7)

Amiloid tabanlı tedaviler

AH hastalarının beyin dokusunda amiloid plaklarının keşfi ve amiloid prekürsör protein genleriyle ilgili bulgular amiloid kaskad hipotezine yol açmıştır. Amiloid plaklardansa A β oligomerlerinin primer toksisiteye yol açtıkları konusunda fikir birliği vardır. A β ₁₋₄₂, A β ₁₋₄₀'dan daha toksiktir. Peptidin uzunluğu toksisiteyi belirlemektedir (Canter, Penney ve Tsai, 2016). Orta düzeyde A β presinaptik uyarılmaya yol açarken, artan ve azalan düzeyleri sinaptik fonksiyonu baskılamaktadır. A β oligomerleri uyarıcı ve inhibe edici sinapslar üzerinde zıt etkilere sahiptir. Bu nedenle nöral trafiğe etkileri, nöronal ağların yapısına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Yüksek seviyede A β aracılı nöronal hiper uyarılabilirlik, anormal nöronal ağ aktivitesi, yavaş osilasyonların disfonksiyonu, öğrenme ve bellek bozukluğuna yol açabilmektedir. A β düzeyini düşürmeye yönelik birçok ilaç geliştirme denemesi yapılmıştır (Zhou ve diğerleri, 2018). A β üretimini azaltmaya yönelik ilgi çeken bir terapötik strateji, β -sekretaz veya γ -sekretaz enzimlerinin, özellikle de β -sekretaz 1 inhibitörlerinin aktivitesini modüle eden ilaçlardır. β -sekretaz 1 inhibitörlerini geliştirmek için önemli çabalar sarf edilmiş olmasına rağmen, çoğu deneme, yetersiz hedef

özgüllüğü, beyin geçirgenliği ve/veya bilişsel sonuçları test etmeden veya A β seviyesini ölçmeyen araştırma tasarımı nedeniyle başarısız olmuştur (Vassar, 2014; DeStrooper, 2014). γ -sekretaz inhibitörlerinin geliştirme başarısızlığı, γ -sekretazın yapısının sınırlı anlaşılmasına atfedilebilir (De Strooper, 2014). Alternatif olarak, peptit ile hem aktif hem de pasif immünizasyon stratejileri, parankimde amiloid plak klirensini artırmak için potansiyel yollardır. Klinik çalışmalarda immünoterapi, β/γ -sekretaz inhibitörlerinden daha fazla başarılı olmuştur. Aktif immünizasyon, bozulmamış A β_{1-42} peptidi veya A β fibril/plakları ile immünizasyon yoluyla sağlanırken, pasif immünizasyon, anti-A β antikoları ile sağlanmaktadır. İmmünizasyon, A β plaklarını oldukça iyi bir şekilde elimine edebilmekte, ancak tedavinin nörodejenerasyon sürecini durdurmamaktadır. Ancak, A β plaklarını daha etkin uzaklaştırmanın yanında bilişsel aktiviteleri iyileştirmeye yönelik ileri çalışmalar gerekmektedir (Aisen ve diğerleri, 2020; Schenk, 2002) (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. AH'nin amiloid kaskad hipotezine dayanan mevcut tedavi stratejileri. A β 40/42: Amiloid β 40/42; APP: Amiloid prekürsör protein; BACE-1: β sekretaz-1; CTF β ; C-terminal parçası β (Zhou ve diğerleri, 2018)

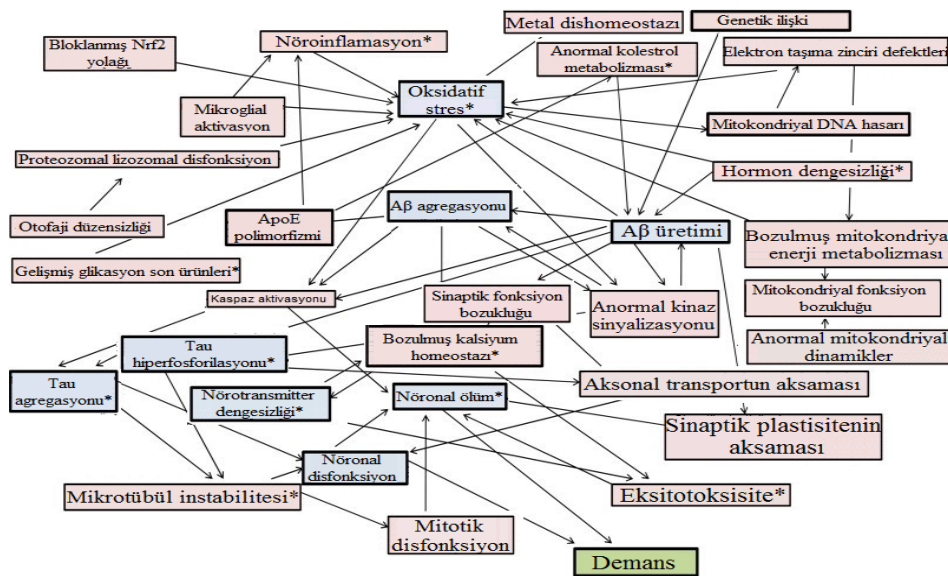
Hücre içi sinyal kaskadlarının modülasyonu

Nörodejenerasyon ve nörodejeneratif hastalıklarda sinyal yollarının nöronal gelişim ve fonksiyonunda kritik role sahip oldukları bilinmektedir (Kaytor ve Orr, 2002). Şekil 2.18, AH'nin patogenezinde yer alan çeşitli mekanizmaları göstermektedir. Hücre içi kalsiyum sinyalizasyonunun disregülasyonu AH'nin patogenezinde yer almakta olup, artmış hücre içi kalsiyum seviyesi, hastalığın tipik lezyonlarını ortaya çıkarmaktadır. A β birikimi, tau hiperfosforilasyonu ve nöron ölümü tipik lezyonlardandır. Endoplazmik retikulumda

kalsiyum regülasyonunun bozulması AH ile ilişkili en önemli sinyal iletim kaskadlarının aktivasyonuna yol açmaktadır. Erken başlangıçlı AH'ye yol açan mutasyonlar hücre içi kalsiyum sinyal yollarıyla ilişkilidir. Kalsiyum sinyalizasyonunun destabilizasyonu AH'nin patogeneziinde merkezi bir rol oynamakta olup, destabilizasyonun hedeflenmesi terapötik olarak faydalı olabilecektir (LaFerla, 2002).

p38 MAPK sinyalizasyonunun nöroinflamasyona katkıda bulunan bir kaskad olduğu geniş oranda kabul görmektedir. p38 MAPK, AH'de birden fazla rol oynabilmektedir. p38 MAPK eksitotoksiste, sinaptik plastisite ve tau fosforilasyonu gibi AH ile ilişkili diğer olaylarda da etkilidir. p38 MAPK yeni bir AH tedavi stratejisi olarak ortaya çıkmaktadır. AH demansı olan hastalar p38 MAPK inhibitörlerinden fayda görebilecekleri düşünülmektedir (Munoz ve Ammit, 2010).

NF- κ B/p65 sinyalizasyonu β -sekretaz 1 gen ekspresyonu ve amiloid prekürsör proteinin işlenmesini kolaylaştırmaktadır. NF- κ B/p65 sinyalizasyonu tarafından aracılık edilen beyinde β -sekretaz 1 ekspresyon artışı, geç başlangıçlı AH gelişiminin altındaki yeni moleküler mekanizmalardan birisidir. Ek olarak, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar inflamasyon aracılı β -sekretaz 1 transkripsiyonunu ve A β üretimini bloke edebilmektedir. NF- κ B/p65 aracılı β -sekretaz 1 ekspresyonunun inhibisyonu AH tedavisi için değerli bir ilaç hedefi olabilecektir (Chen ve diğerleri, 2012).

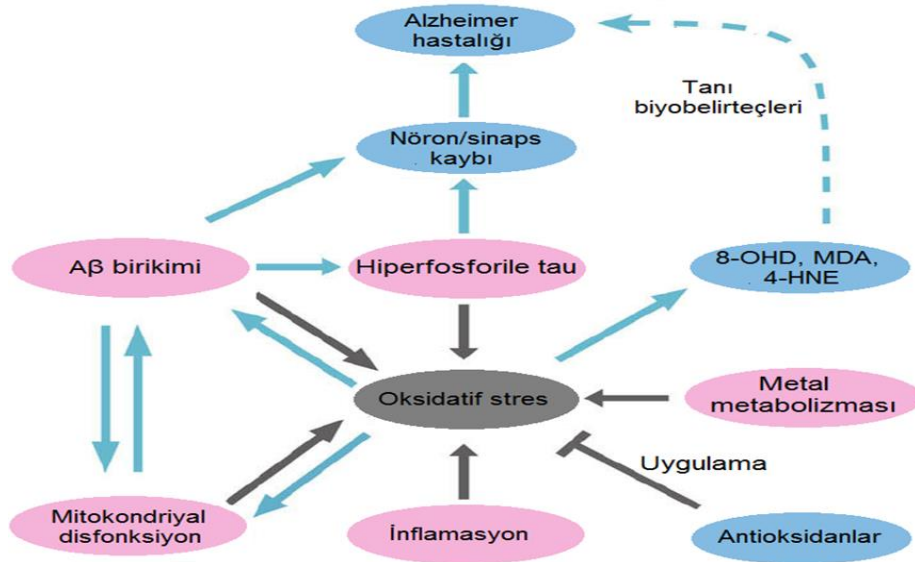


Şekil 2.18. AH'nin patogenezi (Nedensellik ağı). Başlıca mekanizmalar kalın kutular içindedir. Yıldız işareti (*) terapötik stratejilerin hedeflendiği mekanizmaları göstermektedir (Anand, Gill ve Mahdi, 2014)

Oksidatif stresin azaltılması

Antioksidanlar, hem akış yukarı hem de akış aşağı oksijen türlerini hedef alarak nöral hücrelerin redoks dengesini koruyabilmektedir. Akış yukarı koruyucu etkiler ROS'ların aşırı birikiminin ve lipid/protein oksidasyonunun engellenmesine bağlıdır. Tersine, akış aşağı oksijen türleri üzerine etkili antioksidan ilaçlar ise mutant protein birikimini azaltma ve nöral inflamasyonu giderme üzerine odaklanmışlardır (Liu, Zhou, Ziegler, Dimitrion ve Zuo, 2017). Antioksidanların nörodejeneratif semptomların giderilmesindeki aktiviteleri birçok çalışmada araştırılmıştır (Chen ve Zhong, 2014).

AH'de mitokondriyal disfonksiyon, metal malmetabolizması, inflamasyon, hiperfosforile tau ve A β birikimi ROS ile bağlantılıdır (Chen ve Zhong, 2014) (Şekil 2.19). ROS, değişik mekanizmalar yoluyla oluşabilmekte ve AH'nin hastalık gelişimini hızlandırmada karmaşık rolleri bulunmaktadır (Liu ve diğerleri, 2017). ROS'ların AH'deki bu karmaşık rollerinin belirlenmesi ve antioksidan tabanlı terapötik hedeflerin geliştirilmesi için ileri düzey çalışmalara gereksinim vardır (Butterfield ve Halliwell, 2019; Liu ve diğerleri, 2017).



Şekil 2.19. AH'de oksidatif stres hipotezine dayanan mevcut tedavi stratejileri. 4-HNE: 4-hidroksinonal; 8-OHD: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin; A β : Amiloid β , MDA: Malondialdehit (Chen ve Zhong, 2014)

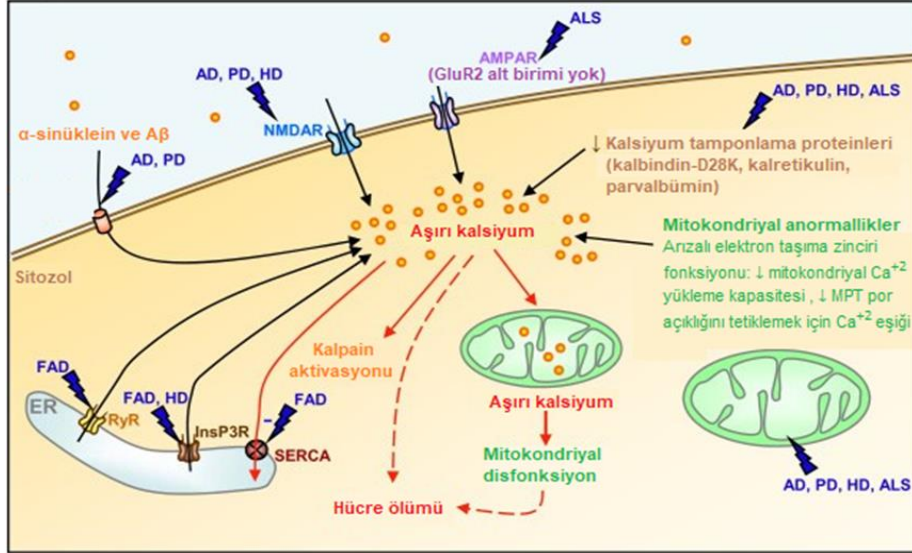
Mitokondriyal tabanlı tedaviler

AH patolojisindeki iki belirgin nokta mitokondriyal disfonksiyon ve bozulmuş enerji metabolizmasıdır. Mitokondriler iki yoldan hedef alınabilmektedir: i) Mitokondriler üzerine doğrudan etki eden farmakolojik yaklaşımlar veya ii) mitokondriyi dolaylı yoldan etkileyen yaşam tarzı üzerine etki eden yaklaşımlar. Mitokondrinin AH tedavisinde uygunluğu halen tartışılmaktadır. Mitokondriyal terapötik stratejiler, klinik öncesi aşamada umut vaat ederken, klinik çalışmalarda çok az ilerleme kaydedilmiştir (Cenini ve Voos, 2019; Lanzillotta, Domenico, Perluigi ve Butterfield, 2019).

Hücresel kalsiyum homeostazının modülasyonu

AH, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı ve amyotrofik lateral skleroz, farklı homeostatik kontrol mekanizmalarını deregüle ederek sitozolik kalsiyum seviyelerini etkilemektedir. N-metil-D-aspartat reseptörü veya AMPA glutamat reseptörü aktiviteleri, kalsiyum tamponlama proteinleri ve mitokondriyal fonksiyonların dört nörodejeneratif hastalıkta da düzensiz olduğu bulunmuştur. Parkinson hastalığındaki Lewy cisimciklerinin ve AH'deki senil plaklarının yapı taşları olan α -sinüklein ve A β peptidleri, plazma membranında kalsiyum geçirgen iyon kanalları oluşturabilmektedir. InsP3R'nin (Huntington hastalığı ve erken başlangıçlı ailesel AH'de) ve RyR'nin (Erken başlangıçlı ailesel AH'de) aşırı duyarlılaştırma mekanizması veya endoplazmik retikulum pompası SERCA'nın (Erken başlangıçlı ailesel AH'de) inaktivasyonu yoluyla anormal endoplazmik retikulum kalsiyum akışı da gözlenmiştir (Bezprozvanny ve Mattson, 2008; LaFerla, 2002; Marambaud, Dreses Werringloer ve Vingdeux, 2009; Wojda, Salinska ve Kuznicki, 2008) (Şekil 2.20). Bozulmuş hücresel kalsiyum homeostazının AH patogenezindeki rolü üzerine yapılmış olan çalışmalar, kalsiyum sinyalizasyon yollarını hedefleme yoluyla nöronal kalsiyum homeostazını stabilize eden terapötik yaklaşımların AH'de nöronal dejenerasyonun önlenmesi veya tedavi edilmesinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bir takım ilaçlar *in vitro* ve *in vivo* potansiyel terapötik fırsatlar sunmuşlardır. Farmakolojinin gelişmesi ve kalsiyum disregülasyonunu AH patolojisine bağlayan moleküler mekanizmalar hakkında daha fazlasının öğrenilmesi ile birlikte, depo kontrollü kanallar, hücre içi kalsiyum salınım kanalları, kalsiyum-ATPaz pompası, A β formulu kalsiyum kanalları, kalsiyum ilişkili proteinler ya da mitokondriyal kalsiyum idare

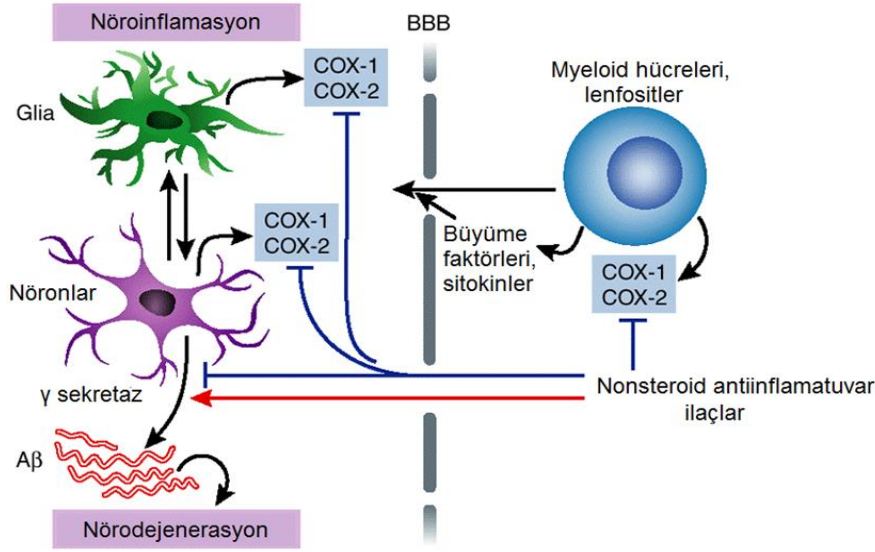
sistemini hedefleyen daha özgül stratejiler gelecekte daha fazla yeni potansiyel fırsatlar sunabilecektir (Popugaeva, Chernyuk ve Bezprozvanny, 2020; Yu, Chang ve Tan, 2009).



Şekil 2.20. AH’de kalsiyum hipotezine dayanan mevcut tedavi stratejileri. A β : Amiloid β ; AD: Alzheimer hastalığı; ALS: Amyotrofik lateral skleroz; AMPAR: AMPA glutamat reseptörü; Ca²⁺: Kalsiyum; ER: Endoplazmik retikulum; FAD: Erken başlangıçlı ailesel Alzheimer hastalığı; HD: Huntington hastalığı; MPT: Mitokondriyal geçirgenlik geçişi; NMDAR: N-metil-D-aspartat reseptörü; PD: Parkinson hastalığı (Marambua ve diğerleri, 2009)

Anti-inflamatuvar tabanlı tedavi

AH’de nöroinflamasyonun kritik role sahip olması, çeşitli çalışma gruplarını nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar denemeye sevk etmiştir. Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçların faydaları; siklooksijenaz ve nöroinflamasyon inhibisyonu dışında kalan, kalsiyum homeostazının korunması, γ -sekretazın, Rho-GTPazların ve peroksizom proliferatör ile aktive reseptörlerin hedeflenmesini içeren çeşitli mekanizmaları içermektedir. Beyin fonksiyonlarındaki mevcut olan karmaşık mikrogial etkileşim düşünüldüğünde, anti-inflamatuvar tedavinin sonucunu tahmin etmek zordur (Anand ve diğerleri, 2014). Bu sebeple, anti-inflamatuvar terapötik hedeflerin geliştirmesi için ileri çalışmalara gereksinim vardır (Maccioni ve diğerleri, 2020).



Şekil 2.21. AH ve nonsteroid antiinflamatuar ilaçlar. A β : Amiloid β ; COX-1: Sikloksijenaz 1; COX-2: Sikloksijenaz 2 (Wyss Coray, 2005)

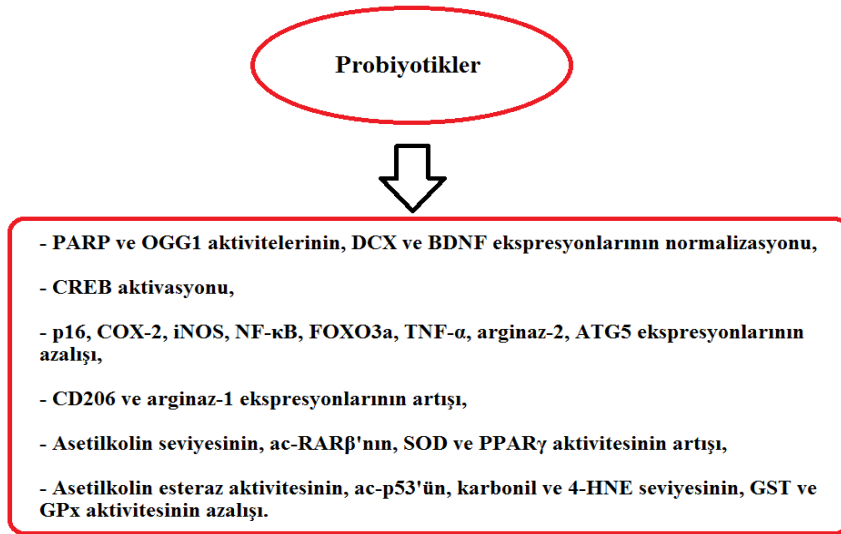
Tedavilere genel bir bakış

Bu zamana kadar AH için uygulanan tedaviler şunları kapsamaktadır: Antikor aşılama ve immünizasyon tedavileri; gen tedavisi; β -sekretaz inhibitörleri, γ -sekretaz inhibitörleri ve modülatörleri ve kolinesteraz inhibitörleri gibi enzim tabanlı tedaviler; N-metil-D-aspartat reseptör antagonistleri, α -amino-3-hidroksi-l-metil-4-izoksazolepropionik 5 asit reseptör modülatörleri, peroksizom proliferatör aktive reseptör agonistleri, M1 muskarinik agonistleri, ileri glikasyon son ürünü ile ilişkili mekanizmalar ve nikotin asetilkolin reseptör agonistleri gibi reseptör tabanlı tedaviler; antioksidanlar ve anti-inflamatuar ve nörokoruyucu yaklaşımlar gibi redoks stresi tabanlı tedaviler; ve tau ilişkili tedaviler. Dahası, kolesterol biyosentezini hedefleyen ajanlar, astrosit modüle edici ajanlar, homosistein düşürücü stratejiler ve kaspaz inhibitörleri gibi diğer başka tedaviler de tasarlanmıştır. Yukarıda sayılan tedavilerin çoğu klinik çalışmalardan da geçmiştir ancak sonuçlar şu ana dek başarılı olmaktan uzaktır. Şu an pazarda varolan tüm tedaviler içinde ticari olarak yalnızca iki ilaç sınıfı mevcuttur: Kolinesteraz inhibitörleri ve N-metil-D-aspartat reseptör antagonisti. Kolinesteraz inhibitörleri ve N-metil-D-aspartat antagonisti AH'yi tam anlamıyla tedavi etmemekte olup, AH'nin sadece semptomlarının düzelmesini sağlamaktadır (İnternet 2; Kamat ve diğerleri, 2016). Ek olarak, bu ilaçların bağırsak mikrobiyotasının bileşimini değiştirerek disbiyozu neden olma ihtimali bulunmaktadır. Disbiyozis, nörodejeneratif sürecin sürdürülmesine, bu ilaçların terapötik etkilerinin önlenmesine veya azaltılmasına katkıda bulunmaktadır (Hort ve diğerleri, 2020). Bu

nedenle, probiyotik mikroorganizmalarla sağlıklı bağırsak mikrobiyotasının restorasyonu, AH'nin önlenmesi ve yönetimi için yeni bir yaklaşım sağlayabilmektedir. Buna ilaveten, AH'nin çok nedenli doğasını anlamak için geliştirilen, “bir molekül-çoklu hedef” uygulamasına dayalı yeni bir yaklaşım son zamanlarda bilim insanlarının geniş biçimde ilgisini çekmektedir. Çok hedefli ilaçlar, AH için tipik olan kilit patolojilerle savaşmanın bir yolu olarak çoklu reseptörleri hedef alma kabiliyetini kombine etmektedirler (Simunkova ve diğerleri, 2019). “Bir molekül-çoklu hedef” uygulamasına probiyotik mikroorganizmalar olan laktik asit bakterilerinden elde edilen ekzopolisakkaritler örnek olarak verilebilir.

2.3. Probiyotikler

Probiyotikler, uygun miktarlarda ağızdan alındıklarında konağa bazı faydalar sağlayan canlı mikroorganizmalardır. Probiyotiklerin en önemli grubunu laktik asit bakterileri oluşturmaktadır. Bunların içerisinde *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleri en yaygın olarak kullanılan probiyotiklerdir. Bazı *Streptococcus*, patojen olmayan *Escherichia coli* ve maya suşları da probiyotik mikroorganizmalardır (Thakur, Rokana ve Panwar, 2016). Probiyotikler, insan vücudunun zorlu koşullarına (tükürük enzimleri, düşük pH ve pankreatik sıvı gibi) dayanma, bağırsak epitel hücrelerini kolonize etme ve zararlı mikroorganizmaları düzenleyip biyolojik işlevler yürütme yoluyla konağın sağlığına katkıda bulunma yeteneklerine sahiptirler (De Melo Pereira, De Oliveira Coelho, Junior, Thomaz Soccol ve Soccol, 2018). Probiyotiklerle ilgili çeşitli sağlık faydaları geniş şekilde çalışılmıştır. Bu faydalar arasında yaşam süresinin uzatılması, antioksidanların ve diğer geroreseptörlerin üretimi, gastrointestinal sistemde patojenlerin inhibe edilmesi, laktoz intoleransının azaltılması, serum kolesterolünün azaltılması, immün yanıtın iyileştirilmesi, kanserlerin önlenmesi, ülseratif kolitin ve atopik dermatitin tedavisi ve önlenmesi, huzursuz bağırsak sendromunun tedavisi, kardiyovasküler risk faktörlerinin azaltılması, *Helicobacter pylori*'nin tedavisi, antibiyotik ile ilişkili ishalin önlenmesi, vitaminlerin üretimi, ürogenital infeksiyonların tedavisi ve önlenmesi, hiperoksalüri tedavisi ve önlenmesi bulunmaktadır (Byakika, Mukisa, Byaruhanga ve Muyanjanja, 2019). Bunlara ek olarak, insan klinik çalışmaları probiyotiklerin hafızayı geliştirdiğini ve AH ve hafif bilişsel bozukluğu olan deneklerde inflamasyonu ve oksidatif stresi azalttığını ortaya koymuştur. Probiyotik mikroorganizmaların AH'de olası etki mekanizmaları Şekil 2.22'de verilmiştir (Kesika, Suganthi, Sivamaruthi ve Chaiyasut, 2020).



Şekil 2.22. Probiyotik mikroorganizmaların AH'de olası etki mekanizmaları. 4-HNE: 4-hidroksinonenal; ac: Asetil; ATG5: Otofajiyle ilgili 5; BDNF: Beyinden türetilen nörotrofik faktör; CD206: Farklılaşma kümesi 206 (Makrofaj mannoz reseptörü); CREB: cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein; COX-2: Siklooksijenaz-2; DCX: Doublecortin; FOXO3a: Çatal kafa kutusu proteini O3 a; GPx: Glutasyon peroksidaz; GST: Glutasyon S-transferaz; iNOS: Nitrik oksit sentaz; NF-κB: Nükleer faktör-κB; OGG1: 8-oksoguanin DNA glikosilazları 1; PARP: Poli (ADP-riboz) polimeraz-1; RARβ: Retinoik asit reseptörü β; SOD: Süperoksit dismutaz; p53: Tümör proteini p53; PPARγ: Peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör-γ; TNF-α: Tümör nekroz faktörü-α (Kesika ve diğerleri, 2020)

2.3.1. Probiyotiklerin AH'de kullanım potansiyelleri

Literatürde, probiyotiklerin AH üzerindeki koruyucu etkilerini belirlemek üzere çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Abraham ve diğerleri (2019)'nin yaptıkları çalışmada probiyotik (*B. longum* ve *L. acidophilus*) desteğinin, APP/PS1 transgenik farelerde (APP/PS1TG) fonksiyonel ve biyokimyasal bozulmanın ilerlemesini yavaşlatabileceği öne sürülmüştür. APP/PS1TG fareleri probiyotik tedavilere tabi tutulmuş ve farelerin fonksiyonel, biyokimyasal ve mikrobiyom belirteçleri analiz edilmiştir. Bu koşullar altında fareler, Morris su labirent testinde kontrollerden daha iyi performans göstermiştir ve hipokampusta amiloid β plaklarının sayısı azalmıştır. *B. thetaiotaomicron* seviyeleri, Morris su labirent testinin sonuçlarıyla yüksek oranda korelasyon göstermiştir ve bu bakteri grubu, APP/PS1TG farelerinin mikrobiyomunda yabancı tipe kıyasla önemli ölçüde yükselmiştir. *L. johnsonii* seviyeleri, amiloid β içeriği ve alanı ile pozitif korelasyon göstermiştir. Veriler, probiyotik tedavinin AH'nin ilerlemesini azaltabileceğini ve yararlı etkilere kısmen mikrobiyomun değişmesine aracılık edebileceğini ortaya koymuştur.

Leblhuber, Steiner, Schuetz, Fuchs ve Gostner (2018)'ın elde ettikleri sonuçlar AH hastalarının çok sayıda probiyotik (*L. casei* W56, *Lactococcus lactis* W19, *L. acidophilus* W22, *B. lactis* W52, *L. paracasei* W20, *L. plantarum* W62, *B. lactis* W51, *B. bifidum* W23 ve *L. salivarius* W24) ile desteklenmesinin bağırsak bakteri kompozisyonunun yanı sıra serumdaki triptofan metabolizmasını etkilediğini göstermiştir. Kynurenine/triptofan ve neopterin konsantrasyonları arasındaki korelasyon, makrofajların ve/veya dendritik hücrelerin aktivasyonuna işaret etmektedir.

AH, oksidan/antioksidan ve inflamatuvar/anti-inflamatuvar biyobelirteçlerdeki değişikliklerle bağlantılı olduğundan, Agahi ve diğerleri (2018)'nin yaptıkları çalışma, inflamatuvar ve oksidatif biyobelirteçlerin probiyotik (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum* ve *B. bifidum*) tedaviye tepkisini değerlendirmek için tasarlanmıştır. Şiddetli AH sahip hastalarda bilişsel ve biyokimyasal endikasyonların probiyotik desteğine duyarsız olduğu sonucuna varmışlardır. Bu nedenle, probiyotik bakterilerin formülasyonu ve dozajına ek olarak, hastalığın şiddeti ve uygulama süresinin, tedavi sonuçlarını derinden etkilediğini düşünmüşlerdir.

Akbari ve diğerleri (2016)'nin yaptıkları çalışmada randomize, çift kör ve kontrollü klinik çalışmayı, probiyotik (*L. acidophilus*, *L. casei*, *B. bifidum* ve *L. fermentum*) desteğinin bilişsel işlev ve metabolik durum üzerindeki etkilerini değerlendirmek için 60 AH hastası arasında gerçekleştirmiştir. 12 haftalık müdahaleden sonra, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, probiyotikle tedavi edilen hastalar mini mental durum muayenesi skorunda anlamlı bir iyileşme göstermiştir. Ek olarak, plazma malondialdehit, serum yüksek duyarlılıklı C-reaktif protein, homeostaz modeli, tahmini insülin direnci, beta hücre işlevi, serum trigliseritleri ve kantitatif insülin duyarlılığı kontrol indeksi, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde farklılık göstermiştir. Probiyotik tedavinin oksidatif stres ve inflamasyonun diğer biyobelirteçleri, açlık plazma glikozu ve diğer lipid profilleri üzerinde önemli bir etkisi olmadığını bulmuşlardır. Genel olarak, mevcut çalışma, 12 hafta boyunca probiyotik tüketiminin, AH hastalarında bilişsel işlevi ve bazı metabolik durumları olumlu yönde etkilediğini göstermiştir.

2.4. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri, bir grup morfolojik, metabolik ve fizyolojik özellik tarafından birleştirilen bir grup gram pozitif bakteridir. Bu grupta yer alan bakterilerin genel tanımı gram pozitif, sporlanmayan, respirasyon yapmayan koklar veya çubuklar olup, bunlar karbonhidrat fermentasyonu sırasında son ürün olarak laktik asit üretmektedirler (Axelsson, 2004). Başlıca insan ve hayvan gastrointestinal sisteminden, muköz membranlardan ve ayrıca bitkilerin yüzeylerinden izole edilmektedirler (Vinusha, Deepika, Johnson, Agrawal ve Rakwal, 2018).

Lactobacillus cinsi, fenotipik, ekolojik ve genotipik seviyelerde 261 tür içermektedir. Zheng ve diğerleri (2020) tarafından yapılan çalışma, Lactobacillaceae ve Leuconostocaceae'nin taksonomisini tüm genom dizileri temelinde değerlendirmiştir. Değerlendirilen parametreler arasında çekirdek genom filogenisi, (korunmuş) ikili ortalama amino asit kimliği, sınıfa özgü imza genleri, fizyolojik kriterler ve organizmaların ekolojisi yer almıştır. Bu polifazik yaklaşıma dayanarak, *Lactobacillus* cinsinin, *Lactobacillus delbrueckii* grubu, *Paralactobacillus* ve *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglio*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* ve *Lentilactobacillus* adların önerildiği 23 yeni cins olarak anılan konakçı tarafından uyarlanmış organizmaları içeren, geliştirilmiş *Lactobacillus* cinsi dahil 25 cinse yeniden sınıflandırılmasını önermişlerdir. Ayrıca Lactobacillaceae familyasının tanımını, daha önce Lactobacillaceae ve Leuconostocaceae familyalarına dahil edilen tüm cinsleri içerecek şekilde değiştirmeyi önermişlerdir. 'Laktobasil' jenerik terimi, 2020 yılına kadar Lactobacillaceae olarak sınıflandırılan tüm organizmaları belirtmek için faydalı olmaya devam etmiştir. Bu yeniden sınıflandırma, mikroorganizmaların filogenetik konumunu yansıtmıştır ve laktobasilleri, omurgalılara (*Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensensii*, *Lactobacillus johnsonii* ve *Lactobacillus acidophilus* gibi) veya omurgasızlara (*Lactobacillus apis* ve *Lactobacillus bombicola* gibi) adapte edilmiş türleri kapsayan, iyileştirilmiş *Lactobacillus* cinsi için örneklendiği gibi, paylaşılan ekolojik ve metabolik özelliklere sahip sağlam sınıflar halinde gruplandırmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız suşların cins adları bu çalışma dikkate alınarak güncellenmiştir. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşunun cins adı değişmemiştir. Ancak, *Lactobacillus plantarum* GD2 suşunun cins adı *Lactiplantibacillus* olarak güncellenmiştir.

2.4.1. Laktik asit bakterilerinin AH'deki kullanım potansiyelleri

Literatürde, laktik asit bakterilerinin AH üzerindeki koruyucu etkilerini belirlemek üzere çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Cecaraini ve diğerleri (2020), insan p62 proteinini kodlayan ökaryotik ekspresyon kaseti içeren plazmidi (pExu) taşıyan *L. lactis* suşunun kullanımına dayalı AH tedavisi için yeni bir strateji sunmuşlardır. Bu bakterilerle iki ay boyunca oral olarak beslenen 3xTg-AD fareleri, hem lenfatik damarları hem de nöral sonlandırmaları içeren bir protein mekanizması ile beyinde artan bir endojen p62 ekspresyonu ve başlıca AH ayırt edici özellikleri üzerinde pozitif etkiler göstermişlerdir. Fareler, iyileştirilmiş hafıza, ubikuitin-proteazom sistemi ve otofajinin modülasyonu, azaltılmış amiloid peptit seviyeleri ve azalmış nöronal oksidatif ve inflamatuvar süreçler göstermişlerdir.

Nimgampalle ve Kuna (2017), *L. plantarum* MTCC1325'in D-Galaktoz tarafından indüklenen AH'si olan albino ratlarda anti-Alzheimer etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak, *L. plantarum* MTCC1325'in anti-Alzheimer özelliklerine sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır.

L. plantarum'un *L. pentosus* ile karşılaştırıldığında farelerde D-Galaktoz ve skopolamin tarafından indüklenen AH'de hafıza defektine karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (Jung, Jung, Kim, Han ve Kim, 2012; Woo ve diğerleri, 2014). Yaşlı ratların öğrenme ve hafıza becerilerinin *L. plantarum* NDC75017 tarafından iyileştirildiği gösterilmiştir (Peng ve diğerleri, 2014).

2.5. Polisakkaritler

Polisakkaritler, glikozitik bağlarla birbirine bağlı monosakkaritlerden oluşan biyopolimerlerdir. Bu yapılar doğrusal olabilmektedir ya da dallanmış yan zincirler içerebilmektedir. Polisakkaritlerin genel formülü $C_x(H_2O)_y$ olup x genellikle 200 ile 2500 arasında değişen bir sayıdır. Polimer omurgada tekrarlayan birimler sıklıkla altı karbonlu

monosakkaritlerdir. Bu sebeple genel formül $(C_6H_{10}O_5)_n$ olarak da belirtilebilmektedir (Zong, Cao ve Wang, 2012). Polisakkaritler bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar (Örneğin laktik asit bakterileri) gibi birçok organizmada yaygın olarak bulunmaktadır. Kimyasal çeşitlilik ve yapılarıyla ya da biyolojik aktiviteleri ile ilgili fizyolojik özellikler göstermektedirler. Yerleşimlerine göre kapsül polisakkaritleri, lipopolisakkaritler ve ekzopolisakkaritler (EPS) olarak sınıflandırılmaktadırlar (Zhou, Cui ve Qu, 2019).

2.5.1. Polisakkaritlerin AH'deki kullanım potansiyelleri

Polisakkaritlerin A β 'yı hedeflemesi

Lonicera japonica Thunb. çiçeklerinden elde edilen homojen bir polisakkarit olan LJW0F2'nin, C-6 pozisyonuna bağlanan bir α -D-(1 $\rightarrow$ 4)-glukan olduğu ortaya konulmuştur. LJW0F2, SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde doz bağımlı olarak A β ₁₋₄₂ agregasyonunu inhibe edebilmektedir. LJW0F2, A β ₁₋₄₂ agregasyonunun indüklediği sitotoksiteyi atenüe edebilmektedir (Wang ve diğerleri, 2014b). *Vitis vinifera* ve Qing Xin Kai Qiao Fang'den elde edilen polisakkaritin, amiloid prekürsör protein mRNA ekspresyonunu ayarlama ve A β oluşumunu düzenlemek suretiyle A β ₂₅₋₃₅ tarafından indüklenen hasara karşı nöronları koruduğu gösterilmiştir (Chu, Hu, Chen, Wang ve Zheng, 2012; Yang, Zhou ve Sheng, 2015a). Xiao ve Li (2009), Kadsura heteroklit polisakkaritinin presenilin 1 mutasyonu taşıyan M146L hücresinde A β ₁₋₄₂ üretimini doz bağımlı olarak düşürdüğünü göstermişlerdir. Huang, Jiao, Zhang, Jiang ve Huang (1986), LYS polisakkaritini ve *Millettia pulchra* Kurz var. Laxior (Dunn) Z Wei'den ekstrakte edilen bir polisakkariti çalışmışlardır. LYS polisakkaritinin, yaşlanmanın hızlandığı demansa yatkın fare/8'de amiloid prekürsör protein, presenilin 1 ve presenilin 2'nin ekspresyonunu doz bağımlı olarak inhibe ettiğini, beyinde A β aşırı ekspresyonunu azalttığını ve nöronları A β nörotoksitesinden koruduğunu göstermişlerdir. Poligonapolisakkaroz, *Ganoderma lucidum* polisakkarit peptit ve *Astragalus* polisakkaritleri hipokampüste A β depolanmasını azaltabilmektedirler (Fei, Gao ve Sun, 2015; Li, Wang ve Chen, 2015; Yi ve diğerleri, 2014). Deniz bitkisi oligomannurat 971'den elde edilen bir dizi homojen kısa zincirli β -1,4-D-mannozil oligosakkarit, SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde A β peptit toksitesine karşı nörokoruyucu etki göstermiştir (Jiang ve diğerleri, 2013).

Polisakkaritlerin tau proteinlerini hedeflemesi

Cornus officinalis'ten elde edilen polisakkarit, AH olan farelerde Ser422 ve Ser396 epitopunda tau proteininin hiperfosforilasyonunu engelleyebilmektedir. Hipokampüste glikojen sentaz kinaz 3 β ekspresyonunu azaltabilmektedir (Su ve diğ erleri, 2013; Yao, Ma ve Zhang, 2013). Chen, Rong, Guo ve Huang (2013a) Yulangsan'dan elde edilen polisakkaritlerin demansa yatkın fare/8'de anormal Ser202 fosforilasyonunu azaltıp frontal lob ve hipokampüste nöron kaybını hafiflettiğini bulmuşlardır. *Ganoderma lucidum* polisakkarit peptidinin p-tau Ser396/Ser404 ve p-tau Ser199/Ser202 ekspresyonunu inhibe ettiğini bildirilmiştir (Li ve diğ erleri, 2015).

Polisakkaritlerin kolinerjik n rotransmiteri hedeflemesi

Angelica sinensis polisakkariti, senil demanslı farelerde AChE aktivitesini inhibe etmektedir.   renme ve hafıza bozukluğunu azaltmaktadır (Li ve diğ erleri, 2013a). *Cistanche deserticola*'dan elde edilen polisakkarit, A β_{1-40} tarafından oluşturulan AH'si olan farelerin serebral korteks ve hipokamp slerinde AChE'ı azaltarak ve kolin asetiltransferaz aktivitesini arttırarak, öğrenme yetisini ve hafızayı iyileştirmektedir (Yin, Gong ve Liu, 2014). Zhao ve diğ erleri (2010), AH'li farelerde fudican polisakkarit sülfatın kolin asetiltransferaz aktivitesini arttırdığını ve AChE aktivitesini azalttığını tespit etmişlerdir. Asetilkolin içeriğini arttırarak öğrenme yetisini iyileştirdiğini bildirmişlerdir. En aktif gradientin AChE aktivitesini arttırarak ve asetilkolin içeriğini azaltarak sinir sistemini koruduğunu bildirmişlerdir. Liu, Wan ve Gao (2014), *Astragalus* polisakkaritlerinin, vasküler demanslı farelerde beyin dokusunda AChE aktivitesini azaltarak ve asetilkolin içeriğini arttırarak öğrenme ve hafıza üzerinde etki gösterdiklerini bulmuşlardır.

Polisakkaritlerin oksidatif stresi hedeflemesi

Yam polisakkariti, alüminyum klorür tarafından indüklenen AH olan farelerde süperoksit dismutaz (SOD), CAT, magnezyum-ATPaz ve sodyum-potasyum-ATPaz vitalitesini arttırmakta ve malondialdehit içeriğini azaltmaktadır (Zhong ve Wang, 2015). Yulangsan'dan elde edilen polisakkaritlerin A β_{25-35} tarafından indüklenen PC12 hücrelerinin hasarına olan antioksidan etkisi incelenmiştir. Yulangsan'dan elde edilen

polisakkaritler ile tedavi edilen grubun hücre kültürü ortamında ve hücre sitoplazmasında malondialdehit, nitrik oksit içeriği ve nitrik oksit sentaz aktivitesi azalmış, buna karşılık SOD, GPx aktivitesi ve glutatyon içeriği artarak hücre canlılığı artmıştır. Bu nedenle, Yulangsan'dan elde edilen polisakkaritlerin serbest radikalleri temizleyerek koruyucu etki gösterdiği sonucuna varılmıştır (Chen, Rong, Zhang ve Huang, 2013b, 2013c). *Angelica* polisakkariti SOD ve telomeraz aktivitesini arttırarak serbest radikallerin temizlenmesini kolaylaştırmakta ve hücreyi hasardan korumakta, bu da yaşlanmayı geciktirerek çalışma yetisini ve hafızayı güçlendirmektedir (Li, Chen ve Zhang, 2013b). LYS polisakkariti, demansa yatkın fare/8 serum ve beyinde SOD ve GPx aktivitelerini artırmakta, malondialdehit ve nitrik oksit içeriklerini azaltmakta, bu da anti-demans hedefi için etkin serbest radikal temizleme sağlamaktadır (Huang, Lin ve Li, 2005). *Radix polygoni multiflori preparata polycose*'un, D-Galaktoz aracılı senil demans tavşan modelinin ammon boynuzunda nitrik oksit sentazı inhibe ettiği, SOD ve CAT aktivitelerini artırdığı, serebral lipofusin ve monoamin oksidaz seviyesini azalttığı, böylece öğrenme kabiliyeti ve hafızayı iyileştirdiği bildirilmiştir (Xiaoyan, 2005; Liang ve Ma, 2007). Hem *Ganoderma lucidum* polisakkaritleri hem de *Cistanche deserticola*'dan elde edilen polisakkaritin $A\beta_{1-40}$ tarafından indüklenen AH olan ratların serum ve beyinde malondialdehit içeriğini azalttığı ve SOD aktivitesini arttırdığı keşfedilmiştir (Yan, Chen, Xu ve Yang, 2011; Yanjun, Hua, Lina ve Shengwei, 2006; Yin, Gong ve Liu, 2013a). Ek olarak, *Cistanche deserticola*'dan elde edilen polisakkarit hipokampus bölgesinde nitrik oksiti ve ROS'u düşürebilmektedir (Yan ve diğerleri, 2011). Tian ve diğerleri (2012), bilateral hipokampus bölgelerindeki CA1 alanına $A\beta_{1-42}$ enjekte ederek değişik *Acori graminei rhizome* ekstre fraksiyonlarının AH'li farelerin öğrenme ve hafıza kabiliyetlerine olan etkisini araştırmışlardır. Hem decoctum hem de esansiyel yağ fraksiyonu serebrum ve hipokampüste nitrik oksit sentaz aktivitesini azaltmakta ve öğrenme ve hafıza kabiliyetlerini iyileştirmektedir. Polisakkarit, su decoctumundaki ana içeriklerden biridir. Lu ve Yu (2008), lentinanın glutamatla bozulan nöral hücre canlılığını antioksidasyon yoluyla iyileştirdiğini ve laktat dehidrogenaz, nitrik oksit ve malondialdehit içeriğini azaltıp SOD aktivitesini artırdığını ispatlamıştır. Polisakkarit, bir Çin herbal bileşik formülü olan optimize edilmiş Danggui shaoyao sanın ana aktif bileşenidir. PC12 ve ECV304 hücrelerinin hidrojen peroksit aracılı hasarında doz bağımlı etkisi vardır. Siklofosfamidin yol açtığı beyin hasarı olan farelerde beyin SOD aktivitesini artırmakta ve malondialdehit içeriğini azaltmaktadır. Bu durum da Danggui shaoyao sanın vasküler demans önleyici etki mekanizmasının polisakkaritlerin antioksidasyonu olduğunu

göstermektedir (Wu, Zhu, Lin ve Yan, 2007). Xu, Wang Yang, Ge ve Zhang (2005), Japon madımağı (fleece flower) kökünden elde edilen polisakkaritin ve berberi kurt üzümü meyvesinden elde edilen polisakkaritin senilite üzerine sinerjistik etkilerini ve mekanizmasını çalışmışlardır. Her iki polisakkaritin değişen oranlarda karışımı ile tedavi sonucunda senil model farelerde SOD ve GPx'in böbrek ve karaciğerdeki aktiviteleri artmış, beyindeki malondialdehit ve lipofusin azalmıştır. Bu nedenle, her iki polisakkaritin kombinasyonu antisenilite üzerine, oksijen serbest radikalının ve aktif oksijenin ortadan kaldırılması ve antilipoperoksidasyon yoluyla sinerjistik etki göstermiştir.

Polisakkaritlerin anti-apoptozu hedeflemesi

Ho ve diğerleri (2007) ve Yu ve diğerleri (2004) *Nerium indicum* çiçeklerinden purifiye edilen homojen polisakkaritler J2, J3, J4 ve J6'nın A β tarafından indüklenen sitotoksiteyi ve *CASP3* aktivitesini azalttığını ve bu nedenle apoptoza karşı nörokoruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir. J2, J3 ve J4 PDK-1 (Ser241) ve AKT/PKB (Thr308) fosforilasyonunu indükleyebilmektedir. Primer olarak AKT/PKB sağkalım sinyalizasyon yolağının aktivasyonuna bağlı olabilmektedir. J6, A β -aracılı JNK1'i inhibe edebilmektedir. Bu durum, JNK sinyalizasyon yolağının inaktivasyonuna bağlı olabilmektedir. Yulangsın'dan elde edilen polisakkaritlerin PC12 hücrelerinde A β ₂₅₋₃₅ tarafından indüklenen apoptoza karşı koruyucu etkisi bulunmaktadır. Anti-apoptotik gen *BCL2*'yi yukarı regüle etmektedir. Proapoptotik gen *TP53*, *BAX* ve *CASP3*'ü aşağı regüle etmektedir (Chen ve diğerleri, 2013b, 2013d). Demansa yatkın fare/8'in frontal lob ve hipokampusünde Tau (Ser202) fosforilasyonu ve *CASP3* ekspresyonu ve aktivitesi Yulangsın'dan elde edilen polisakkaritler tarafından azaltılmaktadır. Bu da azalmış nöron apoptozu ile sonuçlanmaktadır (Chen ve Huang, 2013e). *Angelica sinensis* polisakkariti, *Sargassum fusiforme* polisakkariti ve *Vitis vinifera* *BCL2*'yi artırmaktadır. *BAX* gen ekspresyonunu azaltmaktadır. Hücre apoptozunu önlemektedir (Li, Chen ve Zhang, 2013c; Tang, Cao ve Ye, 2012; Yuan ve diğerleri, 2015). *Ganoderma lucidum* polisakkaritleri *CFOS*, *CASP3* ve *FASL* gen ekspresyonunu azaltmaktadır. Hipokampal hücrelerde apoptoz hızını azaltmaktadır. Sinaptofizin ekspresyon seviyelerini artırmaktadır (Guo Yanjun ve Hua, 2008; Li, Yuan ve Li, 2007; Yuan, Zhang ve Yao, 2011; Yueping, Hua, Li ve Xiaoyun, 2008). *Cistanche deserticola*'dan elde edilen polisakkarit *BCL2*'yi yukarı regüle ve *CASP3* ekspresyonunu aşağı regüle ederek AH'li farelerde hipokampal nöron apoptozunu inhibe etmekte olup, öğrenme yeteneğini artırmaktadır (Yin, Gong, Liu ve

Yao, 2013b). *Polygona-polisakkaroz*, $A\beta_{1-42}$ 'in indüklediği AH'li ratlarda hipokampüste nöron apoptozunu azaltabilmektedir. Öğrenme ve hafızayı iyileştirebilmektedir (Yi, Wu ve Ye, 2015). *Morinda officinalis* oligosakkaritleri hipokampüsteki piramidal nöronların ve hipokampal CA1'deki, serebral korteks ve Meynert'in bazal nükleusundaki nöronların sayısını artırmaktadır. Bu durum beyin nöron apoptozunun inhibisyonundan kaynaklanabilmektedir (Chen, Zhang, Lin, Zhang ve Liu, 2013f). Bir Çin herbal bileşik reçetesi olan Erjingling, eşit miktarda *Lycium barbarum* ve *Lycium polygonatum*'tan oluşmaktadır (Huang, Tu ve Lou, 1998). Erjingling'den ekstrakte edilen polisakkarit ana aktif bileşik olup hipokampal hücrelerin sağkalım hızını artırmakta, *BCL2*'yi yukarı regüle etmekte, *BAX*'ı aşağı regüle etmekte, nöronların apoptozunu azaltmakta ve böylece hipokampal nöronları glutamatın neden olduğu apoptozdan korumaktadır (Xu, Cheng, Li ve Mei, 2008). Qing Xin Kai Qiao Fang formülünden elde edilen polisakkarit, korteks ve hipokampüste *BAX* ve *CASP3* ekspresyonunu azaltmakta ve böylece AH'li ratlarda öğrenme ve hafızayı iyileştirmektedir (Chu ve diğerleri, 2012). *Lycium barbarum* LBA'dan elde edilen aköz ekstraktın, JNK sinyal yolağının inaktivasyonu yoluyla fibriller $A\beta_{1-42}$ ve $A\beta_{25-35}$ fragmanlarının toksisitesine karşı doz bağımlı nörokoruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir. Bu ekstraktın etkin dozu iyi bilinen nörokoruyucu ilaç olan lityum klorürün etkin dozundan daha fazladır (Yu ve diğerleri, 2005). Ancak, *Lycium barbarum* LBB'nin alkali ekstraktı ve iki homojen polisakkarit olan LBB-1 ve LBB-2 (LBB'den saflaştırılan alt-fraksiyonlar), LBA gibi JNK sinyalizasyon yolağını inhibe etmek yerine AKT/PKB sinyalizasyon yolağını stimüle ederek $A\beta$ peptit nörotoksitesini azaltarak nörokoruyucu etki göstermektedirler (Ho ve diğerleri, 2007). *Verbena officinalis* Linn'den elde edilen aköz ekstrakt $A\beta$ peptit nörotoksitesine karşı nörokoruyucu etki göstermektedir. $A\beta$ tarafından aktive edilen protein kinaz inhibitörleri ve JNK stres kinazlarını atenüe ederek hem nörite bağlı hasarlanmayı hem de nöronal apoptozu azaltmaktadır (Lai, Yu, Yuen ve Chang, 2006).

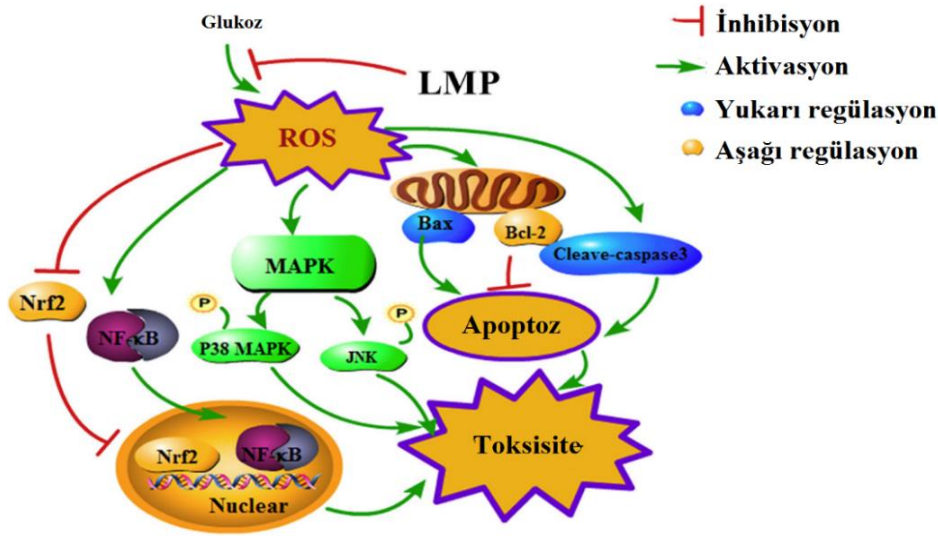
Polisakkaritlerin kalsiyum kanalını hedeflemesi

D-Galaktoz ve sodyum nitrit-aracılı senil demans için 30 günlük intraperitoneal *Angelica* polisakkariti injeksiyonundan sonra beyinde kalsiyum konsantrasyonu düşerken, kalsiyum-ATPaz ve kalsiyum, magnezyum-ATPaz artmaktadır. *Angelica* polisakkaritinin kalsiyum-ATPaz aktivitesini yukarı regüle ederek kalsiyum içeriğini azaltmak yoluyla kalsiyum metabolizmasını düzelttiğini göstermektedir (Li ve diğerleri, 2013a). $A\beta_{25-35}$ ile muamele

edilen PC12'deki hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artarken, Yulangsın'dan elde edilen polisakkaritler ile muamele edilenlerde kalsiyum konsantrasyonu daha düşük tespit edilmektedir. Yulangsın'dan elde edilen polisakkaritlerin PC12 hücrelerini A β ₂₅₋₃₅ tarafından indüklenen aşırı kalsiyum seviyesinden koruduğunu göstermektedir (Chen ve Huang, 2013g).

Polisakkaritlerin sinyal yollarını hedeflemesi

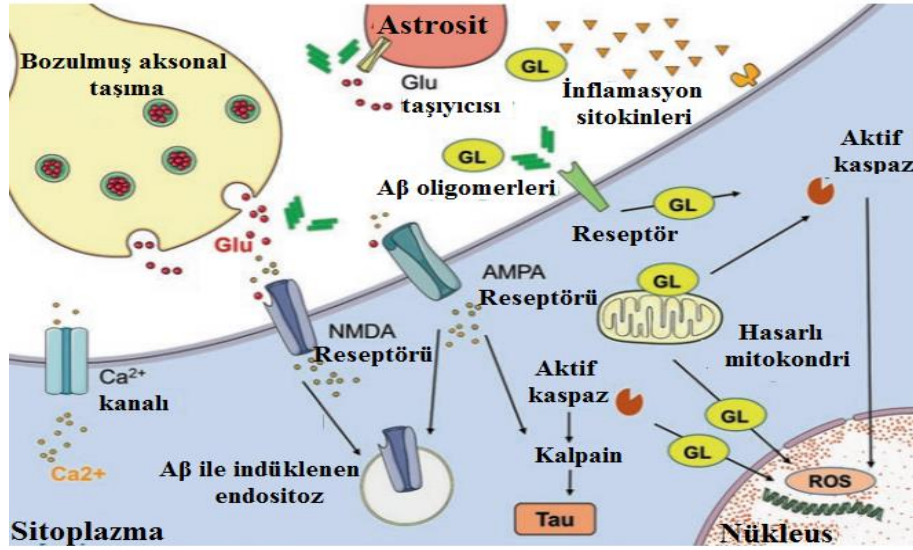
Lentinus edodes'den elde edilen polisakkarit p38 MAPK, JNK, NF- κ B/p65 sinyal yollarının aktivasyonunu inhibe ederek ve Nrf2 yolunu aktive ederek INS-1 hücrelerinde glikoz kaynaklı oksidatif hasarı azaltmıştır. Ayrıca INS-1 hücrelerindeki glikoz kaynaklı apoptozu BAX, BCL2, klivaj CASP3 ve klivaj CASP1 ekspresyonunu düzenleyerek inhibe etmiştir (Cao ve diğerleri, 2019) (Şekil 2.23).



Şekil 2.23. *Lentinus edodes*'den elde edilen polisakkaritin etki mekanizması. JNK: c-Jun N-terminal kinaz; LMP: *Lentinus edodes*'den elde edilen polisakkarit; MAPK: Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz; NF- κ B: Nükleer faktör- κ B; ROS: Reaktif oksijen türleri; p38 MAPK: p38 mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (Cao ve diğerleri, 2019)

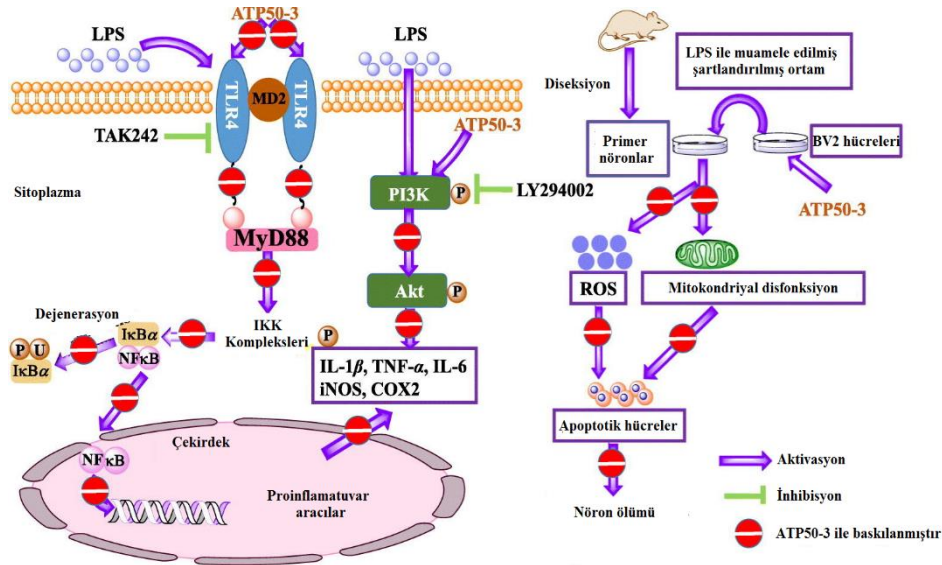
Ganoderma lucidum'dan elde edilen polisakkarit, nöronları A β peptidine karşı birçok mekanizma ile koruyabilmektedir. Bu mekanizmalar; astrositlerin aktivasyonunu ve reaktivitesini inhibe etme, inflamasyon sitokinlerini azaltma, mitokondriyal fonksiyonu düzeltme, antioksidan aktivite gösterme, kalsiyum homeostazını sağlama ve A β ile

indüklenen apoptozu inhibe etme şeklindedir (Quan, Ma ve Yang, 2019: 159-80) (Şekil 2.24).



Şekil 2.24. *Ganoderma lucidum*'dan elde edilen polisakkaritin etki mekanizması. Aβ: Amiloid β; Ca²⁺: Kalsiyum; Glu: Glutamat; NMDA: N-metil-D-aspartat; ROS: Reaktif oksijen türleri (Quan ve diğerleri, 2019: 159-80)

Acorus tatarinowii'den elde edilen polisakkarit *in vitro* olarak lipopolisakkarit ile indüklenen proinflamatuvar BV2 hücrelerinde inflamatuvar mediyatörlerin anormal artışını önemli ölçüde azaltmış ve NF-κB/p65'in aktivasyonunu inhibe etmiştir. Ayrıca, lipopolisakkarit ile indüklenen protein seviyelerini (TLR4, MyD88, p-PI3K ve p-AKT/PKB) aşağı regüle etmiştir. ROS'un aşırı üretimini ve mitokondriyal membran potansiyeline verilen hasarı azaltarak, birincil kortikal ve hipokampal nöronlarda nöroinflamasyona bağlı nörotoksositeye karşı nörokoruma sağlamıştır. TLR4 aracılı MyD88/NF-κB/p65 ve PI3K-AKT/PKB sinyal yollarının modülasyonu yoluyla antinöroinflamatuvar ve nörokoruyucu etkiler göstermiştir (Zhong, Qiu, Yu, Chen ve Yan, 2020) (Şekil 2.25).



Şekil 2.25. *Acorus tatarinowii*'den elde edilen polisakkaritin etki mekanizması. Akt: Protein kinaz B; ATP50-3: *Acorus tatarinowii*'den elde edilen polisakkarit; COX2: Siklooksijenaz 2; IκBα: NF-κB inhibitörü; IKK: IκB kinaz; IL-1β: İnterlökin-1β; IL-6: İnterlökin-6; iNOS: İndüklenmiş nitrik oksit sentaz; LPS: Lipopolisakkarit; LY294002: PI3K inhibitörü; MD2: Miyeloid farklılaşma proteini 2; MYD88: Miyeloid farklılaşma birincil yanıtı 88; NF-κB: Nükleer faktör-κB; P: Fosfor; PI3K: Fosfatidilinositol 3 kinaz; ROS: Reaktif oksijen türleri; TAK242: TLR4 inhibitörü; TLR4: Toll benzeri reseptör 4; TNF-α: Tümör nekrozis faktör-α; U: Ubikitinasyon (Zhong ve diğerleri, 2020)

Polisakkaritlerin gösterdiği diğer olası mekanizmalar

LYS polisakkaritinin demansa yatkın fare/8 beyinlerindeki nörotransmitter üzerine etkileri, 40 gün boyunca sürekli intragastrik verilmesini takiben incelenmiştir. LYS polisakkariti norepinefrin, dopamin ve 5-hidroksitriptaminin monoamin nörotransmitter içeriğini yukarı regüle ederek, glutamik asit ve aspartik asitin monoamin nörotransmitter içeriğini aşağı regüle etmiştir. LYS polisakkaritinin bozuk biçimde metabolize olan monoamin ve amino asit nörotransmitterleri etkin biçimde regüle edebildiğini, öğrenme ve hafızayı iyileştirebildiğini göstermektedir (Huang ve diğerleri, 2001). *Astragalus* polisakkaritinin, vasküler demans olan ratların hipokampusunda hücre dışı glutamin, glisin ve taurin konsantrasyonlarını azalttığı, uzaysal öğrenme ve hafıza yeteneklerini artırdığı bildirilmiştir (Li, Li ve Liang, 2013d). *Ganoderma lucidum* polisakkaritleri, Morris su labirentindeki ratların hipokampusunda sinaptofizin ekspresyonunu, sayısal yoğunluğunu ve yüzey yoğunluğunu arttırabilmekte olup, ortalama delitesansı azaltabilmektedir. Bu durum da öğrenme kabiliyetinin arttığına işaret etmektedir (Yuan ve diğerleri, 2011). Kahverengi deniz yosunu GS201'den elde edilen sülfatlanmış polisakkaritler doz bağımlı

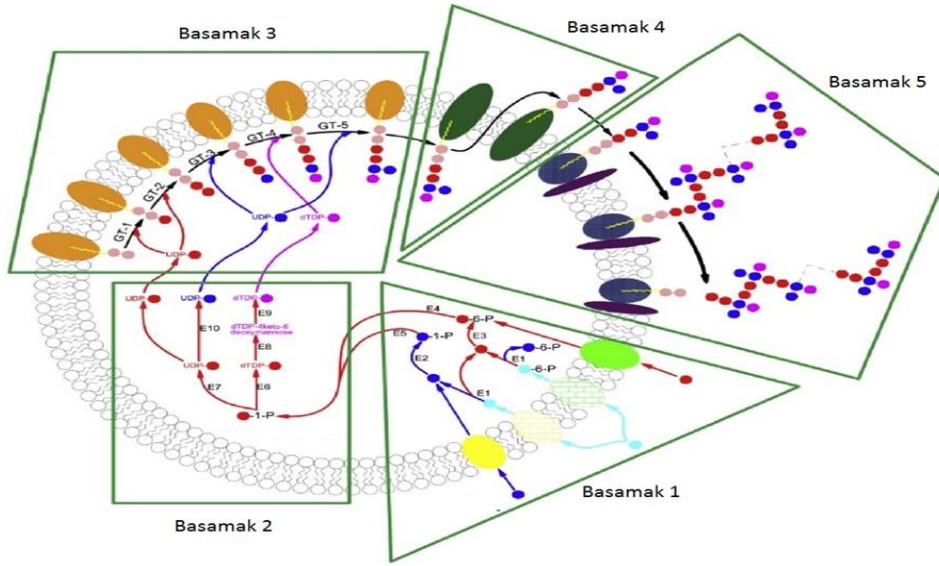
olarak hem hipokampus hem de nörokortekste nöronal sağkalımı artırmakta olup, bu durum nörotrofik aktiviteye işaret etmektedir (Kun, Meiyu, Huashi ve Pingfang, 2001). Huang, Jiao ve Zhang (2008), Y su labirenti ve Morris su labirenti ile skopolamin, %40 alkol, D-Galaktoz ve demansa yatkın fare/8 gibi değişik modellerin öğrenme ve hafıza yetkinliklerini incelemiştir. Tüm demans modelleri öğrenme ve hafıza yeteneklerini anlamlı biçimde bozmuş iken, LYS polisakkariti bu bozulmuş yetenekleri iyileştirebilmektedir. Geleneksel bir Çin ilaç formülü olan Zicheng Dekoksiyonu olarak bilinen Zibu piyin reçetesinin hastaların hafıza ve zekasını artırdığı bulunmuştur (Zhan, Zhong ve Lu, 2007). Zibu piyin reçetesinin değişik fraksiyonlarının farelerde skopolaminin indüklediği hafıza bozukluğuna olan etkisi çalışılmıştır. Polisakkarit ve uçucu yağ ile tedavi, Morris su labirenti testinde daha kısa kaçış latans zamanı ve yüzme mesafesi, aynı zamanda daha kısa platform lokasyonunu çaprazlama latansı ve artmış lokasyon çaprazlama sayısı ile sonuçlanmıştır. Zibu piyin reçetesindeki polisakkaritlerin ve uçucu yağın skopolaminin indüklediği hafıza bozukluğuna iyi geldiği belirlenmiştir (Zhu ve diğerleri, 2014).

2.6. Ekzopolisakkarit (EPS)'ler

Mikrobiyal EPS'ler çoğunlukla hücre adezyonuna yardım etmekte olup, negatif çevresel şartlara koruma sağlamaktadırlar. Ek olarak, EPS'ler karbon ve enerji kaynağı olarak iş görmektedirler. EPS'ler genellikle monosakkaritler ve asetat, fosfat, pirüvat ve süksinat gibi karbonhidrat olmayan içeriklerden oluşmaktadırlar (De Vuyst ve Degeest, 1999; Tükenmez ve Aslım, 2018; Wang ve diğerleri, 2015c).

Yapısal olarak büyük çeşitliliklerine rağmen, EPS'ler mikroorganizmalar tarafından genel dört yola ile üretilmektedirler: (1) Hücre dışı sentez yolağı (Örneğin sükras); (2) ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcı bağımlı yolağı; (3) sentaz bağımlı yolağı; ve (4) Wzx/Wzy bağımlı yolağı. Hücre dışı sentez yolağı ya da Wzx/Wzy bağımlı yolağı genellikle laktik asit bakterilerindeki EPS biyosentez yolağıdır. Wzx/Wzy bağımlı yolağı sadece *Lactococcus*, *Lactobacillus* ve *Streptococcus* cinslerini içine alan laktik asit bakterilerinde bulunmaktadır. Bu yolağı beş basamaktan oluşmaktadır. Basamak 1, monosakkarit ve disakkarit taşıma ve fosforilasyon; basamak 2, şeker nükleotidlerinin oluşumu (Monosakkaritlerin aktivasyonu); basamak 3, tekrar eden birimlerin sentezi; basamak 4, tekrar eden birimlerin hücre içi yüzeyden hücre dışı yüzeye translokasyonu; basamak 5,

tekrar eden birimlerin polimerizasyonu ve uzun zincirin salınması şeklindedir (Şekil 2.26) (Zhou ve diğerleri, 2019).



Şekil 2.26. Laktik asit bakterilerinde Wzx/Wzy bağımlı EPS biyosentezinin basamakları (Zhou ve diğerleri, 2019)

EPS'ler iki ana grupta ele alınmaktadır. Bunlar homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritlerdir. Homopolisakkaritler (Örneğin selüloz, dekstran ve pullulan) yalnızca tek bir tür monosakkarit biriminden oluşmaktadır. Heteropolisakkaritler ise (Örneğin ksantan ve hiyalüronik asit) iki veya daha fazla monosakkarit birimi içermektedirler. D-galaktoz, fruktoz, arabinoz ve mannoz gibi nötr monosakkarit içeriği fazla olan EPS'lerin daha yüksek biyolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (De Vuyst ve Degeest, 1999; Tükenmez ve Aslım, 2018; Wang ve diğerleri, 2015c). EPS kimyasal yapısının karmaşıklığına katkı yapan bir faktör de monosakkarit bağı, tekrarlayan birim büyüklüğü, içindeki monosakkarit sekansı ve yan zincirlerin sayısı ve uzunluğundaki değişikliklerdir (Mende, Rohm ve Jaros, 2016). Heteropolisakkaritlerin molekül kütleleri 10^4 ile 10^6 Da arasında değişmektedir. Genellikle homopolisakkaritlerin ortalama molekül kütlelerinden (Yaklaşık 10^7 Da'ya kadar) daha düşüktür (Yıldız ve Karataş, 2018). EPS'lerin moleküler ağırlığının da biyolojik aktivitesi üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Li ve diğerleri, 2016; Tükenmez ve Aslım, 2018). EPS'lerin omurgasındaki monomerik birimler arasındaki bağlar β -1,3 ya da β -1,4 bağları ve α -1,2 ya da α -1,6 bağlarıdır (Hussain ve diğerleri, 2017). EPS'nin ana zincirindeki β -1,3, β -1,4 bağları ve ek olarak α -1,6 dallanma noktaları gibi yapısal özelliklerin, biyolojik aktivite için gerekli olduğu ve α -1,6 bağları içeren EPS'lerin daha az biyolojik aktiviteye sahip olduğu

bildirilmiştir (Mizuno, 1999; Tükenmez ve Aslım, 2018). EPS'lerin biyolojik aktivitelerinin esas olarak EPS'lerdeki β -1,3 bağlarından kaynaklandığı belirtilmiştir (İsmail ve Nampoothiri, 2010; Tükenmez ve Aslım, 2018). EPS'lerin biyolojik aktivitelerinin yapılarındaki hidroksil, amino, karbonil ve karboksil gibi fonksiyonel gruplarına bağlı olduğu gösterilmiştir (Li ve diğerleri, 2017a; Sathiyarayanan, Dineshkumar ve Yang, 2017). Hücreye bağlanma, EPS'lerin pürüzlülük, topografi ve yük gibi yüzey özelliklerine bağlıdır (Alagöz, Rodriguez Cabello ve Hasırcı, 2018). Pürüzlü yüzey morfolojisi pürüzsüz yüzey morfolojisine göre daha iyi bağlanma kabiliyeti sağlamaktadır (Sasahara ve Zottola, 1993). Yüzey pürüzlülüğünün hücre bağlanmasına potansiyel bir etkisinin olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Leber ve diğerleri, 2016; Wu, Zhang, Liu, Suo ve Li, 2018). Amorf karaktere veya zayıf bir mikro düzenlenme (zayıf kristalin) yapısına sahip EPS'ler, güçlü bir mikro düzenlenme (güçlü kristalin) yapısına sahip EPS'lere göre daha çabuk çözünmektedirler. Ayrıca, amorf karaktere sahip EPS'ler daha yüksek çözünürlük ve biyoyararlanım sunmaktadırlar. Bunun sonucunda amorf karaktere sahip EPS'ler, kristalin karaktere sahip EPS'lere göre daha üstün biyolojik aktivite göstermektedirler (Urpayıl ve Thayyil, 2012).

Literatürde, laktik asit bakterilerinden elde edilen EPS'ler ile ilgili çalışmalar çoğunlukla antioksidan, immünomodülatuar, antitümör, antibiyofilm ve antibakteriyel özellikleri ile ilgilidir (Li ve diğerleri, 2014a; Wang ve diğerleri, 2015a, 2015b; Zhang ve diğerleri, 2013). Bu geniş faydalı biyolojik özellikler, EPS'lerin AH'de sağlıklı gıdalar ve tedavi edici ajanlar olarak potansiyel nütrisyonel ve farmasötik yararları olduğunu düşündürmektedir (Xu ve diğerleri, 2019a).

2.6.1. EPS'lerin kullanım avantajları

EPS'ler ve bunların türetilmiş bileşikleri, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri, toksik olmayan yapıları, biyolojik uyumlulukları ve düşük işlem masrafları nedeniyle sentetik polimerlere kıyasla tıbbi açıdan daha fazla tercih edilmektedirler (Ullah, Khalil, Shaukat ve Song, 2019). EPS'lerin çevresel koşullara dayanıklı olması, uygulama kolaylığı, aynı EPS'lerin kullanımı halinde her zaman stabil sonuç vermesi, uygulama dozu ve konsantrasyonun kolay ayarlanabilmesi, toz halinde bozulmadan uzun süre saklanabilmesi gibi avantajları dikkate alındığında, bu avantajlar EPS'lerin başarılı olarak uygulanabilirliğini ve ürün haline gelme potansiyelini daha da kuvvetlendirmektedir. Canlı

probiyotik mikroorganizmaların uygulamalarında ise, bakterinin uygulama boyunca aynı oranda canlı kalması ve etkinliğini sürekli göstermesi mümkün olmamaktadır. Bu durum canlı probiyotik mikroorganizma uygulamalarında her zaman stabil sonuç elde edebilmeyi imkansız kılmaktadır (Sarıkaya, 2014; Aslım, 2017).

2.6.2. EPS'lerin AH'deki kullanım potansiyelleri

Literatürde, EPS'lerin antioksidan, antitümör, antikoagülan, antivirüs, antiradyasyon, antikanser ve immünoregülatör özellikleri gösterilmiş olup (Li ve diğerleri, 2014a; Wang ve diğerleri, 2015a, 2015b; Zhang ve diğerleri, 2013), EPS'lerin AH'de kullanım potansiyellerini ortaya koyan bir çalışma yapılmamıştır. Ancak, AH'de farklı organizmalardan (alg, bitki, mantar ve yosun) elde edilen polisakkaritlerin etkileri ile ilgili A β 'yı, tau proteinlerini, kolinerjik nörotransmitteri, oksidatif stresi, anti-apoptozu, kalsiyum kanalını ve diğer olası mekanizmaları hedefleyen çalışmalar yapılmıştır (Huang ve diğerleri, 2001; Li ve diğerleri, 2013a; Su ve diğerleri, 2013; Wang ve diğerleri, 2014b; Yu ve diğerleri, 2004; Zhong ve diğerleri, 2015). EPS'lerin sahip olduğu geniş faydalı biyolojik özellikler ve polisakkaritlerin AH'de çok hedefli ajan olarak çeşitli çalışmalarda kullanılması sonucunda, EPS'lerin AH'de sağlıklı gıdalar ve tedavi edici ajanlar olarak potansiyel nütrisyonel ve farmasötik yararları olacağını düşündürmektedir (Xu ve diğerleri, 2019a). Yukarıda bahsi geçen bilgilerden yola çıkarak bu tez çalışması ile literatürdeki eksikliklerin giderilmesi amaçlanmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışmada kullanılan suşlar ve kültür ortamı

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan, yoğurt ve sağlıklı bebek gaitasından izole edilmiş suşlar içerisinde, fizyolojik ve biyokimyasal testleri daha önceki tezler ve projeler kapsamında analitik profil indeks 50 CHL (Biomerieux) test kiti ile yapılmış, 16S rRNA tüm gen bölgesi alınarak moleküler tanımlamaları gerçekleştirilmiş probiyotik özellikleri bakımından öne çıkmış tür düzeyinde tanımlanmış iki suş ile çalışılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız suşların cins adları Zhen ve diğerleri (2020)'nin yaptıkları çalışma dikkate alınarak güncellenmiştir. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşunun cins adı değişmemiştir. Ancak, *Lactobacillus plantarum* GD2 suşunun cins adı *Lactiplantibacillus* olarak güncellenmiştir. Çalışmada kullanılan suşlar Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan suşlar ve izolasyon kaynakları

Suşlar	İzolasyon kaynağı
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> B3	Yoğurt
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> GD2	Sağlıklı bebek gaitası

Çalışmada kullanılan suşların geliştirilmesinde De Man Rogosa ve Sharpe broth besi ortamı kullanılmıştır. De Man Rogosa ve Sharpe broth besi ortamı içeriğinde bulunan maddeler Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. Aşağıda belirtilen miktarlarda maddeler tartılıp, bir miktar distile su ile manyetik karıştırıcıda (Heidolph) homojen hale gelinceye kadar karıştırılmış ve pH'sı 6,2'ye ayarlanmıştır. pH ayarı yapıldıktan sonra, son hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan besi ortamı otoklavda (Sanyo) steril edilmiştir (121 °C'de 15 dk). Suşlar steril gliserol içeren ortama ilave edilip, -20 °C ve -80 °C koşullarında stoklanmış, ekzopolisakkarit (EPS) izolasyonu, miktar belirlenmesi ve liyofilizasyon aşamalarında stok kültürler iki kez aktifleştirilerek kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. De Man Rogosa ve Sharpe broth besi ortamı içeriği

Maddeler	g/L
Pepton (Merck)	10,0
Beef ekstrakt (Merck)	10,0
Yeast ekstrakt (Merck)	5,00
Glikoz (Merck)	20,0
Sodyum asetat (Merck)	5,00
Triamonyum sitrat (Merck)	2,00
Magnezyum sülfat (Merck)	0,20
Manganez sülfat (Merck)	0,05
Disodyum hidrojen fosfat (Merck)	2,00
	mL/L
Tween 80 (Merck)	1,00

3.1.2. Çalışmada kullanılan hücre hattı ve hücre besi ortamı

Çalışmada kullanılan nöroblastom hücre hattı (SH-SY5Y, ATCC® CRL-2266™) Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Zekiye Tuba TÜYLÜ KÜÇÜKKILINÇ'tan temin edilmiştir.

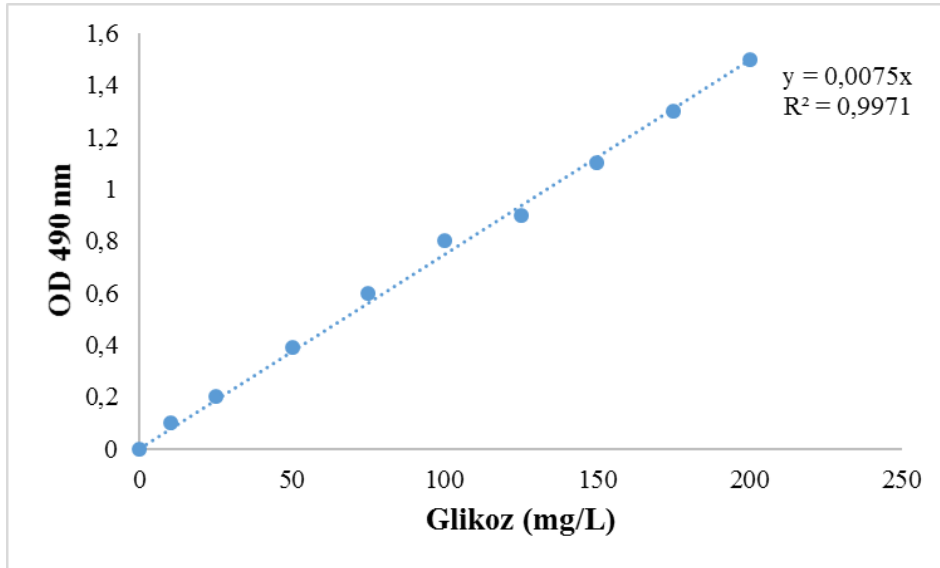
Hücre besi ortamı, 200 mL MCDB 201 (Sigma-Aldrich), 50 mL fetal sığır serumu (Gibco), 5 mL penisilin-streptomisin (Gibco) ve 6 mL L-Glutamin (Gibco) kullanılarak son hacim 500 mL'ye tamamlanacak şekilde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco) ilave edilerek hazırlanmıştır. 0,2 µm'lik filtreden (Merck Millipore) geçirilerek steril edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Suşlardan ekzopolisakkarit (EPS)'lerin izolasyonu ve miktarlarının belirlenmesi

Suşlar De Man Rogosa ve Sharpe broth besi ortamında en az iki kez aktifleştirildikten sonra çalışılmıştır. Aktifleştirilmiş suşlar Mc Farland 5 (~8,4-8,6 log/cfu/mL)'e ve 600 nm'de ~0,600 optik yoğunluğa ayarlanarak De Man Rogosa ve Sharpe broth besi ortamına %2 oranında inoküle edilerek 37 °C'de 18-20 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürler 32 g trikloroasetik asit (Merck) eklenerek manyetik karıştırıcıda 2 saat karıştırılmıştır. Kültürler 4000 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek (Nuve) EPS karışımının en az

yarısı evaporatörde (Heidolph) uzaklaştırılmıştır. EPS karışımındaki sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra oda sıcaklığında bekletilmiştir. Oda sıcaklığına ulaşınca %96'lık etanolde (Alkomed) +4 °C'de bir gece bekletilmiştir. Sonra örnekler sanrifüjlenerek EPS elde edilmiştir. EPS'ler 1 mL distile suda çözünerek liyofilizasyona alınmıştır. Liyofilizasyondan sonra toz haline getirilmiş, vial içindeki EPS'ler çalışmalarda kullanılmıştır. Liyofilize EPS (L-EPS)'lerin miktarları fenol sülfürik asit yöntemine göre belirlenmiştir. Çalışılacak örnekler üzerine 0,5 mL fenol (Sigma-Aldrich) ve 5 mL sülfürik asit (Merck) eklenerek, 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra iyice karıştırılmış, karıştırılan örnekler 30 °C'de 15-20 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 490 nm'de absorbans değerleri spektrofotometrik olarak spektrofotometre cihazında (Pg Instruments) ölçülmüştür. Suşların L-EPS üretim miktarları hazırlanan glikoz standardına göre belirlenmiştir (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers ve Smith, 1956; Marshall ve Rawson, 1999; Tsuda, Hara ve Miyamoto, 2008) (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Glikoz standart eğrisi. OD: Optik dansite

3.2.2. Liyofilize EPS (L-EPS)'lerin karakterizasyonu

Elemental analiz

L-EPS'lerin içerdiği azot, karbon, hidrojen, kükürt ve oksijen yüzdelerinin belirlenmesi amacıyla elemental analiz yapılmıştır. 1 mg L-EPS elemental analiz cihazının (Thermo Scientific Flash 2000) alüminyum örnek hücresine yerleştirilip tartılmıştır. L-EPS'ler

cihaza konulup yakılmıştır. Yakma işlemi sonucunda azot, hidrojen, karbon, kükürt ve oksijen yüzdeleri belirlenmiştir. Analizler Düzce Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi, Çevre ve Kimya Laboratuvarı tarafından hizmet alımı şeklinde yapılmıştır (Du, Yang, Bian ve Xu, 2017).

Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR)

L-EPS'lerin içerdiği fonksiyonel grupların belirlenmesi amacıyla FTIR analizi yapılmıştır. 2 mg L-EPS, 200 mg potasyum bromür (Merck) ile agat havanda ezilmiştir. Homojen hale getirilen karışım, çelik disk aparatı içerisine alınarak ve 10 ton/cm² basınç altında 10 dk tutularak 3 mm çaplı disk haline getirilmiştir. Hazırlanan diskler FTIR cihazında (Shimadzu IR Prestige 21) analiz edilmiştir. Analizde örneklerin 4000 ile 500 cm⁻¹ dalga boyları arasındaki spektrumları alınmıştır. Her örnek 4 cm⁻¹ çözünürlükte, 32 kere taranmıştır. Analizler Düzce Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi, Çevre ve Kimya Laboratuvarı tarafından hizmet alımı şeklinde yapılmıştır (Kanamarlapudi ve Muddada, 2017).

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)

L-EPS'lerin yüzeylerinin üç boyutlu görüntülenmesi amacıyla AFM analizi yapılmıştır. Cam lamalar, 15 mL hidroklorik asit (Merck Millipore) ve 5 mL nitrik asit (Merck Millipore) karışımı ile 30 dk işleminden geçirilmiştir. Daha sonra 20 mL sülfürik asit (Merck Millipore) ve 5 mL hidrojen peroksit (Sigma-Aldrich) karışımına 30 dk süreyle tabi tutulmuştur. Daha sonra lamalar, distile su ile durulanmış ve kullanılabilecek kadar saklanmışlardır. L-EPS'ler distile suda çözülerek taze L-EPS çözeltileri oluşturulmuştur. Cam lamalar üzerine 10 µL L-EPS dökülerek (1 mg/mL) oda sıcaklığında kurutulmuştur. Altın ve gümüş filmler cam lamlara yerleştirilmiştir. Altın ile kaplanmış silikon problemleri aşağıdaki boyutlara sahiptir. Yonga boyutu 3,6 × 1,6 × 0,4 mm, eğrilik yarıçapı 10 nm, uç yüksekliği 10-15 µm. AFM görüntüleri Park Systems XE-100E ile vürmalı (semi-contact) modunda 5,5–22,5 N/m sabit kuvvetle elde edilmiştir. Analizler Düzce Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi, Malzeme ve Yüzey Laboratuvarı tarafından hizmet alımı şeklinde yapılmıştır (Kanamarlapudi ve Muddada, 2017; Prasad ve Krishna, 2014).

Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

L-EPS'lerin yüzey morfolojilerinin yüksek çözünürlükte görüntülenmesi amacıyla SEM analizi yapılmıştır. 5 mg L-EPS, çift taraflı yapışkan bantla staplara monte edilmiştir. Daha sonra, L-EPS'ler kaplama cihazıyla 10 nm kalınlığında altın tabakası ile kaplanmıştır. L-EPS'ler FEI Quanta FEG 250 SEM'de 10 kV'de incelenmiş olup, farklı büyütme oranlarında (100X, 1000X, 2000X, 5000X, 10.000X, 20.000X ve 50.000X) görüntüleri çekilmiştir. Analizler Düzce Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi, Malzeme ve Yüzey Laboratuvarı tarafından hizmet alımı şeklinde yapılmıştır (Du ve diğerleri, 2017).

X-ışını difraktometresi (XRD)

L-EPS'lerin kristalografik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla XRD analizi yapılmıştır. 5 mg toz haline getirilmiş L-EPS'lerin XRD desenleri, bakır potasyum α radyasyonu ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) ve 40 kV-30 mA değerinde ışın saçan bir X-ışını tüpü üzerinde yer alan X-ışını difraktometresi (Rigaku Smart Lab) kullanılarak $0,02 \text{ s}^{-1}$ tarama hızı eşliğinde $2\theta: 10-90^\circ$ aralığında tarama yapılarak elde edilmiştir. Analizler Bartın Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı, Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından hizmet alımı şeklinde yapılmıştır (Saravanan ve diğerleri, 2017).

3.2.3. L-EPS'lerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikalini süpürme aktivitesi

1 mL metanol (Merck) içerisinde değişik konsantrasyonlardaki L-EPS'ler (100-1250 $\mu\text{g/mL}$) çözölmüştür. Örneklerin üzerine 1 mL %0,004 DPPH (Sigma-Alrich) çözöltisi eklenmiştir. Örnekler karanlık ortamda 30 dk bekletilmiştir. Bekleme sonunda örneklerin 517 nm'de spektrofotometrik olarak ölçömleri gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak 0,5 mg/mL askorbik asit (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Örneklerin DPPH serbest radikalini süpürme aktivitesi aşağıdaki formöle göre hesaplanmıştır. DPPH serbest radikalini süpürme aktivitesi (%): $(1 - A_{\text{örnek}} - A_0 / A_{\text{kontrol}}) \times 100$. $A_{\text{örnek}}$: Örnek absorpsansı; A_0 : Örnek içermeyen çözöltinin absorpsansı; A_{kontrol} : Kontrol absorpsansı (Brand Williams, Cuvelier ve Berset, 1995; Öke Altundaş, 2012; Ural, 2016).

Demir iyonunu şelatlama aktivitesi

1 mL L-EPS (100-1250 µg/mL), 3,7 mL metanol ve 0,1 mL 2 mM demir klorür (Sigma-Aldrich) ilave edilerek bir karışım oluşturulmuştur. Örneklerin üzerine 0,2 mL 5 mM ferrozin (Sigma-Aldrich) eklenmiştir. Örnekler karanlık ortamda 10 dk bekletilmiştir. Bekleme sonunda örneklerin 562 nm’de spektrofotometrik olarak ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak 0,5 mg/mL etilendiamin tetra asetik asit-sodyum (Merck) kullanılmıştır. Örneklerin demir iyonunu şelatlama aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Demir iyonunu şelatlama aktivitesi (%): $(1 - A_{\text{örnek}} - A_0 / A_{\text{kontrol}}) \times 100$. $A_{\text{örnek}}$: Örnek absorbansı; A_0 : Örnek içermeyen çözeltinin absorbansı; A_{kontrol} : Kontrol absorbansı (Decker ve Welch, 1990; Öke Altundaş, 2012; Ural, 2016).

Hidroksil radikalini süpürme aktivitesi

1 mL metanol içerisinde değişik konsantrasyonlardaki L-EPS’ler (100-1250 µg/mL) çözülmüştür. Örneklerin üzerine 1 mL 0,435 mM brilliant blue (Sigma-Aldrich), 1 mL 0,75 mM demir sülfat (Sigma-Aldrich), 1 mL %0,01 hidrojen peroksit eklenmiştir. Örnekler 37 °C’de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örneklerin 624 nm’de spektrofotometrik olarak ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak 0,5 mg/mL askorbik asit kullanılmıştır. Örneklerin hidroksil radikalini süpürme aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Hidroksil radikali süpürme aktivitesi (%): $(1 - A_{\text{örnek}} - A_0 / A_{\text{kontrol}}) \times 100$. $A_{\text{örnek}}$: Örnek absorbansı; A_0 : Örnek içermeyen çözeltinin absorbansı; A_{kontrol} : Kontrol absorbansı (Ural, 2016).

Lipit peroksidasyonunun inhibisyonu

200 µL L-EPS (100-1250 µg/mL), 400 µL plazma, 100 µL 0,5 mM demir sülfat ve 100 µL 0,5 mM hidrojen peroksit ilave edilerek bir karışım oluşturulmuştur. Örnekler 37 °C’de 12 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örneklerin üzerine 375 µL %4 trikloroasetik asit ve 75 µL 0,5 mM bütildihidroksianizol (Sigma-Aldrich) eklenmiştir. Örnekler buz banyosunda 5 dk bekletilmiştir. Örneklerin üzerine 0,2 mL %0,6 tiyobarbitürik asit (Sigma-Aldrich) eklenmiştir. Örnekler 95 °C’de 30 dk bekletilmiştir. Bekleme sonunda örneklerin 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak 0,5 mg/mL askorbik asit kullanılmıştır. Örneklerin lipit peroksidasyon

inhibisyon oranları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Lipit peroksidasyon inhibisyon oranı (%): $(1 - A_{\text{örnek}} - A_0 / A_{\text{kontrol}}) \times 100$. $A_{\text{örnek}}$: Örnek absorbansı; A_0 : Örnek içermeyen çözeltinin absorbansı; A_{kontrol} : Kontrol absorbansı (Rodriguez Martinez ve Ruiz Torres, 1992; Öke Altundaş, 2012; Ural, 2016).

Süperoksit anyon radikalini süpürme aktivitesi

1 mL metanol içerisinde değişik konsantrasyonlardaki L-EPS'ler (100-1250 µg/mL) çözülmüştür. Örneklerin üzerine 25 °C'ye ısıtılmış 0,2 mL 3 mM pyrogallol (Sigma-Aldrich) ilave edilmiştir. Örneklerin 325 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak 0,5 mg/mL askorbik asit kullanılmıştır. Örneklerin süperoksit anyon radikalini süpürme aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Süperoksit anyon radikalini süpürme aktivitesi (%): $(1 - A_{\text{örnek}} - A_0 / A_{\text{kontrol}}) \times 100$. $A_{\text{örnek}}$: Örnek absorbansı; A_0 : Örnek içermeyen çözeltinin absorbansı; A_{kontrol} : Kontrol absorbansı (Ural, 2016).

3.2.4. L-EPS'lerin amiloid β ($A\beta$)₁₋₄₂ agregasyonu üzerine inhibitör etkilerinin belirlenmesi

L-EPS'lerin $A\beta$ ₁₋₄₂ agregasyonu üzerine inhibitör etkilerinin belirlenmesi amacıyla tiyoflavin T testi yapılmıştır. Mikroplakalara (96 kuyucuklu) (Corning) SensoLyte marka kit içeriğinde yer alan tiyoflavin T çalışma solüsyonundan (2 mM) 10 µL konulup üzerine $A\beta$ ₁₋₄₂ peptid solüsyonundan 85 µL ve L-EPS'lerden (100-1250 µg/mL) 5 µL ilave edilmiştir. Mikroplakalar mikropilaka okuyucuda (Biotek) 440 nm (eksitasyon dalga boyu) ve 484 nm (emisyon dalga boyu)'de 24 saat boyunca 10'ar dk aralıklarla okutulmuştur. Tüm floresan okumaları, bağıl floresan birimleri olarak ifade edilmiştir (Olasehinde ve diğerleri, 2019a; Wang ve diğerleri, 2014b).

L-EPS'lerin $A\beta$ ₁₋₄₂ agregasyonu üzerine inhibitör etkilerinin doğrulanması amacıyla AFM analizi yapılmıştır. Cam lamalar, 15 mL hidroklorik asit ve 5 mL nitrik asit karışımı ile 30 dk işleminden geçirilmiştir. Daha sonra 20 mL sülfürik asit ve 5 mL hidrojen peroksit karışımına 30 dk süreyle tabi tutulmuştur. Daha sonra lamalar, distile su ile durulanmış ve kullanılabilecek kadar saklanmıştır. L-EPS'ler distile suda çözülerek taze L-EPS çözeltileri oluşturulmuştur. Cam lamalar üzerine 10 µL $A\beta$ ₁₋₄₂ peptid solüsyonu ve/veya 10 µL L-EPS

dökülerek (1250 µg/mL) oda sıcaklığında kurutulmuştur. Altın ve gümüş filmler cam lamlara yerleştirilmiştir. Altın ile kaplanmış silikon problemleri aşağıdaki boyutlara sahiptir. Yonga boyutu $3,6 \times 1,6 \times 0,4$ mm, eğrilik yarıçapı 10 nm, uç yüksekliği 10–15 µm. AFM görüntüleri Park Systems XE-100E ile vurmali (semi-contact) modunda 5,5–22,5 N/m sabit kuvvetle elde edilmiştir (Kanamarlupudi ve Muddada, 2017; Prasad ve Krishna, 2014).

3.2.5. Hücre kültürünün hazırlanması ve uygulama gruplarının oluşturulması

SH-SY5Y hücreleri besi ortamı içinde flasklarda (Corning), 37 °C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde (Sanyo) geliştirilmiştir. Hücre besi ortamı gün aşırı değiştirilerek gelişimi takip edilmiştir. Flasklarda %80-90 yayılma gösteren hücreler tripsin/etilendiamin tetraasetik asit (Gibco) ile kaldırılarak sayılmıştır. Çalışmanın amacına göre 10⁴, 10⁵ ya da 3×10^5 sayıda hücre, kuyucuk başına olacak şekilde 96 ve 6 kuyucuklu mikropiplara aktarılmıştır.

Çalışmada aşağıda belirlenen hücre uygulama grupları kullanılmıştır.

1. Grup (Kontrol grubu): SH-SY5Y hücreleri sadece DMEM ile muamele edilmiştir. Hiçbir uygulama yapılmamıştır.
2. Grup (Aβ₁₋₄₂ grubu): Aβ₁₋₄₂ (Sigma-Aldrich) 10, 25, 50 ve 100 µM olacak şekilde DMEM’de çözünmüştür. SH-SY5Y hücreleri Aβ₁₋₄₂ (10-100 µM) ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir.
3. Grup (L-EPS grubu): L-EPS’ler 100, 250, 500, 1000 ve 1250 µg/mL olacak şekilde DMEM’de çözünmüştür. SH-SY5Y hücreleri L-EPS (100-1250 µg/mL) ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir.
4. Grup (L-EPS + Aβ₁₋₄₂ grubu): SH-SY5Y hücreleri L-EPS (100-1250 µg/mL) ile 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra, 10 µM Aβ₁₋₄₂ ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir (Wang ve diğerleri, 2014b; Wei, Wang ve Kusiak, 2002).

3.2.6. Aβ₁₋₄₂ ve L-EPS’lerin hücre canlılığı üzerine etkilerinin 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazolium bromid; tiazolil mavi (MTT) ile belirlenmesi

Mikropiplalara (96 kuyucuklu) SH-SY5Y hücreleri 10⁴ hücre/kuyucuk gelecek şekilde ekilmiştir. Hücrelerin besi ortamı gün aşırı değiştirilerek %80-90 yoğunluğa gelmeleri

beklenmiştir. Daha sonra, A β_{1-42} (10-100 μ M) ve L-EPS (100-1250 μ g/mL) SH-SY5Y hücrelerine 24 saat boyunca uygulanmıştır. Uygulama yapılmadan normal şartlarda büyütülen SH-SY5Y hücreleri kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Kontrol grubundan elde edilen absorbans değeri %100 hücre canlılığı olarak dikkate alınmıştır. Kontrole göre hücre canlılıkları MTT yöntemi ile belirlenmiştir. MTT yöntemi, hücre proliferasyonu, canlılığı ve sitotoksosite ölçümü için kullanılan, kantitatif kolorimetrik bir yöntem olup, canlı hücrelerin tetrazolium tuzu olan MTT'yi formazan kristallerine dönüştürmesi esasına dayanmaktadır. Mitokondriyal dehidrojenaz enzimleri canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunmakta olup, MTT'yi parçalayarak formazan kristalleri formuna dönüştürmektedir. Bu kristaller dimetil sülfoksit veya asitli izopropanolle çözülürken meydana gelen mor renkli çözeltinin spektrofotometrik ölçümü yapılmaktadır. MTT sadece canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan mitokondriyal dehidrojenaz enzimleri ile parçalanacağı için bulunan absorbans değerleri canlı hücre oranları hakkında bilgi vermektedir (Freimoser, Jakob, Aebi ve Tuor, 1999). Uygulama yapılmış her bir kuyucuğa 20 μ L MTT eklenerek, 4 saat 37 °C'de CO₂'li inkübatörde bekletilmiştir. Kuyucuklardaki sıvı çekilerek tüm kuyucuklara 200 μ L dimetil sülfoksit (Sigma-Aldrich) konulmuştur. 30 dk 37 °C'de CO₂'li inkübatörde bekletildikten sonra mikrolakalar mikrolaka okuyucuda 570 nm'de okutulmuştur. Hücre canlılığı (%): $(A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}}) \times 100$ 'e göre hesaplanmıştır. A_{örnek}: Örnek absorbansı; A_{kontrol}: Kontrol absorbansı (Freimoser ve diğerleri, 1999; Hadjiakhoondi ve diğerleri, 2013; Kim ve diğerleri, 2006; Mosmann 1983).

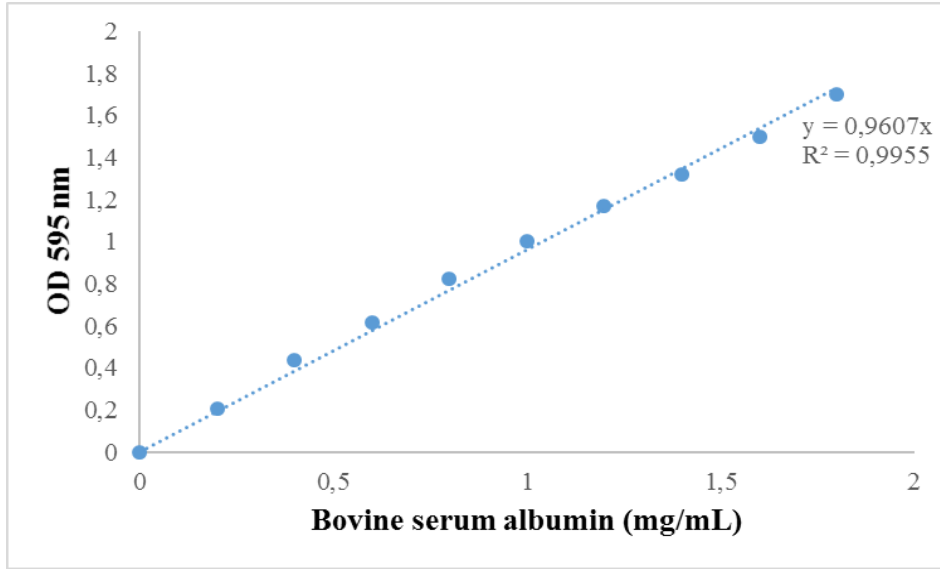
3.2.7. A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan Alzheimer hastalığı (AH) modelinde L-EPS'lerin hücre ölümüne karşı koruyucu etkilerinin MTT ile belirlenmesi

Mikrolakalara (96 kuyucuklu) SH-SY5Y hücreleri 10⁴ hücre/kuyucuk gelecek şekilde ekilmiştir. Hücrelerin besi ortamı gün aşırı değiştirilerek %80-90 yoğunluğa gelmeleri beklenmiştir. Hücreler geliştikten sonra, değişik konsantrasyonlarda (100-1250 μ g/mL) DMEM'de çözünmüş L-EPS'ler 24 saat süre ile hücrelere uygulanmıştır. Ardından kuyulardaki L-EPS'li besi ortamı çekilip, 10 μ M A β_{1-42} 24 saat süre ile kuyucuklara uygulanmıştır. Uygulama yapılmadan normal şartlarda büyütülen SH-SY5Y hücreleri kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Kontrol grubundan elde edilen absorbans değeri

%100 hücre canlılığı olarak dikkate alınmıştır. Kontrole göre hücre canlılıkları MTT yöntemi (bkz. 3.2.6) ile belirlenmiştir.

3.2.8. A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin asetilkolin esterase (AChE) enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkilerinin belirlenmesi

6'lı mikropalakaya SH-SY5Y hücreleri 10⁵ hücre/kuyucuk gelecek şekilde ekilmiştir. SH-SY5Y hücreleri, 2 mL DMEM içinde çözünmüş L-EPS'ler (100-1250 µg/mL) ile 24 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Ardından L-EPS'li besiyeri çekilerek hücreler, 10 µM A β ₁₋₄₂ ile 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Uygulama gruplarında toplam protein izolasyonu yapılmış, daha sonra Ellman yöntemi kullanılarak AChE enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Hücrelerden toplam protein izolasyonu için, uygulamaların ardından hücreler soğuk 1× fosfat tamponlu tuz (Gibco) ile yıkanmıştır. Bütün fosfat tamponlu tuz çekildikten sonra 1 mL soğuk SH-SY5Y çözme tamponu [1 M Tris tamponu (10 mL) pH 7,2 (Sigma-Aldrich), 2 M sodyum klorür (Merck), 1 M magnezyum klorür (Sigma-Aldrich), %1 Triton X-100 (Merck)] direkt hücrelerin üzerine uygulanmıştır. Hücreler, hücre kazıyıcı (Thermo Fischer Scientific) ile kazınmıştır. Kazınan hücreler, steril bir tüpe toplanmıştır. Bundan sonraki tüm aşamalar buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Tüpler, her 5 dk'da bir vorteksenerek, 30 dk 4 °C'de bekletilmiştir. Tüplere, 10000 rpm'de 20 dk santrifüj yapılmıştır. Buna göre 20'şer µL süpernatant, 1 mL Bradford çözeltisi (Sigma-Aldrich) ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından örneklerin 595 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) çözeltilerinin absorbans değerlerinden elde edilen standart kullanılarak her numunenin içerdiği toplam protein miktarı mg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.2). Uygulama gruplarındaki AChE enzim aktivitesi, Ellman yöntemine göre belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Bovine serum albumin standart eğrisi. OD: Optik dansite

Ellman yöntemi

96 kuyucuklu mikrop lakanın ilk sütununu oluşturan kuyucuklara 200'er µL SH-SY5Y çözme tamponu eklenmiş, bu sütunlar negatif kontrol olarak kullanılmıştır. İkinci sütuna ise 1 mg/mL AChE'den (Sigma-Aldrich) 200 µL eklenmiş, bu sütunlar pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Diğer sütunlara ise uygulama gruplarından elde edilen toplam proteinden eşit miktarlarda ilave edilmiştir. Tüm kuyulara 0,1 mM fosfat tamponundan (pH 8,0) (Merck) 100 µL eklenmiştir. Kuyulardaki toplam hacim, SH-SY5Y çözme tamponu ile eşitlenmiştir. 7,5 mg sodyum bikarbonat (Merck) ihtiva eden 5 mL 0,1 M fosfat tamponu içinde 19,8 mg 5,5'-Ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit (Sigma-Aldrich) çözündürülmüştür. 5,5'-Ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit çözeltisi 1/8 oranında 0,1 M fosfat tamponu ile seyreltilmiştir. Seyreltilmiş 5,5'-Ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit çözeltisinden 50'şer µL kuyulara eklenmiştir. Distile su ile hazırlanmış 21,7 mg/mL asetilkolin iyodür (Sigma-Aldrich) çözeltisi 1/40 oranında 0,1 mM fosfat tamponu ile seyreltilmiştir. Seyreltilmiş asetilkolin iyodür çözeltisinden 50'şer µL kuyulara eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Mikrop laka, 25 °C'de, karanlıkta 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Absorbans değerleri mikrop laka okuyucuda 412 nm dalga boyunda ölçülmüştür. AChE enzim aktivitesi 1 mg/mL AChE içeren pozitif kontrolüne göre değerlendirilmiştir. Kontrole göre AChE enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Kontrole göre AChE enzim aktivitesi (%): $(A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}}) \times 100$. $A_{\text{örnek}}$: Örnek absorbansı; A_{kontrol} :

Kontrol absorbansı (Bradford, 1976; Ellman, Courtney, Andres ve Featherstone, 1961; Schwartz, Blundon ve Adler, 2007).

3.2.9. A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin total antioksidan seviyesi (TAS) üzerine indükleyici etkilerinin belirlenmesi

6'lı mikropalakaya SH-SY5Y hücreleri 10⁵ hücre/kuyucuk gelecek şekilde ekilmiştir. SH-SY5Y hücreleri, 2 mL DMEM içinde çözünmüş L-EPS'ler (100-1250 µg/mL) ile 24 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Ardından L-EPS'li besiyeri çekilerek hücreler, 10 µM A β ₁₋₄₂ ile 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Uygulama gruplarında toplam protein izolasyonu yapılmış, daha sonra Rel Assay Diagnostics marka kit kullanılarak TAS belirlenmiştir. Kitin çalışma prensibi; demir-o-dianisidin hidrojen peroksit ile Fenton tipi reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturmaktadır. Hidroksil radikali indirgenerek düşük pH ortamında renksiz o-dianisidinle reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidil radikallerini oluşturmaktadır. Dianisidil radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak sarı-kahverengi renk oluşumunu arttırmaktadır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar ileri oksidasyon reaksiyonlarını inhibe ederek renk oluşumunu baskılamaktadırlar (Sırmatel ve diğerleri, 2009). 30 µL örnek ile 500 µL tampon solüsyonu [Asetat tamponu (0,4 mol/L, pH: 5,8)] karıştırılmış olup, 30 saniye sonra ilk okuma (A₁: Absorbans değeri₁) mikropalaka okuyucuda 660 nm'de yapılmıştır. Karışıma, 75 µL prokromojen solüsyonu [2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-sülfonik asit (30 mmol/L)] eklenmiştir. Son okuma (A₂:Absorbans değeri₂) 10 dk sonra oda sıcaklığında mikropalaka okuyucuda 660 nm'de yapılmıştır.

A₂-A₁: Δ Absorbans (Distile su, örnek ya da standart)

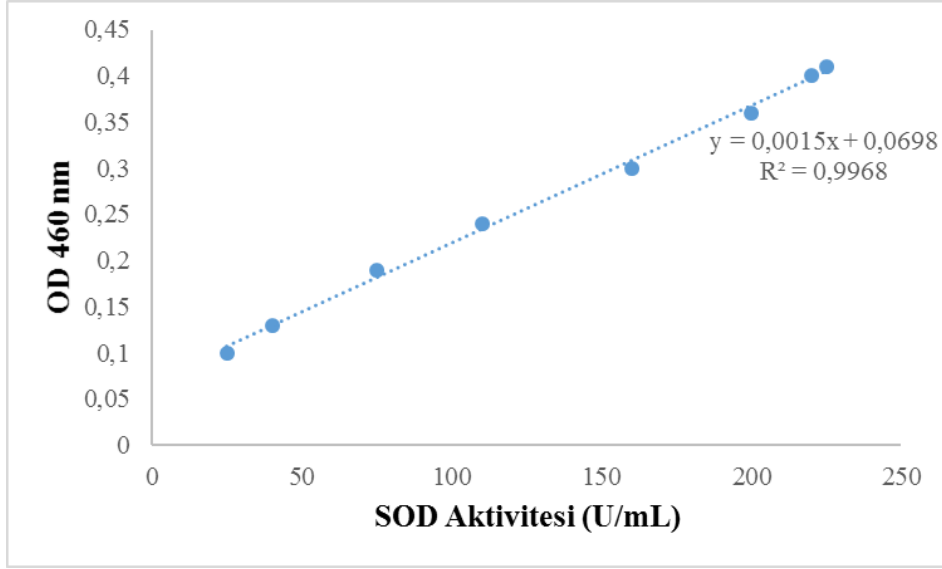
TAS [Troloks eşdeğeri (mmol/L)/L]: (Δ Abs Distile su) - (Δ Abs Örnek) / (Δ Abs Distile su) - (Δ Abs Standart) (Erel, 2004).

3.2.10. A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktiviteleri üzerine indükleyici etkilerinin belirlenmesi

6'lı mikrolakaya SH-SY5Y hücreleri 10⁵ hücre/kuyucuk gelecek şekilde ekilmiştir. SH-SY5Y hücreleri, 2 mL DMEM içinde çözünmüş L-EPS'ler (100-1250 µg/mL) ile 24 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Ardından L-EPS'li besiyeri çekilerek hücreler, 10 µM A β ₁₋₄₂ ile 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Uygulama gruplarında toplam protein izolasyonu yapılmış, daha sonra Cayman marka kit kullanılarak SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

SOD enzim aktivitesi

96 kuyucuklu mikrolakanın her kuyucuğuna 200 µL seyreltilmiş radikal detektörü ve 10 µL SOD standardı veya örnekler eklenmiştir. Reaksiyon 20 µL ksantin oksidaz eklenerek başlatılmıştır. Mikrolaka, oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örneklerin absorbans değerleri 460 nm'de okunmuştur. Köre ait absorbans değerinin kendisine ve standartların absorbans değerlerine bölünmesi ile elde edilen oran, standartların sahip olduğu SOD enzim aktivitelerine karşı grafiğe geçirilerek SOD standart eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 3.3). SOD standart eğrisi kullanılarak örneklerin SOD enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Örneklerin, SOD enzim aktiviteleri, protein değerleri ve dilüsyon faktörleri kullanılarak SOD spesifik enzim aktiviteleri belirlenmiştir.



Şekil 3.3. SOD standart eğrisi. OD: Optik dansite

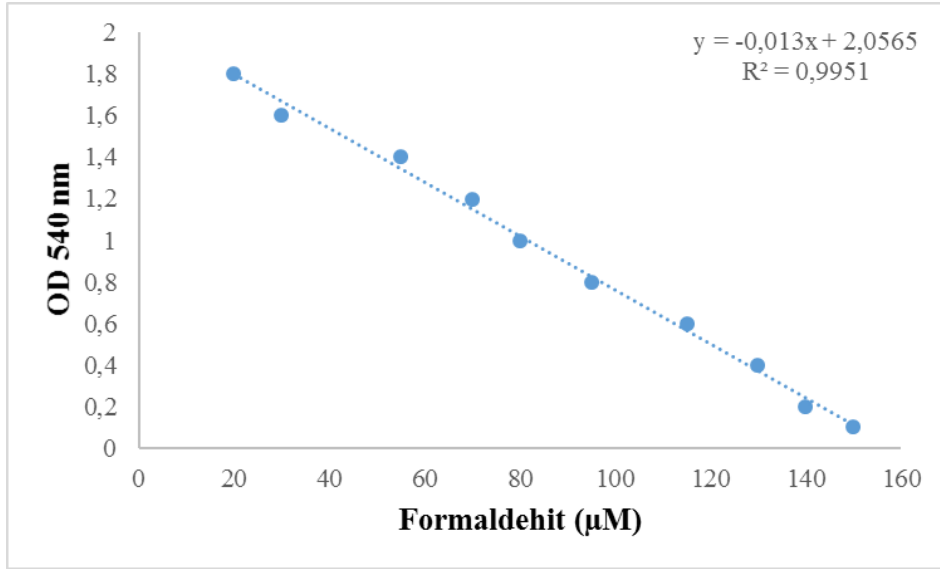
SOD spesifik enzim aktivitesi (U/mg protein): SOD (U/mL) / protein (mg/mL) × dilüsyon faktörü.

Dilüsyon faktörü: $V_{\text{final}} (0,23 \text{ mL}) / V_{\text{örnek}} (0,01 \text{ mL}) \times d_{\text{örnek}} (1)$.

V_{final} : Kuyucuğun nihai hacmi; $V_{\text{örnek}}$: Kuyucuğa eklenen örnek hacmi; $d_{\text{örnek}}$: Örnek dilüsyonu (Sullivan Gun ve Lewandowski, 2013; Şen, 2017).

CAT enzim aktivitesi

96 kuyucuklu mikroplakanın her kuyucuğuna 20 µL formaldehit standardı veya örnekler, 30 µL metanol ve 100 µL seyreltilmiş deney tamponu eklenmiştir. Tüm kuyucuklara reaksiyonun başlaması için 20 µL seyreltilmiş hidrojen peroksit eklenmiştir. Mikroplaka oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında reaksiyonun bitmesi için 30 µL potasyum hidroksit ve 30 µL CAT purpald eklenmiştir. Mikroplaka oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. Tüm kuyucuklara 10 µL potasyum periyodat eklenmiştir. Mikroplaka oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örneklerin absorbans değerleri 540 nm’de okunmuştur. Okunan absorbans değerleri ile formaldehit standart eğrisi kullanılarak formaldehit konsantrasyonları (µM) belirlenmiştir (Şekil 3.4). CAT enzim aktiviteleri, formaldehit konsantrasyonları ve dilüsyon faktörleri kullanılarak hesaplanmıştır. Örneklerin, CAT enzim aktiviteleri ve protein değerleri kullanılarak CAT spesifik enzim aktiviteleri belirlenmiştir.



Şekil 3.4. Formaldehit standart eğrisi. OD: Optik dansite

CAT enzim aktivitesi (nmol/dk/mL): Formaldehit (µM) / 20 dk × dilüsyon faktörü.

Dilüsyon faktörü: $V_{\text{final}} (0,17 \text{ mL}) / V_{\text{örnek}} (0,02 \text{ mL}) \times d_{\text{örnek}} (9)$.

V_{final} : Kuyucuğun nihai hacmi; $V_{\text{örnek}}$: Kuyucuğa eklenen örnek hacmi; $d_{\text{örnek}}$: Örnek dilüsyonu.

CAT spesifik enzim aktivitesi (nmol/mg protein): CAT enzim aktivitesi (nmol/dk/mL) / protein (mg/mL) (Sullivan Gun ve Lewandowski, 2013; Şen, 2017).

GPx enzim aktivitesi

96 kuyucuklu mikropiakanın enzimatik olmayan her kuyucuğuna 120 µL deney tamponu ve 50 µL ko-substrat karışımı eklenmiştir. Pozitif kontrol kuyucuklarına 100 µL deney tamponu, 50 µL ko-substrat ve 20 µL seyreltilmiş GPx eklenmiştir. Örnek kuyucuklarına ise 100 µL deney tamponu, 50 µL ko-substrat ve 20 µL örnek eklenmiştir. Tüm kuyucuklara 20 µL kümen hidroperoksit eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Örneklerin absorbans değerleri 340 nm’de okunmuştur. GPx enzim aktiviteleri, 340 nm’deki absorbans değerlerinin farkı, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat ekstinksiyon katsayısı ve dilüsyon faktörleri kullanılarak hesaplanmıştır. Örneklerin, GPx enzim aktiviteleri ve protein değerleri kullanılarak GPx spesifik enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

GPx enzim aktivitesi (nmol/dk/mL): $(\Delta A_{340}) / 0,00373 \mu\text{M}^{-1}) \times \text{dilüsyon faktörü}$.

ΔA_{340} : Enzimatik olmayan örneklerin absorbansı – örnek absorbansı.

Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat ekstinksiyon katsayısı: $0,00373 \mu\text{M}^{-1}$.

Dilüsyon faktörü: $V_{\text{final}} (0,19 \text{ mL}) / V_{\text{örnek}} (0,02 \text{ mL}) \times d_{\text{örnek}} (1)$.

V_{final} : Kuyucuğun nihai hacmi; $V_{\text{örnek}}$: Kuyucuğa eklenen örnek hacmi; $d_{\text{örnek}}$: Örnek dilüsyonu.

GPx spesifik enzim aktivitesi (nmol/mg protein): GPx enzim aktivitesi (nmol/dk/mL) / protein (mg/mL) (Sullivan Gun ve Lewandowski, 2013; Şen, 2017).

3.2.11. A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin total oksidan seviyesi (TOS) üzerine baskılayıcı etkilerinin belirlenmesi

6'lı mikropalakaya SH-SY5Y hücreleri 10^5 hücre/kuyucuk gelecek şekilde ekilmiştir. SH-SY5Y hücreleri, 2 mL DMEM içinde çözünmüş L-EPS'ler (100-1250 $\mu\text{g/mL}$) ile 24 saat boyunca 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Ardından L-EPS'li besiyeri çekilerek hücreler, 10 μM A β ₁₋₄₂ ile 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Uygulama gruplarında toplam protein izolasyonu yapılmış, daha sonra Rel Assay Diagnostics marka kit kullanılarak TOS belirlenmiştir. Kitin çalışma prensibi; örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidini ferrik iyonla oksitlemektedir. Reaksiyon ortamında bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar düşük pH ortamında xylenol orange ile renkli bir kompleks oluşturmaktadırlar. Rengin şiddeti örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkilidir ve spektrofotometrik olarak ölçülmektedir (Sırmatel ve diğerleri, 2009). 75 μL örnek ile 500 μL tampon solüsyonu [Sülfürik asit (25 mM, pH: 1,75)] karıştırılmış olup, 30 saniye sonra ilk okuma (A_1 : Absorbans değeri₁) mikropalaka okuyucuda 530 nm'de yapılmıştır. Karışıma, 25 μL substrat solüsyonu [Sülfürik asit (25 mM, pH: 1,75), demir (5 mM) ve O-dianisidin (10 nM)] eklenmiştir. Son okuma (A_2 : Absorbans değeri₂) 10 dk sonra oda sıcaklığında mikropalaka okuyucuda 530 nm'de yapılmıştır.

$A_2 - A_1$: Δ Absorbans (Örnek ya da standart)

TOS (μmol hidrojen peroksit eşdeğeri/mg): $(\Delta\text{Abs Örnek}) / (\Delta\text{Abs Standart}) \times \text{Standartın konsantrasyonu (20 } \mu\text{mol/L) (Erel, 2005)}$.

3.2.12. A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) miktarı üzerine baskılayıcı etkilerinin belirlenmesi

6'lı mikropalakaya SH-SY5Y hücreleri 10⁵ hücre/kuyucuk gelecek şekilde ekilmiştir. SH-SY5Y hücreleri, 2 mL DMEM içinde çözünmüş L-EPS'ler (100-1250 µg/mL) ile 24 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Ardından L-EPS'li besiyeri çekilerek hücreler, 10 µM A β ₁₋₄₂ ile 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler 1 mL DMEM ile 15 mL'lik falkon tüplerin içine toplanmıştır. Hücrelerin üzerine 20 µM 2',7'-diklorofluoresin diasetat, H₂DCFDA (DCFDA) (Abcam) eklenerek oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dk inkübe edilmiştir. DCFDA hücre içindeki hidroksil, peroksil ve ROS aktivitesini ölçen fluorojenik bir boyadır. Hücreye difüze olduktan sonra floresan olmayan DCFDA, ROS ile oksitlenerek, floresan bir bileşik olan 2',7'-diklorofluoresin (DCF)'ye dönüşmektedir (Altundağ, 2016). Örneklerin okunması, ACEA NovoCyte flow sitometre cihazında yapılmıştır. Tüm floresan okumaları, bağıl floresan birimleri olarak ifade edilmiştir. Örneklerin analizleri ise ACEA Novo Express yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir (Lin, Liu, Hu, Song ve Zhao, 2012; Yang ve diğerleri, 2015b).

3.2.13. A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin apoptoz üzerine baskılayıcı etkilerinin belirlenmesi

6'lı mikropalakaya SH-SY5Y hücreleri 3x10⁵ hücre/kuyucuk gelecek şekilde ekilmiştir. SH-SY5Y hücreleri, 2 mL DMEM içinde çözünmüş L-EPS'ler (100-1250 µg/mL) ile 24 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Ardından L-EPS'li besiyeri çekilerek hücreler, 10 µM A β ₁₋₄₂ ile 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler 1 mL DMEM ile 15 mL'lik falkon tüplerin içine toplanmıştır. Hücrelerin üzerine 4 mL 1X anneksin V bağlanma tamponu (Immunostep) ilave edilerek, 5 dk 2000 rpm hızda santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak, hücreler 200 µL 1X bağlanma tamponu içerisinde çözülmüştür. Hücre solüsyonundan 100 µL alınarak üzerine 5 µL anneksin V-FITC (Immunostep) ve son konsantrasyonda 40 µg/mL olacak şekilde propidyum iyodür (Immunostep) eklenerek oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dk inkübe edilmiştir. Hücrelerin üzerine 100 µL 1X bağlanma tamponu ilave edilmiştir. Anneksin-V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan

fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (FITC) ile işaretlenmektedir. Bu sayede apoptotik hücre görünür hale getirilmektedir. Geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de anneksin-V bağlanması görülebildiği için non-vital boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Anneksin V-FITC ve propidyum iyodür ile aynı zamanda boyanan hücreler, canlı hücreler (Anneksin V-FITC negatif, propidyum iyodür negatif), erken apoptotik hücreler (Anneksin V-FITC pozitif, propidyum iyodür negatif) ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin (Anneksin V-FITC pozitif, propidyum iyodür pozitif) birbirinden ayırt edilmesine izin vermektedir (Güleş ve Eren, 2008). Örneklerin okunması, ACEA NovoCyte flow sitometre cihazında yapılmıştır. Örneklerin analizleri ise ACEA Novo Express yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir (Wei ve diğerleri, 2015; Zhang ve diğerleri, 2015).

3.2.14. A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin mitokondriyal membran potansiyeli üzerine koruyucu etkilerinin belirlenmesi

6'lı mikropalakaya SH-SY5Y hücreleri 3×10^5 hücre/kuyucuk gelecek şekilde ekilmiştir. SH-SY5Y hücreleri, 2 mL DMEM içinde çözünmüş L-EPS'ler (100-1250 $\mu\text{g/mL}$) ile 24 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Ardından L-EPS'li besiyeri çekilerek hücreler, 10 μM A β ₁₋₄₂ ile 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler 1 mL DMEM ile 15 mL'lik falkon tüplerin içine toplanmıştır. Hücreler 5 dk 1500 rpm hızda santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak, hücreler 100 μL assay tamponu (Cayman) içerisinde çözülmiştir. Hücreler oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 5 dk inkübe edilmiştir. Hücrelerin üzerine 100 μL JC-1 boyama solüsyonu (Cayman) ilave edilmiştir. JC-1 mitokondriyal depolarizasyonu belirlemek için kullanılan ve mitokondride biriken katyonik bir boyadır. JC-1 ile boyanmış canlı hücreler mitokondride kırmızı floresan özellik göstermektedirler. Apoptozla sonuçlanan bir durumda ise mitokondriyal membran potansiyelindeki bozulma ile kırmızı floresan yeşil floresana doğru kayma göstermektedir. Bu özelliğinden dolayı JC-1 boyası mitokondriyal membran potansiyelinin ölçümü için spesifik bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Altundağ, 2016). Örneklerin okunması, ACEA NovoCyte flow sitometre cihazında yapılmıştır. Örneklerin analizleri ise ACEA Novo Express yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir (Jia, Rao, Xue ve Lei, 2015; Zhang ve diğerleri, 2015).

3.2.15. A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin protein kinaz B (AKT/PKB), nüklear faktör- κ B (NF- κ B/p65), mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) ve apoptoz sinyal yolları üzerine modülatör etkilerinin belirlenmesi

6'lı mikropalakaya SH-SY5Y hücreleri 10⁵ hücre/kuyucuk gelecek şekilde ekilmiştir. SH-SY5Y hücreleri, 2 mL DMEM içinde çözünmüş L-EPS'ler (100- 1250 μ g/mL) ile 24 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Ardından L-EPS'li besiyeri çekilerek hücreler, 10 μ M A β ₁₋₄₂ ile 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.

RNA izolasyonu

The RNeasy Mini kit (Qiagen) ile hücrelerden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Pellet halindeki hücrelerin her birine, 350 μ L Buffer RLT (Lizis tamponu) + 3,5 μ L β -merkaptoetanol (Merck) karışımı ve 350 μ L %70 etanol eklenmiştir. Daha sonra 700 μ L'ye kadar örnek, toplama tüpü içine yerleştirilmiş kolona aktarılmıştır. Kolon 8500 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne akan kısım uzaklaştırılmıştır. 700 μ L Buffer RW1 kolona aktarılmıştır. Kolon 8500 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne akan kısım uzaklaştırılmıştır. 500 μ L RPE (yıkama solüsyonu) kolona aktarılmıştır. Kolon 8500 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne akan kısım uzaklaştırılmıştır. 500 μ L RPE kolona aktarılmıştır. Kolon 8500 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Kolon yeni bir 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Membranın kuruması için maksimum hızda 1 dk santrifüj yapılmıştır. Kolon yeni bir 1,5 mL'lik toplama tüpüne yerleştirilmiştir. 30-50 μ L RNaz içermeyen su kolona ilave edilmiştir. 8500 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. İzole edilen total RNA'ların kalite kontrolü %1'lik agaroz (Sigma-Aldrich) jelde etidyum bromür (Sigma-Aldrich) ile boyanarak ve mikropalaka okuyucu kullanılarak 260 ve 280 nm'de RNA miktarı ve saflığı ölçülerek belirlenmiştir. Saflık derecesi ve miktarı yüksek olan örneklerle çalışmaya devam edilmiştir. Beklenen saflık değeri; DNA ölçümleri için : ~ 1,8, RNA ölçümleri için : ~ 2,0 olarak kabul edilmektedir. İzole edilen RNA'lar kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

cDNA sentezi

QuantiTect Reverse Transcription kiti (Qiagen) kullanılarak RNA örneklerinden cDNA sentezi yapılmıştır. Genomik DNA eliminasyonu reaksiyonu için GDNA eliminasyon tamponu (7X) her 1 µg'lık RNA örneğine eklenmiştir. Son hacim 14 µL olacak şekilde RNaz içermeyen su ilave edilmiştir. Tüpler 42 °C'de 2 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra tüpler buz üzerine alınmıştır. Reverse transkriptaz 1 µL, reaksiyon tamponu (5X) 4 µL ve primer karışımı 1 µL olacak şekilde, buz üzerinde reverse-transkripsiyon karışımı hazırlanmıştır. Elde edilen (14 µL) tamamlayıcı RNA, revers-transkripsiyon karışımı içeren her bir tüpe eklenmiştir. Karıştırılmış ve buz üzerinde bekletilmiştir. cDNA sentez reaksiyonu kit protokolünde belirtilen şartlara göre programlanan PZR cihazında (Thermo Fisher Scientific) gerçekleştirilmiştir. Tüpler 42 °C'de 15 dk ve 95 °C'de 3 dk inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyon sonucunda 20 µL cDNA sentezlenmiştir. Sentezlenen cDNA'ların absorbans değerleri mikropilaka okuyucu kullanılarak 260 ve 280 nm'de ölçülüp saflık dereceleri ve miktarları belirlenmiştir. Saflık derecesi ve miktarı yüksek olan örneklerle çalışmaya devam edilmiştir. Beklenen saflık değeri; DNA ölçümleri için : ~ 1,8, RNA ölçümleri için : ~ 2,0 olarak kabul edilmektedir. Elde edilen cDNA'lar, qRT-PZR için kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

qRT-PZR

cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak spesifik primerler (Çizelge 3.3) aracılığıyla PZR reaksiyon koşulları oluşturulmuştur. PZR reaksiyonu için 10 µL SYBR green karışımı, 0,8 µL ileri primer (10 pmol/µL), 0,8 µL geri primer (10 pmol/µL), her 2 µL'lik cDNA örneğine eklenmiştir. Son hacim 20 µL olacak şekilde RNaz içermeyen su ilave edilmiştir. Bu çalışma için QuantiFast SYBR Green PZR Kiti (Qiagen) kullanılmıştır. PZR reaksiyonu, BCL2 associated X (BAX), BCL2, kaspaz-3 (CASP3), kaspaz-7 (CASP7), kaspaz-8 (CASP8), kaspaz-9 (CASP9) ve sitokrom C (CYCS) için; 95°C'de 5 dk, 95°C'de 10 saniye, 60°C'de 30 saniyeye (40 döngü) ayarlanmıştır. PZR reaksiyonu, c-Jun N-Terminal kinaz (JNK), hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1 (ERK1), hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 2 (ERK2), JUN, nükleer faktör-κB (NF-κB/p65), protein kinaz B (AKT/PKB) ve p38 mitojenle aktive edilmiş protein kinazı (p38 MAPK) için; 95°C'de 5 dk, 95°C'de 10 saniye, 56 °C (JNK), 57 °C (JUN, NF-κB/p65), 59 °C (AKT/PKB, ERK1, p38 MAPK), 60 °C (ERK2) 30 saniyeye (40 döngü) ayarlanan QuantStudio 3 Real Time PCR

(Applied Biosystems) cihazında yapılmıştır. Primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin tespiti için daha önceki tez çalışmaları kapsamında spesifik primerlerin melting curve (erime eğrisi) analizleri yapılmıştır. Gen ekspresyonunun nicelleştirilmesi için, her bir gen transkripti için, floresan sinyalinin eşiğin üzerine çıkması için yani arka plan seviyesini aşması için gerekli döngülerin sayısı olarak tanımlanan döngü eşiği (Ct) belirlenmiştir (Wong ve Medrano, 2005). Floresans başlangıç sinyali ve eşik sinyali otomatik olarak qRT-PZR cihazı ile sayısal veri olarak belirlenmiştir. Transkript seviyeleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile hesaplanmıştır (Schmittgen ve Livak, 2008). Normalizasyon amacıyla her hücrede aynı miktarda ifade edilen, zorunlu idare geni (housekeeping) gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (*GAPDH*) miktarı, SH-SY5Y hücrelerinde hedef genlerin ifade düzeyleri ile karşılaştırılarak incelenmiş ve hedef genin nispi ekspresyonu olarak tanımlanmıştır. Nispi ekspresyon = $2^{-[\Delta Ct \text{ Örnek (Hedef-referans)} - \Delta Ct \text{ Kontrol (Hedef-referans)}]}$; ΔCt örnek: Uygulama yapılmış örneklerde hedef genin Ct değerinin referans genin Ct değerine göre farkıdır (Hedef Ct-Referans Ct). ΔCt Kontrol: Uygulama yapılmamış negatif kontrol örneklerinde hedef genin Ct değerinin referans genin Ct değerine göre farkıdır (Hedef Ct-Referans Ct) (Hu, Qu, Chu, Li ve He, 2018; Jia ve diğerleri, 2015; Li ve diğerleri, 2019b; Sun, Liao, Li ve Guo, 2017; Xiong, Li, Chen, Chen ve Huang, 2016; Yu ve diğerleri, 2007; Zhang ve diğerleri, 2015).

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primerler

Gen adı	İleri primer 5'→3'	Geri primer 5'→3'
<i>BAX</i>	GGAGCTGCAGAGGATGATTG	GGCCTTGAGCACCAGTTT
<i>BCL2</i>	GTGGATGACTGAGTACCTGAAC	GAGACAGCCAGGAGAAATCAA
<i>CASP3</i>	GAGCCATGGTGAAGAAGGAATA	TCAATGCCACAGTCCAGTTC
<i>CASP7</i>	CGAAACGGAACAGACAAAGATG	TTAAGAGGATGCAGGCGAAG
<i>CASP8</i>	GCCCAAACCTTCACAGCATTAG	GTGGTCCATGAGTTGGTAGATT
<i>CASP9</i>	CGACCTGACTGCCAAGAAA	CATCCATCTGTGCCGTAGAC
<i>CYCS</i>	GGAGAGGATACACTGATGGAGTA	GTCTGCCCTTTCTTCCTTCTT
<i>AKT/PKB</i>	ATGGCACCTTCATTGGCTAC	CCCAGCAGCTTCAGGTACTC
<i>ERK1</i>	CTACACGCAGTTGCAGTACAT	CAGCAGGATCTGGATCTCCC
<i>ERK2</i>	GCGCGGGCCCGGAGATGGTC	TGAAGCGCAGTAAGATTTTT
<i>JNK</i>	TTTGAGAACTCTTCCCTGAT	ATTGATGTACGGGTGTTGGA
<i>JUN</i>	GGTGGCACAGCTTAAACAGA	AACTGCTGCGTTAGCATGAG
<i>NF-κB/p65</i>	GCATCCAGACCAACAACAAC	ATGGGATGAGAAAGGACAGG
<i>p38 MAPK</i>	CCCGAGCGTTACCAGAAC	TCGCATGAATGATGGACTGAAT
<i>GAPDH</i>	TGAACGGGAAGCTCACTGG	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

3.2.16. İstatistiksel analizler

Çalışma sonuçları SPSS 16.0 programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Uygulama yapılmamış kontrol grubu ile $A\beta_{1-42}$ grubu ve L-EPS'ler uygulamasının ardından $A\beta_{1-42}$ uygulamasının yapıldığı grup arasındaki farklar t testi ile, ortalamalar arasındaki farklar tek yönlü Anova Post Hoc Tukey HSD ($p<0,05$) ile belirlenmiştir. L-EPS'lerin nörokoruyucu etkileri ile antioksidan aktiviteleri, $A\beta_{1-42}$ agregasyonu ve AChE enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkileri, TAS ve SOD, CAT, GPx enzim aktiviteleri üzerine indükleyici etkileri, TOS, hücre içi ROS miktarı ve apoptoz üzerine baskılayıcı etkileri, mitokondriyal membran potansiyeli üzerine koruyucu etkileri ve AKT/PKB, NF- κ B/p65, MAPK ve apoptoz sinyal yolları üzerine modülatör etkileri arasında ilişki olup olmadığı Pearson korelasyon katsayısına göre belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık %95 önem düzeyinde, $p<0,05$ olarak belirlenmiştir. Tüm analizler tekrarlı ve paralelli [MTT (n: 3), antioksidan aktivite (n: 3), agregasyon (n: 3), AChE enzim aktivitesi, TAS, SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri, TOS (n: 3), flow sitometre (n: 3), qRT-PCR (n: 3)] olarak çalışılmış ve sonuçlar, ortalama değer (OD) $\pm$ standart sapma (SD) olarak verilmiştir.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Çalışmada Kullanılan Suşlar

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan, yoğurt ve sağlıklı bebek gaitasından izole edilmiş suşlar içerisinde, probiyotik özellikleri bakımından kapsamlı taramalarla öne çıkan *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 ve *Lactiplantibacillus plantarum* GD2 suşları çalışmada kullanılmıştır. Suşların fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler tanımlamaları daha önceki tezler ve projeler kapsamında gerçekleştirildiği için elde edilen sonuçlar bu tez kapsamında verilmemiştir.

4.2. Liyofilize EPS (L-EPS)'lerin Miktarlarının Belirlenmesi

Suşların kültür ortamında ürettikleri ekzopolisakkarit (EPS)'ler saflaştırılarak L-EPS olarak elde edilmiştir. Liyofilize olarak kültür ortamında elde edilen EPS'lerin toplam karbohidrat miktarları fenol sülfürik asit yöntemi ile belirlenmiş olup, sonuçlar Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Suşların L-EPS üretim miktarları birbirine yakın bulunmuş olup, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşundan elde edilen L-EPS kısmi olarak öne çıkmıştır.

Çizelge 4.1. Suşların ürettiği liyofilize hale getirilmiş EPS'lerin miktarları (mg/L)

Suşlar	L-EPS miktarı (mg/L)
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> B3	435±5
<i>L. plantarum</i> GD2	385±4

Sonuçlar, n: 3, OD ± SD

4.3. L-EPS'lerin Karakterizasyonu

L-EPS'lerin yapısal özellikleri ile fonksiyonel özellikleri arasında pozitif bir ilişki bulunduğu için L-EPS'lerin karakterizasyonu oldukça önem arz etmektedir. L-EPS'lerin monomer yapısı yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile, moleküler ağırlığı büyüklükçe ayırma kromatografisi ile ve bağ yapıları 1D- ve 2D-nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ile farklı bir proje ve çalışma kapsamında belirlendiği için sonuçlar bu tez kapsamında verilmemiştir. Bu tez kapsamında L-EPS'lerin karakterizasyonuna devam

edilmiş olup, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin elemental, fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR), atomik kuvvet mikroskobu (AFM), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve X-ışını difraktometresi (XRD) analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu sayede, L-EPS'lerin azot, karbon, hidrojen, kükürt ve oksijen yüzdeleri, fonksiyonel grupları, yüzey morfolojileri ve kristalografik özellikleri belirlenmiştir.

4.3.1. Elemental analiz

Bu çalışmada, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin içerdiği azot, karbon, hidrojen, kükürt ve oksijen yüzdelerinin elemental analiz ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin elemental analiz sonuçları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin azot ve karbon yüzdeleri yüksek bulunurken, *L. plantarum* GD2 suşundan elde edilen L-EPS'nin ise oksijen yüzdesi yüksek bulunmuştur. Her iki şustan elde edilen L-EPS'lerin hidrojen yüzdeleri birbirine yakın bulunmuştur. L-EPS'lerin organik yapısında kükürt elementine ise hiç rastlanmamıştır.

Çizelge 4.2. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin azot, karbon, hidrojen, kükürt ve oksijen yüzdeleri (%)

Örnek adı	Azot	Karbon	Hidrojen	Kükürt	Oksijen
L-EPS B3	5,9±0,1	44,8±0,0	6,6±0,2	-	42,7±0,0
L-EPS GD2	1,6±0,1	23,3±0,0	6,4±0,1	-	68,7±0,1

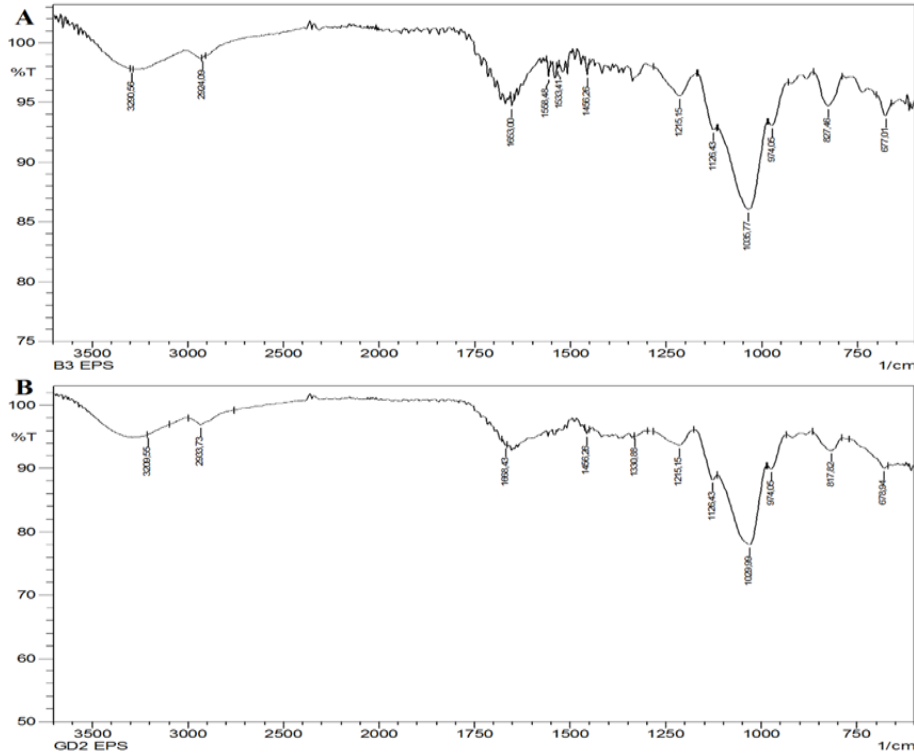
Sonuçlar, n: 3, OD ± SD

4.3.2. Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR)

Bu çalışmada, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin içerdiği fonksiyonel grupların FTIR analizi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, bu çalışma sayesinde L-EPS'lerin içerdiği fonksiyonel grupların L-EPS'lerin biyolojik aktivitesine olan olası katkıları değerlendirilmiştir.

Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin FTIR spektrumları Şekil 4.1'de verilmiştir. Suşların FTIR spektrumlarına göre 836 cm⁻¹'deki bandın α -D glukanın germe titreşimini temsil ettiği belirlenmiştir. 974 cm⁻¹'deki ana absorpsiyon bandı, C-O-C glikozit bağının germe

titreşimini göstermiştir. 800-1200 cm^{-1} arasındaki dalga sayısı, polisakkaritlerin parmak izi bölgesidir ve farklı polisakkaritlerin karakterize edilmesi için kullanılabilir. 1200 cm^{-1} 'deki bantlar, şeker monomerlerinin germe titreşimini temsil etmişlerdir. Üronik asit varlığında oluşan C=O grubunun karboksilat asimetrik germe ve gerdirmesi nedeniyle 1200-1400 cm^{-1} civarında zayıf sinyaller görülmüştür. 1650-1660 cm^{-1} 'deki bantlar genellikle C=O grubunun gerilme titreşimini temsil etmişlerdir. C=O grubunun ester karbonil germe ve gerdirmesi nedeniyle 1735 cm^{-1} 'de güçlü bir sinyal görülmüştür. 2850-2960 cm^{-1} 'deki bantlar, metil ve metilen gruplarının (-CH₂-)C-H gerilme titreşimini temsil etmişlerdir. Genellikle glikoz veya galaktoz gibi eksozlarda veya ramnoz gibi deoksiheksozlarda mevcuttur. 3300 cm^{-1} 'deki geniş bant, hidroksil gruplarının germe titreşimini temsil etmekte olup, bir karbonhidrat halkasının karakteristik pikidir. FTIR spektrumlarından elde edilen sonuçlar L-EPS'lerin tipik polimerik yapısını ortaya koymuş olup, L-EPS'lerin polisakkarit yapısında olduklarını doğrulamıştır. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin FTIR spektrumları birbirine benzer bulunmakla birlikte, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin polianyonik fonksiyonel grupların (hidroksil, amino, karbonil ve karboksil grupları gibi) oluşturduğu germe titreşiminin *L. plantarum* GD2 suşundan elde edilen L-EPS'ye göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

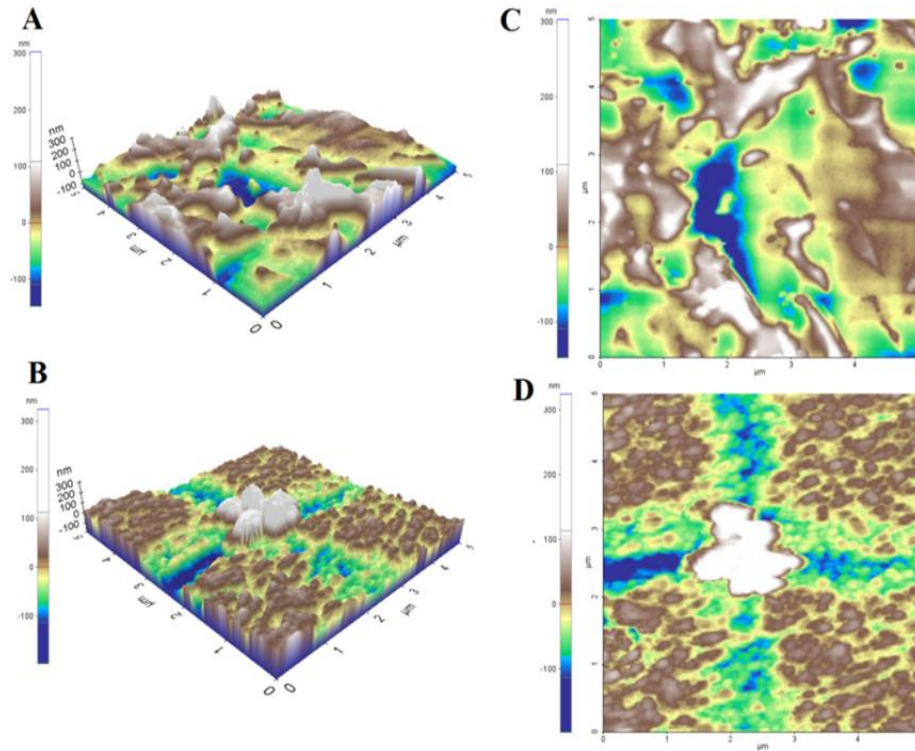


Şekil 4.1. *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 (A) ve *L. plantarum* GD2 (B) suşlarından elde edilen L-EPS'lerin FTIR spektrumları

4.3.3. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)

Bu çalışmada, AFM analizi ile suşlardan elde edilen L-EPS'lerin yüzeylerinin üç boyutlu görüntülenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma sayesinde L-EPS'lerin gösterdiği yüzey özellikleri ile hücre adezyon kapasiteleri arasındaki ilişki değerlendirilmiştir.

L-EPS'lerin AFM görüntüleri Şekil 4.2'de verilmiştir. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin yüzey morfolojilerindeki maksimum yükseklik sırasıyla, 303 ve 324 nm iken, minimum derinlik sırasıyla 147 ve 197 nm, pürüzlülük ortalaması ise sırasıyla 77 ve 63 nm'dir. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin yüzey morfolojileri farklılık göstermiştir. Maksimum yükseklik ve minimum derinlik ortalamasına göre *L. plantarum* GD2 suşundan elde edilen L-EPS öne çıkarken, pürüzlülük ortalamasına göre *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşundan elde edilen L-EPS öne çıkmıştır.

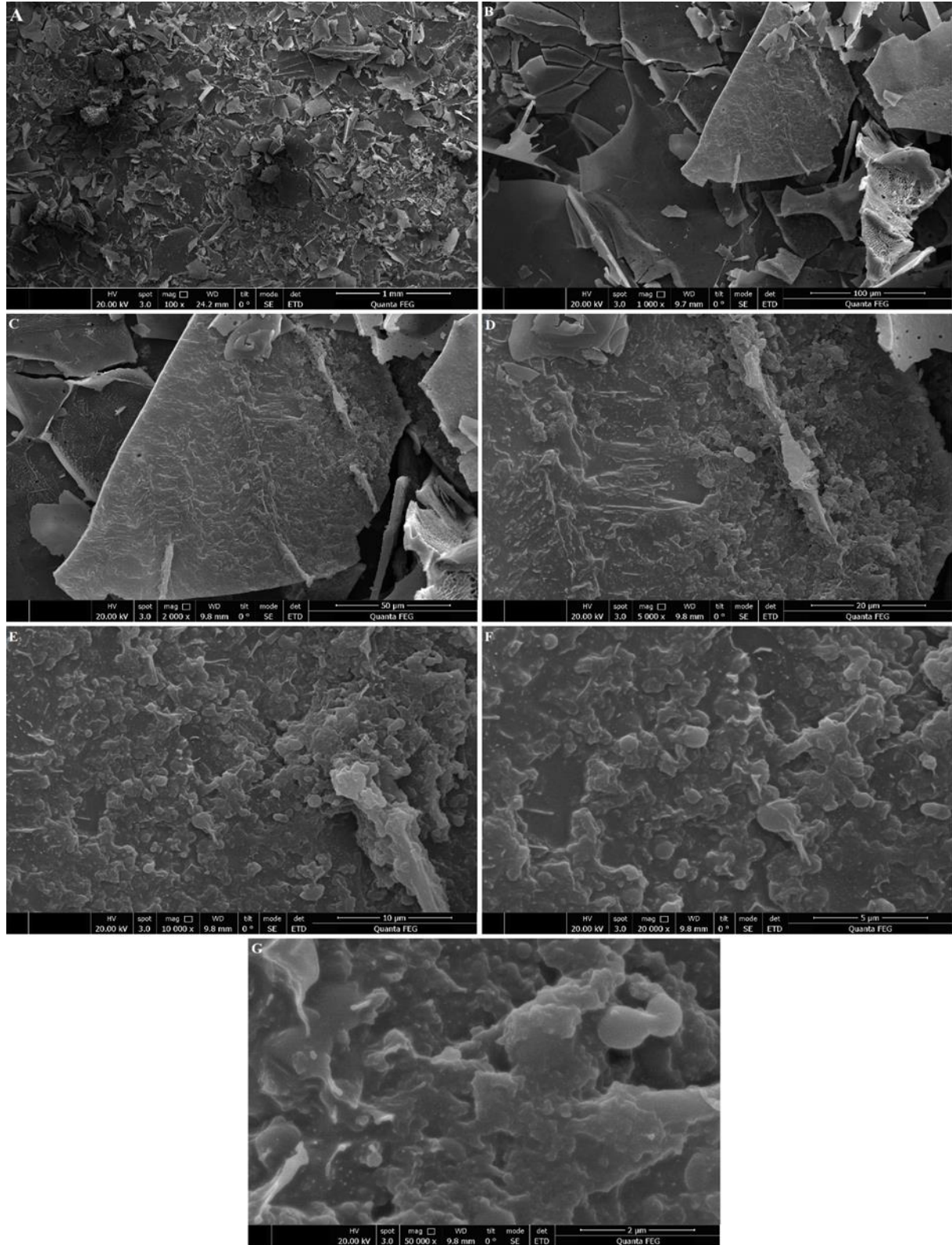


Şekil 4.2. *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 [(A) 3 boyutlu, (C) 2 boyutlu] ve *L. plantarum* GD2 [(B) 3 boyutlu, (D) 2 boyutlu] suşlarından elde edilen L-EPS'lerin AFM görüntüleri

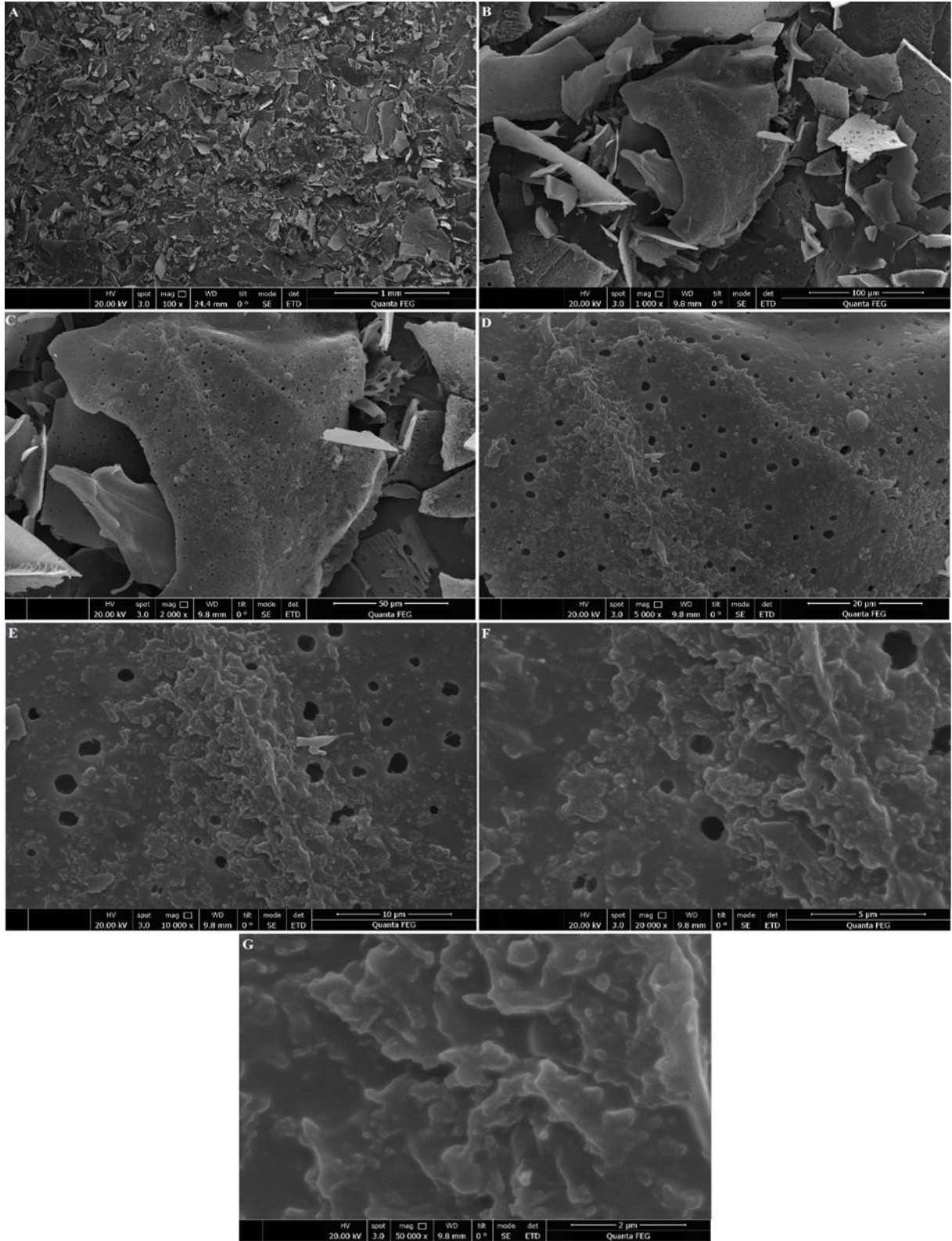
4.3.4. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Bu çalışmada, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin yüzey morfolojilerinin yüksek çözünürlükte SEM analizi ile görüntülenmesi amaçlanmıştır. Bu sayede L-EPS'lerin gösterdiği yüzey özelliklerinin hücre adezyonuna olan olası katkıları değerlendirilebilmiştir.

L-EPS'lerin farklı büyütme ölçeklerinde çekilen SEM görüntüleri Şekil 4.3 ve 4.4'de verilmiştir. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin yüzey morfolojileri birbirlerine göre farklılık göstermiştir. *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin yüzey morfolojisinin pürüzlü bir yapıya sahip olduğu, *L. plantarum* GD2 suşundan elde edilen L-EPS'nin ise gözenekli bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.3. *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin SEM görüntüsü (A) 100X, (B) 1000X, (C) 2000X, (D) 5000X, (E) 10.000X, (F) 20.000X ve (G) 50.000X

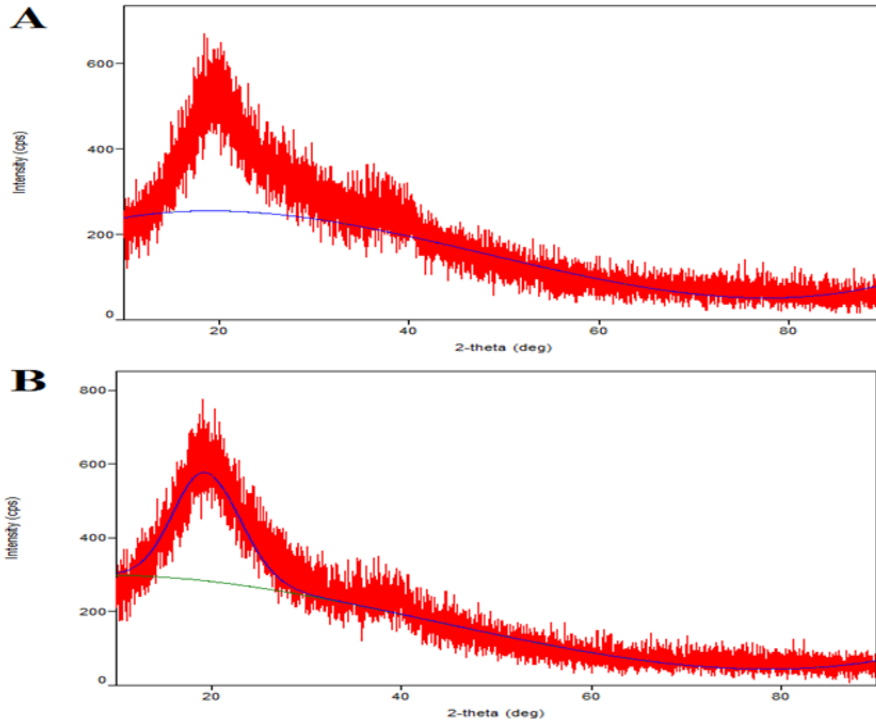


Şekil 4.4. *L. plantarum* GD2 suşundan elde edilen L-EPS'nin SEM görüntüsü (A) 100X, (B) 1000X, (C) 2000X, (D) 5000X, (E) 10.000X, (F) 20.000X ve (G) 50.000X

4.3.5. X-ışını difraktometresi (XRD)

Bu çalışmada, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin kristalografik özelliklerinin XRD analizi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre L-EPS'lerin sahip olduğu kristalografik özelliklerin L-EPS'lerin biyolojik aktivitesine olan olası etkileri değerlendirilmiştir.

L-EPS'lerin XRD desenleri Şekil 4.5'de verilmiştir. Güçlü ve dar pikler kristal karakteri gösterirken, küçük ve geniş pikler amorf karakteri göstermiştir. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin büyük ölçüde amorf veya zayıf bir mikro düzenlenme (zayıf kristalin) yapısına sahip oldukları görülmüştür. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin kristalografik özellikleri birbirine benzer bulunmuş olup, L-EPS'ler arasında belirgin bir farklılık tespit edilememiştir.



Şekil 4.5. *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 (A) ve *L. plantarum* GD2 (B) suşlarından elde edilen L-EPS'lerin XRD desenleri

L-EPS'lerin karakterizasyonuna genel bir değerlendirme yapacak olursak; elemental analiz sonuçlarına göre B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin azot ve karbon yüzdeleri yüksek bulunurken, GD2 suşundan elde edilen L-EPS'nin oksijen yüzdesi yüksek bulunmuştur. Her iki şustan elde edilen L-EPS'lerin hidrojen yüzdeleri birbirine yakın bulunmuştur. L-

EPS'lerin organik yapısında kükürt elementine ise hiç rastlanmamıştır. FTIR spektrumlarına göre B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin polianyonik fonksiyonel grupların (hidroksil, amino, karbonil ve karboksil grupları gibi) oluşturduğu germe titreşimi GD2 suşundan elde edilen L-EPS'ye göre daha fazladır. AFM görüntülerine göre maksimum yükseklik ve minimum derinlik ortalamasına göre GD2 suşundan elde edilen L-EPS öne çıkarken, pürüzlülük ortalamasına göre B3 suşundan elde edilen L-EPS öne çıkmıştır. SEM görüntülerine göre B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin yüzey morfolojisinin pürüzlü bir yapıya sahip olduğu, GD2 suşundan elde edilen L-EPS'nin ise gözenekli bir yapıya sahip olduğu saptanmıştır. XRD desenlerine göre suşlardan elde edilen L-EPS'lerin büyük ölçüde amorf veya zayıf bir mikro düzenlenme (zayıf kristalin) yapısına sahip oldukları gözlenmiştir. B3 ve GD2 suşlarından elde edilen L-EPS'ler arasında kristalografik özellikleri bakımından belirgin bir farklılık tespit edilememiştir.

4.4. L-EPS'lerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin antioksidan aktivitelerinin (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikalini süpürme aktivitesi, hidroksil radikalini süpürme aktivitesi, süperoksit anyon radikalini süpürme aktivitesi ve lipid peroksidasyonun inhibisyon oranı) mikropilaka okuyucu ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Antioksidan aktivite sonuçları Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. L-EPS'lerin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak gösterdikleri antioksidan aktivitelerinin de arttığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Denenen serbest radikallere göre L-EPS'lerin süpürme aktiviteleri farklılık göstermiştir. Her iki suşun L-EPS'lerinin serbest radikalleri süpürme aktivitesi DPPH > Hidroksil > Süperoksit radikali şeklinde belirlenmiş olup, L-EPS'ler arasından *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin *L. plantarum* GD2 suşundan elde edilen L-EPS'ye göre daha yüksek serbest radikalleri süpürme aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı şekilde demir iyonunu şelatlama aktivitesi ve lipid peroksidasyonun inhibisyonu bakımından da en iyi sonucu, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin 1250 µg/mL konsantrasyonu göstermiştir (%46; %48).

Çizelge 4.3. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin yüzde (%) antioksidan aktivite sonuçları

Uygulamalar	DPPH serbest radikalini süpürme aktivitesi		Hidroksil radikalini süpürme aktivitesi		Süperoksit anyon radikalini süpürme aktivitesi		Demir iyonunu şelatlama aktivitesi		Lipit peroksidasyonun % inhibisyon oranı	
Pozitif kontrol ^a	95±4		60±2		98±2		94±3		25±1	
<u>L-EPS (µg/mL)</u>	<u>L-EPS B3</u>	<u>L-EPS GD2</u>	<u>L-EPS B3</u>	<u>L-EPS GD2</u>	<u>L-EPS B3</u>	<u>L-EPS GD2</u>	<u>L-EPS B3</u>	<u>L-EPS GD2</u>	<u>L-EPS B3</u>	<u>L-EPS GD2</u>
100	6±1*	3±1*	7±1*	5±1*	3±0*	2±1*	13±2*	11±0*	12±0*	10±0*
250	14±2*	12±2*	13±0*	7±2*	8±1*	6±0*	18±1*	14±2*	19±2*	16±2*
500	25±3*	23±1*	24±2*	16±0*	19±2*	16±3*	28±1*	26±1*	28±1*	24±2*
1000	42±2*	38±2*	36±1*	34±2*	36±3*	27±2*	38±2*	34±2*	37±1*	36±1*
1250	58±1*	53±1*	54±2*	48±2*	48±2*	36±1*	46±2*	43±3*	48±2*	42±1*

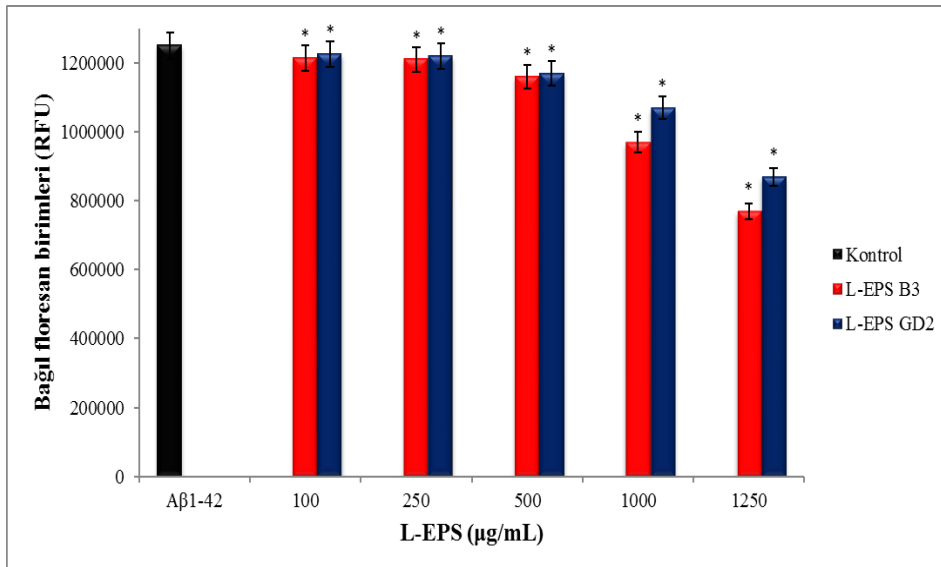
^aSerbest radikallerin süpürme aktivitesi ve lipit peroksidasyonunun inhibisyonu için pozitif kontrol olarak askorbik asit kullanılırken; demir iyonunu şelatlama aktivitesi için etilendiamin tetra asetik asit-sodyum kullanılmıştır.

Sonuçlar, n: 3, OD ± SD, Tukey testi, * $p < 0,05$

4.5. L-EPS'lerin Amiloid β ($A\beta$)₁₋₄₂ Agregasyonu Üzerine İnhibitör Etkilerinin Belirlenmesi

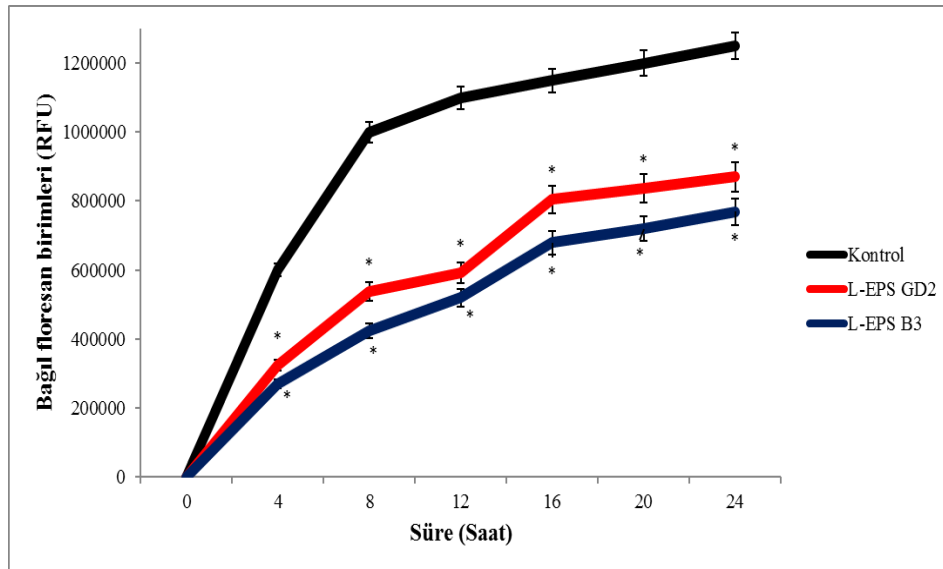
Bu çalışmada, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin $A\beta$ ₁₋₄₂ agregasyonu üzerine inhibitör etkilerinin tiyoflavin T testi kullanılarak, mikropilaka okuyucu ile belirlenmesi amaçlanmıştır. $A\beta$ ₁₋₄₂ agregasyonunun inhibisyonu AH tedavisinde güncel olarak hedeflenen ana stratejilerden birisi olduğu için, L-EPS'lerin $A\beta$ ₁₋₄₂ agregasyonu üzerine inhibitör etkilerinin belirlenmesi önem taşımaktadır.

Sonuçlar Şekil 4.6'da verilmiştir. $A\beta$ ₁₋₄₂'nin kendisi ile agregasyonu sonucu $A\beta$ oligomerleri ve $A\beta$ fibrilleri oluşmaktadır. $A\beta$ oligomerleri ve $A\beta$ fibrillerinden de $A\beta$ plaklarının oluştuğu bilinmektedir. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin 24 saat uygulama süresinde artan konsantrasyonlarına bağlı olarak $A\beta$ ₁₋₄₂ agregasyonunu kontrol grubuna göre %2-38 arasında değişen oranlarda azalttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). $A\beta$ ₁₋₄₂ agregasyonunun artan L-EPS konsantrasyonlarına bağlı olarak azalması L-EPS'lerin $A\beta$ ₁₋₄₂ agregasyonuna karşı inhibitör etkilerini göstermiştir. Her iki suştan elde edilen L-EPS'lerin artan konsantrasyonlarında $A\beta$ ₁₋₄₂ agregasyonunu azalttığı belirlenmiştir. En iyi inhibisyonu %38 oranında *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşunun 1250 $\mu\text{g/mL}$ L-EPS uygulaması göstermiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Suşlardan elde edilen farklı konsantrasyonlardaki L-EPS'lerin $A\beta$ ₁₋₄₂ agregasyonu üzerine inhibitör etkileri. Sonuçlar, n: 3, OD $\pm$ SD, Tukey testi, * $p<0,05$, Kontrol grubuna ($A\beta$ ₁₋₄₂) göre L-EPS uygulanmış gruplardaki bağlı floresan birimleri (RFU)

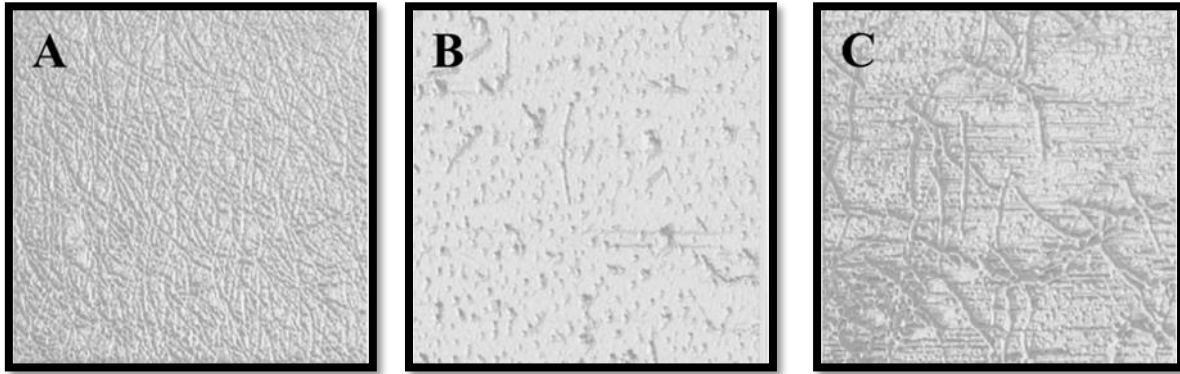
Suşlardan elde edilen 1250 µg/mL konsantrasyondaki L-EPS'lerin ($A\beta_{1-42}$ agregasyonu üzerine en iyi inhibitör etkiyi göstermiş olan konsantrasyon) artan uygulama sürelerine baēlı olarak $A\beta_{1-42}$ agregasyonunu kontrol grubuna göre %0-38 arasında deēişen oranlarda azalttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). $A\beta_{1-42}$ agregasyonunun artan L-EPS uygulama sürelerine baēlı olarak azalması L-EPS'lerin $A\beta_{1-42}$ agregasyonuna karşı inhibitör etkilerini göstermiştir. Her iki suştan elde edilen L-EPS'lerin artan uygulama sürelerinde $A\beta_{1-42}$ agregasyonunu azalttığı belirlenmiş olup, en yüksek inhibitör etkiyi *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin 24 saat uygulama süresi göstermiştir (%38) (Şekil 4.7). Elde ettiğimiz sonuçlara göre L-EPS'lerin $A\beta_{1-42}$ agregasyonuna karşı en etkin konsantrasyonun 1250 µg/mL ve en etkin uygulama süresinin ise 24 saat olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. Suşlardan elde edilen farklı uygulama süreleri denenilen 1250 µg/mL'deki L-EPS'lerin $A\beta_{1-42}$ agregasyonu üzerine inhibitör etkileri. Sonuçlar, n: 3, OD ± SD, Tukey testi, * $p<0,05$ Kontrol grubuna göre L-EPS uygulanmış gruptaki baēlı floresan birimleri (RFU)

Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin en etkin koşulları (1250 µg/mL konsantrasyon ve 24 saat uygulama süresi) kullanılarak $A\beta_{1-42}$ agregasyonu üzerine inhibitör etkileri AFM ile de belirlenmiş olup, sonuçlar Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Şekil 4.8A'da $A\beta_{1-42}$ 'nin kendisi ile agregasyonu sonucu $A\beta$ oligomerlerinin ve $A\beta$ fibrillerinin oluştuēu gözlenmiştir. Şekil 4.8B ve C'de ise suşlardan elde edilen L-EPS'lerin (1250 µg/mL konsantrasyon ve 24 saat uygulama süresi) $A\beta_{1-42}$ 'nin kendisi ile agregasyonu sonucu oluşan $A\beta$ oligomerlerini ve $A\beta$ fibrillerini inhibe ettikleri tespit edilmiştir. AFM görüntülerine göre de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin agrege olmuş $A\beta_{1-42}$ 'yi daha fazla

depolimerize ederek öne çıktığı görülmüştür. Elde ettiğimiz sonuçlar, L-EPS'lerin AH tedavisinde $A\beta_{1-42}$ agregasyonunun inhibitörü olarak kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.



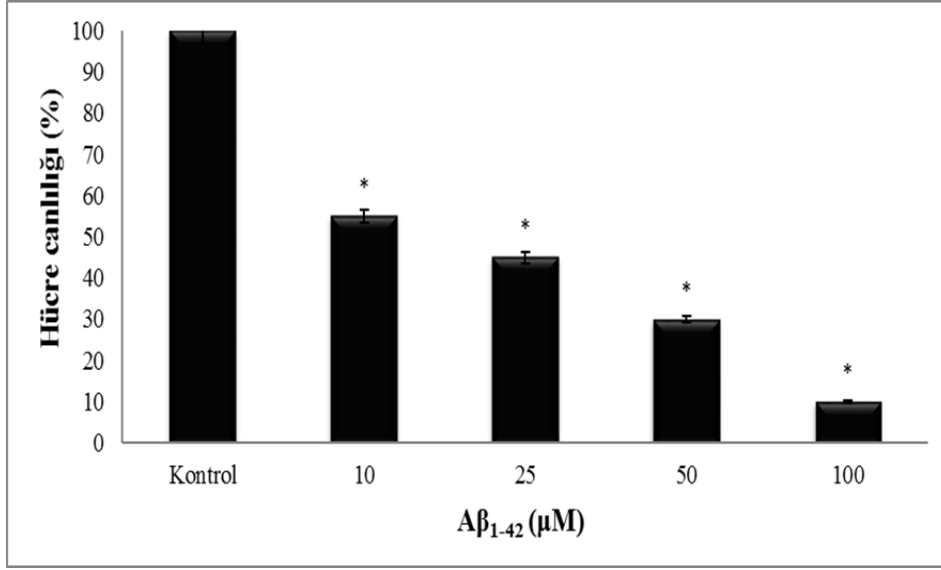
Şekil 4.8. L-EPS'lerin $A\beta_{1-42}$ agregasyonu üzerine inhibitör etkilerinin AFM görüntüleri. [A: $A\beta_{1-42}$, B: $A\beta_{1-42}$ + L-EPS B3 (1250 $\mu\text{g/mL}$, 24 saat), C: $A\beta_{1-42}$ + L-EPS GD2 (1250 $\mu\text{g/mL}$, 24 saat)]

4.6. 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil Tetrazolium Bromid; Tiazolil Mavi (MTT) Yöntemi ile Belirlenen Sitotoksikite Sonuçları

$A\beta_{1-42}$ 'nin hücre canlılığı üzerine sitotoksik etkisinin belirlenmesi

Bu çalışmada, $A\beta_{1-42}$ 'nin Alzheimer hastalığı (AH) modeli oluşturmak üzere hücre canlılığı üzerine sitotoksik etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, $A\beta_{1-42}$ (0-100 μM) ile muamele edilen SH-SY5Y hücreleri 24 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığı belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak hiçbir uygulama yapılmamış SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır. $A\beta_{1-42}$ 'nin artan konsantrasyonlarında SH-SY5Y hücrelerine sitotoksik etkisinin arttığı bundan kaynaklı olarak da hücre canlılığının azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$). 25 μM ve üzeri konsantrasyonlarda $A\beta_{1-42}$ 'nin SH-SY5Y hücrelerine %55-90 arasında değişen yüksek oranlarda sitotoksik etkisinin olduğu belirlenmiştir. $A\beta_{1-42}$ 'nin SH-SY5Y hücreleri üzerinde AH modeli oluşturabilecek ancak yüksek oranda sitotoksik etkisi olmayan etkin konsantrasyonu tespit edilmiştir. Bundan sonraki çalışmalara bu konsantrasyon (10 μM) ile devam edilmiştir (Şekil 4.9).

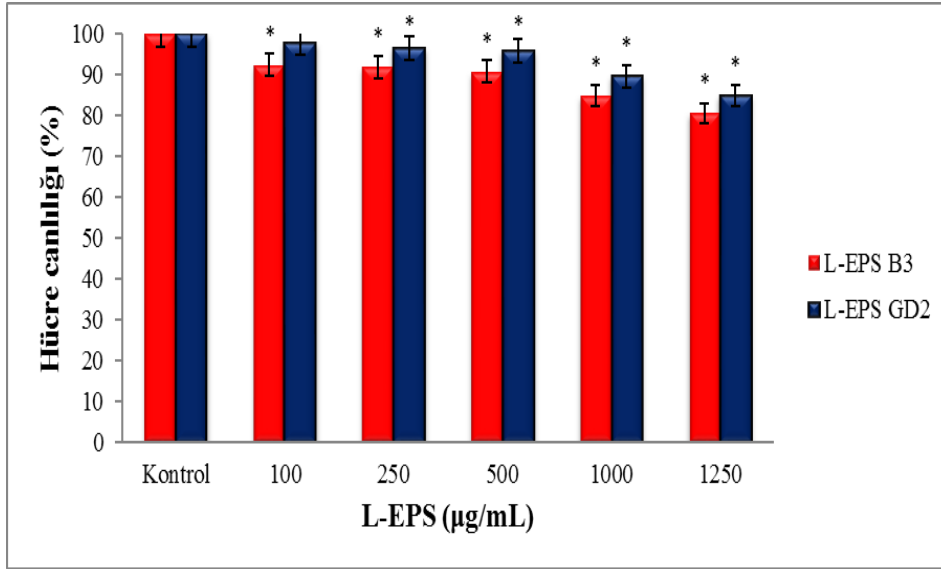


Şekil 4.9. Aβ₁₋₄₂'nin hücre canlılığı üzerine sitotoksik etkisi. Sonuçlar, n: 3, OD ± SD, Tukey testi, **p*<0,05 Kontrol grubuna göre Aβ₁₋₄₂ uygulanmış gruplardaki hücre canlılığı (%)

L-EPS'lerin hücre canlılığı üzerine sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Bu çalışmada, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin AH tedavisinde kullanılan Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmış ve yan etkisi bulunan ilaçlara alternatif olabileceği görüşünü desteklemek üzere hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, suşlardan elde edilen L-EPS'ler (0-1250 μg/mL) ile muamele edilen SH-SY5Y hücreleri 24 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığı belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak hiçbir uygulama yapılmamış SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin artan konsantrasyonlarında SH-SY5Y hücrelerine sitotoksik etkilerinin arttığı belirlenmiştir (*p*>0,05). Ancak, uygulama yapılan tüm gruplar incelendiğinde L-EPS'lerin SH-SY5Y hücrelerine %2-19,3 arasında değişen düşük oranlarda sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.10). Elde ettiğimiz sonuçlardan L-EPS'lerin uygulanan en yüksek konsantrasyonda dahi hücre canlılığını %80,7'nin üzerinde azaltmadığı gözlenmiştir. L-EPS'lerin SH-SY5Y hücrelerinin canlılığını düşük oranda etkilemesi (sitotoksik olmayan etki) AH tedavisinde güvenli olarak kullanılabilirliğinin kanıtı olmuştur.



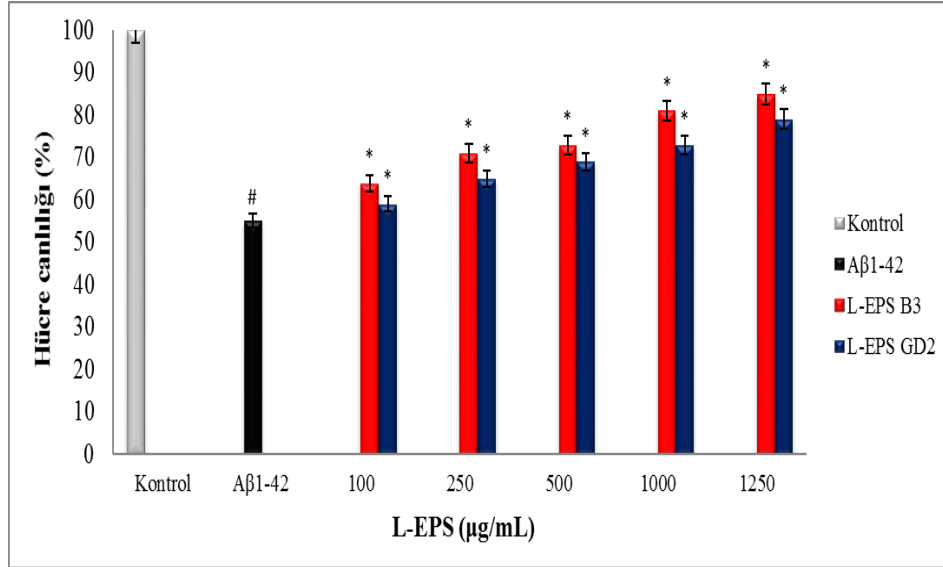
Şekil 4.10. L-EPS’lerin hücre canlılığı üzerine sitotoksik etkileri. Sonuçlar, n: 3, OD ± SD, Tukey testi, * $p < 0,05$ Kontrol grubuna göre L-EPS uygulanmış gruplardaki hücre canlılığı (%)

A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS’lerin hücre ölümüne karşı koruyucu etkilerinin belirlenmesi

Bu çalışmada, A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde suşlardan elde edilen L-EPS’lerin hücre ölümüne karşı koruyucu etkilerinin MTT yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, suşlardan elde edilen L-EPS’ler (0-1250 µg/mL) ile muamele edilen SH-SY5Y hücreleri 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından kuyulardaki L-EPS’li besi ortamı çekilip, SH-SY5Y hücreleri A β_{1-42} (10 µM) ile 24 saat boyunca muamele edilmiş ve inkübasyon süresi sonunda hücre ölümü belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak hiçbir uygulama yapılmamış SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır. A β_{1-42} , hücre ölümünü kontrol grubuna göre %45 oranında arttırmıştır ($p < 0,05$). A β_{1-42} ’nin sitotoksik etkisi sonucunda hücre ölümünü arttırdığı tespit edilmiş olup, bu sayede AH modeli başarı ile oluşturulmuştur. Diğer yandan, suşlardan elde edilen farklı konsantrasyonlardaki L-EPS’lerin ise hücre ölümünü A β_{1-42} grubuna göre %4-30 arasında değişen oranlarda azalttığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$). L-EPS’ler ile yapılan uygulama sonucunda azalan sitotoksik etki ve artan hücre canlılığı, L-EPS’lerin A β_{1-42} ile hücrelerde oluşturulan AH modelinde hücre ölümüne karşı koruyucu etkilerini göstermiştir. Her iki suştan elde edilen L-EPS’lerin artan konsantrasyonlarında hücre

ölümünü azalttığı belirlenmiştir. En yüksek koruyuculuk *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin 1250 µg/mL konsantrasyonunda belirlenmiş olup, kontrole göre hücre ölümünü %30 oranında azaltmıştır (Şekil 4.11). Çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar L-EPS'lerin AH tedavisinde Aβ₁₋₄₂'nin oluşturduğu hücre ölümüne karşı koruyucu ajan olarak kullanılabilirliğini göstermiştir.

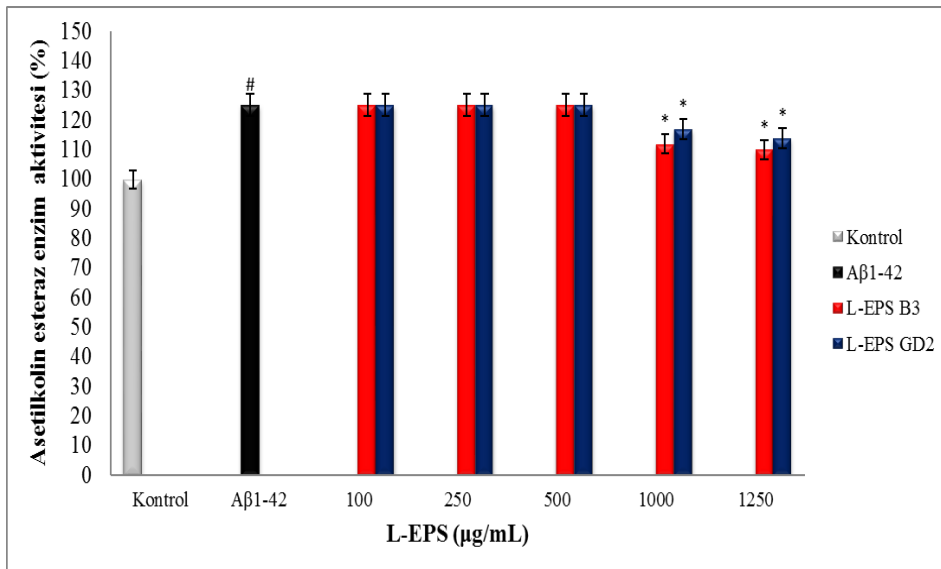


Şekil 4.11. Aβ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin hücre ölümüne karşı koruyucu etkileri. Sonuçlar, n: 3, OD ± SD, Tukey testi, [#]*p*<0,05 Kontrol grubuna göre Aβ₁₋₄₂ uygulanmış gruptaki hücre canlılığı (%). ^{*}*p*<0,05 Aβ₁₋₄₂ grubuna göre L-EPS uygulanmış gruptaki hücre canlılığı (%)

4.7. Aβ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y Hücrelerinde Oluşturulan AH Modelinde L-EPS'lerin Asetilkolin Esteraz (AChE) Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkilerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, Aβ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde suşlardan elde edilen L-EPS'lerin AChE enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkilerinin Ellman yöntemi kullanılarak mikropilaka okuyucu ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Günümüzde AH kısmi tedavisinde bazı semptomları iyileştirmek için kullanılan ilaçlar AChE inhibitörüdür. AChE inhibitörleri, AChE enzim aktivitesini inhibe ederek, asetilkolinin yıkımını önlerler. Nöronal sinaptaki asetilkolin miktarını artırarak ve kolinerjik sinapslardaki etkisini uzatarak işlev görürler. Bu bağlamda L-EPS'lerin AH'deki kolinerjik eksikliğin giderilebilmesi için AChE enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkilerinin tespit edilmesi önem taşımaktadır.

A β ₁₋₄₂, AChE enzim aktivitesini kontrol grubuna göre %25 oranında arttırmıştır ($p<0,05$). A β ₁₋₄₂ ile yapılan uygulama sonucunda AChE enzim aktivitesinin indüklendiği belirlenmiştir. Diğer yandan, suşlardan elde edilen 100, 250 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki L-EPS'lerin AChE enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkileri tespit edilememiştir ($p<0,05$). Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin sadece 1000 ve 1250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonları A β ₁₋₄₂ ile indüklenen AChE enzim aktivitesini %8-15 arasında değişen oranlarda inhibe ettiği belirlenmiştir ($p>0,05$). Her iki suştan elde edilen L-EPS'lerin 1000 ve 1250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda AChE enzim aktivitesinin inhibisyonu birbirine yakın olmakla birlikte, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin 1250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu biraz daha öne geçmiştir (%15) (Şekil 4.12). Çalışmamız sonuçları 1000 ve 1250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki L-EPS'lerin AH'de kolinerjik transmisyonu düzeltmek için AChE inhibitörü olarak kullanılabileceğini göstermiştir.



Şekil 4.12. A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin AChE enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkileri. Sonuçlar, n: 3, OD $\pm$ SD, Tukey testi, # $p<0,05$ Kontrol grubuna göre A β ₁₋₄₂ uygulanmış gruptaki AChE enzim aktivitesi (%). * $p<0,05$ A β ₁₋₄₂ grubuna göre L-EPS uygulanmış gruptaki AChE enzim aktivitesi (%)

4.8. A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y Hücrelerinde Oluşturulan AH Modelinde L-EPS'lerin Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Üzerine İndükleyici Etkilerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde suşlardan elde edilen L-EPS'lerin TAS üzerine indükleyici etkilerinin ticari kit kullanılarak mikropilaka

okuyucu ile belirlenmesi amaçlanmıştır. AH'nin fizyopatolojisi ile ilişkili hipotezlerden birisi de oksidatif stres hipotezidir. Bu sebeple $A\beta_{1-42}$ ile oluşturulan oksidatif strese karşı L-EPS'lerin TAS'ı indükleyici ajan olarak kullanabilirliğinin belirlenmesi önem taşımaktadır.

$A\beta_{1-42}$, TAS'ı kontrol grubuna göre %18 oranında azaltmıştır ($p<0,05$). $A\beta_{1-42}$, reaktif oksijen türleri (ROS)'nin üretimini indükleyerek TAS'ı azaltmış bunun sonucunda da çalışmada kullanılacak hücre modelinde oksidatif stres oluşturmuştur. Diğer yandan, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin artan konsantrasyonlarında ise TAS'ı $A\beta_{1-42}$ grubuna göre %36-69 arasında değişen oranlarda arttırdığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Artan TAS, L-EPS'lerin $A\beta_{1-42}$ ile oluşturulan oksidatif strese karşı antioksidan etkilerini göstermiştir. Suşlardan elde edilen tüm konsantrasyonlardaki L-EPS'lere ait TAS'ın kontrol grubundan daha yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. Her iki suştan elde edilen L-EPS'lerin artan konsantrasyonlarında TAS'ı arttırdığı saptanmıştır. En iyi sonucu *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin 1250 $\mu\text{g/mL}$ uygulaması göstermiş olup, TAS'ı %69 oranında arttırdığı gözlenmiştir (Çizelge 4.4). Çalışmadan elde edilen sonuçlar, L-EPS'lerin gösterdikleri antioksidan aktivite sonucunda azalan TAS'ı arttırarak $A\beta_{1-42}$ ile indüklenen oksidatif strese karşı koruma sağladığını göstermiştir.

Çizelge 4.4. $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin TAS üzerine indükleyici etkileri

Uygulamalar	TAS (μmol Troloks eşdeğeri/mg)	
Kontrol	0,337 $\pm$ 0,015	
$A\beta_{1-42}$	0,275 $\pm$ 0,031 [#]	
L-EPS ($\mu\text{g/mL}$)	L-EPS B3	L-EPS GD2
100	0,428 $\pm$ 0,021 [*]	0,375 $\pm$ 0,028 [*]
250	0,435 $\pm$ 0,019 [*]	0,382 $\pm$ 0,017 [*]
500	0,441 $\pm$ 0,014 [*]	0,390 $\pm$ 0,032 [*]
1000	0,458 $\pm$ 0,022 [*]	0,398 $\pm$ 0,025 [*]
1250	0,465 $\pm$ 0,033 [*]	0,407 $\pm$ 0,019 [*]

Sonuçlar, n: 3, OD $\pm$ SD, Tukey testi, [#] $p<0,05$ Kontrol grubuna göre $A\beta_{1-42}$ uygulanmış gruptaki TAS (μmol Troloks eşdeğeri/mg). ^{*} $p<0,05$ $A\beta_{1-42}$ grubuna göre L-EPS uygulanmış gruptaki TAS (μmol Troloks eşdeğeri/mg)

4.9. A β ₁₋₄₂ ile Oluşturulan AH Modelinde L-EPS'lerin Sodyum Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktiviteleri Üzerine İndükleyici Etkilerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde suşlardan elde edilen L-EPS'lerin SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri üzerine indükleyici etkilerinin ticari kit kullanılarak mikropilaka okuyucu ile belirlenmesi amaçlanmıştır. AH'deki nörolojik bozukluklara katkıda bulunan en önemli faktörlerden biri oksidatif strestir. Bu sebeple, L-EPS'lerin oksidatif strese karşı gösterdiği koruyucu etkisindeki antioksidan enzim aktivitelerinin rolünün belirlenmesi önem arz etmektedir.

A β ₁₋₄₂'nin SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerini kontrol grubuna göre sırasıyla %62; %58 ve %34 oranında azalttığı belirlenmiştir ($p<0,05$). A β ₁₋₄₂, temel antioksidan savunma hattındaki SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerini azaltarak, SH-SY5Y hücrelerini ROS'a karşı savunmasız hale getirmiştir. Bu sayede hücrelerde ROS kaynaklı oksidatif stres oluşmuştur. Diğer yandan, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin ise SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerini A β ₁₋₄₂ grubuna göre sırasıyla %104-296; %48-211 ve %32-90 arasında değişen oranlarda arttırdığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Artan SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri, L-EPS'lerin A β ₁₋₄₂'ye karşı temel antioksidan savunmayı güçlendirdiğini göstermiştir. L-EPS'lerin SOD enzim aktivitesine etkisi en yüksek iken, GPx enzim aktivitesine etkisi ise en düşüktür. B3 suşundan elde edilen 250, 500, 1000 ve 1250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki L-EPS'ye ve GD2 suşundan elde edilen 500, 1000 ve 1250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki L-EPS'ye ait SOD ve GPx enzim aktivitelerinin kontrol grubundan daha yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. B3 ve GD2 suşundan elde edilen 1000 ve 1250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki L-EPS'lerin CAT enzim aktivitesi kontrol grubundan daha yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. Her iki suştan elde edilen L-EPS'lerin artan konsantrasyonlarında SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerini arttırdığı belirlenmiş olup, en yüksek indükleyici etkiyi *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin 1250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu göstermiştir (%296; %211 ve %90) (Çizelge 4.5, 4.6 ve 4.7). Elde ettiğimiz sonuçlara göre L-EPS'ler antioksidan enzim aktivitelerini (SOD, CAT ve GPx) indükleyerek antioksidan etki göstermiş olup, A β ₁₋₄₂ tarafından oluşturan ROS kaynaklı oksidatif strese karşı koruyucu etki göstermişlerdir.

Çizelge 4.5. A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin SOD enzim aktivitesi üzerine indükleyici etkileri

Uygulamalar	SOD (U/mg)	
Kontrol	13,5 $\pm$ 0,2	
A β_{1-42}	5,2 $\pm$ 0,1 [#]	
<u>L-EPS (μg/mL)</u>	<u>L-EPS B3</u>	<u>L-EPS GD2</u>
100	11,3 $\pm$ 0,0*	10,6 $\pm$ 0,2*
250	13,7 $\pm$ 0,1*	12,8 $\pm$ 0,0*
500	16,8 $\pm$ 0,3*	15,7 $\pm$ 0,1*
1000	18,2 $\pm$ 0,2*	17,3 $\pm$ 0,3*
1250	20,6 $\pm$ 0,0*	19,8 $\pm$ 0,3*

Sonuçlar, n: 3, OD $\pm$ SD, Tukey testi, [#] $p < 0,05$ Kontrol grubuna göre A β_{1-42} uygulanmış gruptaki SOD enzim aktivitesi (U/mg). * $p < 0,05$ A β_{1-42} grubuna göre L-EPS uygulanmış gruplardaki SOD enzim aktivitesi (U/mg)

Çizelge 4.6. A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin CAT enzim aktivitesi üzerine indükleyici etkileri

Uygulamalar	CAT (U/mg)	
Kontrol	14,8 $\pm$ 0,3	
A β_{1-42}	6,2 $\pm$ 0,0 [#]	
<u>L-EPS (μg/mL)</u>	<u>L-EPS B3</u>	<u>L-EPS GD2</u>
100	9,5 $\pm$ 0,1*	8,2 $\pm$ 0,0*
250	11,3 $\pm$ 0,2*	10,7 $\pm$ 0,3*
500	14,2 $\pm$ 0,0*	13,2 $\pm$ 0,1*
1000	16,7 $\pm$ 0,2*	15,4 $\pm$ 0,0*
1250	18,3 $\pm$ 0,1*	17,6 $\pm$ 0,3*

Sonuçlar, n: 3, OD $\pm$ SD, Tukey testi, [#] $p < 0,05$ Kontrol grubuna göre A β_{1-42} uygulanmış gruptaki CAT enzim aktivitesi (U/mg). * $p < 0,05$ A β_{1-42} grubuna göre L-EPS uygulanmış gruplardaki CAT enzim aktivitesi (U/mg)

Çizelge 4.7. A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin GPx enzim aktivitesi üzerine indükleyici etkileri

Uygulamalar	GPx (U/mg)	
Kontrol	22,4 $\pm$ 0,0	
A β_{1-42}	14,8 $\pm$ 0,3 [#]	
<u>L-EPS (μg/mL)</u>	<u>L-EPS B3</u>	<u>L-EPS GD2</u>
100	20,2 $\pm$ 0,2*	19,6 $\pm$ 0,2*
250	22,6 $\pm$ 0,0*	21,6 $\pm$ 0,3*
500	24,5 $\pm$ 0,1*	23,5 $\pm$ 0,0*
1000	26,9 $\pm$ 0,2*	25,6 $\pm$ 0,3*
1250	28,1 $\pm$ 0,0*	27,8 $\pm$ 0,1*

Sonuçlar, n: 3, OD $\pm$ SD, Tukey testi, [#] $p < 0,05$ Kontrol grubuna göre A β_{1-42} uygulanmış gruptaki GPx enzim aktivitesi (U/mg). * $p < 0,05$ A β_{1-42} grubuna göre L-EPS uygulanmış gruplardaki GPx enzim aktivitesi (U/mg)

4.10. A β ₁₋₄₂ ile Oluşturulan AH Modelinde L-EPS'lerin Total Oksidan Seviyesi (TOS) Üzerine Baskılayıcı Etkilerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde suşlardan elde edilen L-EPS'lerin TOS üzerine baskılayıcı etkilerinin ticari kit kullanılarak mikropilaya okuyucu ile belirlenmesi amaçlanmıştır. AH ile ilgili araştırmalarda ilgi odağı haline gelen oksidatif stres teorisi merkezi bir rol oynamaktadır. Bu sebeple A β ₁₋₄₂ ile oluşturulan oksidatif strese karşı L-EPS'lerin TOS'u baskılayıcı ajan olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi önem taşımaktadır.

A β ₁₋₄₂'nin TOS'u kontrol grubuna göre %42 oranında arttırdığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Oksidatif stres, TAS ile TOS arasındaki dengenin bozulması nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Artan TOS, oksidatif stresin belirteçidir. Diğer yandan, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin ise TOS'u A β ₁₋₄₂ grubuna göre %21-47 arasında değişen oranlarda azalttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Azalan TOS, L-EPS'lerin A β ₁₋₄₂ ile oluşturulan oksidatif strese karşı baskılayıcı etkilerini göstermiştir. Ayrıca, B3 suşundan elde edilen 500, 1000 ve 1250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki L-EPS'nin ve GD2 suşundan elde edilen 1000 ve 1250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki L-EPS'nin TOS'u kontrol grubundan daha düşük seviyede olduğu belirlenmiştir. Her iki suştan elde edilen L-EPS'lerin artan konsantrasyonlarında TOS'u azalttığı belirlenmiş olup, en yüksek baskılayıcı etkiyi *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin 1250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu göstermiştir (%47) (Çizelge 4.6). Çalışmadan elde edilen sonuçlar L-EPS'lerin gösterdikleri antioksidan aktivite sonucunda artan TOS'u azaltarak A β ₁₋₄₂ ile indüklenen oksidatif strese karşı koruma sağladığını göstermiştir.

Çizelge 4.8. A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin TOS üzerine baskılayıcı etkileri

Uygulamalar	TOS (μmol hidrojen peroksit eşdeğeri/mg)	
Kontrol	6,9 $\pm$ 0,2	
A β_{1-42}	9,8 $\pm$ 0,3 [#]	
L-EPS ($\mu\text{g/mL}$)	L-EPS B3	L-EPS GD2
100	7,6 $\pm$ 0,2*	7,7 $\pm$ 0,0*
250	7,3 $\pm$ 0,3*	7,6 $\pm$ 0,1*
500	6,8 $\pm$ 0,0*	7,3 $\pm$ 0,2*
1000	5,8 $\pm$ 0,1*	6,8 $\pm$ 0,0*
1250	5,2 $\pm$ 0,0*	6,6 $\pm$ 0,1*

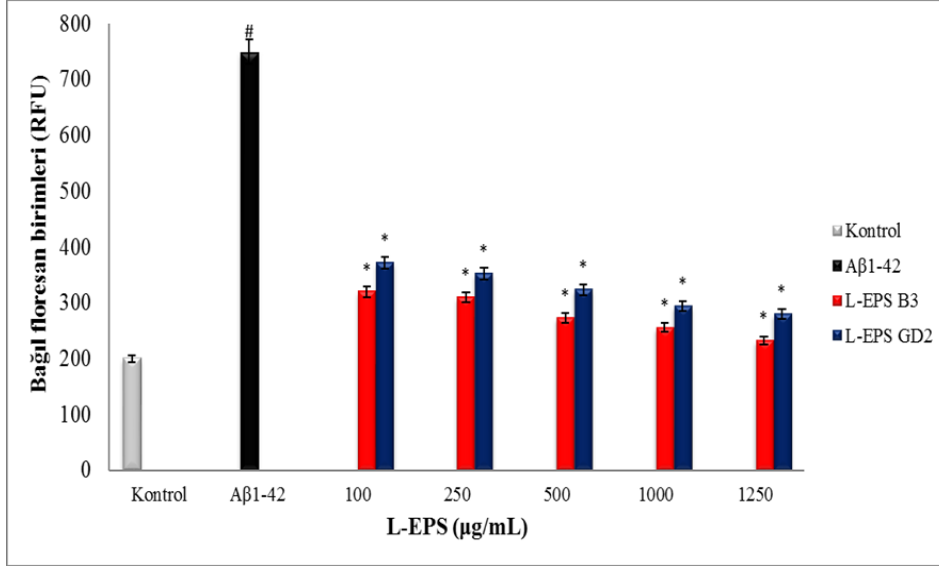
Sonuçlar, n: 3, OD $\pm$ SD, Tukey testi, [#] $p < 0,05$ Kontrol grubuna göre A β_{1-42} uygulanmış gruptaki TOS (μmol hidrojen peroksit eşdeğeri/mg). * $p < 0,05$ A β_{1-42} grubuna göre L-EPS uygulanmış gruplardaki TOS (μmol hidrojen peroksit eşdeğeri/mg)

4.11. A β_{1-42} ile Oluşturulan AH Modelinde L-EPS'lerin Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Miktarı Üzerine Baskılayıcı Etkilerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, A β_{1-42} ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde suşlardan elde edilen L-EPS'lerin hücre içi ROS miktarı üzerine baskılayıcı etkilerinin 2',7'-diklorofluoresin diasetat, H2DCFDA (DCFDA) boyası kullanılarak flow sitometre ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Renksiz olan H2DCFDA (DCFDA) boyası ortamdaki ROS ile oksitlenmektedir ve yeşil floresans özellikteki DCF boyasına dönüşmektedir.

A β_{1-42} 'nin hücre içi ROS miktarını kontrol grubuna göre %275 oranında arttırdığı belirlenmiştir ($p < 0,05$). A β_{1-42} 'nin arttırdığı hücre içi ROS miktarı, yayılan floresan ile pozitif korelasyon göstermiştir. Bu durum A β_{1-42} 'nin oksidatif stresi etkin bir şekilde arttırdığını göstermiştir. Diğer yandan, suşlardan elde edilen farklı konsantrasyonlardaki L-EPS'lerin ise hücre içi ROS miktarını A β_{1-42} grubuna göre %50-69 arasında değişen oranlarda azalttığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Azalan hücre içi ROS miktarı L-EPS'lerin A β_{1-42} ile oluşturulan oksidatif strese karşı baskılayıcı etkilerini göstermiştir. Her iki suştan elde edilen L-EPS'lerin artan konsantrasyonlarında hücre içi ROS miktarını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiş olup, L-EPS'lerin ROS'u baskılayıcı etkilerinin birbirine yakın olduğu dikkati çekmiştir. En yüksek baskılayıcı etki ise %69 oranında belirlenmiş ve *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşunun 1250 $\mu\text{g/mL}$ L-EPS uygulamasından elde

edilmiştir (Şekil 4.13). Elde ettiğimiz sonuçlar L-EPS'lerin hücre içi ROS miktarını baskılayarak $A\beta_{1-42}$ kaynaklı oksidatif strese karşı koruma sağladığını kanıtlar niteliktedir.



Şekil 4.13. $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin hücre içi ROS miktarı üzerine baskılayıcı etkileri. Sonuçlar, n: 3, OD $\pm$ SD, Tukey testi, # $p < 0,05$ Kontrol grubuna göre $A\beta_{1-42}$ uygulanmış gruptaki bağlı floresan birimleri (RFU). * $p < 0,05$ $A\beta_{1-42}$ grubuna göre L-EPS uygulanmış gruplardaki bağlı floresan birimleri (RFU)

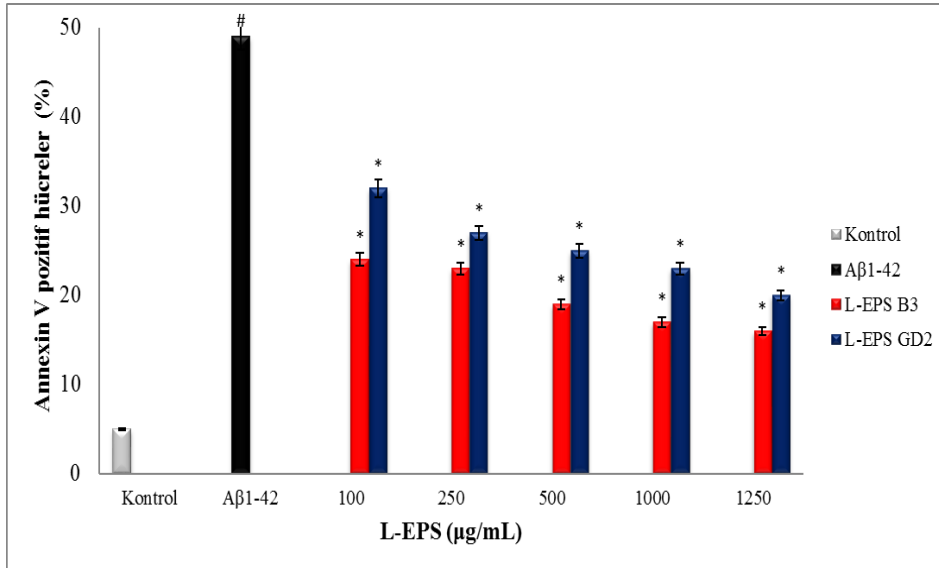
L-EPS'lerin antioksidan aktivitelerinden (DPPH serbest radikalini süpürme aktivitesi, hidroksil radikalini süpürme aktivitesi, süperoksit anyon radikalini süpürme aktivitesi ve lipid peroksidasyonun inhibisyon oranı) elde ettiğimiz sonuçlar, ticari kitlerden (TAS, SOD, CAT, GPx enzim aktiviteleri ve TOS) ve flow sitometreden elde ettiğimiz sonuçları (hücre içi ROS miktarı) destekler nitelikte olup, L-EPS'lerin antioksidan etki sonucu $A\beta_{1-42}$ kaynaklı oksidatif stresi baskıladığını gösterir niteliktedir.

4.12. $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y Hücrelerinde Oluşturulan AH Modelinde L-EPS'lerin Apoptoz Üzerine Baskılayıcı Etkilerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan suşlardan elde edilen L-EPS'lerin apoptoz üzerine baskılayıcı etkilerinin anneksin V-FITC ve propidyum iyodür boyaları kullanılarak flow sitometre ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Anneksin V, membran fosfolipidlerine bağlanan bir protein olup, fosfatidilserine karşı yüksek afiniteye sahiptir. Normal hücrelerde hücre zarının iç yüzünde fosfatidilserin bulunurken, apoptotik hücrede fosfatilserinler hücre zarının dış yüzüne transloke olmaktadır. Dış yüze transloke olan

fosfatidilserinler, FITC ile işaretlenmiş anneksin V kullanılarak görünür hale getirilmektedir.

$A\beta_{1-42}$ 'nin erken apoptoz ve geç apoptoz safhasındaki hücre yüzdesini kontrol grubuna göre %880 oranında arttırdığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Anneksin V pozitif hücrelerinin artışı, erken apoptoz ve geç apoptozun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Diğer yandan, suşlardan elde edilen farklı konsantrasyonlardaki L-EPS'lerin $A\beta_{1-42}$ grubuna göre erken apoptoz ve geç apoptoz safhasındaki hücre yüzdesini %35-67 arasında değişen oranlarda azalttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Anneksin V pozitif hücrelerinin azalışı, L-EPS'lerin $A\beta_{1-42}$ ile indüklenen erken apoptoz ve geç apoptoza karşı baskılayıcı etkilerini göstermiştir. Her iki suştan elde edilen L-EPS'lerin artan konsantrasyonlarında $A\beta_{1-42}$ ile indüklenmiş AH hücre modelinde erken apoptoz ve geç apoptoz safhasındaki hücre yüzdesini önemli ölçüde baskıladığı belirlenmiştir. En yüksek baskılayıcı etkiyi *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin 1250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu göstermiştir (%67) (Şekil 4.14). Çalışmadan elde edilen sonuçlar, L-EPS'lerin anneksin V pozitif hücrelerini baskılayarak, anti-apoptotik etki sonucu $A\beta_{1-42}$ ile indüklenen hücre ölümüne karşı koruyucu etki gösterdiğini yansıtmıştır.

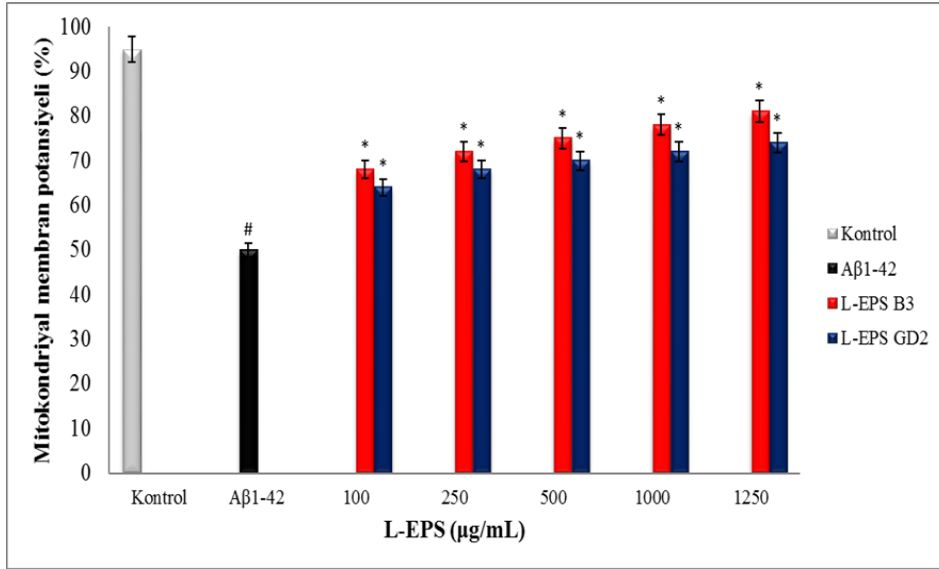


Şekil 4.14. $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin apoptoz üzerine baskılayıcı etkileri. Sonuçlar, n: 3, OD $\pm$ SD, Tukey testi, [#] $p<0,05$ Kontrol grubuna göre $A\beta_{1-42}$ uygulanmış gruptaki anneksin V hücreler (%). ^{*} $p<0,05$ $A\beta_{1-42}$ grubuna göre L-EPS uygulanmış gruptaki anneksin V hücreler (%)

4.13. A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y Hücrelerinde Oluşturulan AH Modelinde L-EPS'lerin Mitokondriyal Membran Potansiyeli Üzerine Koruyucu Etkilerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde suşlardan elde edilen L-EPS'lerin mitokondriyal membran potansiyeli üzerine koruyucu etkilerinin JC-1 boyası kullanılarak flow sitometre ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Potansiyel farkını ölçen JC-1 boyası, polarize mitokondri varlığında mitokondri membranları arasına toplanarak kırmızı floresan artışı göstermektedir. Depolarize mitokondriyal varlığında ise, boya sitoplazmaya dağılmaktadır ve boyanın bu formu yeşil floresan özelliğindedir.

A β ₁₋₄₂'nin mitokondriyal membran potansiyel yüzdesini kontrol grubuna göre %47 oranında belirlenmiştir ($p < 0,05$). Düşük mitokondriyal membran potansiyeli hasarlı mitokondriyi göstermiştir. A β ₁₋₄₂ ile indüklenen mitokondriyal membran potansiyelindeki kayıp, ATP üretiminin inhibisyonuna neden olarak apoptozu indüklemiş ve SH-SY5Y hücrelerinin ölümüne sebep olmuştur. Diğer yandan, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin A β ₁₋₄₂ grubuna göre mitokondriyal membran potansiyel yüzdesini %28-62 arasında değişen oranlarda arttırdığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Artan mitokondriyal membran potansiyeli L-EPS'lerin A β ₁₋₄₂ ile oluşturulan mitokondriyal hasara karşı koruyucu etkilerini göstermiştir. Her iki suştan elde edilen L-EPS'lerin artan konsantrasyonlarında mitokondriyal membran potansiyel yüzdesini arttırdığı belirlenmiş olup, en yüksek koruyucu etkiyi *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin 1250 μ g/mL konsantrasyonu göstermiştir (%62) (Şekil 4.15). Elde ettiğimiz sonuçlara göre, L-EPS'lerin mitokondriyal membran potansiyelindeki kaybı engelleyerek, anti-apoptotik etki sonucu A β ₁₋₄₂ kaynaklı hücre ölümüne karşı koruma özelliğinin olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.15. Aβ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin mitokondriyal membran potansiyeli üzerine koruyucu etkileri. Sonuçlar, n: 3, OD ± SD, Tukey testi, #*p*<0,05 Kontrol grubuna göre Aβ₁₋₄₂ uygulanmış gruptaki mitokondriyal membran potansiyeli (%). **p*<0,05 Aβ₁₋₄₂ grubuna göre L-EPS uygulanmış gruptaki mitokondriyal membran potansiyeli (%)

4.14. Aβ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y Hücrelerinde Oluşturulan AH Modelinde L-EPS'lerin Protein Kinaz B (AKT/PKB), Nüklear Faktör-κB (NF-κB/p65), Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinaz (MAPK) ve Apoptoz Sinyal Yolakları Üzerine Modülatör Etkilerinin Belirlenmesi

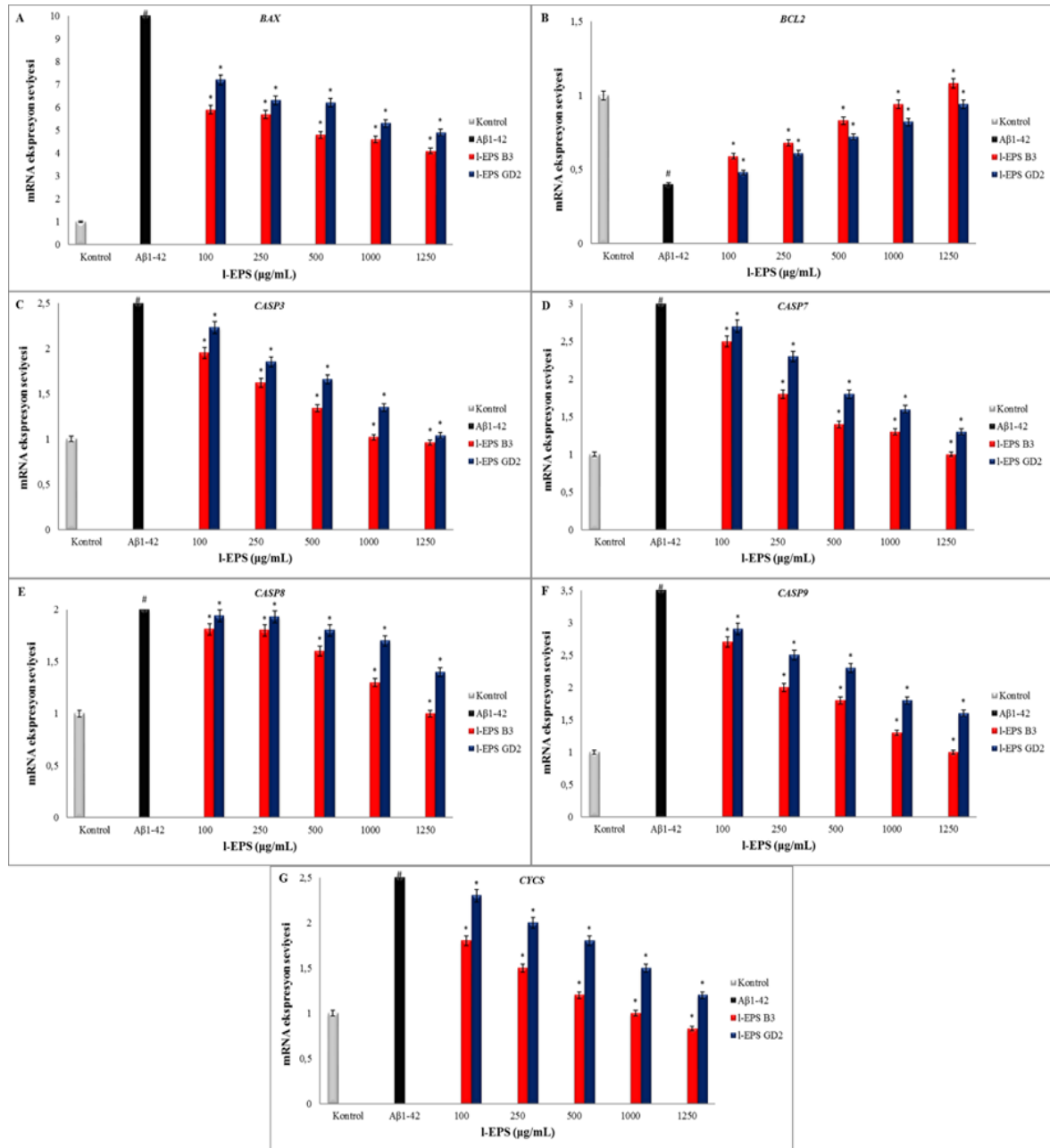
Bu çalışmada, Aβ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan suşlardan elde edilen L-EPS'lerin AKT/PKB, NF-κB/p65, MAPK ve apoptoz sinyal yolaklarında yer alan protein kinaz B (AKT/PKB), nüklear faktör-κB (NF-κB/p65), hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1 (ERK1), hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 2 (ERK2), c-Jun N-terminal kinaz (JNK), JUN, p38 mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (p38 MAPK), BCL2 associated X (BAX), BCL2, kaspaz-3 (CASP3), kaspaz-7 (CASP7), kaspaz-8 (CASP8), kaspaz-9 (CASP9) ve sitokrom C (CYCS) genlerinin ekspresyon seviyeleri üzerine modülatör etkilerinin qRT-PZR ile belirlenmesi amaçlanmıştır. AH'de yukarıda bahsi geçen sinyal yolaklarının nöronal gelişim ve fonksiyonunda kritik role sahip oldukları bilinmektedir. Bu sebeple L-EPS'lerin AKT/PKB, NF-κB/p65, MAPK ve apoptoz sinyal yolakları üzerine modülatör etkilerinin belirlenmesi, L-EPS'lerin AH'nın tedavisinde çoklu sinyal yolaklarını hedef alma kabiliyetlerini göstermiş olması bakımından oldukça önem arz etmektedir.

A β_{1-42} 'nin *BCL2* ve *AKT/PKB* genlerinin ekspresyon seviyelerini kontrol grubuna göre sırasıyla 2,5 ve 5,0 kat azalttığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Diğer taraftan, suşlardan elde edilen farklı konsantrasyonlardaki L-EPS'lerin A β_{1-42} grubuna göre *BCL2* ve *AKT/PKB* genlerinin ekspresyon seviyelerini sırasıyla 1,2-2,7 ve 1,7-4,2 arasında değişen katlarda arttırdığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Her iki suştan elde edilen L-EPS'lerin artan konsantrasyonlarında *BCL2* ve *AKT/PKB* genlerinin ekspresyon seviyelerini arttırdığı belirlenmiş olup, en yüksek indükleyici etkiyi *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin 1250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu göstermiştir (2,7 kat ve 4,2 kat) (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17).

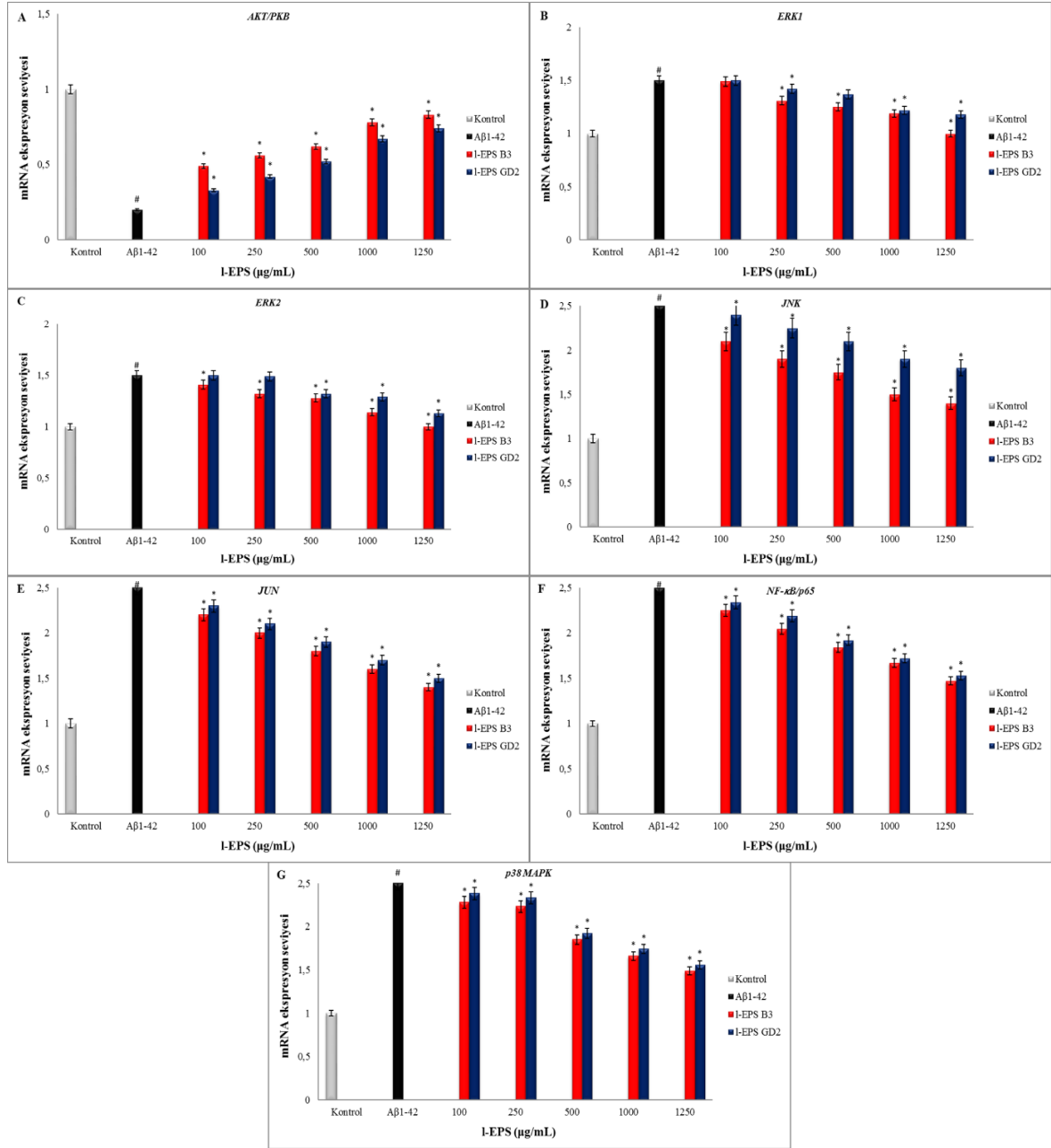
A β_{1-42} 'nin *BAX*, *CASP3*, *CASP7*, *CASP8*, *CASP9*, *CYCS*, *ERK1*, *ERK2*, *JNK*, *JUN*, *NF- κ B/p65* ve *p38 MAPK* genlerinin ekspresyon seviyelerini kontrol grubuna göre değişen katlarda arttırdığı belirlenmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.7). Diğer taraftan, suşlardan elde edilen farklı konsantrasyonlardaki L-EPS'lerin A β_{1-42} grubuna göre *BAX*, *CASP3*, *CASP7*, *CASP8*, *CASP9*, *CYCS*, *ERK1*, *ERK2*, *JNK*, *JUN*, *NF- κ B/p65* ve *p38 MAPK* genlerinin ekspresyon seviyelerini değişen katlarda azalttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.7). Her iki suştan elde edilen L-EPS'lerin artan konsantrasyonlarında *BAX*, *CASP3*, *CASP7*, *CASP8*, *CASP9*, *CYCS*, *ERK1*, *ERK2*, *JNK*, *JUN*, *NF- κ B/p65* ve *p38 MAPK* genlerinin ekspresyon seviyelerini azalttığı belirlenmiş olup, en yüksek baskılayıcı etkiyi *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin 1250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu göstermiştir (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17).

Her iki suştan elde edilen L-EPS'lerin etkili olduğu sinyal yolları sırasıyla *AKT/PKB* > apoptoz > *MAPK* > *NF- κ B/p65* şeklindeyken, etkili olduğu genler ise sırasıyla *AKT/PKB* > *CASP9* > *CASP7* = *CYCS* > *BCL2* > *CASP3* > *BAX* > *CASP8* > *JNK* > *JUN* > *NF- κ B/p65* = *p38 MAPK* > *ERK1* = *ERK2* şeklindedir. L-EPS'ler *AKT/PKB* sinyal yolağını indükleyerek ve *NF- κ B/p65* sinyal yolağını baskılayarak, apoptoz ile ilişkili genleri modüle etmiş ve böylece apoptozu baskılamıştır. L-EPS'ler, *MAPK* sinyal yolağında yer alan *ERK1*, *ERK2*, *JNK*, *JUN* ve *p38 MAPK* genlerinin ekspresyonlarında azalışa neden olarak, nöronal apoptozun indüksiyonunun altında yatan *MAPK* sinyal yolağını baskılamıştır. L-EPS'ler apoptoz sinyal yolağında yer alan proapoptotik genlerin ekspresyonlarında azalışa, anti-apoptotik genin ise ekspresyonunda artışa neden olarak apoptozu baskılayıcı etki göstermiştir. qRT-PZR'dan elde ettiğimiz sonuçlar (apoptoz sinyal yolağı), flow sitometreden elde ettiğimiz sonuçları (apoptoz ve mitokondriyal

membran potansiyeli) destekler nitelikte olup, L-EPS'lerin apoptozu baskılayıcı etkilerinin mekanizmasını açıklar niteliktedir.



Şekil 4.16. Aβ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin apoptoz sinyal yolağında rol oynayan genler üzerine modülatör etkileri (A) *BAX*, (B) *BCL2*, (C) *CASP3*, (D) *CASP7*, (E) *CASP8*, (F) *CASP9* ve (G) *CYCS*. Sonuçlar, n: 3, OD ± SD, Tukey testi, #*p*<0,05 Kontrol grubuna göre Aβ₁₋₄₂ uygulanmış gruptaki mRNA ekspresyon seviyesi. **p*<0,05 Aβ₁₋₄₂ grubuna göre L-EPS uygulanmış gruplardaki mRNA ekspresyon seviyesi



Şekil 4.17. Aβ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin AKT/PKB, NF-κB ve MAPK sinyal yollarında rol oynayan genler üzerine modulator etkileri (A) *AKT/PKB*, (B) *ERK1*, (C) *ERK2*, (D) *JNK*, (E) *JUN*, (F) *NF-κB/p65* ve (G) *p38 MAPK*. Sonuçlar, n: 3, OD ± SD, Tukey testi, #*p*<0,05 Kontrol grubuna göre Aβ₁₋₄₂ uygulanmış gruptaki mRNA ekspresyon seviyesi. **p*<0,05 Aβ₁₋₄₂ grubuna göre L-EPS uygulanmış gruptaki mRNA ekspresyon seviyesi

Çizelge 4.9. $A\beta_{1-42}$ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin AKT/PKB, NF- κ B/p65, MAPK ve apoptoz sinyal yollarında yer alan genlerin üzerine modölatör etkileri

mRNA ekspresyon seviyesi (kat)			
Gen adı	$A\beta_{1-42}$ ↓	L-EPS B3 ↑	L-EPS GD2 ↑
<i>BCL2</i>	2,5 [#]	1,5-2,7*	1,2-2,4*
<i>AKT/PKB</i>	5,0 [#]	2,5-4,2*	1,7-3,7*
Gen adı	$A\beta_{1-42}$ ↑	L-EPS B3 ↓	L-EPS GD2 ↓
<i>BAX</i>	10,0 [#]	1,7-2,4*	1,4-2,0*
<i>CASP3</i>	2,5 [#]	1,3-2,6*	1,1-2,4*
<i>CASP7</i>	3,0 [#]	1,2-3,0*	1,1-2,3*
<i>CASP8</i>	2,0 [#]	1,1-2,0*	1,0-1,4*
<i>CASP9</i>	3,5 [#]	1,3-3,5*	1,0-2,2*
<i>CYCS</i>	2,5 [#]	1,4-3,0*	1,1-2,0*
<i>ERK1</i>	1,5 [#]	1,0-1,5*	1,0-1,3*
<i>ERK2</i>	1,5 [#]	1,1-1,5*	1,0-1,3*
<i>JNK</i>	2,5 [#]	1,2-1,8*	1,0-1,4*
<i>JUN</i>	2,5 [#]	1,1-1,8*	1,1-1,7*
<i>NF-κB/p65</i>	2,5 [#]	1,1-1,7*	1,1-1,6*
<i>p38 MAPK</i>	2,5 [#]	1,1-1,7*	1,1-1,6*

Tukey testi, [#] $p < 0,05$ Kontrol grubuna göre $A\beta_{1-42}$ uygulanmış gruptaki mRNA ekspresyon seviyesi. * $p < 0,05$ $A\beta_{1-42}$ grubuna göre L-EPS uygulanmış gruptaki mRNA ekspresyon seviyesi

5. TARTIŞMA

Demans, günlük yaşam aktivitelerine müdahale edecek kadar şiddetli bilişsel yeteneklerdeki düşüşü ifade eden genel bir terimdir. Alzheimer hastalığı (AH), 65 yaş ve üstü kişilerde demans vakalarının en az üçte ikisini oluşturan en yaygın bunama türüdür (Kumar ve Tsao, 2019: 1-150). AH, kolinerjik disfonksiyon, senil plaklar, nörofibriler yumak oluşumu, oksidatif stres, kronik nöroinflamasyon, nöral hasar ve sinaps kaybı ile karakterizedir (Tramutola ve diğerleri, 2017). AH'nin tedavisi yoktur, ancak bazı semptomlarını iyileştirebilecek kısmi tedaviler mevcuttur (Kumar ve Tsao, 2019: 1-150). Asetilkolin esterase (AChE) inhibitörleri ve memantin, demans yönetiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Knight, Khondoker, Magill, Stewart ve Landau, 2018).

AH'nin çok nedenli doğasını anlamak için geliştirilen, “bir molekül-çoklu hedef” uygulamasına dayalı yeni bir yaklaşım son zamanlarda bilim insanlarının geniş biçimde ilgisini çekmektedir. Çok hedefli ilaçlar, AH için tipik olan kilit patolojilerle savaşmanın bir yolu olarak çoklu reseptörleri hedef alma kabiliyetini kombine etmektedirler (Simunkova ve diğerleri, 2019). “Bir molekül-çoklu hedef” uygulamasına probiyotik mikroorganizmalar olan laktik asit bakterilerinden elde edilen ekzopolisakkarit (EPS)'ler örnek olarak verilebilir.

Literatürde, EPS'lerin antioksidan, antitümör, antikoagülan, antivirüs, antiradyasyon, antikanser ve immünoregülatör özellikleri gösterilmiş olup (Li ve diğerleri, 2014a; Wang ve diğerleri, 2015a, 2015b; Zhang ve diğerleri, 2013), EPS'lerin AH'de kullanım potansiyellerini ortaya koyan bir çalışma yapılmamıştır. Ancak, AH'de farklı organizmalardan (alg, bitki, mantar ve yosun) elde edilen polisakkaritlerin etkileri ile ilgili amiloid β ($A\beta$)'yı, tau proteinlerini, kolinerjik nörotransmitteri, oksidatif stresi, anti-apoptozu, kalsiyum kanalını ve diğer olası mekanizmaları hedefleyen çalışmalar yapılmıştır (Huang ve diğerleri, 2001; Li ve diğerleri, 2013a; Su ve diğerleri, 2013; Wang ve diğerleri, 2014b; Yu ve diğerleri, 2004; Zhong ve diğerleri, 2015). EPS'lerin sahip olduğu geniş faydalı biyolojik özellikler ve polisakkaritlerin AH'de çok hedefli ajan olarak çeşitli çalışmalarda kullanılması sonucunda, EPS'lerin AH'de sağlıklı gıdalar ve tedavi edici ajanlar olarak potansiyel nütrisyonel ve farmasötik yararları olacağını düşündürmüştür (Xu ve diğerleri, 2019a).

Bu doktora tez çalışmasında A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde AH modeli oluşturularak, AH'nin ortak mekanizmaları üzerinde probiyotik kaynaklı EPS'lerin yapılarının ve nörokoruyucu etki mekanizmalarının keşfine yönelik deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kapsamlı taramalarla öne çıkan 2 suş (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 ve *Lactiplantibacillus plantarum* GD2) kullanılmıştır.

Suşlardan elde edilen liyofilize EPS (L-EPS)'lerin toplam karbonhidrat miktarları belirlenmiştir. B3 suşunun L-EPS miktarı 435 mg/L iken, GD2 suşunun L-EPS miktarı 385 mg/L'dir. Suşların üretim miktarları birbirine yakın bulunmuş olup, B3 suşundan elde edilen L-EPS kısmi olarak öne çıkmıştır. Literatürde *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *L. plantarum*'un farklı suşlarından elde edilen EPS'lerin üretim miktarları 69-324 mg/L arasında değişen miktarlarda tespit edilmiştir (Bouzar, Cerning ve Desmazeaud, 1996; Imran ve diğerleri, 2016; Kimmel ve Roberts, 1998; Tang ve diğerleri, 2017; Zhang ve diğerleri, 2013; Zhou ve diğerleri, 2016; Zhu ve diğerleri, 2019). EPS üretim miktarı bakteri türüne ve suşuna göre değişebilmektedir (Tosun, 2016). Bakterideki hücre içi ve hücre dışı faktörler de EPS üretim miktarını etkilemektedir. Bu faktörler; ortam ve gelişme şartları (sıcaklık, inkübasyon sıcaklığı ve süresi, karbon:nitrojen oranı, pH, vitamin ve mineraller), şeker nükleotitlerin bazal hücre metabolizmasındaki yeterlilikleri, bakteri tarafından kullanılan karbon kaynağı ve EPS üretiminden sorumlu gen kümesinin transkripsiyon miktarı gibi faktörleri içermektedir (Karasu, 2019).

L-EPS'lerin karakterizasyonu, anlamlı bir yapı-özellik ilişkisi kurulmasında çok önemli yer tutmaktadır. Bu sebeple, bir önceki çalışmamızda 115R282 kodlu TÜBİTAK projesi kapsamında L-EPS'lerin monomer yapısı, moleküler ağırlığı ve bağ yapıları belirlenmiştir. Bu doktora tezi kapsamında L-EPS'lerin karakterizasyonuna devam edilerek, L-EPS'lerin azot, karbon, hidrojen, kükürt ve oksijen yüzdeleri, fonksiyonel grupları, yüzey morfolojileri ve kristalografik özellikleri belirlenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan suşlardan elde edilen L-EPS'lerin başka bir çalışmada monomer yapısı yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile belirlenmiştir. B3 ve GD2 suşlarından elde edilen L-EPS'lerin sırasıyla %88,25; %71,03 mannoz, %9,54; %25,97 glikoz, %0; %2,73 arabinoz, %1,04; %0 fruktoz, %1,10; %0 sukroz + maltoz ve %0,07; %0,27 N-

asetilglukozamin içerdiği tespit edilmiştir (Tükenmez, Aktaş, Aslım ve Yavuz, 2019). L-EPS'lerin ağırlıklı olarak mannoz ve glikoz monomerlerinden oluştuğu belirlenmiş olup, ana monomer mannozdur. L-EPS'lerin içerdikleri monomer kompozisyonları ve oranları birbirlerine göre farklılık göstermiştir. Benzer şekilde literatürde aynı türlerden elde edilen EPS'lerin bile farklı oranlarda, farklı monomerler içerebileceği görülmüştür (Li ve diğerleri, 2014a; Tallon, Bressollier ve Urdaci, 2003; Wang ve diğerleri, 2010; 2015c). Mayadan elde edilen EPS'lerin fonksiyonel özellikleri üzerine yapılan bir incelemede, %50'den fazla mannoz içeren EPS'lerin biyolojik aktivitelerinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Gientka, Blazejak, Stasiak Rozanska ve Chlebowska Smigiel, 2015). EPS'lerin antioksidan aktivitesinin monomer kompozisyonundaki yüksek miktardaki mannoz ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Wang ve diğerleri, 2017). Shao, Dai, Xu, Lin ve Gao (2004), yüksek oranda mannoz ve glikozdan oluşan polisakkaritlerin toll-like reseptörlerle etkileşime girebileceğini ve immünmodülatör aktivite sonucunda konakçı bağışıklığını etkinleştirebileceğini göstermiştir. AH'deki senil demansı tedavi etmek veya önlemek için mannoz ve glukuronik asitçe zengin oligosakkaritlerin uygulamasını içeren bir patent 2014 yılında Çin'de alınmış olup, bu oligosakkaritlerin nörokoruyucu etkileri gösterilmiştir (İnternet 8). Kahverengi alglerden ekstrakte edilen bir oligosakkarit olan GV-971 (sodyum oligomannurat)'in faz III klinik deneme verileri AH hastalarının bilişsel işlevini iyileştirme açısından istatistiksel ve klinik öneme sahip olduğunu göstermiştir. GV-971'in potansiyel mekanizmaları arasında A β agregasyonunun inhibisyonu, bağırsak florası dengesizliğinin düzenlenmesi ve nöroinflamasyonun azaltılmasının yer aldığı tespit edilmiştir (Gao ve diğerleri, 2020). Lewis ve diğerleri (2013), aloe polimannoz multivitamin kompleks formülünün, AH tanısı konan yetişkinler arasında 12 ay boyunca bilişsel ve immün işlevler üzerindeki etkisini araştırmıştır. Formülün hem klinik hem de fizyolojik sonuçlarda iyileşmeler gösterdiği belirlenmiştir. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin her ikisinde mannoz oranı diğer monomerlere göre daha yüksek oranda bulunmuştur. Ancak, B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin mannoz oranı kısmi olarak öne çıkmıştır. Literatürden elde edilen bilgiler ışığında B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin biyoaktivitesinin buna bağlı olarak nörokoruyucu etkisinin daha yüksek olacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada kullanılan suşlardan elde edilen L-EPS'lerin başka bir çalışmada moleküler ağırlığı büyüklükçe ayırma kromatografisi ile belirlenmiştir. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin farklı moleküler ağırlıklarda iki fraksiyona sahip olduğu belirlenmiştir. B3 ve

GD2 suşlarından elde edilen L-EPS'lerin fraksiyonları sırasıyla $1,2 \times 10^4$, $3,5 \times 10^2$; $2,4 \times 10^3$, $2,3 \times 10^2$ Da şeklindedir (Tükenmez ve diğerleri, 2019). L-EPS'lerin fraksiyon sayıları benzer olup, fraksiyonların moleküler ağırlıkları birbirlerine göre farklılık göstermiştir. Literatürdeki EPS'lerin de farklı sayıda ve moleküler ağırlıkta fraksiyon içerebileceği görülmüştür. Tallon ve diğerleri (2003), *L. plantarum* EP56'dan izole edilmiş EPS'nin iki farklı fraksiyona sahip olduğunu belirlemişlerdir ($8,5 \times 10^5$ Da ve 4×10^4 Da). Bununla birlikte, *L. plantarum* YW32 suşundan elde edilen EPS'nin $1,03 \times 10^5$ Da moleküler ağırlığa sahip yalnızca bir fraksiyondan oluştuğu bildirilmiştir (Wang ve diğerleri, 2015b). Hamet, Piermaria ve Abraham (2015), 28 farklı *Lactobacillus*'un EPS'sini incelemiş ve fraksiyon sayısının bir ile üç arasında değiştiğini ve moleküler ağırlık dağılımının suşa bağlı olduğunu göstermiştir. EPS'lerin biyoaktivitesinin moleküler ağırlıktan etkilendiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Literatüre göre $\text{EPS} \leq 10^4$ Da, düşük moleküler ağırlık olarak kabul edilmektedir (Nwodo, Green ve Okoh, 2012; Xu, Shen, Ding, Gao ve Li, 2011; Zarour ve diğerleri, 2017). Düşük moleküler ağırlıklı EPS'lerin, hücre zarı bariyerlerini kolaylıkla geçebildiği bildirilmiştir (Li ve diğerleri, 2016). Ancak, düşük molekül ağırlıklı EPS'lerin de biyoaktivitelerini etkileyen üçlü sarmal konformasyonunu oluşturmakta zorlandıkları belirtilmiştir (You ve diğerleri, 2011). Yüksek moleküler ağırlıklı EPS'lerin, düşük moleküler ağırlıklı olanlardan daha fazla immünregülatör aktiviteye sahip olma eğiliminde oldukları bulunmuştur (Ooi ve Liu, 2000; Suarez ve diğerleri, 2005; Wasser, 2002). Chen ve diğerleri (2009), yüksek moleküler ağırlıklı oligosakkaritlerin düşük moleküler ağırlıklılara göre daha yüksek antioksidasyon aktivitesine sahip olduklarını bildirmişlerdir. *Herba lophatheri*'den izole edilen dört polisakkaritten daha yüksek moleküler ağırlığa sahip olan BLP80-C adı verilen polisakkaritin, daha yüksek aktif süperoksit anyon süpürme kapasitesi sergilediği bulunmuştur (Ge ve diğerleri, 2013). Cheng, Tsai, Lien, Lee ve Sheu (2016), *Hericium erinaceus*'dan elde edilen iki yüksek moleküler ağırlıklı ($1,7 \times 10^5$ Da ve $1,1 \times 10^5$ Da) fraksiyona sahip polisakkaritlerin sıçan feokromasitoma PC12 hücrelerinde A β ile indüklenen nörotoksisite üzerindeki koruyucu etkilerini belirlemişlerdir. B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin yüksek ve düşük moleküler ağırlıklı 2 fraksiyon içerdiği tespit edilmiştir. GD2 suşundan elde edilen L-EPS'nin 2 fraksiyonun da düşük moleküler ağırlıklı olduğu görülmüştür. Literatürden elde edilen verilere göre B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin hem yüksek hem de düşük moleküler ağırlıklı fraksiyonlarının olması sebebiyle biyolojik aktivitesinin ve nörokoruyucu etkisinin daha yüksek olması beklenmektedir.

Bu çalışmada kullanılan suşlardan elde edilen L-EPS'lerin başka bir çalışmada bağ yapıları 1D ve 2D-nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ile belirlenmiştir. B3 ve GD2 suşlarından elde edilen L-EPS'lerin bağ yapıları β -H1-H3 (β -D-Mannoz- α -D-Mannoz)/ α -H1-H2 (α -D-Mannoz- α -D-Glikoz) olarak yani β -1,3 (β -D-Mannoz- α -D-Mannoz), α -1,2 (α -D-Mannoz- α -D-Glikoz) şeklinde tespit edilmiştir (Tükenmez ve diğerleri, 2019). L-EPS'lerin bağ yapıları suşlara göre farklılık göstermemiştir. EPS'lerin omurgasındaki monomerik birimler arasındaki bağların β -1,3 veya β -1,4 bağları ve α -1,2 veya α -1,6 bağları olduğu belirtilmiştir (Martinez Martinez, Timmerman, Fleer ve Verhoef, 1993). EPS'lerin bağ yapıları dahil olmak üzere moleküler özelliklerinin, proteinlerle etkileşimleri güçlü bir şekilde etkilediği gösterilmiştir (Diemer ve diğerleri, 2012). Biyolojik aktivite gösteren EPS'lerin esas olarak β -1,3 bağlarını içerdiği bildirilmiştir (Diemer ve diğerleri, 2012). Xu ve diğerleri (2009) tarafından yapılan çalışmada *Ganoderma lucidum*'dan izole edilen β -1,3 glikozitik bağına sahip polisakkaritlerin antioksidan aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Tsai, Yen ve Yang (2015) tarafından yapılan bir çalışmada *Cordyceps militaris*'den elde edilen β -1,3 glikozitik bağına sahip polisakkarit peptit komplekslerinin AChE'ye karşı karakteristik inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır. Kao ve diğerleri (2012), *G. lucidum*'dan elde edilen β -1,3 glikozitik bağına sahip glukanın hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) miktarını azaltarak ve sfingomiyelinaz aktivitesini inhibe ederek hidrojen peroksit kaynaklı hücre ölümüne karşı antioksidan etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Literatürden elde edilen veriler ışığında suşlardan elde edilen L-EPS'lerin β -1,3 glikozitik bağını içermesi gösterdikleri biyolojik aktivitelerinin ve nörokoruyucu etkilerinin bir göstergesi olabilir.

Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin içerdiği azot, karbon, hidrojen, kükürt ve oksijen yüzdeleri elemental analiz ile belirlenmiştir. B3 ve GD2 suşlarından elde edilen L-EPS'ler sırasıyla %5,9; %1,6 azot, %44,8; %23,3 karbon, %6,6; %6,4 hidrojen ve %42,7; %68,7 oksijen içerdiği tespit edilmiştir. Literatürdeki EPS'lerin içerdiği elementlerin ve oranlarının elde edildiği bakteri türüne ve suşuna göre farklılık gösterdiği görülmüştür. Goh, Haisman ve Singh (2005)'in yaptıkları çalışmaya göre *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2483 suşundan elde edilen EPS'nin içerdiği karbon, hidrojen, azot ve oksijen yüzdeleri sırasıyla %39,1, %6,2, %2,8 ve %50,3 şeklindedir. Van Calsteren, Gagnon, Nishimura ve Makino (2015)'nin yaptıkları çalışmada *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 suşundan elde edilen EPS'nin sadece karbon ve hidrojen atomlarını içerdiği belirlenmiştir. *L. plantarum* HM47 suşundan elde edilen EPS'nin

içerdiği karbon, oksijen, fosfor, sodyum, klor ve kükürt yüzdeleri sırasıyla %57,5, %39,9, %1,5, %0,4, %0,4 ve %0,2 şeklinde bulunmuştur (Nambiar ve diğerleri, 2018). Polisakkarit açısından zengin örnekler azot içermemekte veya bu elementin küçük miktarlarını içerdiği belirlenmiştir. Polisakkaritlerin yapısında bulunan azotun proteinlerden ya da kitinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu proteinlerin muhtemelen çözünür glukanlara bağlandığı tespit edilmiştir (Du ve diğerleri, 2017).

Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin içerdiği fonksiyonel gruplar fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) analizi ile belirlenmiştir. Suşların FTIR spektrumlarına göre 836 cm^{-1} 'deki bandın α -D glukanın germe titreşimini temsil ettiği saptanmıştır. 974 cm^{-1} 'deki ana absorpsiyon bandı, C-O-C glikozit bağının germe titreşimini göstermiştir. $800\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ arasındaki dalga sayısı, polisakkaritlerin parmak izi bölgesidir ve farklı polisakkaritlerin karakterize edilmesi için kullanılabilir. 1200 cm^{-1} 'deki bantlar, şeker monomerlerinin germe titreşimini temsil etmişlerdir. Üronik asit varlığında oluşan C=O grubunun karboksilat asimetrik germe ve gerdirmesi nedeniyle $1200\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ civarında zayıf sinyaller görülmüştür. $1650\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ 'deki bantlar genellikle C=O grubunun gerilme titreşimini temsil etmişlerdir. C=O grubunun ester karbonil germe ve gerdirmesi nedeniyle 1735 cm^{-1} 'de güçlü bir sinyal görülmüştür. $2850\text{-}2960\text{ cm}^{-1}$ 'deki bantlar, metil ve metilen gruplarının (-CH₂-)C-H gerilme titreşimini temsil etmişlerdir. Genellikle glikoz veya galaktoz gibi eksozlarda veya ramnoz gibi deoksiheksozlarda mevcuttur. 3300 cm^{-1} 'deki geniş bant, hidroksil gruplarının germe titreşimini temsil etmekte olup, bir karbonhidrat halkasının karakteristik pikidir. FTIR spektrumlarından elde edilen sonuçlar L-EPS'lerin tipik polimerik yapısını ortaya koymuş olup, L-EPS'lerin polisakkarit yapısında olduklarını doğrulamıştır. Literatürdeki EPS'lerin fonksiyonel gruplarının oluşturduğu germe titreşimlerinin bakteri türlerine ve suşlarına göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Adebayo Tayo ve Fashogbon (2020)'un yaptıkları çalışmaya göre *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşundan elde edilen EPS'nin FTIR spektrumuna göre $1637\text{-}1641\text{ cm}^{-1}$ 'deki bantlar C=O grubunun gerilme titreşimini temsil etmiştir. $2364\text{-}2360\text{ cm}^{-1}$ 'deki bantlar, metil ve metilen gruplarının (-CH₂-)C-H gerilme titreşimini göstermiştir. $3404\text{-}3385\text{ cm}^{-1}$ 'deki geniş bant, hidroksil gruplarının germe titreşimini temsil etmiştir. Adesulu Dahunsi, Sanni ve Jeyaram (2018)'ın yaptıkları çalışmaya göre *L. plantarum* YO175 ve OF101 suşlarından elde edilen EPS'lerin FTIR spektrumlarına göre $1150\text{-}1159\text{ cm}^{-1}$ 'deki ana absorpsiyon bandı, C-O-C glikozit bağlantısının germe titreşimini göstermiştir. $1649\text{-}1655\text{ cm}^{-1}$ 'deki bantlar C=O grubunun gerilme titreşimini temsil

etmiştir. 2898-2924 cm^{-1} 'deki bantlar, metil ve metilen gruplarının ($-\text{CH}_2-$)C-H gerilme titreşimini göstermiştir. 3276-3288 cm^{-1} 'deki geniş bant, hidroksil gruplarının germe titreşimini temsil etmiştir. Fonksiyonel grupların gösterdiği germe titreşimindeki farklılıklar EPS'lerin biyolojik aktivitesini etkileyebilmekte olup, bakteri türüne ve suşuna göre farklılık gösterdiği görülmüştür. Lu ve diğerleri (2020), polisakkaritlerin biyoaktivitesinin, fonksiyonel gruplarının sayısı ve konumundan etkilenebileceğini belirtmişlerdir. Chen ve diğerleri (2009)'nin yaptıkları çalışmada EPS'lerin biyolojik aktivitesinin, hidroksil, sülfat, amin, karboksil ve fosfat gibi fonksiyonel grupların moleküler ağırlığı, tipi ve konumu, sakkarit tipi ve glikozitik dallanma gibi çeşitli yapısal parametrelere bağlı olduğu bildirilmiştir. Polianyonik fonksiyonel gruplara (hidroksil, amino, karbonil ve karboksil grupları vb.) bağlı olarak EPS'lerin biyolojik aktivitesinin farklılık gösterdiği de literatürde çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Li ve diğerleri, 2017a; Sathiyarayanan ve diğerleri, 2017). Polianyonik fonksiyonel gruplara sahip polisakkaritlerin AMPA reseptörü-mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) etkileşimlerini içeren hayatta kalma yolağını ve hücresel onarımı desteklediği bildirilmiştir (Chicoine ve Bahr, 2007). El Missiry ve diğerleri (2020)'nin yaptıkları çalışmada, nanoformüle edilmiş polianyonik fonksiyonel gruplara sahip polisakkaritin erkek fare beyinlerinde oksidatif stres, inflamatuvar sitokinler ve apoptozu modüle ederek pentilentetrazol kaynaklı deneysel epileptik nöbetlerini iyileştirdiği bulunmuştur. 2005 yılında alınan Amerika kaynaklı bir patentte, *Lycium barbarum*'dan elde edilen polianyonik fonksiyonel gruplara sahip polisakkaritlerin kronik ve travmatik nöronal yaralanma sonucunda tedavi edilen ratlarda retinal gangliyon hücrelerinin dejenerasyonunu önleyerek ve koruyarak nörokoruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir (İnternet 9). Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin FTIR spektrumları birbirine benzer bulunmakla birlikte, B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin polianyonik fonksiyonel gruplarının (hidroksil, amino, karbonil ve karboksil grupları gibi) oluşturduğu germe titreşiminin GD2 suşundan elde edilen L-EPS'ye göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu sebeple literatürden elde edilen bilgiler doğrultusunda B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin biyolojik aktivitesinin buna bağlı olarak nörokoruyucu etkisinin GD2 suşundan elde edilen L-EPS'ye göre öne çıkması beklenmektedir.

Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin yüzeylerinin üç boyutlu ve yüzey morfolojilerinin yüksek çözünürlükte görüntülenmesi atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi ile belirlenmiştir. B3 ve GD2 suşlarından elde edilen

L-EPS'lerin yüzey morfolojilerindeki maksimum yükseklik sırasıyla 303 ve 324 nm iken, minimum derinlik sırasıyla 147 ve 197 nm, pürüzlülük ortalaması ise sırasıyla 77 ve 63 nm'dir. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin yüzey morfolojileri birbirlerine göre farklılık göstermiştir. Maksimum yükseklik ve minimum derinlik ortalamasına göre GD2 suşundan elde edilen L-EPS öne çıkarken, pürüzlülük ortalamasına göre B3 suşundan elde edilen L-EPS öne çıkmıştır. B3 ile GD2 suşlarından elde edilen L-EPS'lerin SEM görüntülerine göre B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin yüzey morfolojisinin pürüzlü bir yapıya sahip olduğu, GD2 suşundan elde edilen L-EPS'nin ise gözenekli bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin sahip oldukları yüzey morfolojileri maksimum yükseklik, minimum derinlik ve pürüzlülük ortalaması ile açıklanabilir. B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin pürüzlülük ortalamasının yüksek olması pürüzlü bir yapıya sahip olmasını kanıtlar niteliktedir. GD2 suşundan elde edilen L-EPS'nin maksimum yükseklik ve minimum derinlik ortalamasının yüksek olması ise gözenekli bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir. Literatürde, EPS'lerin elde edildiği bakteri türü ve suşuna göre yüzey morfolojilerinin değişkenlik gösterdiği görülmüştür. Goh ve diğerleri (2005)'nin yaptıkları çalışmaya göre *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşundan elde edilen EPS'nin yüzey morfolojisinde 3-13,5 nm arasında değişen küresel topaklar ve lifli ağ oluşumu tespit edilmiştir. *L. kefiranofaciens* ZW3 suşundan elde edilen EPS'nin yüzey morfolojisinin pürüzsüz ve gözeneksiz bir yapıya sahip olduğu görülmüştür (Ahmed, Wang, Anjum, Ahmad ve Khan, 2013). *L. plantarum* KF5 suşundan elde edilen EPS'nin ise pürüzsüz ve gözenekli bir yüzey morfolojisine sahip olduğu belirlenmiştir (Wang ve diğerleri, 2010). EPS'lerin gelişme ortamına bağlı olarak yüzey morfolojileri değişmektedir. Değişen yüzey morfolojileri ile bakterilerin yüzeyine veya birbirlerine tutundukları belirlenmiştir (Çetin, 2016). EPS'lerin sahip olduğu yüzey pürüzlülüğü veya yüzey topografyası, yüzeyin çevre ile interaktif proseslerini etkilediği tespit edilmiştir (Özkan, 2006). Polimerlerin hücreye adezyonu, polimerlerin yüzey özelliklerine (pürüzlülük, topografya ve yük gibi) bağlıdır (Alagöz ve diğerleri, 2018). Pürüzlü yüzey morfolojisinin, pürüzsüz yüzey morfolojisine kıyasla daha fazla hücre adezyon kapasitesi sağladığı bildirilmiştir (Leber ve diğerleri, 2016). Kılıç ve diğerleri (2004), hücre adezyon kapasitesini epitel yüzey üzerindeki mannoz reseptörleri ile ilişkilendirmişlerdir. Mannoz içeren EPS'ye sahip bakterilerin bu reseptörlere bağlanmasının, hücre adezyon kapasitesine katkı sağlayacağını belirlemişlerdir. Li ve diğerleri (2019c)'nin yaptıkları çalışmada, polisakkaritlerin yüzey morfolojisinin, fizikokimyasal özellikleriyle yakından ilişkili olduğunu ve biyolojik işlevlerini etkileyebildiğini bulmuşlardır. Wu ve Huang

(2020), polisakkaritlerin biyoaktivitelerinin yüzey morfolojilerinden ve zincir konformasyonlarından da etkilendiğini belirtmişlerdir. Yüzey morfolojisinin hücre reseptörünün tanınması için çok önemli olduğunu vurgulamışlardır. *Sargassum thunbergii*'dan elde edilen beş polisakkarit fraksiyonundan pürüzlü yüzey morfolojisine sahip polisakkaritin zebra balığı modelinde hidrojen peroksit aracılı hücre hasarına ve oksidatif strese karşı daha fazla koruma sağladığı bildirilmiştir (Kang, Lee, Choi ve Jeon, 2019). *Polygonum multiflorum*'dan elde edilen pürüzlü yüzeye sahip polisakkaritin *in vitro* olarak antioksidan aktivite sergilediği belirlenmiştir (Zhu, Xue ve Zhang, 2017). Bir önceki çalışmamızda B3 suşundan elde edilen L-EPS %88 oranında hücre adezyon kapasitesi gösterirken, GD2 suşundan elde edilen L-EPS de %83 oranında hücre adezyon kapasitesi göstermiştir ($p<0.05$) (Tükenmez ve diğerleri, 2019). B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin mannoz oranı ve yüzey morfolojisindeki pürüzlülük ortalaması daha yüksek bulunmuştur. Bu sebeple B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin hücre reseptörlerine bağlanma yeteneğinin ve hücre adezyon kapasitesinin daha fazla olacağı, buna bağlı olarak biyolojik aktivitesinin ve nörokoruyucu etkisinin daha yüksek olacağını düşünmekteyiz. Önceki çalışmamızdan elde edilen hücre adezyon kapasitesi sonuçları da bu çıkarımımızı destekler niteliktedir.

Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin kristalografik özellikleri X-ışını difraktometresi (XRD) analizi ile belirlenmiştir. XRD desenlerindeki güçlü ve dar pikler kristal karakteri gösterirken, küçük ve geniş pikler amorf karakteri göstermektedir. B3 ile GD2 suşlarından elde edilen L-EPS'lerin XRD desenlerine göre büyük ölçüde amorf veya zayıf bir mikro düzenlenme (zayıf kristalin) yapısına sahip oldukları görülmüştür. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin kristalografik özellikleri birbirine benzer bulunmuş olup, L-EPS'ler arasında belirgin bir farklılık tespit edilememiştir. Literatürde yapılan çalışmalara göre *L. gasseri* FR4 ve *L. paracasei* M7 suşlarından elde edilen EPS'lerin XRD desenlerine göre büyük ölçüde amorf karaktere veya zayıf bir mikro düzenlenme (zayıf kristalin) yapısına sahip olduğu görülmüştür (Bhat ve Bajaj, 2019; Rani, Anandharaj ve Ravindran, 2018). Li ve diğerleri (2018), pürüzlü yüzey morfolojisinin amorf karaktere işaret ettiğini bildirmişlerdir. *Hericium erinaceus*'dan elde edilen amorf karaktere sahip polisakkaritin makrofajların yüzeyindeki spesifik hücre zarı reseptörlerine (TLR2 ve MR) bağlanabildiğini ve daha sonra transkripsiyonel faktörlerin aktivasyonunu ve sitokinlerin ekspresyonunu indüklediğini tespit etmişlerdir. Bu sayede polisakkaritlerin farelerde siklofosamid kaynaklı immünosupresyona karşı koruma sağladığını belirlemişlerdir (Wu

ve Huang, 2020). Amorf karaktere veya zayıf bir mikro düzenlenme (zayıf kristalin) yapısına sahip polimerler, güçlü bir mikro düzenlenme (güçlü kristalin) yapısına sahip polimerlere göre daha çabuk çözünmüştür. Ayrıca, amorf karaktere sahip polimerler daha yüksek çözünürlük ve biyoyararlanım sunmuştur. Bunun sonucunda amorf karaktere sahip polimerler, kristalin karaktere sahip polimerlere göre daha üstün biyolojik aktivite göstermiştir (Urpayıl ve Thayyil, 2012). B3 ve GD2 suşlarından elde edilen L-EPS'lerin XRD desenlerine göre büyük ölçüde amorf karaktere sahip oldukları belirlenmiştir. Bundan kaynaklı olarak, B3 ve GD2 suşlarından elde edilen L-EPS'lerin kristal karaktere sahip muadillerine göre üstün biyolojik aktivite ve nörokoruyucu etki göstermeleri beklenmektedir.

Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin antioksidan aktiviteleri (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikalini süpürme aktivitesi, hidroksil radikalini süpürme aktivitesi, süperoksit anyon radikalini süpürme aktivitesi ve lipid peroksidasyonun inhibisyon oranı) belirlenmiştir. L-EPS'lerin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak gösterdikleri antioksidan aktivitelerinin de arttığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Denenen serbest radikallere göre L-EPS'lerin süpürme aktiviteleri farklılık göstermiştir. Her iki suşun L-EPS'lerinin serbest radikalleri süpürme aktivitesi DPPH > Hidroksil > Süperoksit radikali şeklinde belirlenmiş olup, L-EPS'ler arasında B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin GD2 suşundan elde edilen L-EPS'ye göre daha yüksek serbest radikalleri süpürme aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı şekilde demir iyonunu şelatlama aktivitesi ve lipid peroksidasyonun inhibisyonu bakımından da en iyi sonucu, B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin 1250 µg/mL konsantrasyonu göstermiştir. Literatürde çeşitli bakteri türleri ve suşlarından elde edilen EPS'lerin antioksidan aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Li ve diğerleri (2014a), Liu ve diğerleri (2011), Tang ve diğerleri (2017) ve Wang ve diğerleri (2017)'nin yaptıkları çalışmalara göre *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* SRFM-1 (4 mg/mL), *L. paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 ve *L. plantarum* NTU 102 (10 mg/mL), *L. plantarum* KX041 (6-8 mg/mL) ve *L. plantarum* R315 (1,5 mg/mL) suşlarından elde edilen L-EPS'lerin antioksidan aktiviteleri %29-83 arasında değişmektedir. Çalışmamızda kullanılan L-EPS'lerin antioksidan aktiviteleri (%36-58) konsantrasyonları da göz önüne alınarak literatürdekilere göre daha etkili oldukları tespit edilmiştir. Tang ve diğerleri (2017)'nin yaptığı çalışmada *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* SRFM-1 suşundan elde edilen yüksek moleküler ağırlıklı EPS'lerin ($3,97 \times 10^5$ Da ve $3,86 \times 10^5$ Da) DPPH serbest radikalini, hidroksil radikalini, süperoksit anyon radikalini süpürme aktivitesi gösterdiği

belirlenmiştir. EPS'lerin sahip olduğu moleküler ağırlığın, serbest radikalleri süpürme aktivitesi ile önemli ölçüde pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Su ve Li, 2020). Yi ve diğerleri (2014), monosakkarit kompozisyonunun antioksidan aktiviteyi etkilediğini tespit etmiştir. *L. plantarum* KX041 suşundan elde edilen ana monomer olarak mannoz içeren EPS'nin serbest radikallere karşı süpürme aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Wang ve diğerleri, 2017). Yüksek mannoz içeriği EPS'lerin serbest radikal süpürme aktivitesi ile pozitif korelasyon göstermiştir (He ve diğerleri, 2016). EPS'lerin sahip olduğu farklı süpürme aktiviteleri, elektron bulutu yoğunluğunun farklı boyutlarının birleşik etkilerine ve serbest radikal ile EPS arasındaki farklı erişilebilirliğe bağlı olabileceği belirlenmiştir. Bu da, EPS'nin yapısını oluşturan monomerlerin farklı hidrofobikliklerine bağlıdır (Chen, Tsai, Huang ve Chen, 2009). EPS'lerin serbest radikalleri süpürme aktivitesinin hidroksil bağının ayrışma enerjisi aracılığıyla meydana geldiği bildirilmiştir (Li ve diğerleri, 2014b; Tang ve diğerleri, 2017; Xu ve diğerleri, 2011). Yapılan bir başka çalışmada ise *L. paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 ve *L. plantarum* NTU 102 suşlarından elde edilen yüksek oranda mannoz içeren EPS'nin demir iyonunu şelatlama aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Liu ve diğerleri, 2011). Yapılan çalışmalarda şelatlama aktivitesinin, negatif yüklü EPS'nin spesifik kimyasal doğası ve olası pozitif yüklü metal bağlanma yerlerinin sayısı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Karboksilat (alduronat, piruvat) ve N-asetil heksosaminler gibi güçlü elektron donörlerinin bağlanma işlemine katılmakta olduğu, hidroksil grupları gibi daha zayıf elektron donörlerinin ise tridentat kompleksleri oluşturduklarını veya karboksilat komplekslerinin stabilitesine katkıda bulunduğu tespit edilmiştir (Gupta ve Diwan, 2017; Loaec, Olier ve Guezennec, 1998). *L. plantarum* R315 suşundan elde edilen yüksek miktarda üretilen EPS'nin (290,17 mg/L) lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir (Li ve diğerleri, 2014b). D-galaktoz ile oluşturulan yaşlanma fare modelinde *Bifidobacterium animalis* RH suşundan elde edilen EPS'nin lipid peroksidasyonunu baskıladığı tespit edilmiştir (Xu ve diğerleri, 2011). EPS'lerin lipid peroksidasyon zincir reaksiyonu sonucunda oluşan lipid hidroperoksitleri ve konjuge dienlerin parçalanma ürünlerinin oluşumunu baskıladığı belirlenmiştir (Chen, Zhang ve Xie, 2005; Matsumura ve diğerleri, 2003). EPS yapısındaki β -1,3 glikozitik bağlarının antioksidan aktiviteyi arttırdığı tespit edilmiştir (Cui ve diğerleri, 2016). β -1,3 glikozitik bağına sahip glukanın hücre içi ROS miktarını azaltarak hidrojen peroksit kaynaklı hücre ölümüne karşı antioksidan etki gösterdiği tespit edilmiştir (Kao ve diğerleri, 2012). Zhu ve diğerleri (2017), *Polygonum multiflorum*'dan elde edilen pürüzlü yüzeye sahip polisakkaritin antioksidan aktivite sergilediğini bildirmişlerdir.

Sargassum thunbergii'dan elde edilen pürüzlü yüzey morfolojisine sahip polisakkaritin hidrojen peroksit ile indüklenen oksidatif strese karşı antioksidan aktivite sonucunda nörokoruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Kang ve diğerleri, 2019). EPS'lerin sahip olduğu yapılarındaki farklılıklar, gösterdikleri antioksidan aktivitelerinin de farklılaşmasına sebep olmuştur (Tang ve diğerleri, 2017). Ayrıca, antioksidan aktivite ile nörokoruyucu etki arasında yakın ilişki olduğu saptanmıştır (Takahashi, Kosaka, Watanabe, Nakade ve Fukuyama, 2003). Çalışmamızda da L-EPS'lerin nörokoruyucu etkileri ile antioksidan aktiviteleri arasında pozitif yönlü, yüksek düzeyde 0,984 olan bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$). B3 suşundan elde edilen L-EPS yüksek mannoz oranına, hem yüksek hem de düşük moleküler ağırlıklı 2 fraksiyona, β -1,3 glikozitik bağına ve pürüzlü yüzey morfolojisine sahiptir. Ayrıca, elemental analizine göre hidrojen yüzdesi ve FTIR spektrumuna göre polianyonik fonksiyonel grupların ve elektrofilik grupların oluşturduğu germe titreşimi ve C=O grubunun karboksilat asimetrik germe ve gerdirmesi nedeniyle görülen zayıf sinyaller GD2 suşundan elde edilen L-EPS'ye göre daha fazladır. Bu sebeple, B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin antioksidan aktivitesinin GD2 suşundan elde edilen L-EPS'ye göre daha yüksek olması beklenmektedir. Elde ettiğimiz antioksidan aktivite sonuçları da bu çıkarımımızı destekler niteliktedir. B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin sahip olduğu yüksek antioksidan aktivitesinin nörokoruyucu etkisine katkısı olduğunu düşünmekteyiz.

AH'nin ana ayırt edici özelliği, beyinde A β plaklarına yol açan çözünmeyen A β 'nın nöron dışında birikmesidir (Xu ve diğerleri, 2019b). A β_{1-42} agregasyonunun inhibisyonu AH tedavisinde güncel olarak hedeflenen stratejilerden birisidir (Folch ve diğerleri, 2018). Bu sebeple, çalışmamızda L-EPS'lerin A β_{1-42} agregasyonu üzerine inhibitör etkileri belirlenmiştir. A β oligomerleri ve A β fibrillerinden de A β plaklarının oluştuğu bilinmektedir. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin artan konsantrasyonlarına ve uygulama sürelerine bağlı olarak A β_{1-42} agregasyonunu kontrol grubuna göre %0-38 arasında değişen oranlarda azalttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). A β_{1-42} agregasyonunun artan L-EPS konsantrasyonlarına ve uygulama sürelerine bağlı olarak azalması L-EPS'lerin A β_{1-42} agregasyonuna karşı inhibitör etkilerini göstermiştir. Her iki suştan elde edilen L-EPS'lerin artan konsantrasyonlarında ve uygulama sürelerinde A β_{1-42} agregasyonunu azalttığı belirlenmiş olup, en yüksek inhibitör etkiyi B3 suşundan elde edilen L-EPS göstermiştir (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). Elde ettiğimiz sonuçlara göre L-EPS'lerin A β_{1-42} agregasyonuna karşı en etkin konsantrasyonun 1250 μ g/mL ve en etkin uygulama süresinin ise 24 saat

olduğu tespit edilmiştir. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin en etkin koşulları (1250 µg/mL konsantrasyon ve 24 saat uygulama süresi) kullanılarak Aβ₁₋₄₂ agregasyonu üzerine inhibitör etkileri AFM ile de belirlenmiş olup, sonuçlar Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Şekil 4.8A'da Aβ₁₋₄₂'nin kendisi ile agregasyonu sonucu Aβ oligomerlerinin ve Aβ fibrillerinin oluştuğu gözlenmiştir. Şekil 4.8B ve C'de ise suşlardan elde edilen L-EPS'lerin (1250 µg/mL konsantrasyon ve 24 saat uygulama süresi) Aβ₁₋₄₂'nin kendisi ile agregasyonu sonucu oluşan Aβ oligomerlerini ve Aβ fibrillerini inhibe ettikleri tespit edilmiştir. AFM görüntülerine göre de B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin öne çıktığı görülmüştür. Elde ettiğimiz sonuçlar, L-EPS'lerin AH tedavisinde Aβ₁₋₄₂ agregasyonunun inhibitörü olarak kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin Aβ₁₋₄₂ agregasyonu üzerine inhibitör etkileri literatürde ilk defa belirlenmiştir. Literatürde bulunan kısıtlı sayıda çalışmada sadece bakteriler ya da farklı organizmalardan (alg, bitki, mantar ve yosun) elde edilen polisakkaritler kullanılmıştır (Athari Nik Azk ve diğerleri, 2018; Nimgampalle ve Kuna, 2017; Olasehinde, Mabinya, Olaniran ve Okoh, 2019a; Wang ve diğerleri, 2014b; Yeon ve diğerleri, 2010; Yu ve diğerleri, 2017). Literatürde yapılan çalışmalar, çalışmamız ile karşılaştırıldığında kullanılan organizma, Aβ₁₋₄₂, polisakkaritlerin uygulandığı konsantrasyon ve süre bakımından birbirinden farklılık gösterdiği için tam anlamıyla kıyaslanamamış olup, elde ettiğimiz sonuçlar literatürle uyumlu bulunmuştur. Zhou ve diğerleri (2018)'ne göre *Lycium barbarum* L.'den izole edilen yüksek moleküler ağırlıklı ve β-1,3 glikozitik bağına sahip farklı konsantrasyonlardaki arabinogalaktanın 45 saat uygulama süresinde 20 µM Aβ₁₋₄₂ agregasyonunu %52-58 arasında değişen oranlarda inhibe ettiği belirlenmiş olup, agreg olmuş Aβ₁₋₄₂'yi depolimerize ettiği tespit edilmiştir. Olasehinde ve diğerleri (2019a)'nin yaptıkları çalışmalara göre *Ecklonia maxima*, *Gelidium pristoides* ve *Ulva rigida*'dan elde edilen pürüzlü ve pürüzsüz yüzey morfolojisine sahip polisakkaritlerin 96 saat uygulama süresinde 5 µM Aβ₁₋₄₂'nin agregasyonu üzerine %7-19 arasında değişen oranlarda inhibitör etkileri belirlenmiştir. Pürüzlü yüzey morfolojisine sahip polisakkaritin Aβ₁₋₄₂'nin agregasyonu üzerine inhibitör etkisinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum pürüzlü yüzey morfolojisine sahip polisakkaritlerin Aβ₁₋₄₂'ye bağlanma kapasitesinin daha yüksek olduğunu düşündürmüştür. Tekrarlayan polianyonik fonksiyonel gruplara ve hidrofobik yüzeylere sahip polisakkaritlerin Aβ yapısının etkili inhibitörleri olduğu belirlenmiştir (Bravo ve diğerleri, 2008). *Lonicera japonica* Thunb.'dan elde edilen glikozca zengin farklı konsantrasyonlardaki glukanın da 36 saat uygulama süresinde 20 µM Aβ₁₋₄₂'nin agregasyonunu %25-70 arasında değişen oranlarda inhibe ettiği

belirlenmiştir (Wang ve diğerleri, 2014b). Literatürde yapılan çalışmalarda polisakkaritlerin $A\beta_{1-42}$ fibril oluşumunu doğrudan inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu durum fibrillerin parçalanmasına sebebiyet vererek onların agregasyonunu engellemiştir. Alternatif olarak, $A\beta_{1-42}$ fibril üretimini dolaylı olarak azaltmak için polisakkaritlerin antioksidan savunma sistemini modüle ettiği tespit edilmiştir (Li ve diğerleri, 2019b; Olasehinde ve diğerleri, 2019a; Wang ve diğerleri, 2014b; Zhou ve diğerleri 2020). Polisakkaritlerin $A\beta_{1-42}$ çevresinde, çözücü su molekülleri ile hidrojen bağları oluşturmak için $A\beta_{1-42}$ ile etkili bir şekilde rekabet edebileceği, böylece $A\beta_{1-42}$ 'nin doğal konformasyonunu stabilize ettiği ve $A\beta_{1-42}$ agregasyonunu inhibe edebileceği bir kaplama tabakası oluşturabileceği tespit edilmiştir (Wang ve diğerleri, 2014b). Çalışmamızda L-EPS'lerin nörokoruyucu etkileri ile $A\beta_{1-42}$ agregasyonu üzerine inhibitör etkileri arasında negatif yönlü, yüksek düzeyde -0,923 olan bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$). Literatürdeki çalışmalardan da $A\beta_{1-42}$ agregasyonun inhibisyonu ile nörokoruyucu etki arasında bir bağlantı olduğunu tespit edilmiştir. *Ecklonia maxima*, *Gelidium pristoides* ve *Ulva rigida*'dan elde edilen sülfatlanmış polisakkaritlerin kolinesterazlara, β -sekretaza ve $A\beta$ fibrillerinin agregasyonuna karşı inhibe edici etkiler sergileyerek nörokoruyucu özellik gösterdiği belirlenmiştir (Olasehinde ve diğerleri, 2019a). Liu ve diğerleri (2020), *Ulva*'dan elde edilen asidik polisakkaritin $A\beta$ fibrilasyonuna karşı inhibe edici etkisini bildirmişlerdir. Polisakkaritin hücre içi ROS üretimini etkili bir şekilde azaltarak, PC12 hücrelerini $A\beta$ fibrilasyonunun neden olduğu hasara karşı koruduğu belirlenmiştir. Literatürden ve çalışmamızdan elde edilen sonuçlar polisakkaritlerin $A\beta_{1-42}$ agregasyonu üzerine inhibitör aktivitelerinin, polisakkaritlerin monomer kompozisyonu, moleküler ağırlığı, glikozitik bağ yapısı, fonksiyonel gruplar ve yüzey morfolojisi gibi çeşitli yapısal parametrelere bağlı olarak değişebileceğini göstermiştir. B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin yüksek mannoz oranına, hem yüksek hem de düşük moleküler ağırlıklı 2 fraksiyona, β -1,3 glikozitik bağına, tekrarlayan polianyonik fonksiyonel gruplara ve pürüzlü yüzey morfolojisine sahip olması $A\beta_{1-42}$ agregasyonu üzerine inhibitör aktivitesinin buna bağlı olarakta nörokoruyucu etkisinin GD2 suşundan elde edilen L-EPS'ye göre daha yüksek olmasını açıklayabilir.

Çalışmamızda SH-SY5Y hücreleri $A\beta_{1-42}$ ile muamele edilerek, oksidatif stres ve apoptoz kaynaklı AH hücre modeli oluşturulması amaçlanmıştır. $A\beta_{1-42}$ 'nin oksidatif stres ve apoptozu indüklediği çeşitli çalışmalarla da gösterilmiştir (Chen ve diğerleri, 2018; Mao ve diğerleri, 2015). $A\beta_{1-42}$ 'nin hücre içi ROS miktarını ve apoptotik hücrelerin yüzdesini

arttırdığı bildirilmiştir (Yurinskaya ve diğerleri, 2015). $A\beta$ 'nin, stresle aktive olan protein kinazlar (SAPK)'ların [(hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK), c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38 mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (p38 MAPK)] oksidatif stres aracılı aktivasyonu boyunca mitokondriyal apoptozu (kaspaz 3 (CASP3) bağımlı) indükleyebileceğini ve bunun da proapoptotik mitokondriyal düzenleyici yolları bağımsız olarak, hem *TP53* hem de *BCL2*'ye bağlı olarak etkileyebileceğini göstermiştir (Tamagno ve ark., 2003a). $A\beta_{1-42}$ ile oluşturulan sitotoksikite AH için geçerli *in vitro* nöral dejenerasyon modellerinden biridir (Gürsoy Çalan, Akan, Bağrıyanık ve Fasıloğlu, 2014). AH için kullanılan hücre modellerinin amacı, AH'nin nöropatolojik bulgularını taklit etmek ve nörokoruyucu ajanların biyolojik sonuçlarının olup olmadığının ve bilişsel işlevin korelasyonunu belirlemektir (Aydoğan, 2017). Çalışmada, $A\beta_{1-42}$ (0-100 μ M) ile muamele edilen SH-SY5Y hücreleri 24 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığı belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak hiçbir uygulama yapılmamış SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır. $A\beta_{1-42}$ 'nin artan konsantrasyonlarında SH-SY5Y hücrelerine sitotoksik etkisinin arttığı bundan kaynaklı olarak da hücre canlılığının azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). ISO 10993-5 standartlarına göre, *in vitro* olarak test edilen ajanların sitotoksik etki düzeylerini belirlemek için dört nitel sınıflandırma grubu temel alınmıştır. Bu standartta yüksek derecede sitotoksik etki gösteren ajanların toplam hücre konsantrasyonunun %50'nin üzerinde hücre ölümüne sebep olduğu belirtilmişken, orta derecede sitotoksik etki gösteren ajanların, %50-79; hafif sitotoksik etki gösteren ajanların, %80-89; sitotoksik olmayan ajanların ise %90'a eşit veya daha fazla hücre canlılığı sağladığı belirtilmiştir (ISO, 2009). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre 25 μ M ve üzeri konsantrasyonlarda $A\beta_{1-42}$ 'nin SH-SY5Y hücrelerine %55-90 arasında değişen yüksek oranlarda sitotoksik etkisinin olduğu belirlenmiştir. $A\beta_{1-42}$ 'nin SH-SY5Y hücreleri üzerinde AH modeli oluşturabilecek ancak yüksek oranda sitotoksik etkisi olmayan etkin konsantrasyonu tespit edilmiş olup, bundan sonraki çalışmalara bu konsantrasyon (10 μ M) ile devam edilmiştir (Şekil 4.9). $A\beta_{1-42}$ 'nin SH-SY5Y hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini gösterir benzer sonuçlar literatürde de mevcuttur. 2 μ M $A\beta_{1-42}$ 'nin 48 saat inkübasyon sonucunda %10-30 arasında değişen oranlarda SH-SY5Y hücrelerine sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Wang ve diğerleri, 2014b). Yapılan bir başka çalışmaya göre 0-50 μ M arasında değişen konsantrasyonlarda $A\beta_{1-42}$ 'nin 48 saat uygulama süresi sonrasında %10-50 arasında değişen oranlarda SH-SY5Y hücrelerine sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Wei ve diğerleri, 2002).

Çalışmamızda L-EPS'lerin SH-SY5Y hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerinin olup olmadığı belirlenmiştir. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin artan konsantrasyonlarında SH-SY5Y hücrelerine sitotoksik etkilerinin arttığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Sitotoksik etki, ISO 10993-5 standartlarına göre belirlenmiştir (hücre ölümü, $\geq$ %50 ise yüksek derecede sitotoksik, %50-21 ise orta derecede sitotoksik, %20-11 ise hafif derecede sitotoksik, $\leq$ %10 ise sitotoksik değil). Uygulama yapılan tüm gruplar incelendiğinde L-EPS'lerin SH-SY5Y hücrelerine %2-19,3 arasında değişen oranlarda hafif derecede sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.10). Elde ettiğimiz sonuçlardan L-EPS'lerin uygulanan en yüksek konsantrasyonda dahi hücre canlılığını %80,7'nin üzerinde azaltmadığı gözlenmiştir. L-EPS'lerin SH-SY5Y hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini gösterir sonuçlar literatürde de mevcuttur. *L. plantarum* MTCC 9510 suşundan elde edilen EPS'nin (50 mg/mL) L929 normal fibroblast hücrelerine %60 oranında yüksek derecede sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (İsmail ve Nampoothiri, 2013). Çalışmamızda kullanılan L-EPS konsantrasyonu yüksek derecede sitotoksik etkisi belirlenen konsantrasyonun kırkta biridir. L6 normal fibroblast hücrelerine uygulanan *L. plantarum* RJF4 suşundan elde edilen EPS'nin (500 µg/mL) ise %35 oranında orta derecede sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Dilna ve diğerleri, 2015). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre L-EPS'lerin SH-SY5Y hücrelerine hafif derecede sitotoksik etkisinin olduğunun belirlenmesi, AH tedavisinde güvenli olarak kullanılabilirliğini göstermiş olup, AH tedavisinde kullanılan Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmış ve yan etkisi bulunan ilaçlara alternatif olabileceği görüşünü desteklemiştir. EPS'ler ve bunların türetilmiş bileşiklerinin, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri, toksik olmayan yapıları, biyolojik uyumlulukları ve düşük işlem masrafları nedeniyle sentetik polimerlere kıyasla tıbbi açıdan daha fazla tercih edildikleri bildirilmiştir (Ullah ve diğerleri, 2019). EPS'lerin çevresel koşullara dayanıklı olması, uygulama kolaylığı, aynı EPS'lerin kullanımı halinde her zaman stabil sonuç vermesi, uygulama dozu ve konsantrasyonun kolay ayarlanabilmesi, toz halinde bozulmadan uzun süre saklanabilmesi gibi avantajları dikkate alındığında, bu avantajlar EPS'lerin başarılı olarak uygulanabilirliğini ve ürün haline gelme potansiyelini daha da kuvvetlendirmiştir (Sarıkaya, 2014; Aslım, 2017).

Çalışmamız kapsamında SH-SY5Y hücrelerine A β ₁₋₄₂ uygulaması ile oluşturulan *in vitro* AH modelinde L-EPS'lerin A β ₁₋₄₂'ye karşı nörokoruyucu etkileri araştırılmıştır. A β ₁₋₄₂, hücre ölümünü kontrol grubuna göre %45 oranında arttırmıştır ($p<0,05$). A β ₁₋₄₂'nin sitotoksik etkisi sonucunda hücre ölümünü arttırdığı tespit edilmiş olup, bu sayede AH

modeli başarı ile oluşturulmuştur. A β 'nın nöronal hücrelerde serbest radikal üretimini arttırdığı bu sayede oksidatif strese ve hücre ölümüne yol açtığı belirlenmiştir (Muthaiyah, Essa, Chauhan ve Chauhan, 2011). Diğer yandan, suşlardan elde edilen farklı konsantrasyonlardaki L-EPS'lerin ise hücre ölümünü A β ₁₋₄₂ grubuna göre %4-30 arasında değişen oranlarda azalttığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$). L-EPS'ler ile yapılan uygulama sonucunda azalan sitotoksik etki ve artan hücre canlılığı, L-EPS'lerin A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde hücre ölümüne karşı nörokoruyucu etkilerini göstermiştir. Her iki suştan elde edilen L-EPS'lerin artan konsantrasyonlarında hücre ölümünü azalttığı belirlenmiş olup, en yüksek nörokoruyucu etkiyi B3 suşundan elde edilen L-EPS göstermiştir (Şekil 4.11). Çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar L-EPS'lerin AH tedavisinde A β ₁₋₄₂ ile indüklenen hücre ölümüne karşı nörokoruyucu ajan olarak kullanılabilirliğini göstermiş olması bakımından önem taşımaktadır. EPS'lerin hücre ölümüne karşı nörokoruyucu etkilerinin çalışıldığı literatür sayısı çok sınırlı olup, bu çalışmalarda genellikle farklı organizmalardan (alg, bitki, mantar ve yosun) elde edilen polisakkaritler kullanılmıştır (Liu ve diğerleri, 2017; Wang ve diğerleri, 2014b). Bu bağlamda bu çalışma sonuçları literatüre önemli katkı sağlayacaktır. EPS'lerin hücre ölümüne karşı nörokoruyucu etkilerinin oksidatif, enflamatuvar ve proteotoksik stresler dahil birden çok stresin hafifletilmesiyle ilişkili olduğu belirlenmiştir (Li ve diğerleri, 2017a). *In vitro* ve *in vivo* deneyler, EPS'lerin nörit büyümesinin ve nükleer faktör- κ B (NF- κ B), fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K)-AKT/PKB, MAPK, nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2/hem oksijenaz-1 sinyal yollarının modülasyonu yoluyla nörokoruyucu etkiler sağlama yeteneğini göstermiştir (Gao ve diğerleri, 2018). Li, Jin, Meng, Gao ve Lu (2013e)'nin yaptıkları çalışmaya göre *L. planterum* LP6 suşundan elde edilen EPS'lerin hidrojen peroksit ile PC12 hücrelerinde oluşturulan oksidatif stres modelinde yaklaşık olarak %10-25 oranında hücre ölümüne karşı nörokoruyucu etkilerini tespit etmişlerdir. EPS'lerin hücre içi antioksidan enzim sisteminin aktivitelerini arttırarak ve lipid peroksidasyonunu inhibe ederek hücre ölümüne karşı nörokoruyucu etki gösterdikleri belirlenmiştir. *Lonicera japonica* Thunb.'dan elde edilen glukanın A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde yaklaşık olarak %20 oranında hücre ölümüne karşı nörokoruyucu etkisi belirlenmiştir. Glukanın A β ₁₋₄₂ agregasyonunu doğrudan bloke ettiği ve bu sayede A β ₁₋₄₂'nin sitotoksik etkisini zayıflatıldığını tespit edilmiştir (Wang ve diğerleri, 2014b). Çalışmamızdaki A β ₁₋₄₂ ile oluşturulan hücre ölümüne karşı L-EPS'lerin nörokoruyucu etki oranı literatürdeki çalışmalarla benzer bulunmuştur. Xiang ve diğerleri (2015), *Rhizoma dioscoreae*'dan elde edilen polisakkaritlerin nöronal hücrelerde hücre

ölümüne karşı nörokoruyucu etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Nörokoruyucu etki sonucunda, hipoksiye bağlı mitokondriyal hasar ve apoptozun azaldığı tespit edilmiştir. EPS'lerin nörokoruyucu etkilerinin, sahip oldukları kimyasal yapıları ile yakından bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (Gao ve diğerleri, 2018). EPS'lerin sahip olduğu kimyasal yapıya göre EPS'lerin göstereceği nörokoruyucu etki mekanizmasının da farklılık gösterebileceği sonucuna varılmıştır. B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin yüksek mannoz oranına, hem yüksek hem de düşük moleküler ağırlıklı 2 fraksiyona, β -1,3 glikozitik bağına, tekrarlayan polianyonik fonksiyonel gruplara, pürüzlü yüzey morfolojisine ve amorf karaktere sahip olması nörokoruyucu etkisinin altında yatan yapısal özellikler olabilir. Bu etkinin altında yatan yapısal özelliklerin belirlenebilmesi için ileri düzey çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

AH, merkezi kolinerjik nöronların erken dejenerasyonu ile ilerleyen bir hastalıktır (Karami ve diğerleri, 2019). AChE enzimi, nörotransmitter asetilkolinin hidrolizinde anahtar enzimdir ve aynı zamanda AH tedavisi için klinik olarak kullanılan ilaçların çoğunun hedefidir (Saxena ve Dubey, 2019). AChE inhibitörlerinin, beyindeki sinapslarda asetilkolinin mevcudiyetini arttığı belirlenmiştir. Kolinerjik sistem AH'deki terapötik hedeflerden birisidir (Hampel ve diğerleri, 2018). Bu sebeple, A β ₁₋₄₂ ile SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan AH modelinde suşlardan elde edilen L-EPS'lerin AChE enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkisi belirlenmiştir. A β ₁₋₄₂, AChE enzim aktivitesini kontrol grubuna göre %25 oranında arttırmıştır ($p<0,05$). A β ₁₋₄₂ ile yapılan uygulama sonucunda AChE enzim aktivitesinin indüklendiği belirlenmiştir. AChE aktivitesinin, AH sahip hastanın beyinde bulunan amiloid plaklarının içinde ve çevresinde arttığı belirlenmiştir. A β ₂₅₋₃₅ tarafından indüklenen AChE enzim aktivitesinin artmasına oksidatif stresin aracılık ettiği bildirilmiştir (Melo, Agostinho ve Oliveira, 2003). Biyokimyasal çalışmalar AChE'nin periferik anyonik bölgesinin A β ile etkileşimi yoluyla AChE-A β kompleksleri oluşturarak amiloid fibril oluşumunu indüklediği göstermiştir. AChE-A β komplekslerinin indüklediği nörotoksisite, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak tek başına A β 'nın indüklediğinden daha yüksek bulunmuştur (Aisen, 2002). Diğer yandan, suşlardan elde edilen 100, 250 ve 500 μ g/mL konsantrasyonlardaki L-EPS'lerin AChE enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkileri tespit edilememiştir ($p<0,05$). Suşlardan elde edilen 1000 ve 1250 μ g/mL konsantrasyonlardaki L-EPS'lerin ise AChE enzim aktivitesini A β ₁₋₄₂ grubuna göre %8-15 arasında değişen oranlarda azalttığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Azalan AChE enzim aktivitesi L-EPS'lerin A β ₁₋₄₂ ile indüklenen AChE enzim aktivitesi üzerine inhibitör

etkilerini göstermiştir. Her iki suştan elde edilen L-EPS'lerin 1000 ve 1250 µg/mL konsantrasyonlarda AChE enzim aktivitesini azalttığı belirlenmiş olup, en yüksek inhibitör etkiyi B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin 1250 µg/mL konsantrasyonu göstermiştir (Şekil 4.12). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar 1000 ve 1250 µg/mL konsantrasyonlardaki L-EPS'lerin AH'de kolinerjik transmisyonu düzeltmek için AChE inhibitörü olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin AChE enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkilerinin çalışıldığı literatür sayısı çok sınırlıdır. Literatürde bulunan çalışmalarda alg, bitki, mantar ve yosun gibi farklı organizmalardan elde edilen polisakkaritler kullanılmıştır (Liu ve diğerleri, 2017; Wang ve diğerleri, 2014b). *Physalis alkekengi L.*'den izole edilen mannoz ve glikoz içeren polisakkaritin AChE inhibitör aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Liu ve diğerleri, 2019). *Achromobacter piechaudii* NRC2 suşundan elde edilen moleküler ağırlığı $5,67 \times 10^3$ g/mol olan EPS'nin *in vitro* AChE enzim aktivitesini %38 oranında azalttığı saptanmıştır. Bu inhibisyon aktivitesine EPS'nin sahip olduğu antioksidan aktivitesinin eşlik ettiği tespit edilmiştir (Asker, Mahmoud, İbrahim ve Mohamed, 2015). *Flammulina velutipes*'den elde edilen polisakkaritlerin AChE inhibitör aktivitesi ve DPPH radikalini süpürme aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Yang, Fang, Liang ve Hu, 2011). Tsai ve diğerleri (2015) tarafından yapılan bir çalışmada *Cordyceps militaris*'den elde edilen β-1,3 glikozitik bağına sahip polisakkarit peptit komplekslerinin AChE'ye karşı karakteristik inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmaya göre *in silico* olarak tasarlanan β-glukanın *ex vivo* AChE enzim aktivitesini %20-60 arasında değişen oranlarda azalttığı tespit edilmiştir. Elde edilen verilere göre β-glukanın AChE'nin önemli katalitik bölgeleri (Ser203, Ser125, Thr83 ve Tyr341) ile hidrojen bağı oluşturduğu belirlenmiştir. Oluşan hidrojen bağı ile karbonil grubuna nükleofilik bir katılmanın AChE'yi indirgediği bildirilmiştir (Haider, Inam, Khan, Mahmood ve Abbas, 2016). AChE'nin aktif bölgesinin, katalitik cebi çok dar yapan ve bu nedenle büyük substratları kabul etmeyen ancak küçük substratları tercih eden birkaç fenilalanin rezidüsünden oluştuğu tespit edilmiştir (Mebrek ve diğerleri, 2018). EPS'ler enzim substratı olan asetilkolin ile aynı aktif bölgeye bağlanmıştır. Bu sayede reaksiyon metabolize edilememiştir (Tsai ve diğerleri, 2015). Elde edilen sonuçlar varsayımsal olarak, EPS'lerin kolinerjik sistemi modüle etmede ve bellek fonksiyonlarını iyileştirmede potansiyel bir değere sahip olabileceği anlamına gelmiştir (Liu ve diğerleri, 2019). Çalışmamızda L-EPS'lerin nörokoruyucu etkileri ile AChE enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkileri arasında negatif yönlü, yüksek düzeyde -0,896 olan bir ilişki bulunmuştur ($p < 0,05$). AChE inhibitör aktivitesi ile nörokoruyucu etki arasında

pozitif bir korelasyon olduğu literatürden elde edilen verilerle de kanıtlanmıştır. Olasehinde, Mabinya, Olaniran ve Okoh (2019b)'nin yaptıkları çalışmaya göre *Gracilaria gracilis* ve *Ulva lactuca*'dan izole edilen polianyonik fonksiyonel sülfat grubuna sahip polisakkaritlerin antioksidan aktivite ve kolinesteraz inhibitör aktivitesi sayesinde nörokoruyucu etki gösterdiğini belirlemişlerdir. *Ulva rigida*'dan elde edilen polianyonik sülfat grubuna ve pürüzlü yüzey morfolojisine sahip polisakkarit kolinesterazlara, β -sekretaza ve A β fibrillerinin agregasyonuna karşı inhibe edici etki sergileyerek nörokoruyucu özellik göstermiştir (Olasehinde ve diğerleri, 2019a). Literatürde yapılan çalışmalara göre EPS'lerin kimyasal yapılarındaki farklılıkların AChE inhibitör aktivitesini etkilediği düşünülmüştür. B3 suşundan elde edilen EPS'nin sahip olduğu yüksek mannoz oranının, hem yüksek hem de düşük moleküler ağırlıklı 2 fraksiyonun, β -1,3 glikozitik bağının, polianyonik fonksiyonel grupların ve pürüzlü yüzey morfolojisinin bu inhibitör aktivitede rol oynadığı söylenebilir.

Sağlıklı dokulardaki oksidan/antioksidan dengesinin, antioksidanların baskınlığı ile korunduğu bilinmektedir. Doku hasarına neden olabilecek çeşitli faktörler oksidan/antioksidan dengesini oksidan lehine bozmaktadır (Kısaoğlu, Börekçi, Yapca, Bilen ve Süleyman, 2013). Total antioksidan seviyesi (TAS); sodyum dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleri dahil olmak üzere enzimatik antioksidanların yanı sıra enzimatik olmayan antioksidanları da kapsamaktadır (Gupta ve diğerleri, 2011; Wang ve diğerleri, 2012). Bu nedenle, her antioksidandan ziyade sadece TAS'ı nicel olarak ölçmek, vücut oksidan/antioksidan dengesini daha iyi bir şekilde değerlendirmeye olanak sağlayacaktır (Arıkanoglu ve diğerleri, 2013). Moslemnezhad ve diğerleri (2016), oksidatif stres ve AH arasında, AH'nin gelişiminde ve AH'nin sağlıklı kontrollerden ayırt edilmesinde bir gösterge olarak TAS belirtecinin olası katkı rolünü gösteren bir bağlantı olduğunu göstermiştir. AH'de SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerinin de oksidatif stres belirteci olarak kullanıldığı gösterilmiştir (Puertas ve diğerleri, 2012). Bu sebeple suşlardan elde edilen L-EPS'lerin A β ₁₋₄₂ ile oluşturulan AH modelinde TAS ve SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri üzerine indükleyici etkileri değerlendirilmiştir. A β ₁₋₄₂'nin TAS'ı ve SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerini kontrol grubuna göre sırasıyla %18; %62; %58 ve %34 oranlarında azalttığı belirlenmiştir ($p<0,05$). A β ₁₋₄₂, TAS'ı ve temel antioksidan savunma hattındaki SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerini azaltarak, SH-SH5Y hücrelerini ROS'a karşı savunmasız hale getirmiştir. Bu sayede hücrelerde ROS kaynaklı oksidatif stres oluşmuştur. A β ₁₋₄₂'nin

ROS'u indükleyerek oksidatif strese yol açtığı belirlenmiştir (Yang ve diğerleri, 2019). Ying ve Wei (2017), $A\beta_{1-42}$ ile oluşturulan deneysel AH modelinde $A\beta_{1-42}$ 'nin ROS'u indüklediğini ve TAS'ı düşürdüğünü tespit etmişlerdir. AH ve vasküler demans hastalarından alınan kan örneklerinde sağlıklı demanssız kontrollere göre SOD, CAT, GPx ve glutatyon redüktaz enzim aktivitelerinin azaldığı belirlenmiştir. Gözlemlenen değişikliklerin çoğunun SOD enzim aktivitesinde olduğu tespit edilmiştir (Casado, Lopez Fernandez, Casado ve De La Torre, 2008). Diğer yandan, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin ise TAS'ı ve SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerini $A\beta_{1-42}$ grubuna göre %36-69; %104-296; %48-211 ve %32-90 arasında değişen oranlarda arttırdığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Artan TAS ve SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri L-EPS'lerin $A\beta_{1-42}$ ile oluşturulan oksidatif strese karşı antioksidan savunmayı güçlendirdiğini göstermiştir. L-EPS'lerin SOD enzim aktivitesine etkisi en yüksek iken, GPx enzim aktivitesine etkisi ise en düşüktür. AH'de SOD enzim aktivitesinin diğer antioksidan enzim aktivitelerine göre daha çok etkilendiği belirlenmiştir (Casado ve diğerleri, 2008). Suşlardan elde edilen L-EPS'lerin SOD enzim aktivitesine etkisinin en yüksek olması bu bakımdan önem taşımaktadır. Her iki suştan elde edilen L-EPS'lerin artan konsantrasyonlarında TAS'ı ve SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerini arttırdığı belirlenmiş olup, en yüksek indükleyici etkiyi B3 suşundan elde edilen L-EPS göstermiştir (Çizelge 4.4, 4.5, 4.6 ve 4.7). Çalışmadan elde edilen sonuçlar L-EPS'lerin gösterdikleri antioksidan aktivite sonucunda azalan TAS'ı arttırarak ve azalan antioksidan enzim aktivitelerini (SOD, CAT ve GPx) indükleyerek $A\beta_{1-42}$ tarafından oluşturan oksidatif strese karşı koruma sağladığını göstermiştir. Bu durum L-EPS'lerin gösterdiği antioksidan aktivite sonuçlarımızı da destekler niteliktedir. Suşlardan elde edilen tüm konsantrasyonlardaki L-EPS'lere ait TAS'ın kontrol grubundan daha yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. SOD ve GPx enzim aktivitelerinin de B3 suşundan elde edilen 100 $\mu\text{g/mL}$ hariç tüm konsantrasyonlardaki L-EPS'lerde kontrol grubundan daha yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. GD2 suşunda ise bu etki sadece 500, 1000 ve 1250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki L-EPS'lerde saptanmıştır. CAT enzim aktivitesinde ise her iki suştan elde edilen 1000 ve 1250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki L-EPS'lerin benzer etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir. Literatürde de benzer durumlarla karşılaşmıştır. Zhang ve diğerleri (2013)'nin yaptıkları çalışmada *L. plantarum* C88 suşundan elde edilen EPS uygulanan gruplarda TAS'ın kontrol grubunun üzerinde olduğu bulunmuştur. Yapılan başka bir çalışmada ise aynı suştan elde edilen EPS'nin uygulandığı gruplarda SOD enzim aktivitesinin kontrol grubunun üzerine çıktığı tespit edilmiştir (Zhao ve diğerleri, 2017). Bu durum L-EPS'lerin

oksidatif strese karşı güçlü bir antioksidan cevap oluşturduğunu düşündürmüştür. Literatürde yer alan çalışmalarda antioksidan aktivite ile TAS ve SOD, CAT ve GPx enzim aktiviteleri arasında ilişki olduğu bulunmuştur. Li ve diğerleri (2013e)'nin yaptıkları çalışmalara göre PC12 hücrelerinde hidrojen peroksitin TAS'ı kontrol grubuna göre %78 oranında azalttığı belirlenmiştir. *L. plantarum* LP6 suşundan elde edilen saflaştırılmış EPS'lerin ise TAS'ı hidrojen peroksit grubuna göre %94-294 oranında arttırdığı tespit edilmiştir. EPS'ler bu etkileri serbest radikal süpürme aktivitesi ve indirgeme gücü ile göstermiştir. Yapılan bir başka çalışmada, *L. plantarum* C88 suşundan elde edilen $1,15 \times 10^6$ Da moleküler ağırlığındaki ve 1:2 molar oranında galaktoz ve glikoz içeren farklı konsantrasyondaki EPS'lerinin hidrojen peroksit ile oluşturulan oksidatif stres modelinde sırasıyla %33 ve %66 oranlarında azalan TAS ve SOD enzim aktivitesini sırasıyla %100-150 ve %0-150 oranlarda arttırdığını tespit etmişlerdir. EPS'lerin TAS ve SOD enzim aktivitesini etkileme mekanizmasında DPPH ve hidroksil radikalini süpürme aktivitesi yer almıştır (Zhang ve diğerleri, 2013). Guo ve diğerleri (2013)'nin yaptıkları çalışmaya göre *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*'den elde edilen EPS'lerin normal fare grubuna göre SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerini sırasıyla %7,2-19,65; %6,13-33,32 ve %5,78-32,77 arasında değişen oranlarda arttırdığı tespit edilmiştir. EPS'lerin süperoksit ve hidroksil radikallerini süpürme aktivitesi göstererek antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir. Zhang ve diğerleri (2017)'nin yaptıkları çalışmaya göre yaşlanmış fare grubunda TAS'ın ve SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerinin normal fare grubuna göre sırasıyla %50; %25; %50 ve %15 oranlarında azaldığı belirlenmiştir. *L. plantarum* YW11 suşundan elde edilen EPS'lerin TAS'ı ve SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerini yaşlanmış fare grubuna göre sırasıyla %45; %15; %40 ve %5 oranlarında arttırdığı tespit edilmiştir. EPS'lerin antioksidan özellik göstermesinde demir iyonunu şelatlama ve DPPH, hidroksil ve süperoksit anyon radikallerini süpürme aktivitesi rol oynamıştır. *L. fermentum* S1 suşundan elde edilen $7,19 \times 10^5$ Da moleküler ağırlığındaki, mannoz içeren ve β -1,3 glikozitik bağına sahip EPS'nin artan konsantrasyonlarında antioksidan etki göstererek TAS'ı ve SOD enzim aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. EPS'lerin antioksidan etkilerini 2,2'-azinobis 3-etil-bezotiazolin 6 sülfonat, DPPH, hidroksil radikallerini süpürme aktiviteleri ve demir iyonunu indirgeyici antioksidan güç ile gösterdiği tespit edilmiştir (Wang ve diğerleri, 2019a). EPS'lerin yapısında bulunan polianyonik fonksiyonel grupların, intramoleküler hidrojen ayrılmasını hızlandıran ve serbest radikallerin zincir reaksiyonunu kırmak için spirociklizasyon reaksiyonunu indükleyebilen alkoksil ürünlerini üretmek üzere elektron eksikliği olan serbest radikallere hidrojen verdiği tespit edilmiştir (Li ve diğerleri, 2017a).

EPS'lerin antioksidan özellikleri serbest radikalleri süpürme aktivitesi, metal iyonlarını şelatlama aktivitesi ve serbest radikallerin zincir reaksiyonlarını kırma aktivitesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. EPS'lerin serbest radikal üreten enzimleri baskılayarak veya SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzim aktivitelerini indükleyerek serbest radikal üreten enzimleri düzenlediği belirlenmiştir (Andrew ve Jayaraman, 2020). Çalışmamızda L-EPS'lerin nörokoruyucu etkileri ile TAS ve SOD, CAT, GPx enzim aktiviteleri üzerine indükleyici etkileri arasında pozitif yönlü, yüksek düzeyde sırasıyla 0,992; 0,986; 0,991 ve 0,996 olan bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$). Literatürde yapılan çalışmalarda da antioksidan aktivite ile nörokoruyucu etki arasında anlamlı bir ilişkinin bulunduğu saptanmıştır. *Chuanminshen violaceum*'dan izole edilen polisakkaritlerin, yaşlanmayı hızlandıran bir madde olan ve oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon yoluyla AH semptomlarına benzer bilişsel ve motor performans bozulmasını tetikleyen D-galaktoz enjekte edilen farelerde SOD, CAT, GPx ve tiyoredoksin izoformlarının mRNA ekspresyon düzeylerini yukarı regüle ettiği ve bu antioksidan enzim ve enzimatik olmayan genlerin aktivitelerini arttırarak nörokoruyucu etki gösterdikleri belirlenmiştir (Fan ve diğerleri, 2017). Han ve diğerleri (2015)'nin yaptıkları çalışmada *Radix Cyathulae officinalis* Kuan'dan elde edilen mannoz ve glikoz içeren polisakkaritin D-galaktoz ile oluşturulan yaşlandırılmış farelerde SOD, CAT, GPx ve tiyoredoksin genlerinin ekspresyon seviyelerini arttırdığı belirlenmiştir. Polisakkaritin nörokoruyucu etkisinin, antioksidan enzim aktivitelerinin mRNA ekspresyonu üzerindeki indüksiyonu ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Literatürden ve çalışmamızdan elde edilen sonuçlar EPS'lerin antioksidan kapasitesinin buna bağlı olarak nörokoruyucu etkisinin herhangi bir tek faktörün değil, birkaç faktörün kombinasyonunun sonucu olduğunu düşündürmüştür. EPS'lerin monosakkarit bileşimine ek olarak, moleküler ağırlığı, glikozitik bağlantı tipleri, fonksiyonel grupları, yüzey morfolojisi ve kristalografik özellikleri gibi diğer faktörlerin de EPS'lerin antioksidan aktivitesini ve nörokoruyucu özelliğini etkileyebileceği bulunmuştur (Wang ve diğerleri, 2019b).

Total oksidan seviyesi (TOS) sıklıkla oksidatif stresin biyobelirteci olarak kullanılmaktadır (Peluso ve Raguzzini, 2016). TOS tüm serbest radikallerin sentezinin bir göstergesi olarak da kullanılabilir (Arıkanoglu ve diğerleri, 2013). ROS arasında süperoksit, hidroksil, peroksil, lipid peroksil ve alkoksil serbest radikalleri yer almaktadır (Karabulut ve Gülay, 2016). ROS'un hücre zarı lipidlerinin peroksidasyonunu tetiklediği, zarın akışkanlığı gibi biyolojik özelliklerini değiştirdiği ve zara bağlı reseptörleri veya enzimleri etkisiz hale

getirdiği, normal hücresel işlevi bozduğu, kimyasal olarak reaktif olabilen ve diğer makromolekülleri değiştirebilen yeni oksitlenmiş ürünler üreten hücresel hasarı arttırdığı belirlenmiştir. Oksidatif stresin erken AH evrelerinde başlayan anahtar bir rol oynadığı bilinmektedir (Garcia Blanco ve diğerleri, 2017). Oksidatif stres lipitlere, proteinlere ve nükleik asitlere oksidatif hasarın spesifik biyobelirteçleri ile dolaylı olarak gösterilebilmektedir. Oksidatif lipit hasarının biyobelirteçleri arasında 4-hidroksinonenal, malondialdehit, lipit hidroperoksitler, izoprostanlar ve tiyobarbitürik asitle reaktif maddeler bulunmaktadır. Oksidatif stres tarafından oluşturulan protein hasarı, protein karboniller ve protein nitrasyonu ile ortaya çıkmaktadır. 8-hidroksiguanin veya alternatif olarak 8-hidroksi-2'-deoksiguanozinin miktarının belirlenmesi, oksidatif DNA hasarının biyobelirtecidir (Coppede ve Migliore, 2011). Bu sebeple, A β ₁₋₄₂ ile oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin TOS ve hücre içi ROS miktarı üzerine baskılayıcı etkileri değerlendirilmiştir. A β ₁₋₄₂'nin TOS'u ve hücre içi ROS miktarını kontrol grubuna göre sırasıyla %42 ve %275 oranlarında arttırdığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Oksidatif stres, TAS ile TOS arasındaki dengenin bozulması nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Artan TOS ve hücre içi ROS miktarı, oksidatif stresin belirtecidir. Bu durum A β ₁₋₄₂'nin oksidatif stresi etkin bir şekilde arttırdığını göstermiştir. AH'ye sahip beyinlerde oksidatif stres kaynağı olarak A β ₁₋₄₂ oligomerleri gösterilmiştir. Oksidatif stresin A β ₁₋₄₂'den zengin beyin bölgelerinde meydana geldiği, ancak A β ₁₋₄₂'den fakir bölgelerde bu stresin olmadığı tespit edilmiştir (Butterfield ve Boyd Kimball, 2018). Diğer yandan, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin ise TOS'u ve hücre içi ROS miktarını A β ₁₋₄₂ grubuna göre %21-47 ve %50-69 arasında değişen oranlarda azalttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Azalan TOS ve hücre içi ROS miktarı L-EPS'lerin A β ₁₋₄₂ ile oluşturulan oksidatif strese karşı baskılayıcı etkilerini göstermiştir. Ayrıca, B3 suşundan elde edilen 500, 1000 ve 1250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki L-EPS'nin ve GD2 suşundan elde edilen 1000 ve 1250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki L-EPS'nin TOS'u kontrol grubundan daha düşük seviyede olduğu belirlenmiştir. Literatürde de benzer durumlarla karşılaşmıştır. Zhang ve diğerleri (2013)'nin yaptıkları çalışmada *L. plantarum* C88 suşundan elde edilen EPS uygulanan gruplarda malondialdehit oluşum seviyesinin kontrol grubunun altında olduğu bulunmuştur. Bu durum EPS'lerin oksidatif strese karşı güçlü bir antioksidan cevap oluşturduğunu düşündürmüştür. Her iki suştan elde edilen L-EPS'lerin artan konsantrasyonlarında TOS'u ve hücre içi ROS miktarını azalttığı belirlenmiş olup, en yüksek baskılayıcı etkiyi B3 suşundan elde edilen L-EPS göstermiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.13). Çalışmadan elde edilen sonuçlar L-EPS'lerin gösterdikleri antioksidan aktivite sonucunda artan TOS'u azaltarak ve hücre içi ROS miktarını

baskılayarak A β ₁₋₄₂ ile indüklenen oksidatif strese karşı koruma sağladığını göstermiştir. Literatürde yer alan çalışmalarda antioksidan aktivite ile TOS ve hücre içi ROS miktarı arasında negatif bir korelasyonun olduğu bulunmuştur. Negatif korelasyon nörokoruyucu etkinin göstergesidir. Çalışmamızda da L-EPS'lerin nörokoruyucu etkileri ile TOS ve hücre içi ROS miktarı üzerine baskılayıcı etkileri arasında negatif yönlü, yüksek düzeyde sırasıyla -0,977 ve -0,982 olan bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$). *L. lactis* subsp. *lactis*'den elde edilen EPS'lerin normal fare grubuna göre serumda ve farelerin karaciğerindeki lipid peroksidasyonun belirteci olan malondialdehit seviyesini %17-58 ve %1-46 oranlarında düşürdüğü tespit edilmiştir (Guo ve diğerleri, 2013). Li ve diğerleri (2013e)'nin yaptıkları çalışmaya göre PC12 hücrelerinde hidrojen peroksitin malondialdehiti ve laktat dehidrogenazı kontrol grubuna göre sırasıyla %210 ve %102 oranlarında arttırdığı, *L. plantarum* LP6 suşundan elde edilen EPS'lerin ise malondialdehiti ve laktat dehidrogenazı hidrojen peroksit grubuna göre sırasıyla %28-53 ve %12-30 oranlarında azalttığı tespit edilmiştir. EPS'nin malondialdehit oluşumunu engellediği, zarın çapraz bağlanmasını azalttığı, zar akışkanlığı ve sinyal iletimindeki düşüşü sınırladığı belirlenmiştir. *Lycium barbarum* polisakkaritlerinin PC12 hücrelerinde 6-hidroksi dopamin ile indüklenen oksidatif hasara karşı nörokoruyucu etkilerini hücre içi ROS ve nitrik oksit birikimini yavaşlatarak, protein oksidasyonunun belirteci olan 3-nitrotirozin ve hücre içi serbest kalsiyum düzeylerini düşürerek ve NF- κ B/p65, nöronal nitrik oksit sentaz ve indüklenabilir nitrik oksit sentazın aşırı ekspresyonunu inhibe ederek göstermişlerdir (Gao ve diğerleri, 2015). *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.'dan elde edilen polisakkaritlerin oksidatif stres oluşturulmuş deneysel hayvan modelinde serum, karaciğer ve kasta artan malondialdehit ve oksidatif DNA hasarı göstergesi olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin seviyelerini azalttığı belirlenmiştir (Yan, Wang ve Zhang, 2014). Yang ve diğerleri (2015b)'nin yaptıkları çalışmaya göre HepG2 hücrelerinde hidrojen peroksitin malondialdehit (%200 oranında) ve hücre içi ROS miktarını kontrol grubuna göre arttırdığı, *B. amyloliquefaciens*'den elde edilen mannoz ve glikozca zengin EPS'lerin ise malondialdehit (%15-45 oranlarında) ve hücre içi ROS miktarını hidrojen peroksit grubuna göre azalttığı belirlenmiştir. EPS'lerin, hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif strese enzimatik ve enzimatik olmayan hücre içi antioksidan savunmaları arttırarak yanıt verdiği tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmaya göre HUVECs hücrelerinde glikozun hücre içi ROS miktarını kontrol grubuna göre %450 oranında arttırdığı, *Bordetella* sp. B4 suşundan elde edilen glikozca zengin, α -1,4, β -1,6 glikozitik bağlarını içeren EPS'lerin ise hücre içi ROS miktarını glikoz grubuna göre %35-90 oranlarında azalttığı tespit edilmiştir. EPS'lerin oksidatif hasara karşı

nörokoruyucu etkisinin redoks depolimerizasyonuna bağlı olduğu belirlenmiştir (Lin ve diğerleri, 2012). Nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2/antioksidan yanıt elemanı, MAPK'ler, PI3K-AKT/PKB ve insülin/insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IIS)'in yer aldığı bir takım sinyal yollarının, oksidatif stresi de içeren çoklu streslere verilen hücre yanıtlarıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Cohen ve Dillin, 2008; Kaspar, Nitire ve Jaiswal, 2009; Kim ve Choi, 2010). Hücresel antioksidan yanıtta önemli rol oynayan bazik lösin fermuarı transkripsiyon faktörü bölgesi olan Nrf2'nin aktive edildiğinde çekirdek içerisine yer değiştirerek ARE'ye bağlanmakta olduğu ve böylece hücresel antioksidan ve anti-inflamatuvar savunmada ve mitokondriyal korumada yer alan genlerin yukarı regülasyonuna yol açtığı belirlenmiştir (Kaspar ve diğerleri, 2009). Yaşlanmayı geciktirmek ve nöron fonksiyonunu iyileştirmek için kullanılan *Lycium barbarum*'dan elde edilen polisakkaritin, insan keratinosit HaCaT hücrelerinde Nrf2'nin çekirdeğe translokasyonunu ve Nrf2 bağımlı ARE hedef genlerinin ekspresyonunu artırarak, hücre canlılığında ultraviyole B tarafından indüklenen düşüşü ve ROS düzeyi artışını azalttığı gösterilmiştir (Li ve diğerleri, 2017b). Parakuat maruziyeti altındaki yabanıl tip *Caenorhabditis elegans*'ta *Dictyophora indusiata* polisakkaritinin DAF-16/FOXO transkripsiyon faktörünün çekirdeğe translokasyonunu destekleyerek oksidatif sağkalımı arttırdığı gösterilmiştir. DAF-16, IIS'deki çok önemli bir regülatör olduğundan, polisakkaritin antioksidan aktivitesinin organizma metabolizmasını ve ömrünü düzenleyen evrimsel olarak korunmuş bir yol olan IIS ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (Zhang ve diğerleri, 2016). EPS'lerin oksidatif stres üzerine baskılayıcı etkileri; 4-hidroksinonenal, malondialdehit, lipid hidroperoksitler, izoprostanlar ve tiyobarbitürik asitle reaktif maddeler içeriğini azaltması, protein karbonil oluşumunu ve protein nitrasyonunu baskılaması, süperoksit anyon, hidroksil, peroksil, lipid peroksil ve alkoksil radikallerini süpürme aktivitesi, ROS'un zincir reaksiyonlarını kırma aktivitesi, SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimlerin modülasyonu ve ROS'la ilişkili peroksidasyon ürünlerinin düzeylerinin düşürülmesi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Andrew ve Jayaraman, 2020; Li ve diğerleri, 2017a). Elde ettiğimiz sonuçlar ve literatürden elde ettiğimiz sonuçlara göre EPS'lerin oksidatif strese karşı gösterdikleri etki mekanizmasındaki farklılıkların EPS'lerin yapısal özelliklerine (monosakkarit bileşimleri, moleküler ağırlıkları, bağlantı türleri, zincir konformasyonları, fonksiyonel grupları, yüzey morfolojileri ve kristalografik özellikler) bağlı olduğu düşünülmüştür.

L-EPS'lerin antioksidan aktivitelerinden (DPPH serbest radikalini süpürme aktivitesi, hidroksil radikalini süpürme aktivitesi, süperoksit anyon radikalini süpürme aktivitesi ve lipid peroksidasyonun inhibisyon oranı) elde ettiğimiz sonuçlar, ticari kitlerden (TAS, SOD, CAT, GPx enzim aktiviteleri ve TOS) ve flow sitometreden elde ettiğimiz sonuçları (hücre içi ROS miktarı) destekler nitelikte olup, L-EPS'lerin antioksidan etki sonucu A β ₁₋₄₂ kaynaklı oksidatif stresi baskıladığını gösterir niteliktedir.

Mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözenəğinin, AH'ye yol açan mitokondriyal yapı ve fonksiyon değişikliklerinde merkezi bir rol oynadığı belirlenmiştir. Bu geçiş gözenəğı, voltaj bağımlı anyon kanalından ve adenin nükleotid translokatoründen oluşmaktadır (Rao, Carlson ve Yan, 2014). Hücre dışı veya hücre içi A β 'nın, reseptöre bağlı yol, TOM40 makinesi ve doğrudan endoplazmik retikulum-mitokondri transferi yoluyla mitokondriye taşınabildiği tespit edilmiştir. A β ve mitokondriyal proteinlerin etkileşimleri sonucunda (siklofilin D ve A β bağlayıcı alkol dehidrojenaz) A β 'nın mitokondriyal ve nöronal fonksiyon üzerindeki etkilerini arttırdığı belirlenmiştir (Chen ve Yan, 2010). Bu etkileşimin, mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözenəğı oluşumunu tetikleyerek, azalmış mitokondriyal membran potansiyeli, bozulmuş mitokondriyal solunum fonksiyonu, artmış oksidatif stres, sitokrom c salınımı, bozulmuş aksonal mitokondriyal taşıma ve nöronal apoptoz ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Rao ve diğerleri, 2014). Bu sebeple L-EPS'lerin A β ₁₋₄₂ ile oluşturulan AH modelinde mitokondriyal membran potansiyeli üzerine koruyucu etkileri belirlenmiştir. A β ₁₋₄₂'nin mitokondriyal membran potansiyel yüzdesini kontrol grubuna göre %47 oranında azalttığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Düşük mitokondriyal membran potansiyeli hasarlı mitokondriyi göstermiştir. A β ₁₋₄₂ ile indüklenen mitokondriyal membran potansiyelindeki kayıp, ATP üretiminin inhibisyonuna neden olarak apoptozu indüklemiş ve SH-SY5Y hücrelerinin ölümüne sebep olmuştur. A β ₂₅₋₃₅'in PC12 hücrelerinde hücre sel büyümei inhibe ettiğini, hücre içi ROS oluşumunu arttırdığını ve mitokondriyal membran potansiyelini azalttığını göstermişlerdir (Huang ve diğerleri, 2019). Alberdi ve diğerleri (2018), A β aracılı ROS aşırı üretiminin intranöronal redoks dengesini bozarak nöronal hasara yol açan mitokondriyal disfonksiyonu şiddetlendirdiğini belirlemişlerdir. Artan kanıtlar, mitokondriyal membran potansiyelindeki azalmanın ve ardından gerçekleşen sitokrom c salınımının apoptotik sürecin merkezi bir olayını oluşturduğunu tespit etmişlerdir (Favaloro, Allocati, Graziano, Di Ilio ve De Laurenzi, 2012; Green ve Reed, 1998). Diğer yandan, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin A β ₁₋₄₂ grubuna göre mitokondriyal membran potansiyel yüzdesini %28-62 arasında değişen

oranlarda arttırdığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Artan mitokondriyal membran potansiyeli L-EPS'lerin $A\beta_{1-42}$ ile oluşturulan mitokondriyal hasara karşı koruyucu etkilerini göstermiştir. Her iki suştan elde edilen L-EPS'lerin artan konsantrasyonlarında mitokondriyal membran potansiyel yüzdesini arttırdığı belirlenmiş olup, en yüksek koruyucu etkiyi B3 suşundan elde edilen L-EPS göstermiştir (Şekil 4.15). Elde ettiğimiz sonuçlara göre, L-EPS'lerin mitokondriyal membran potansiyelindeki kaybı engelleyerek, anti-apoptotik etki sonucu $A\beta_{1-42}$ kaynaklı hücre ölümüne karşı koruma özelliğinin olduğu tespit edilmiştir. L-EPS'lerin AH modelinde mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkileri literatürde ilk defa belirlenmiştir. Literatürde bulunan çalışmalarda farklı organizmalardan (alg, bitki, mantar ve yosun) elde edilen polisakkaritler kullanılmıştır (Jia ve diğerleri, 2015; Zhang ve diğerleri, 2015) ya da bakterilerden elde edilen EPS'lerin kanser hastalığı modelinde mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkileri incelenmiştir (Rajoka ve diğerleri, 2018; Tian, Zhao, Zeng, Zhang ve Zheng, 2016). *Polygonatum sibiricum*'dan elde edilen galaktoz ve mannozca zengin polisakkaritin AH hücre modelinde mitokondriyal membran potansiyeli üzerine % 26-44 arasında değişen oranlarda koruyucu etkisi tespit edilmiştir. Polisakkaritin nörokoruyucu etkisini *BCL2/BAX* oranını modüle ederek, sitokrom c salınımını azaltarak, *CASP3* aktivasyonunu inhibe ederek gösterdiği belirlenmiştir (Zhang ve diğerleri, 2015). *Gynostemma pentaphyllum* polisakkaritlerinin $A\beta_{25-35}$ kaynaklı oksidatif stresi, aşırı kalsiyum akışını ve %41-57 arasında değişen oranlarda mitokondriyal membran potansiyeli kaybını önleyerek PC12 hücrelerini $A\beta_{25-35}$ ile indüklenen sitotoksositeye karşı koruduğu belirlenmiştir (Jia ve diğerleri, 2015). Han, Nan, Fan, Chen ve Zhang (2019)'ın yaptığı çalışmaya göre *Inonotus obliquus* polisakkariti ($1,1 \times 10^5$ Da moleküler ağırlığında) L-glutamik asit ile hasar oluşturulan HT22 hücrelerindeki mitokondriyal membran potansiyeli kaybını önleyerek nörokoruyucu etki göstermiştir. Bu etkiyi oksidatif stresi, özellikle Nrf2 sinyallemesini modüle ederek ve mitokondriyal apoptozu inhibe ederek göstermiştir. *Amanita caesaera*'dan elde edilen polianyonik fonksiyonel gruplar içeren polisakkaritin L-glutamik aside maruz kalan HT22 hücrelerindeki azalmış hücre canlılığını arttırdığı, apoptozu inhibe ettiği, hücre içi ROS birikimini bastırdığı ve mitokondriyal membran potansiyelindeki kaybı önlediği belirlenmiştir. Bu etkilerin antioksidan aktivite ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Li ve diğerleri, 2019a). Yapılan bir başka çalışmada *Inonotus obliquus*'dan elde edilen pürüzlü yüzey morfolojisine sahip polisakkaritin oksidatif koşullar altında mitokondrinin bütünlüğünü etkili bir şekilde %25-100 arasında değişen oranlarda koruyabildiği gösterilmiştir (Wang ve diğerleri, 2018). Çalışmamızda L-EPS'lerin nörokoruyucu etkileri

ile mitokondriyal membran potansiyeli üzerine koruyucu etkileri arasında pozitif yönlü, yüksek düzeyde 0,994 olan bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$). Literatürdeki çalışmalardan da mitokondriyal membran potansiyeli ile nörokoruyucu etki arasında anlamlı bir ilişkinin olduğu anlaşılmış olup, bu ilişkinin EPS'lerin yapısal özelliklerine de (monosakkarit bileşimleri, moleküler ağırlıkları, fonksiyonel grupları ve yüzey morfolojileri) bağlı olarak değişebileceği düşünülmüştür. Literatürden elde edilen bilgiler ışığında L-EPS'lerin mitokondriyal membran potansiyeli üzerine koruyucu etkilerini A β ve mitokondriyal proteinlerin (siklofilin D ve A β bağlayıcı alkol dehidrojenaz) etkileşimlerini baskılayarak ve mitokondriyal proteinlere bağlı mitokondriyal geçiş gözenegini inhibe ederek etki ettiğini düşünmekteyiz. Bu sayede L-EPS'ler tarafından mitokondriye A β girişi bloke edilebilecektir. Bu görüşümüzü desteklemek amacıyla ileri düzey çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Mitokondriyal membran potansiyeline bağlı olarak mitokondriyal geçirgenliğin düzenlenmesi ve sitokrom C'nin mitokondriden sitozole salınması apoptotik süreç için önem arz etmektedir (Mullauer, Kessler ve Medema, 2009). Bu durum mitokondriyal membran potansiyeli ile apoptoz arasındaki bağlantıyı göstermiştir. Bu sebeple L-EPS'lerin A β_{1-42} ile oluşturulan AH modelinde apoptozu baskılayıcı etkileri tespit edilmiştir. A β_{1-42} 'nin erken apoptoz ve geç apoptoz safhasındaki hücre yüzdesini kontrol grubuna göre %880 oranında arttırdığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Anneksin V pozitif hücrelerinin artışı, erken apoptoz ve geç apoptozun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Diğer yandan, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin A β_{1-42} grubuna göre erken apoptoz ve geç apoptoz safhasındaki hücre yüzdesini %35-67 arasında değişen oranlarda azalttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Anneksin V pozitif hücrelerinin azalışı, L-EPS'lerin A β_{1-42} ile indüklenen erken apoptoz ve geç apoptozu karşı baskılayıcı etkilerini göstermiştir. Her iki suştan elde edilen L-EPS'lerin artan konsantrasyonlarında erken apoptoz ve geç apoptoz safhasındaki hücre yüzdesini azalttığı belirlenmiş olup, en yüksek baskılayıcı etkiyi B3 suşundan elde edilen L-EPS göstermiştir (Şekil 4.15). Çalışmamızda L-EPS'lerin nörokoruyucu etkileri ile apoptoz üzerine baskılayıcı etkileri arasında negatif yönlü, yüksek düzeyde -0,988 olan bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$). Çalışmadan elde edilen sonuçlar, L-EPS'lerin anneksin V pozitif hücrelerini baskılayarak, anti-apoptotik etki sonucu A β_{1-42} ile indüklenen hücre ölümüne karşı nörokoruyucu etki gösterdiğini yansıtmıştır. Ayrıca, bu baskılayıcı etkinin altında yatan mekanizmanın belirlenmesi için apoptoz sinyal yolağındaki genlerin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

A β_{1-42} 'nin *BCL2* geninin ekspresyon seviyesini kontrol grubuna göre azalttığı ve *BCL2* associated X (*BAX*) geninin ekspresyon seviyesini kontrol grubuna göre arttırdığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Mitokondriyal geçirgenliğin düzenlenmesi ve sitokrom C'nin mitokondriden sitozole salınması apoptotik süreç için çok önemlidir. Bu sürecin Bcl-2 ailesi tarafından sıkı bir şekilde kontrol edildiği bildirilmiştir (Mullauer, Kessler ve Medema, 2009). Bcl-2 ailesinin farklı hücre içi apoptotik sinyal yollarının düzenlenmesinde merkezi bir rol oynadığı ve AH dahil olmak üzere çeşitli nörodejeneratif bozukluklarla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Desagher ve Martinou, 2000). Bcl-2 ailesi proteinlerinin, Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinler ve Bax, Bim dahil pro-apoptotik proteinler dahil olmak üzere birkaç homolog proteinden oluştuğu bildirilmiştir (Kosten, Galloway, Duman, Russell ve D'Sa, 2008). Bax/Bcl-2 oranı, A β hasarını takiben nöronal hücrelerin apoptotik durumunu belirlemek için önerilmiştir (Gu ve diğerleri, 2009). Diğer taraftan, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin A β_{1-42} grubuna göre *BCL2* geninin ekspresyon seviyesini arttırdığı ve *BAX* geninin ekspresyon seviyesini azalttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.16, Şekil 4.17, Çizelge 4.7). L-EPS'lerin AH modelinde apoptoz üzerine etkileri literatürde ilk defa belirlenmiştir. Literatürde bulunan çalışmalarda farklı organizmalardan (alg, bitki, mantar ve yosun) elde edilen polisakkaritler kullanılmıştır (Wei ve diğerleri, 2015; Zhang ve diğerleri, 2015) ya da bakterilerden elde edilen EPS'lerin kanser hastalığı modelinde apoptoz üzerine etkileri incelenmiştir (Di, Zhang, Han, Zhang ve Xin, 2018; Tipiriti Kourpeti ve diğerleri, 2016; Tükenmez ve diğerleri, 2019; Zhou ve diğerleri, 2017). Zhang ve diğerleri (2015)'nin yaptıkları çalışmaya göre PC12 hücrelerinde A β_{25-35} 'nin sebep olduğu anneksin V pozitif hücre sayısındaki artışı, *Polygonatum sibiricum*'dan elde edilen $7,6 \times 10^4$ Da moleküler ağırlıklı, galaktoz ve mannozca zengin polisakkaritin %20-60 arasında değişen oranlarda azalttığı belirlenmiştir. Bu durumun etki mekanizması Bax/Bcl-2 oranının azaltılması şeklindedir. CGCs hücrelerinde hidrojen peroksit ile oluşturulan hasarda *Ganoderma lucidum*'dan elde edilen polisakkaritin artan *BAX* ve *BIM* seviyelerini sırasıyla yaklaşık olarak 3 ve 4 kat azalttığı ve azalan *BCL2* seviyesini ise yaklaşık olarak 4 kat arttırdığı tespit edilmiştir (Sun ve diğerleri, 2017). Zhang, Li, Yang, Jin ve Zhang (2018)'ın yaptıkları çalışmaya göre AH modeli oluşturulan ratlarda *Flammulina velutipes*'dan elde edilen polisakkaritin *BAX* seviyelerindeki artışı (1,5 kat), konsantrasyona bağlı olarak azalttığı (1,3 kat) ve *BCL2* seviyesindeki azalışı (1,25 kat), konsantrasyona bağlı olarak arttırdığı (1,25 kat) tespit edilmiştir. L-Glutamin ile PC12 hücrelerinde oluşturulan modelde *BAX* seviyesinde 1,5 kat artış ve *BCL2* seviyesinde 2 kat azalış olduğu tespit edilmiştir. *Lycium barbarum*'dan elde

edilen polisakkaritin bu durumu tersine çevirdiği belirlenmiştir (sırasıyla 1,5 kat azalış ve 2,4 kat artış) (Hu ve diğerleri, 2018). Yulangsan'dan elde edilen polisakkaritlerin PC12 hücrelerinde A β ₂₅₋₃₅ tarafından indüklenen apoptoza karşı koruyucu etkisi bulunmuştur. Polisakkaritin anti-apoptotik gen *BCL2*'yi yukarı regüle ettiği, proapoptotik gen *TP53* ve *BAX*'ı aşağı regüle ettiği belirlenmiştir (Chen ve diğerleri, 2013b, 2013d). *Angelica sinensis* polisakkariti, *Sargassum fusiforme* polisakkariti ve *Vitis vinifera*'nın *BCL2*'yi arttırarak ve *BAX* gen ekspresyonunu azaltarak hücre apoptozunu önlediği bildirilmiştir (Li ve diğerleri, 2013c; Tang ve diğerleri, 2012; Yuan ve diğerleri, 2015). *Cistanche deserticola*'dan elde edilen polisakkaritin *BCL2*'yi yukarı regüle ederek AH'li farelerde hipokampal nöron apoptozunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bunun sonucunda AH'li farelerde öğrenme yeteneğinin arttığı bildirilmiştir (Yin ve diğerleri, 2013b). Erjingling'den ekstrakte edilen polisakkarit hipokampal hücrelerin sağkalım hızını arttırarak, *BCL2*'yi yukarı regüle ederek, *BAX*'ı aşağı regüle ederek ve böylece hipokampal nöronları glutamatın neden olduğu apoptoza karşı koruma sağlamıştır (Xu ve diğerleri, 2008). Çalışmamızda L-EPS'lerin nörokoruyucu etkileri ile apoptoz sinyal yolağı üzerine baskılayıcı etkileri arasında negatif yönlü, yüksek düzeyde sırasıyla -0,997 olan bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$). Literatürden elde edilen bilgiler ve çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar da L-EPS'lerin Bax/Bcl-2 oranını düzenleyerek anti-apoptotik etki sonucunda nörokoruyucu etki gösterdiğini kanıtlar niteliktedir. L-EPS'ler tarafından bu oranın düzenlenmesi aynı zamanda mitokondriyal geçirgenliğin de düzenlenmesi anlamına gelmiştir.

A β ₁₋₄₂'nin kaspaz-3 (*CASP3*), kaspaz-7 (*CASP7*), kaspaz-8 (*CASP8*), kaspaz-9 (*CASP9*) ve sitokrom C (*CYCS*) genlerinin ekspresyon seviyelerini kontrol grubuna göre arttırdığı belirlenmiştir ($p<0,05$). A β 'nın mitokondriyal apoptoz yolunu aktive edebileceği gösterilmiş olup, mitokondriyal disfonksiyonu indüklediği belirtilmiştir. Mitokondriyal membran bütünlüğünün bozulması sonucunda sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salınmasına yol açmıştır (Dragicevic ve diğerleri, 2010). Serbest bırakıldıktan sonra sitozolik sitokrom c, başlatıcı proteaz *CASP9*'u aktive eden bir apoptozom oluşturarak ve bu da daha sonra yürütücü *CASP-3*'ü aktive ederek hücrenin apoptoza girmesine neden olmuştur (Twiddy ve diğerleri, 2004, Wu, Hsu ve Chan, 2007). AH hastalarından türetilen beyin dokusunda artan nöronal kaspaz-3 ekspresyonu gözlenmiştir (Abrahamson ve diğerleri, 2006). Diğer taraftan, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin A β ₁₋₄₂ grubuna göre *CASP3*, *CASP7*, *CASP8*, *CASP9* ve *CYCS* genlerinin ekspresyon seviyelerini azalttığı

tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.16, Şekil 4.17, Çizelge 4.7). Literatürde yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilmiştir. Yu ve diğerleri (2007)'nin yaptıkları çalışmaya göre kortikal nöron hücrelerinde $A\beta_{25-35}$ ile oluşturulan hasarda *Nerium indicum*'dan elde edilen $2,8 \times 10^4 - 1 \times 10^6$ Da aralığında değişen moleküler ağırlıklı, ramnoz, arabinoz, ksiloz, galaktoz ve glikoz içeren farklı konsantrasyondaki polisakkaritlerin *CASP3* ekspresyon seviyesini 1,1-1,5 arasında değişen katlarda azalttığı tespit edilmiştir. Zhang ve diğerleri (2015)'nin yaptıkları çalışmaya göre PC12 hücrelerinde $A\beta_{25-35}$ 'nin sebep olduğu *CASP3* ve sitozolik *CYCS* seviyesindeki artışı, *Polygonatum sibiricum*'dan elde edilen polisakkaritin sırasıyla 1,4-1,6 ve 1,7-2,0 arasında değişen katlarda azalttığı belirlenmiştir. CGCs hücrelerinde hidrojen peroksit ile oluşturulan hasarda *Ganoderma lucidum*'dan elde edilen polisakkaritin artan *CASP3* seviyesini 4,5 kat azalttığı tespit edilmiştir (Sun ve diğerleri, 2017). L-Glutamin ile PC12 hücrelerinde oluşturulan modelde *CASP3*, *CASP8* ve *CASP9* seviyelerinde sırasıyla 1,5; 1,7 ve 1,5 kat artış tespit edilmiştir. *Lycium barbarum*'dan elde edilen polisakkaritin bu durumu tersine çevirdiği belirlenmiştir (sırasıyla 1,5; 1,4 ve 1,1 kat) (Hu ve diğerleri, 2018). Zhang ve diğerleri (2018)'nin yaptıkları çalışmaya göre AH modeli oluşturulan ratlarda *Flammulina velutipes*'dan elde edilen polisakkaritin *CASP3*, *CASP9* ve *CYCS* seviyelerindeki artışı (sırasıyla 1,6; 1,3 ve 1,7 kat), konsantrasyona bağlı olarak azalttığı (sırasıyla 1,4; 1,3 ve 1,1 kat) tespit edilmiştir. Demansa yatkın fare/8'in frontal lob ve hipokampusunda Tau (Ser202) fosforilasyonu ve *CASP3* ekspresyonu ve aktivitesi Yulangsan'dan elde edilen polisakkaritler tarafından azaltılmıştır. Bu da azalmış nöron apoptozu ile sonuçlanmıştır (Chen ve Huang, 2013e). *Ganoderma lucidum* polisakkaritlerinin *CFOS*, *CASP3* ve *FASL* gen ekspresyonlarını azaltarak, hipokampal hücrelerde apoptoz hızını azalttığı bildirilmiştir (Guo Yanjun ve Hua, 2008; Li ve diğerleri, 2007; Yuan ve diğerleri, 2011; Yueping ve diğerleri, 2008). Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar suşlardan elde edilen L-EPS'lerin kaspazların ekspresyonunu ve sitokrom c salınımını baskıladığı belirlenmiş olup, AH'de içsel apoptoz (mitokondriyal yolak) üzerinde baskılayıcı etki sonucunda nörokoruyucu özellik gösterebilme potansiyelinin olduğunu göstermiştir.

qRT-PZR'dan elde ettiğimiz sonuçlar (apoptoz sinyal yolağı), flow sitometreden elde ettiğimiz sonuçları (apoptoz ve mitokondriyal membran potansiyeli) destekler nitelikte olup, L-EPS'lerin apoptozu baskılayıcı etkilerinin mekanizmasını açıklar niteliktedir.

A β ile indüklenen apoptozun, stres kinazların aktivasyonu (Chang ve diğerleri, 2002; McDonald, Bamberger, Combs ve Landreth, 1998; Tamagno ve diğerleri, 2003b), kaspazların aktivasyonu (Allen, Eldadah, Huang, Knoblach ve Faden, 2001), hayatta kalma yolunun inhibisyonu (Kubo, Nishimura ve Oda, 2002), oksidatif stres (Canevari, Abramov ve Duchon, 2004) ve ölüm reseptörleri (Li ve diğerleri, 2004) gibi farklı mekanizmaları içerebildiği bildirilmiştir. A β ile indüklenen apoptozun farklı mekanizmalar üzerinden etki göstermesi sebebiyle L-EPS'lerin bu farklı mekanizmalar üzerine modülatör etkilerinin olup olmadığının belirlenebilmesi için apoptozla ilişkili diğer sinyal yollarındaki genlerin de ekspresyon düzeylerine bakılmıştır.

PI3K-AKT/PKB sinyali, hücre sağ kalımını arttırmanın sağlandığı önemli hücre içi sinyal yollarından birisi olduğu tespit edilmiştir. AKT, hücre dışı sinyallerle aktive edilen PI3-K'nın bir alt akış protein kinazıdır (Gao, Li ve Lai, 2008). Bu sebeple L-EPS'lerin A β_{1-42} ile oluşturulan AH modelinde AKT/PKB sinyal yolağı üzerine indükleyici etkileri tespit edilmiştir. A β_{1-42} 'nin protein kinaz B (AKT/PKB) geninin ekspresyon seviyesini kontrol grubuna göre azalttığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Artan kanıtlar PI3K-AKT/PKB sinyal yolağının A β maruziyetinden doğrudan etkilendiğini ve AH sahip beyinlerde değiştiğini göstermiştir (Bhaskar ve diğerleri, 2009). A β , PI3K-AKT/PKB'yi inaktive etmekte olup, Bad proapoptotik proteinin fosforilasyonuna yol açmıştır. Bu sayede, Bad'ın sitoplazmadan mitokondriye translokasyonuna neden olmuştur. Bad'ın translokasyonu, mitokondriyal membran potansiyelinin azalmasına yol açmıştır. Bunun sonucunda, PI3K-AKT/PKB/BAD/BCLXL aracılı mitokondriyal apoptotik yol indüklenmiştir (Zeng ve diğerleri, 2011). Diğer taraftan, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin A β_{1-42} grubuna göre AKT/PKB geninin ekspresyon seviyesini arttırdığı tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.16, Şekil 4.17, Çizelge 4.7). Çalışmamızda L-EPS'lerin nörokoruyucu etkileri ile AKT/PKB sinyal yolağı üzerine indükleyici etkileri arasında pozitif yönlü, yüksek düzeyde 0,989 olan bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$). L-EPS'lerin AKT/PKB sağ kalımını etkinleştirerek, apoptoza karşı nörokoruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar alınmıştır. Zhang ve diğerleri (2015)'nin yaptıkları çalışmaya göre PC12 hücrelerinde A β_{25-35} 'nin sebep olduğu p-AKT seviyesindeki 2 kat azalışı, *Polygonatum sibiricum*'dan elde edilen farklı konsantrasyondaki polisakkaritlerin 1,5-1,8 arasında değişen katlarda arttırdığı tespit edilmiştir. Yu ve diğerleri (2007)'nin yaptıkları çalışmaya göre kortikal nöron hücrelerinde A β_{25-35} ile p-AKT protein ekspresyon seviyesini azalttığı belirlenmiştir. *Nerium indicum*'dan elde edilen polisakkaritin p-AKT

protein ekspresyon seviyesini arttırdığı tespit edilmiştir. Ho ve diğerleri (2007) ve Yu ve diğerleri (2004), *Nerium indicum* çiçeklerinden purifiye edilen homojen polisakkaritler J2, J3 ve J4'ün PDK-1 (Ser241) ve AKT/PKB (Thr308) fosforilasyonunu indükleyebildiği ve apoptoza karşı nörokoruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu durumun AKT/PKB sağkalım sinyal yolağının aktivasyonuna bağlı olduğu tespit edilmiştir. *Lycium barbarum* LBB'nin alkali ekstraktı ve iki homojen polisakkarit olan LBB-1 ve LBB-2 (LBB'den saflaştırılan alt-fraksiyonlar) AKT/PKB sinyal yolağını stimüle ederek A β nörotoksisitesini azaltarak nörokoruyucu etki göstermiştir (Ho ve diğerleri, 2007). Literatürden elde edilen bilgiler ve çalışmamızdan elde edilen sonuçlar doğrultusunda çalışmamızdaki L-EPS'lerin aktive ettiği PI3K-AKT/PKB sinyalinin, Bad proapoptotik proteinin defosforilasyonuna yol açabileceği ve Bad'ın sitoplazmada kalmasına neden olabileceği varsayılmaktadır. Bu sayede L-EPS'ler tarafından mitokondri membran potansiyelinin korunabileceği ve PI3K-AKT/PKB/BAD/BCLXL aracılı mitokondriyal apoptotik yolun baskılanabileceğini düşünmekteyiz. Bu görüşümüzü desteklemek amacıyla daha ileri düzey çalışmaların yapılması gerekmektedir.

NF- κ B/p65 ailesi, yapısal olarak ilgili 5 proteinden oluşmaktadır: c-Rel, RelA/p65, RelB, p50 ve p52 (Huang ve diğerleri, 2012). L-EPS'lerin A β ₁₋₄₂ ile oluşturulan AH modelinde NF- κ B/p65 sinyal yolağı üzerine baskılayıcı etkileri tespit edilmiştir. A β ₁₋₄₂'nin nükleer faktör- κ B (NF- κ B/p65) geninin ekspresyon seviyesini kontrol grubuna göre arttırdığı belirlenmiştir ($p<0,05$). A β ile stimülasyon, hücre içi kalsiyum ve oksidatif stresi arttırmakta olup, IKK proteinlerinin fosforilasyonuna, I κ B α 'nın ubiquitinasyonu ve p50:p65 NF- κ B heterodimer aktivasyonuna yol açmıştır. Çekirdeğe translokasyon sonrasında pro-enflamatuvar genler (interlökin-12, interlökin-17 gibi), pro-apoptotik genler (kaspazlar, BAX gibi) ve nörotoksik faktörlerin (glutamat, uyarılmış nitrik oksit sentaz) transaktivasyonunu indüklemiştir. Aktif p65:p50 dimerlerindeki artış, nöroinflamasyon ve nörodejenerasyona yol açan pro-apoptotik ve eksitotoksik faktörlerin gelişmiş transaktivasyonuna yol açmıştır (Srinivasan ve Lahiri, 2015). Diğer taraftan, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin A β ₁₋₄₂ grubuna göre NF- κ B/p65 geninin ekspresyon seviyesini azalttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.16, Şekil 4.17, Çizelge 4.7). Çalışmamızda L-EPS'lerin nörokoruyucu etkileri ile NF- κ B/p65 sinyal yolağı üzerine baskılayıcı etkileri arasında negatif yönlü, yüksek düzeyde sırasıyla -0,990 olan bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$). L-EPS'lerin NF- κ B/p65 sinyal yolağını baskılayarak, apoptoza karşı nörokoruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde

edilmiştir. PC12 hücrelerinde hidrojen peroksit ile oluşturulan modelde *Morchella importuna*'den elde edilen polisakkaritin p-NF- κ B/p65 seviyesindeki artışı azalttığı belirlenmiştir (Xiong ve diğerleri, 2016). Zhong ve diğerleri (2020), *Acorus tatarinowii*'den elde edilen polisakkaritin lipopolisakkarit ile indüklenen nöroinflamasyon ve nörotoksositeye karşı TLR4 aracılı MyD88/NF- κ B ve PI3K-AKT/PKB sinyal yollarını inhibe ederek etki gösterdiklerini belirlemiştir. Bu etkiyi IKK α/β ve I κ B α 'nın fosforilasyon seviyelerini inhibe ederek ve NF- κ B/p65 fosforilasyonunu (1,2-1,5 kat) ve nükleer translokasyonunu baskılayarak gösterdiği tespit edilmiştir. *Lentinus edodes*'den elde edilen polisakkarit p38 MAPK, JNK, NF- κ B/p65 sinyal yollarının aktivasyonunu inhibe ederek ve Nrf2 yolunu aktive ederek INS-1 hücrelerinde glikoz kaynaklı oksidatif hasarı azaltmıştır (Cao ve diğerleri, 2019). Çalışmamızdaki L-EPS'lerin, oksidatif stresi azaltarak, IKK proteinlerinin defosforilasyonuna, I κ B α 'nın ubiquitinasyonunu engellenmesine ve p50:p65 NF- κ B heterodimer deaktivasyonuna yol açtığı düşünülmektedir. Bu sayede p50:p65 NF- κ B heterodimerlerinin çekirdeğe translokasyonunun gerçekleşmeyeceği ve L-EPS'lerin pro-enflamatuvar genler, pro-apoptotik genler ve nörotoksik faktörlerin transaktivasyonunu inhibe edebileceği varsayılmaktadır. Bu görüşümüzü desteklemek amacıyla daha ileri düzey çalışmaların yapılması gerekmektedir.

MAPK'ler, çeşitli hücrel aktivitelere rol oynayan bir grup serin-treonin kinazdır ve 3 ana alt gruba ayrılır; ERK, JNK ve p38 MAPK. L-EPS'lerin A β ₁₋₄₂ ile oluşturulan AH modelinde MAPK sinyal yolağı üzerine baskılayıcı etkileri tespit edilmiştir. A β ₁₋₄₂'nin hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1 (*ERK1*), hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 2 (*ERK2*), c-Jun N-terminal kinaz (*JNK*), *JUN*, ve p38 mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (*p38 MAPK*) genlerinin ekspresyon seviyelerini kontrol grubuna göre arttırdığı belirlenmiştir ($p < 0,05$). A β agregatları, ROS, tümör nekroz faktör- α ve interlökin-1 β gibi pro-enflamatuvar sitokinleri üreten mikrogial makrofajları aktive etmiştir. Bunlar birlikte nöronal ölümün indüksiyonunun altında yatan MAPK sinyal yollarının aktivasyonunu tetiklemiştir (Ghasemi, Zarifkar, Rastegar ve Moosavi, 2014; Kim ve Choi, 2010). Apoptoz sinyali düzenlenmiş kinaz-1, Ser83 rezidüsünden AKT/PKB tarafından fosforilasyonu inaktive edilen bir serin/treonin MAPK kinaz (MAPKK) kinazdır (MAPKK kinaz, MAPKKK). Apoptoz sinyali düzenlenmiş kinaz-1'in aşağı akım hedefleri arasında MAPKK'lar MKK4/7 ve MKK3/6 yer almıştır. Sonuç olarak, bu MAPKK'lar CJUN'u, yani ERK $\frac{1}{2}$, JNK ve p38 MAPK'yi aktive edebilen üç MAPK'nin indüklenmesine yol

açmıştır. İkinci moleküller, sırayla, CJUN, JUNB ve ATF2 gibi hücre ölümü için gerekli olan çeşitli transkripsiyon faktörlerini fosforile etmiştir. Ayrıca, DP5/HRK, BIM, BID, BAD, PUMA ve NOXA gibi sadece-BH3 proteinleri, apoptozun kritik başlatıcılarıdır. CJUN yolağının aktivasyonu, nöronal hücre ölümünde anahtar rol oynayan DP5 ve BIM dahil olmak üzere birçok genin yukarı regülasyonunu sağlamıştır. Bu durum kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanmıştır (De La Torre ve diğerleri, 2013; Yarza ve diğerleri, 2016). Diğer taraftan, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin A β ₁₋₄₂ grubuna göre ERK1, ERK2, JNK, JUN, ve p38 MAPK genlerinin ekspresyon seviyelerini azalttığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.16, Şekil 4.17, Çizelge 4.7). Çalışmamızda L-EPS'lerin nörokoruyucu etkileri ile MAPK sinyal yolağı üzerine baskılayıcı etkileri arasında negatif yönlü, yüksek düzeyde sırasıyla -0,990 olan bir ilişki bulunmuştur ($p < 0,05$). L-EPS'lerin MAPK sinyal yolağını baskılayarak, apoptoza karşı nörokoruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Yu ve diğerleri (2007)'nin yaptıkları çalışmaya göre kortikal nöron hücrelerinde A β ₂₅₋₃₅ ile p-JNK-1, p-JNK-2 ve p-p38 MAPK protein ekspresyon seviyelerinin arttığı belirlenmiştir. *Nerium indicum*'dan elde edilen polisakkaritin p-JNK-1, p-JNK-2 ve p-p38 MAPK protein ekspresyon seviyelerini azalttıkları tespit edilmiştir. Li ve diğerleri (2019b)'nin yaptıkları çalışmaya göre PC12 hücrelerinde A β ₂₅₋₃₅ ile p-p38, p-ERK^{1/2} ve p-JNK^{1/2} seviyelerinde sırasıyla 3,5; 1,1 ve 2,0 kat artış sağlanmıştır. *Coptis chinensis*'den elde edilen polisakkaritin bu artışı sırasıyla 1,1; 1,1 ve 1,4 katlarda azalttığı tespit edilmiştir. Ho ve diğerleri (2007) ve Yu ve diğerleri (2004), *Nerium indicum* çiçeklerinden purifiye edilen homojen polisakkarit J6'nın A β -aracılı JNK1'i inhibe edebildiği bildirilmiştir. Bu durumun JNK sinyal yolağının inaktivasyonuna bağlı olduğu düşünülmüştür. *Lycium barbarum* LBA'dan elde edilen aköz ekstraktın, JNK inaktivasyonu yoluyla fibriller A β ₁₋₄₂ ve A β ₂₅₋₃₅ fragmanlarının toksisitesine karşı doz bağımlı nörokoruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Yu ve diğerleri, 2005). *Verbena officinalis* Linn'den elde edilen aköz ekstrakt A β peptit nörotoksitesine karşı nörokoruyucu etki göstermiştir. A β tarafından aktive edilen protein kinaz inhibitörleri ve JNK stres kinazlarını atenüe ederek hem nörite bağlı hasarlanmayı hem de nöronal apoptozu azalttığı belirlenmiştir (Lai ve diğerleri, 2006). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre L-EPS'lerin aktive ettiği AKT/PKB'nin, apoptoz sinyali düzenlenmiş kinaz-1'in fosforilasyonunu inaktive edebileceği ve MKK4/7 ve MKK3/6'nın uyarılmasını engelleyebileceği düşünülmektedir. Bu sayede, L-EPS'ler MAPK (ERK^{1/2}, JNK ve p38 MAPK) sinyal yolağının baskılanmasına yol açabilecektir. Baskılanan MAPK sinyal yolağının apoptoz için gerekli olan çeşitli transkripsiyon faktörlerini fosforile edemeyeceği

ve kaspazları aktiveleştiremeyeceği düşünölmektedir. Bu görüşümüzü desteklemek amacıyla daha ileri düzey çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin apoptoz baskılayıcı etkisinin farklılık göstermesi L-EPS'lerin yapısal farklılıklarından (monomer kompozisyonu, moleküler ağırlığı, bağ yapısı, fonksiyonel grup, yüzey morfolojisi ve kristalografik özellik) kaynaklandığı düşünölmektedir. L-EPS'lerin apoptoz üzerine baskılayıcı etkisinin *BAX* ve *BCL2* düzeylerini regüle etmesi, mitokondriyal membran potansiyelini koruması, kaspaz aktivasyonunu inhibe etmesi ve dolaylı yoldan AKT/PKB, MAPK ve NF-κB/p65 yolaklarının modölasyonu ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Li ve diğerleri, 2017a).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu doktora tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde aşağıdaki çıkarımlar ve öneriler yapılmıştır.

1. Çalışmada kapsamlı taramalarla öne çıkan 2 suş (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3 ve *Lactiplantibacillus plantarum* GD2) kullanılmıştır.
2. Suşların L-EPS üretim miktarları birbirine yakın bulunmuş olup, B3 suşundan elde edilen L-EPS kısmi olarak öne çıkmıştır. Bu durum L-EPS'lerin biyoteknolojik kullanım potansiyellerinin ortaya konulması bakımından önemli bir bulgu olmuştur.
3. L-EPS'lerin karakterizasyonu anlamlı bir yapı-özellik ilişkisi kurulmasında çok önemli bir yer tutmaktadır. Bu sebeple, bir önceki çalışmamızda L-EPS'lerin monomer yapısı, moleküler ağırlığı ve bağ yapıları belirlenmiştir. Bu çalışma kapsamında L-EPS'lerin azot, karbon, hidrojen, kükürt ve oksijen yüzdeleri, fonksiyonel grupları, yüzey morfolojileri ve kristalografik özellikleri belirlenmiştir.
4. L-EPS'lerin ağırlıklı olarak mannoz monomerinden oluştuğu belirlenmiştir. B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin mannoz oranı kısmi olarak öne çıkmıştır. Yüksek mannoz oranı ile biyolojik aktivite ve nörokoruyucu etki arasında pozitif bir korelasyonun olduğunu düşünmekteyiz. Literatürden elde edilen bilgilerde bu çıkarımımızı destekler niteliktedir.
5. B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin yüksek ve düşük molekül ağırlıklı 2 fraksiyon içerdiği tespit edilmiştir. GD2 suşundan elde edilen L-EPS'nin 2 fraksiyonun da düşük moleküler ağırlıklı olduğu saptanmıştır. Yüksek moleküler ağırlıklı fraksiyonlara sahip L-EPS'lerin daha yüksek biyolojik aktivite ve nörokoruyucu etki göstereceğini düşünmekteyiz. Literatürden elde edilen bilgilerde bu varsayımımızı desteklemiştir.
6. L-EPS'lerin bağ yapıları α -1,2 ve β -1,3 şeklinde tespit edilmiştir. Literatürden elde edilen veriler ışığında L-EPS'lerin β -1,3 glikozitik bağınyı içermesi gösterdikleri biyolojik aktivitelerinin ve nörokoruyucu etkilerinin bir göstergesi olabilir.

7. B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin polianyonik fonksiyonel gruplarının oluşturduğu germe titreşiminin GD2 suşundan elde edilen L-EPS'ye göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Literatürden elde edilen bilgilere göre tekrarlayan polianyonik fonksiyonel grupların L-EPS'lerin biyolojik aktivitesine buna bağlı olarak da nörokoruyucu etkisine katkı sağladığını düşünmekteyiz.

8. B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin yüzey morfolojisinin pürüzlü bir yapıya sahip olduğu, GD2 suşundan elde edilen L-EPS'nin ise gözenekli bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Pürüzlü yüzey morfolojisinin diğer yüzey morfolojilerine kıyasla daha fazla hücre adezyon kapasitesi sağladığı bilinmektedir. B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin hücre reseptörlerine bağlanma yeteneğinin ve hücre adezyon kapasitesinin daha fazla olacağı, buna bağlı olarak biyolojik aktivitesinin ve nörokoruyucu etkisinin daha yüksek olacağını düşünmekteyiz. Önceki çalışmamızdan elde edilen hücre adezyon kapasitesi sonuçları ve çalışmamızdan elde edilen biyoaktivite ve nörokoruyucu etki sonuçları da bu çıkarımımızı desteklemiştir.

9. L-EPS'lerin XRD desenlerine göre büyük ölçüde amorf veya zayıf bir mikro düzenlenme (zayıf kristalin) yapısına sahip oldukları görülmüştür. Literatürde yapılan çalışmalara göre amorf karaktere sahip polimerlerin daha yüksek çözünürlük ve biyoyararlanım sunduğu bilinmektedir. Bu sebeple, L-EPS'lerin kristal karaktere sahip muadillerine göre üstün biyolojik aktivite ve nörokoruyucu etki göstereceğini düşünmekteyiz.

10. B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin yüksek mannoz oranına, hem yüksek hem de düşük moleküler ağırlıklı 2 fraksiyona, β -1,3 glikozitik bağına, tekrarlayan polianyonik fonksiyonel gruplara, pürüzlü yüzey morfolojisine ve amorf karaktere sahip olması biyolojik aktivitesinin ve nörokoruyucu etkisinin GD2 suşundan elde edilen L-EPS'ye göre daha yüksek olmasını açıklayabilir.

11. Yapılan karakterizasyon çalışmaları ile L-EPS'lerin sahip olduğu yapısal özellik ile gösterdiği biyolojik aktivite ve nörokoruyucu etki arasındaki ilişki ortaya konulmaya çalışılmıştır. L-EPS'lerin karakterizasyonuna (viskozite, reolojik analiz, termogravimetrik analiz, emülsifikasyon aktivitesi, vb.) devam edilerek, L-EPS'lerin sahip olduğu yapısal özellikler daha da aydınlatılabilir.

12. L-EPS'lerin antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Serbest radikalleri süpürme aktivitesi bakımından B3 suşunun L-EPS'si öne çıkarken, aynı şekilde demir iyonunu şelatlama aktivitesi ve lipit peroksidasyonun inhibisyonu bakımından da en iyi sonucu B3 suşundan elde edilen L-EPS göstermiştir.

13. AH tedavisinde güncel olarak hedeflenen stratejilerden birisi $A\beta_{1-42}$ 'nin agregasyonudur. Bu sebeple, L-EPS'lerin $A\beta_{1-42}$ agregasyonu üzerine inhibitör etkileri belirlenmiştir. En yüksek inhibitör etkiyi B3 suşundan elde edilen L-EPS göstermiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, L-EPS'lerin AH tedavisinde $A\beta_{1-42}$ agregasyonunun inhibitörü olarak kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. L-EPS'lerin $A\beta_{1-42}$ agregasyonunu doğrudan ya da dolaylı olarak hangi mekanizma üzerinden inhibe ettiğinin belirlenmesi için ileri düzey moleküler çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

14. $A\beta_{1-42}$ ile oluşturulan toksisite AH için geçerli *in vitro* nöral dejenerasyon modellerinden biri olup, çalışmamızda da bu model başarı ile oluşturulmuştur.

15. L-EPS'lerin hafif derecede sitotoksik etkisinin olduğunun belirlenmesi, AH tedavisinde güvenli olarak kullanılabilirliğini göstermiş olup, AH tedavisinde kullanılan Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmış ve yan etkisi bulunan ilaçlara alternatif olabileceği görüşünü desteklemiştir. L-EPS'lerin çevresel koşullara dayanıklı olması, uygulama kolaylığı, aynı L-EPS'lerin kullanımı halinde her zaman stabil sonuç vermesi, uygulama dozu ve konsantrasyonun kolay ayarlanabilmesi, toz halinde bozulmadan uzun süre saklanabilmesi gibi avantajları dikkate alındığında, bu avantajlar L-EPS'lerin başarılı olarak uygulanabilirliğini ve ürün haline gelme potansiyelini daha da kuvvetlendirmiştir.

16. $A\beta_{1-42}$ ile oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin nörokoruyucu etkileri araştırılmıştır. En yüksek nörokoruyucu etkiyi B3 suşundan elde edilen L-EPS göstermiştir. Çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar L-EPS'lerin AH tedavisinde $A\beta_{1-42}$ ile indüklenen hücre ölümüne karşı nörokoruyucu ajan olarak kullanılabilirliğini göstermiş olması bakımından önem taşımaktadır. L-EPS'lerin nörokoruyucu etkilerinin farklılık göstermesi L-EPS'lerin yapısal farklılıklarından kaynaklanabilir. L-EPS'lerin hücre ölümüne karşı nörokoruyucu etkileri apoptotik, oksidatif, enflamatuvar ve proteotoksik stresler dahil birden çok stresin hafifletilmesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. İlerleyen basamaklardaki çalışmalarımız bu çıkarımımızı destekler niteliktedir.

17. AH'deki terapötik hedeflerden birisi de kolinerjik sistemdir. Bu sebeple, $A\beta_{1-42}$ ile oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin AChE enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkisi belirlenmiştir. En yüksek inhibitör etkiyi B3 suşundan elde edilen L-EPS göstermiştir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar 1000 ve 1250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki L-EPS'lerin AH'de kolinerjik transmisyonu düzeltmek için AChE inhibitörü olarak kullanılabileceğini göstermiştir. L-EPS'lerin AChE enzim aktivitesi üzerine nasıl etki ettiğinin belirlenmesi için ileri düzey enzim kinetiği çalışmalarına ihtiyaç bulunmaktadır.

18. AH'nin fizyopatolojisi ile ilişkili hipotezlerden birisi de oksidatif stres hipotezidir. Bu sebeple $A\beta_{1-42}$ ile oluşturulan AH modelinde L-EPS'lerin TAS, antioksidan enzim aktiviteleri, TOS ve hücre içi ROS miktarı üzerine modülatör etkileri belirlenmiştir. En yüksek etkiyi B3 suşundan elde edilen L-EPS göstermiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar L-EPS'lerin gösterdikleri antioksidan aktivite sonucunda azalan TAS'ı arttırarak, azalan antioksidan enzim aktivitelerini indükleyerek, artan TOS'u azaltarak ve hücre içi ROS miktarını baskılayarak $A\beta_{1-42}$ tarafından oluşturan oksidatif strese karşı koruma sağladığını göstermiştir. Bu durum L-EPS'lerin gösterdiği antioksidan aktivite sonuçlarımızı da destekler niteliktedir. L-EPS'lerin TAS, antioksidan enzim aktiviteleri, TOS ve hücre içi ROS miktarına hangi mekanizma üzerinden etki ettiğinin belirlenmesi için ileri düzey moleküler çalışmalar yapılabilir.

19. AH patolojisinde mitokondri hasarının ve apoptozun merkezi bir rol oynadığı belirlenmiştir. Bu sebeple L-EPS'lerin $A\beta_{1-42}$ ile oluşturulan AH modelinde mitokondriyal membran potansiyeli üzerine koruyucu etkileri ve apoptoz üzerine baskılayıcı etkileri belirlenmiştir. En yüksek etkiyi B3 suşundan elde edilen L-EPS göstermiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, L-EPS'lerin mitokondriyal membran potansiyelindeki kaybı engelleyerek, anti-apoptotik etki sonucu $A\beta_{1-42}$ kaynaklı hücre ölümüne karşı koruma özelliğinin olduğu tespit edilmiştir. Bu etkinin altında yatan mekanizmanın belirlenmesi için apoptoz sinyal yolağındaki genlerin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar L-EPS'lerin Bax/Bcl-2 oranını düzenleyerek, kaspazların ekspresyonunu ve sitokrom c salınımını baskılayarak anti-apoptotik etki sonucunda nörokoruyucu etki gösterdiğini kanıtlamıştır. qRT-PZR'dan elde ettiğimiz sonuçlar, flow sitometreden elde ettiğimiz sonuçları destekler nitelikte olup, L-EPS'lerin apoptozu baskılayıcı etkilerinin mekanizmasını açıklar niteliktedir.

20. A β ile indüklenen apoptozun farklı mekanizmalar üzerinden etki göstermesi sebebiyle L-EPS'lerin bu farklı mekanizmalar üzerine modölatör etkilerinin olup olmadığının belirlenebilmesi için apoptozla ilişkili diğer sinyal yollarındaki genlerin de ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. En yüksek modölatör etkiyi B3 suşundan elde edilen L-EPS göstermiştir. L-EPS'lerin apoptoz üzerine baskılayıcı etkisinin dolaylı yoldan AKT/PKB, NF- κ B/p65 ve MAPK yollarının modülasyonu ile de ilişkili olduğu belirlenmiştir. L-EPS'ler ile aktive olmuş AKT/PKB, fosforilasyon yoluyla apoptoza bağlı genlerin aktivasyon formlarını ayarlayarak, nöronların indüklenen apoptozunu inhibe ettiği belirlenmiştir. L-EPS'lerin, NF- κ B/p65 ve MAPK sinyal yollarını inhibe ederek ve muhtemel antioksidan ve immünmodölatör özellikleri ile anti-apoptotik etki gösterdiği saptanmıştır. L-EPS'lerin apoptozla ilişkili diğer sinyal yollarındaki etki mekanizmasının tam olarak saptanabilmesi için ileri düzey moleküler çalışmaların yapılması gerekmektedir.

21. B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin biyolojik aktivitesinin ve nörokoruyucu etkisinin daha yüksek oluşu, biyoteknolojik uygulamalar için B3 suşundan elde edilen L-EPS'nin kullanımının daha avantajlı olabileceğini göstermektedir.

22. AChE inhibitörleri ve memantin AH'yi tam anlamıyla tedavi etmemekte olup, AH'nin sadece semptomlarının düzelmesini sağlamaktadır. AH'nin tek bir mekanizma üzerinden değil çoklu mekanizmalarla etkili olarak geliştiği bilinmektedir. AH'nin çok nedenli doğasını anlamak için geliştirilen, "bir molekül-çoklu hedef" uygulamasına dayalı yeni bir yaklaşım bulunmaktadır. Çalışmamızda L-EPS'lerin çoklu hedefler üzerinden etki potansiyelinin olduğu gösterilmiştir. AH fizyopatogenezinde alternatif olabilecek yeni çok hedefli bir L-EPS'nin çoklu mekanizmalar üzerindeki etkisinin tümüyle ortaya konulması, daha etkili gıda ve ilaç alternatiflerinin geliştirilmesi açısından önemlidir. Ayrıca, L-EPS'nin etki mekanizmalarının ortaya konulması ile, diğer nöral hastalıklara (amyotrofik lateral skleroz, huntington, multiple skleroz ve parkinson vb.) karşı geliştirilecek biyoteknolojik gıda ve ilaçlara da örnek olabilecektir.

23. L-EPS'lerin A β agregasyonu, kolinerjik nörotransmitter, oksidatif stres, apoptoz ve AKT/PKB, NF- κ B/p65 ve MAPK sinyal yolları üzerindeki yapı-özellik ilişkilerinin mukayeseli olarak araştırıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır. Bu doktora tez çalışması ilk olması nedeniyle bundan sonraki çalışmalara da kaynak oluşturabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abraham, D., Feher, J., Scuderi, G. L., Szabo, D., Dobolyi, A., Cservenak, M., Juhasz, J., Ligeti, B., Pongor, S., Gomez-Cabrera, M. C., Vina, J., Higuchi, M., Suzuki, K., Boldogh, I., Radak, Z. (2019). Exercise and probiotics attenuate the development of Alzheimer's disease in transgenic mice: Role of microbiome. *Experimental Gerontology*, 115, 122-31.
- Abrahamson, E. E., Ikonovic, M. D., Ciallella, J. R., Hope, C. E., Paljug, W. R., Isanski, B. A., Flood, D. G., Clark, R. S. B., DeKosky, S. T. (2006). Caspase inhibition therapy abolishes brain trauma-induced increases in A β peptide: implications for clinical outcome. *Experimental Neurology*, 197(2), 437-450.
- Adebayo Tayo, B., Fashogbon, R. (2020). *In vitro* antioxidant, antibacterial, *in vivo* immunomodulatory, antitumor and hematological potential of exopolysaccharide produced by wild type and mutant *Lactobacillus delbureckii* subsp. *bulgaricus*. *Heliyon*, 6(2), e03268.
- Adesulu Dahunsi, A. T., Sanni, A. I., Jeyaram, K. (2018). Production, characterization and *in vitro* antioxidant activities of exopolysaccharide from *Weissella cibaria* GA44. *LWT-Food Science and Technology*, 87, 432-42.
- Agahi, A., Hamidi, G. A., Daneshvar, R., Hamdieh, M., Soheili, M., Alinaghipour, A., Taba, S. M. E., Salami, M. (2018). Does severity of Alzheimer's disease contribute to its responsiveness to modifying gut microbiota? A double blind clinical trial. *Frontiers in Neurology*, 9, 662.
- Ahmed, Z., Wang, Y., Anjum, N., Ahmad, A., Khan, S. T. (2013). Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir-Part II. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 343-350.
- Aisen, P. S. (2002). Evaluation of selective COX-2 inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Pain and Symptom Management*, 23(4), 35-40.
- Aisen, P. S., Cummings, J., Doody, R., Kramer, L., Salloway, S., Selkoe, D. J., Sims, J., Sperling, R. A., Vellas, B. (2020). The future of anti-amyloid trials. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 7(3), 146-51.
- Akbari, E., Asemi, Z., Daneshvar Kakhaki, R., Bahmani, F., Kouchaki, E., Tamtaji, O. R., Hamidi, G. A., Salami, M. (2016). Effect of probiotic supplementation on cognitive function and metabolic status in Alzheimer's disease: A randomized, double-blind and controlled trial. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8, 256.
- Aksenov, M. Y., Aksenova, M. V., Butterfield, D. A., Geddes, J. W., Markesbery, W. R. (2001). Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 103(2), 373-83.

- Alagöz, A. S., Rodriguez Cabello, J. C., Hasirci, V. (2018). PHBV wet-spun scaffold coated with ELR-REDV improves vascularization for bone tissue engineering. *Biomedical Materials*, 13(5), 055010.
- Alberdi, E., Sánchez-Gómez, M. V., Ruiz, A., Cavaliere, F., Ortiz-Sanz, C., Quintela-López, T., Capetillo-Zarate, E., Sole-Domenech, S., Matute, C. (2018). Mangiferin and morin attenuate oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and neurocytotoxicity, induced by amyloid beta oligomers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 2856063.
- Allen, J. W., Eldadah, B. A., Huang, X., Knobloch, S. M., Faden, A. I. (2001). Multiple caspases are involved in β -amyloid-induced neuronal apoptosis. *Journal of Neuroscience Research*, 65(1), 45-53.
- Altundağ, E. M. (2016). *Kronik myeloid lösemi hücrelerinde (K562) apoptotik süreç ve reaktif oksijen türleri arasındaki ilişkinin araştırılması*, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1-100.
- Alzheimer Birliği. (2019). 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 15(3), 321-87.
- Anand, R., Gill, K. D., Mahdi, A. A. (2014). Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*, 76, 27-50.
- Andrew, M., Jayaraman, G. (2020). Structural features of microbial exopolysaccharides in relation to their antioxidant activity. *Carbohydrate Research*, 487, 107881.
- Arendt, T., Stieler, J. T., Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies. *Brain Research Bulletin*, 126(3), 238-92.
- Arıkanoglu, A., Akil, E., Varol, S., Yucel, Y., Yuksel, H., Cevik, M. U., Cevik, Y. Palancı Unan, F. (2013). Relationship of cognitive performance with prolidase and oxidative stress in Alzheimer disease. *Neurological Sciences*, 34(12), 2117-21.
- Asker, M. M., Mahmoud, M. G., Ibrahim, A. Y., Mohamed, S. S. (2015). Inhibitory effect of exopolysaccharide from *Achromobacter piechaudii* NRC2 against cyclooxygenases and acetylcholinesterase with evaluation of its antioxidant properties and structure elucidation. *Der Pharmacia Lettre*, 7(4), 129-41.
- Aslım, B. (2017). Muhtemel probiyotik bakterilerin ve probiyotik kaynaklı ekzopolisakkaridlerin direkt ve sinbiyotik olarak kolon kanser hücrelerinde apoptoz yolağı üzerine etkilerinin araştırılması, *TÜBİTAK 1002 Projesi Sonuç Raporu* (115R282), Ankara, 1-168.
- Athari Nik Azm, S., Djazayeri, A., Safa, M., Azami, K., Ahmadvand, B., Sabbaghziarani, F., Sharifzadeh, M., Vafa, M. (2018). Lactobacilli and bifidobacteria ameliorate memory and learning deficits and oxidative stress in β -amyloid (1–42) injected rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 43(7), 718-26.

- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. *Food Science and Technology*, 139, 1-66.
- Aydoğan, T. (2017). *Timokinon tedavisinin sporadik Alzheimer modeli oluşturulmuş sıçan beyin dokusundaki mikroRNA ve mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Bezmi Alem Vakıf Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1-73.
- Bezprozvanny, I., Mattson, M. P. (2008). Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences*, 31(9), 454-63.
- Bhaskar, K., Miller, M., Chludzinski, A., Herrup, K., Zagorski, M., Lamb, B. T. (2009). The PI3K-Akt-mTOR pathway regulates A β oligomer induced neuronal cell cycle events. *Molecular Neurodegeneration*, 4(1), 1-18.
- Bhat, B., Bajaj, B. K. (2019). Hypocholesterolemic potential and bioactivity spectrum of an exopolysaccharide from a probiotic isolate *Lactobacillus paracasei* M7. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 19, 100191.
- Bird, T. D. (2018). *Alzheimer disease overview*, Seattle: University of Washington, 235-9.
- Bouzar, F., Cerning, J., Desmazeaud, M. (1996). Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants. *Journal of Dairy Science*, 79(2), 205-11.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-54.
- Brand Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bravo, R., Arimon, M., Valle-Delgado, J. J., García, R., Durany, N., Castel, S., Cruz, M., Ventura, S., Fernández-Busquets, X. (2008). Sulfated polysaccharides promote the assembly of amyloid β 1-42 peptide into stable fibrils of reduced cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 283(47), 32471-83.
- Butterfield, D. A. (2004). Proteomics: A new approach to investigate oxidative stress in Alzheimer's disease brain. *Brain Research*, 1000(1-2), 1-7.
- Butterfield, D. A., Boyd Kimball, D. (2018). Oxidative stress, amyloid- β peptide, and altered key molecular pathways in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 62(3), 1345-67.
- Butterfield, D. A., Halliwell, B. (2019). Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(3), 148-60.
- Byakika, S., Mukisa, I. M., Byaruhanga, Y. B., Muyanja, C. (2019). A review of criteria and methods for evaluating the probiotic potential of microorganisms. *Food Reviews International*, 35(5), 427-66.

- Canevari, L., Abramov, A. Y., Duchen, M. R. (2004). Toxicity of amyloid β peptide: Tales of calcium, mitochondria, and oxidative stress. *Neurochemical Research*, 29(3), 637-50.
- Canter, R. G., Penney, J., Tsai, L. H. (2016). The road to restoring neural circuits for the treatment of Alzheimer's disease. *Nature*, 539(7628), 187-96.
- Cao, X. Y., Liu, D., Bi, R. C., He, Y. L., He, Y., Liu, J. L. (2019). The protective effects of a novel polysaccharide from *Lentinus edodes* mycelia on islet β (INS-1) cells damaged by glucose and its transportation mechanism with human serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 344-53.
- Casado, Á., López-Fernández, M. E., Casado, M. C., de La Torre, R. (2008). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. *Neurochemical Research*, 33(3), 450-8.
- Cecarini, V., Bonfili, L., Gogoi, O., Lawrence, S., Venanzi, F. M., Azevedo, V., Mancha-Agresti, P., Drumond, M. M., Rossi, G., Galosi, L. (2020). Neuroprotective effects of p62 (SQSTM1)-engineered lactic acid bacteria in Alzheimer's disease: a pre-clinical study. *Aging*, 12(16), 15995.
- Cenini, G., Voos, W. (2019). Mitochondria as potential targets in Alzheimer disease therapy: An update. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 902.
- Chang, R. C. C., Suen, K. C., Ma, C. H., Elyaman, W., Ng, H. K., Hugon, J. (2002). Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α in neuronal degeneration. *Journal of Neurochemistry*, 83(5), 1215-25.
- Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*, 14, 450-64.
- Chen, C. H., Zhou, W., Liu, S., Deng, Y., Cai, F., Tone, M., Tone Y., Tong, Y., Song, W. (2012). Increased NF- κ B signalling up-regulates BACE1 expression and its therapeutic potential in Alzheimer's disease. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 15(1), 77-90.
- Chen, D. L., Zhang, P., Lin, L., Zhang, H. M., Liu, S. H. (2013f). Effect of oligosaccharides from *Morinda officinalis* on beta-amyloid-induced learning and memory dysfunction in rats [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2, 271-6.
- Chen, H., Zhang, M., Xie, B. (2005). Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea. *Food Chemistry*, 90(1-2), 17-21.
- Chen, J. X., Yan, S. S. (2010). Role of mitochondrial amyloid- β in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(2), 569-78.

- Chen, K., Lu, Y., Liu, C., Zhang, L., Fang, Z., Yu, G. (2018). Morroniside prevents H₂O₂ or A β ₁₋₄₂-induced apoptosis via attenuating JNK and p38 MAPK phosphorylation. *European Journal of Pharmacology*, 834, 295-304.
- Chen, X. Y. (2013d). Effects of YLS polysaccharides on A β ₂₅₋₃₅ induced PC12 cells apoptosis [J]. *Seek Med*, 6, 4-5.
- Chen, X. Y., Huang, R. B. (2013e). Effects of Yulangsang polysaccharides on caspase-3 expression and activity in the frontal lobe and hippocampus of SAMP8 mice [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 13, 208-11.
- Chen, X. Y., Huang, R. B. (2013g). Effects of YLS polysaccharides on intracellular calcium concentration in AD cell model [J]. *Chinese Journal of New Clinical Medicine*, 7, 613-5.
- Chen, X. Y., Rong, Y. P., Guo, Y. J., Huang, R. B. (2013a). Effects of *Millettia pulchra* polysaccharides on neuronal loss and tau phosphorylation in frontal lobe and hippocampus of SAMP8 mice. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 9, 53.
- Chen, X. Y., Rong, Y. P., Zhang, S. J., Huang, R. B. (2013b). Protective effects of YLS polysaccharides on A β ₂₅₋₃₄ induced apoptosis in PC12 cells [J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 11, 837-40.
- Chen, X. Y., Rong, Y. P., Zhang, S. J., Huang, R. B. (2013c). Protective effects of YLS polysaccharides on A β ₂₅₋₃₄ induced PC12 cells injury [J]. *China Pharmacy*, 19, 1735-8.
- Chen, S. K., Tsai, M. L., Huang, J. R., Chen, R. H. (2009). *In vitro* antioxidant activities of low-molecular-weight polysaccharides with various functional groups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2699-704.
- Chen, Z., Zhong, C. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin*, 30(2), 271-81.
- Cheng, J. H., Tsai, C. L., Lien, Y. Y., Lee, M. S., Sheu, S. C. (2016). High molecular weight of polysaccharides from *Hericium erinaceus* against amyloid beta-induced neurotoxicity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 170.
- Chicoine, L. M., Bahr, B. A. (2007). Excitotoxic protection by polyanionic polysaccharide: Evidence of a cell survival pathway involving AMPA receptor-MAPK interactions. *Journal of Neuroscience Research*, 85(2), 294-302.
- Chu, S. H., Hu, H. Y., Chen, X., Wang, W. H., Zheng, X. Y. (2012). Effect of qing xin kaiqiaofang and polysaccharide on the expression of the apoptosis signal transduction molecule caspase-3 and apoptosis associated genes Bax\Bcl-2 in brain of AD rats [J]. *Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine*, 8, 841-4.

- Cohen, E., Dillin, A. (2008). The insulin paradox: Aging, proteotoxicity and neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(10), 759-67.
- Coon, E. A., Cutsforth-Gregory, J. K., Benarroch, E. E. (2018). Neuropathology of autonomic dysfunction in synucleinopathies. *Movement Disorders*, 33(3), 349-58.
- Coppede, F., Migliore, L. (2011). Suitable biomarkers of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Molecular Aspects of Neurodegeneration and Neuroprotection*, 16, 23-38.
- Cui, C., Lu, J., Sun-Waterhouse, D., Mu, L., Sun, W., Zhao, M., Zhao, H. (2016). Polysaccharides from *Laminaria japonica*: Structural characteristics and antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 73, 602-608.
- Çetin, Ö. (2016). *Termofilik Bacillus licheniformis*'ten saflaştırılan ekstrapolisakkarit'in (EPS) fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 1-83.
- Decker, E. A., Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 674-7.
- De La Torre, A. V., Junyent, F., Folch, J., Pelegrí, C., Vilaplana, J., Auladell, C., Beas Zarate, C., Pallas, M., Verdaguer, E., Camins, A. (2013). PI3K/Akt inhibition induces apoptosis through p38 activation in neurons. *Pharmacological Research*, 70(1), 116-25.
- De Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Júnior, A. I. M., Thomaz-Soccol, V., Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2060-76.
- Desagher, S., Martinou, J. C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 10, 369–377.
- De Strooper, B. (2014). Lessons from a failed γ -secretase Alzheimer trial. *Cell*, 159(4), 721-726.
- De Vuyst, L., Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(2), 153-77.
- Di, W., Zhang, L., Yi, H., Han, X., Zhang, Y., Xin, L. (2018). Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* strains suppress HT-29 cell growth via induction of G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Oncology Letters*, 16(3), 3577-86.
- Dickson, D. W. (2004). Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: Cause or effect?. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(1), 23-7.
- Diemer, S. K., Svensson, B., Babol, L. N., Cockburn, D., Grijpstra, P., Dijkhuizen, L., Folkenberg, D. M., Garrigues, C., Ipsen, R. H. (2012). Binding interactions between α -glucans from *Lactobacillus reuteri* and milk proteins characterised by surface plasmon resonance. *Food Biophysics*, 7(3), 220-226.

- Dilna, S. V., Surya, H., Aswathy, R. G., Varsha, K. K., Sakthikumar, D. N., Pandey, A., Nampoothiri, K. M. (2015). Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF 4. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1179-86.
- Dragicevic, N., Mamcarz, M., Zhu, Y., Buzzeo, R., Tan, J., Arendash, G. W., Bradshaw, P. C. (2010). Mitochondrial amyloid-beta levels are associated with the extent of mitochondrial dysfunction in different brain regions and the degree of cognitive impairment in Alzheimer's transgenic mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2, S535-S550.
- Du, B., Yang, Y., Bian, Z., Xu, B. (2017). Characterization and anti-inflammatory potential of an exopolysaccharide from submerged mycelial culture of *Schizophyllum commune*. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 252.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-6.
- Dugger, B. N., Dickson, D. W. (2017). Pathology of neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(7), a028035.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.
- El Missiry, M. A., Othman, A. I., Amer, M. A., Sedki, M., Ali, S. M., El-Sherbiny, I. M. (2020). Nanoformulated ellagic acid ameliorates pentylenetetrazol-induced experimental epileptic seizures by modulating oxidative stress, inflammatory cytokines and apoptosis in the brains of male mice. *Metabolic Brain Disease*, 35(2), 385-99.
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4), 277-85.
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38(12), 1103-11.
- Eroymak, S., Yiğit, V. (2017). Alzheimer hastalığının maliyet analizi. *Journal of Suleyman Demirel University Institute of Social Sciences*, 29, 167-96.
- Fan, J., Feng, H., Yu, Y., Sun, M., Liu, Y., Li, T., Sun, X., Liu, S., Sun, M. (2017). Antioxidant activities of the polysaccharides of *Chuanminshen violaceum*. *Carbohydrate Polymers*, 157, 629-36.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., De Laurenzi, V. (2012). Role of apoptosis in disease. *Aging*, 4(5), 330.

- Fei, H., Gao, Y., Sun, L. (2015). Effect of *Astragalus* polysaccharides on the hippocampal tissue in Alzheimer's disease mouse [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 35(16), 4426-9.
- Francis, P. T. (2005). The interplay of neurotransmitters in Alzheimer's disease. *CNS Spectrums*, 10(18), 6-9.
- Freimoser, F. M., Jakob, C. A., Aebi, M., Tuor, U. (1999). The MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3727-9.
- Folch, J., Etcheto, M., Petrov, D., Abad, S., Pedrós, I., Marin, M., Olloquequi, J., Camins, A. (2018). Review of the advances in treatment for Alzheimer disease: Strategies for combating β -amyloid protein. *Neurología*, 33(1), 47-58.
- Gao, F., Zhao, J., Liu, P., Ji, D., Zhang, L., Zhang, M., Li, Y., Xiao, Y. (2020). Preparation and *in vitro* evaluation of multi-target-directed selenium-chondroitin sulfate nanoparticles in protecting against the Alzheimer's disease. *International Journal of Biological Macromolecules*, 142, 265-76.
- Gao, K., Liu, M., Cao, J., Yao, M., Lu, Y., Li, J., Zhu, X., Yang, Z., Wen, A. (2015). Protective effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on 6-OHDA-induced apoptosis in PC12 cells through the ROS-NO pathway. *Molecules*, 20(1), 293-308.
- Gao, Q. H., Fu, X., Zhang, R., Wang, Z., Guo, M. (2018). Neuroprotective effects of plant polysaccharides: A review of the mechanisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 749-754.
- Gao, X. H., Li, Z. S., Lai, H. (2008). The regulatory effect of PI3-K/Akt pathway on the neurons apoptosis of Alzheimer's disease [J]. *Progress of Anatomical Sciences*, 3.
- Garcia Blanco, A., Baquero, M., Vento, M., Gil, E., Bataller, L., Cháfer-Pericás, C. (2017). Potential oxidative stress biomarkers of mild cognitive impairment due to Alzheimer disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 373, 295-302.
- Ge, Q., Mao, J. W., Guo, X. Q., Zhou, Y. F., Gong, J. Y., Mao, S. R. (2013). Composition and antioxidant activities of four polysaccharides extracted from *Herba lophatheri*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 437-441.
- Ghasemi, R., Zarifkar, A., Rastegar, K., Moosavi, M. (2014). Insulin protects against A β -induced spatial memory impairment, hippocampal apoptosis and MAPKs signaling disruption. *Neuropharmacology*, 85, 113-20.
- Gientka, I., Błażej, S., Stasiak-Róžańska, L., Chlebowska-Śmigiel, A. (2015). Exopolysaccharides from yeast: Insight into optimal conditions for biosynthesis, chemical composition and functional properties? review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 14(4), 283-92.

- Goedert, M. (2001). Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(7), 492-501.
- Goh, K. K., Haisman, D. R., Singh, H. (2005). Development of an improved procedure for isolation and purification of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2483. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(2), 202-8.
- Golde, T. E. (2003). Alzheimer disease therapy: Can the amyloid cascade be halted?. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(1), 11-8.
- Green, D. R., Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281(5381), 1309-12.
- Gu, B., Nakamichi, N., Zhang, W. S., Nakamura, Y., Kambe, Y., Fukumori, R., Takuma, K., Yamada, K., Takarada, T., Taniura, H., Yoneda, Y. (2009). Possible protection by notoginsenoside R1 against glutamate neurotoxicity mediated by N-methyl-D-aspartate receptors composed of an NR1/NR2B subunit assembly. *Journal of Neuroscience Research*, 87, 2145–2156.
- Guo, Y., Pan, D., Li, H., Sun, Y., Zeng, X., Yan, B. (2013). Antioxidant and immunomodulatory activity of selenium exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Food Chemistry*, 138(1), 84-9.
- Guo Yanjun, L. P., Hua, Y. (2008). Relationship between effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on learning and memory in Alzheimer's disease rats and apoptosis of hippocampus cells [J]. *Chinese Journal of Anatomy*, 3.
- Gupta, P., Diwan, B. (2017). Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports*, 13, 58-71.
- Gupta, S., Choi, A., Hope, Y. Y., Czerniak, S. M., Holick, E. A., Paoletta, L. J., Agarwal, A., Combelles, C. M. (2011). Fluctuations in total antioxidant capacity, catalase activity and hydrogen peroxide levels of follicular fluid during bovine folliculogenesis. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(5), 673-80.
- Güleş, Ö., Eren, Ü. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2), 73-8.
- Gürsoy Çalan, Ö., Akan, P., Bağrıyanık, H. A., Fadiloğlu, M. (2014). Amiloid beta peptit ve nöroaktif steroid uygulamasına karşı insan ve sıçan nöronal hücrelerinin vital Yanıtlarının değerlendirilmesi. *Journal of Neurological Sciences*, 31(1), 28-39.
- Hadjiakhoondi, F., Ostad, S. N., Khanavi, M., Hadjiakhoondi, A., Farahanikia, B., Salarytabar, A. (2013). Cytotoxicity of two species of *Glaucium* from Iran. *Journal of Medicinal Plants*, 12(45), 85-92.

- Haider, A., Inam, W., Khan, S. A., Mahmood, W., Abbas, G. (2016). β -glucan attenuated scopolamine induced cognitive impairment via hippocampal acetylcholinesterase inhibition in rats. *Brain Research*, 1644, 141-8.
- Hamet, M. F., Piermaria, J. A., Abraham, A. G. (2015). Selection of EPS-producing *Lactobacillus* strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 129-35.
- Hempel, H., Mesulam, M. M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Cavedo, E., Synder, P. J., Khachaturian, Z. S. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*, 141(7), 1917-33.
- Han, X., Shen, S., Liu, T., Du, X., Cao, X., Feng, H., Zeng, X. (2015). Characterization and antioxidant activities of the polysaccharides from *Radix Cyathulae officinalis* Kuan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 544-52.
- Han, Y., Nan, S., Fan, J., Chen, Q., Zhang, Y. (2019). *Inonotus obliquus* polysaccharides protect against Alzheimer's disease by regulating Nrf2 signaling and exerting antioxidative and antiapoptotic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 769-78.
- Handley, E. E., Pitman, K. A., Dawkins, E., Young, K. M., Clark, R. M., Jiang, T. C., Turner, B. J., Dickson, T. C., Blizzard, C. A. (2017). Synapse dysfunction of layer V pyramidal neurons precedes neurodegeneration in a mouse model of TDP-43 proteinopathies. *Cerebral Cortex*, 27(7), 3630-47.
- He, P., Li, F., Huang, L., Xue, D., Liu, W., Xu, C. (2016). Chemical characterization and antioxidant activity of polysaccharide extract from spent mushroom substrate of *Pleurotus eryngii*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 69, 48-53.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-6.
- Ho, Y. S., Yu, M. S., Lai, C. S. W., So, K. F., Yuen, W. H., Chang, R. C. C. (2007). Characterizing the neuroprotective effects of alkaline extract of *Lycium barbarum* on β -amyloid peptide neurotoxicity. *Brain Research*, 1158, 123-34.
- Hort, J., Valis, M., Angelucci, F. (2020). Administration of pre/probiotics with conventional drug treatment in Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, 15(3), 448-9.
- Hu, X., Qu, Y., Chu, Q., Li, W., He, J. (2018). Investigation of the neuroprotective effects of *Lycium barbarum* water extract in apoptotic cells and Alzheimer's disease mice. *Molecular Medicine Reports*, 17(3), 3599-606.
- Huang, J. Y., Tu, X. Y., Lou, L. Y. (1998). Pharmacological study on the antisenility effects of Erjingling [J]. *China J Chin Mater Med*, 23(12), 748-9.

- Huang, X., Chen, Y., Zhang, H., Ma, Q., Zhang, Y. W., Xu, H. (2012). Salubrinal attenuates β -amyloid-induced neuronal death and microglial activation by inhibition of the NF- κ B pathway. *Neurobiology of Aging*, 33(5), 10079-17.
- Huang, X., Zhen, J., Dong, S., Zhang, H., Van Halm-Lutterodt, N., Yuan, L. (2019). DHA and vitamin E antagonized the A β ₂₅₋₃₅-mediated neuron oxidative damage through activation of Nrf2 signaling pathways and regulation of CD36, SRB1 and FABP5 expression in PC12 cells. *Food & Function*, 10(2), 1049-61.
- Huang, W. J., Zhang, X. I. A., Chen, W. W. (2016). Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomedical Reports*, 4(5), 519-22.
- Huang, Z., Jiao, Y., Zhang, S., Jiang, W., Huang, R. (1986). Effect of LYS polysaccharides on dementia-related gene expressions in SAMP8 mouse brain. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 4, 509-12.
- Huang, Z., Ling, X., Zhang, S., Jiao, Y., Jiang, W., Huang, R. (2001). Effects of LYS polysaccharides on learning and memory as well as monoamine neurotransmitter content in SAMP8 mice's brain. *China Pharmacy*, 9, 648-9.
- Huang, Z. S., Jiao, Y., Zhang, S. J. (2008). Improving effects of LYS polysaccharides on learning and memory in senile dementia SAMP8 mice [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 21, 2086-8.
- Huang, Z. S., Lin, X., Li, J. (2005). Effect of LYS polysaccharide on NO, SOD and MDA in brain of dementia mice induced by D-galactose [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2, 176-7.
- Hussain, A., Zia, K. M., Tabasum, S., Noreen, A., Ali, M., Iqbal, R., Zuber, M. (2017). Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 10-27.
- Imran, M. Y. M., Reehana, N., Jayaraj, K. A., Ahamed, A. A. P., Dhanasekaran, D., Thajuddin, N., Alharbi, N. S., Muralitharan, G. (2016). Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* NTMI05 and NTMI20. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 731-45.
- İnternet 1: <https://www.noroloji.org.tr>, Son Erişim Tarihi: 15.09.2020.
- İnternet 2: <http://tfd.org.tr>, Son Erişim Tarihi: 15.09.2020.
- İnternet 3: <http://www.tuik.gov.tr>, Son Erişim Tarihi: 15.09.2020.
- İnternet 4: <https://www.bezelyedergi.net>, Son Erişim Tarihi: 15.09.2020.
- İnternet 5: <https://www.upi.com>, Son Erişim Tarihi: 15.09.2020.
- İnternet 6: <https://www.openpr.com>, Son Erişim Tarihi: 15.09.2020.
- İnternet 7: <https://www.pharmaceutical-journal.com>, Son Erişim Tarihi: 15.09.2020.

İnternet 8: <https://patents.google.com>, Son Erişim Tarihi: 15.09.2020.

İnternet 9: <https://patents.google.com>, Son Erişim Tarihi: 15.09.2020.

- İsmail, B., Nampoothiri, K. (2013). Exposition of antitumour activity of a chemically characterized exopolysaccharide from a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Biologia*, 68(6), 1041-7.
- İsmail, B., Nampoothiri, K. M. (2010). Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Archives of Microbiology*, 192(12), 1049-57.
- Jia, D., Rao, C., Xue, S., Lei, J. (2015). Purification, characterization and neuroprotective effects of a polysaccharide from *Gynostemma pentaphyllum*. *Carbohydrate Polymers*, 122, 93-100.
- Jiang, R. W., Du, X. G., Zhang, X., Wang, X., Hu, D. Y., Meng, T., Chen, Y. I., Geng, M., Shen, J. K. (2013). Synthesis and bioassay of β -(1, 4)-D-mannans as potential agents against Alzheimer's disease. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(12), 1585-91.
- Jung, I. H., Jung, M. A., Kim, E. J., Han, M. J., Kim, D. H. (2012). *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* C29 protects scopolamine-induced memory deficit in mice. *Journal of Applied Microbiology*, 113(6), 1498-1506.
- Kamat, P. K., Kalani, A., Rai, S., Swarnkar, S., Tota, S., Nath, C., Tyagi, N. (2016). Mechanism of oxidative stress and synapse dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: Understanding the therapeutics strategies. *Molecular Neurobiology*, 53(1), 648-61.
- Kanamarlapudi, S. L. R. K., Muddada, S. (2017). Characterization of exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* CC30. *BioMed Research International*, 2017, 4201809.
- Kandimalla, R., Reddy, P. H. (2017). Therapeutics of neurotransmitters in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(4), 1049-69.
- Kang, M. C., Lee, H., Choi, H. D., Jeon, Y. J. (2019). Antioxidant properties of a sulfated polysaccharide isolated from an enzymatic digest of *Sargassum thunbergii*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 142-9.
- Kao, P. F., Wang, S. H., Hung, W. T., Liao, Y. H., Lin, C. M., Yang, W. B. (2012). Structural characterization and antioxidative activity of low-molecular-weights beta-1, 3-glucan from the residue of extracted *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 673764.
- Karabulut, H., Gülay, M. Ş. (2016). Serbest radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1).

- Karami, A., Eriksdotter, M., Kadir, A., Almkvist, O., Nordberg, A., Darreh-Shori, T. (2019). CSF cholinergic index, a new biomeasure of treatment effect in patients with Alzheimer's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 239.
- Karasu, E. N. (2019). *Lactobacillus brevis e25 suşlarından elde edilen ekzopolisakkaritlerin bazı gıda tozlarının yapışma özellikleri üzerine etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1-67.
- Kaspar, J. W., Niture, S. K., Jaiswal, A. K. (2009). Nrf2: INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(9), 1304-9.
- Kaur, K., Kaur, R., Kaur, M. (2016). Recent advances in Alzheimer's disease: Causes and treatment. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(2), 8-15.
- Kaytor, M. D., Orr, H. T. (2002). The GSK3 β signaling cascade and neurodegenerative disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(3), 275-8.
- Kesika, P., Suganthy, N., Sivamaruthi, B. S., Chaiyasut, C. (2020). Role of gut-brain axis, gut microbial composition, and probiotic intervention in Alzheimer's disease. *Life Sciences*, 264, 118627.
- Kılıç, A. O., Tao, L., Zhang, Y., Lei, Y., Khammanivong, A., Herzberg, M. C. (2004). Involvement of *Streptococcus gordonii* beta-glucoside metabolism systems in adhesion, biofilm formation, and in vivo gene expression. *Journal of Bacteriology*, 186(13), 4246-53.
- Kısaoglu, A., Borekci, B., Yapca, O. E., Bilen, H., Suleyman, H. (2013). Tissue damage and oxidant/antioxidant balance. *The Eurasian Journal of Medicine*, 45(1), 47-9.
- Kim, E. K., Choi, E. J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1802(4), 396-405.
- Kim, S. K., Kim, S. U., Park, I. H., Bang, J. H., Aboody, K. S., Wang, K. C., Cho, B. K., Kim, M., Menon, L. G., Black, P. M., Carroll, R. S. (2006). Human neural stem cells target experimental intracranial medulloblastoma and deliver a therapeutic gene leading to tumor regression. *Clinical Cancer Research*, 12(18), 5550-6.
- Kimmel, S. A., Roberts, R. F. (1998). Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. *International Journal of Food Microbiology*, 40(1-2), 87-92.
- Kneynsberg, A., Combs, B., Christensen, K., Morfini, G., Kanaan, N. M. (2017). Axonal degeneration in tauopathies: Disease relevance and underlying mechanisms. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 572.

- Knight, R., Khondoker, M., Magill, N., Stewart, R., Landau, S. (2018). A systematic review and meta-analysis of the effectiveness of acetylcholinesterase inhibitors and memantine in treating the cognitive symptoms of dementia. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 45(3-4), 131-51.
- Koçancı, F. G. (2018). *Nöral hastalıklarda alternatif bir ilaç adayı olabilecek Glaucium corniculatum ekstraktlarının apoptoz, inflamasyon ve asetilkolinesteraz (AChE)'i baskılama potansiyellerine göre etkilerinin araştırılması*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-216.
- Kosten, T. A., Galloway, M. P., Duman, R. S., Russell, D. S., D'Sa, C. (2008). Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the bcl-2 family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures. *Neuropsychopharmacology*, 33, 1545–1558.
- Kovacs, G. G. (2018). *Concepts and classification of neurodegenerative diseases*, Amsterdam: Elsevier, 301-7.
- Kubo, T., Nishimura, S., Oda, T. (2002). Amyloid β -peptide alters the distribution of early endosomes and inhibits phosphorylation of Akt in the presence of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). *Molecular Brain Research*, 106(1-2), 94-100.
- Kumar, A., Tsao, J. W. (2019). Alzheimer disease, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 1-150.
- Kumar, K., Kumar, A., Keegan, R. M., Deshmukh, R. (2018). Recent advances in the neurobiology and neuropharmacology of Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 297-307.
- Kun, C., Meiyu, G., Huashi, G., Pingfang, L. (2001). The effect of sulfated polysaccharides from brown seaweeds GS201 on neuronal survival in embryonic wistar rats. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 20(1), 20-2.
- LaFerla, F. M. (2002). Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(11), 862-72.
- LaFerla, F. M., Green, K. N., Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(7), 499-509.
- Lahut, S., Özeş, B., Ağar, S., Başak, A. N. (2012). TDP-43 proteinopatileri: Nörodejeneratif konformasyon bozukluğu hastalıklarında yeni bir oyuncu. *Türk Noroloji Dergisi*, 18(1), 1-10.
- Lai, S. W., Yu, M. S., Yuen, W. H., Chang, R. C. C. (2006). Novel neuroprotective effects of the aqueous extracts from *Verbena officinalis* Linn. *Neuropharmacology*, 50(6), 641-50.

- Lanzillotta, C., Di Domenico, F., Perluigi, M., Butterfield, D. A. (2019). Targeting mitochondria in Alzheimer disease: Rationale and perspectives. *CNS Drugs*, 33(10), 957-69.
- Leber, M., Shandhi, M. M. H., Hogan, A., Solzbacher, F., Bhandari, R., Negi, S. (2016). Different methods to alter surface morphology of high aspect ratio structures. *Applied Surface Science*, 365, 180-90.
- Leblhuber, F., Steiner, K., Schuetz, B., Fuchs, D., Gostner, J. M. (2018). Probiotic supplementation in patients with Alzheimer's dementia-an explorative intervention study. *Current Alzheimer Research*, 15(12), 1106-13.
- Lee, J. H., Cheon, Y. H., Woo, R. S., Song, D. Y., Moon, C., Baik, T. K. (2012). Evidence of early involvement of apoptosis inducing factor-induced neuronal death in Alzheimer brain. *Anatomy & Cell Biology*, 45(1), 26-37.
- Lewis, J. E., McDaniel, H. R., Agronin, M. E., Loewenstein, D. A., Riveros, J., Mestre, R., Martinez, M., Colina, N., Abreu, D., Konefal, J., Woolger, J. M., Ali, K. H. (2013). The effect of an aloe polymannose multinutrient complex on cognitive and immune functioning in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 33(2), 393-406.
- Li, C., Li, W., Chen, X., Feng, M., Rui, X., Jiang, M., Dong, M. (2014b). Microbiological, physicochemical and rheological properties of fermented soymilk produced with exopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria strains. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2), 477-85.
- Li, G., Yuan, H., Li, L. (2007). Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on c-Fos expression in the hippocampus of Alzheimer's disease model rats [J]. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 6, 727-32.
- Li, H., Ding, F., Xiao, L., Shi, R., Wang, H., Han, W., Huang, Z. (2017a). Food-derived antioxidant polysaccharides and their pharmacological potential in neurodegenerative diseases. *Nutrients*, 9(7), 778.
- Li, H., Li, Z., Peng, L., Jiang, N., Liu, Q., Zhang, E., Liang, B., Li, R., Zhu, H. (2017b). *Lycium barbarum* polysaccharide protects human keratinocytes against UVB-induced photo-damage. *Free Radical Research*, 51(2), 200-10.
- Li, J. Y., Jin, M. M., Meng, J., Gao, S. M., Lu, R. R. (2013e). Exopolysaccharide from *Lactobacillus planterum* LP6: Antioxidation and the effect on oxidative stress. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 1147-52.
- Li, Q., Li, J., Li, H., Xu, R., Yuan, Y., & Cao, J. (2019c). Physicochemical properties and functional bioactivities of different bonding state polysaccharides extracted from tomato fruit. *Carbohydrate Polymers*, 219, 181-190.
- Li, R., Yang, L., Lindholm, K., Konishi, Y., Yue, X., Hampel, H., Zhang, D., Shen, Y. (2004). Tumor necrosis factor death receptor signaling cascade is required for amyloid- β protein-induced neuron death. *Journal of Neuroscience*, 24(7), 1760-71.

- Li, S., Huang, R., Shah, N. P., Tao, X., Xiong, Y., Wei, H. (2014a). Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum* R315. *Journal of Dairy Science*, 97(12), 7334-43.
- Li, S., Xiong, Q., Lai, X., Li, X., Wan, M., Zhang, J., Yan, Y., Cao, M., Guan, J. G., Zhang, D, Lin, Y. (2016). Molecular modification of polysaccharides and resulting bioactivities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 237-50.
- Li, X. Y., An, F. Y., Li, S. G. (2013a). Effects of *Angelica* polysaccharides on calcium overloads and cholinergic neurons injury in senile dementia mice [J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 3, 68-70.
- Li, X. Y., Chen, K. B., Zhang, L. Y (2013b). Effects of *Angelica* polysaccharide on behavior, SOD and telomerase activity in serum and brain of senile mice model [J]. *Modern Traditional Chinese Medicine*, 2, 101-4.
- Li, X. Y., Chen, K. B., Zhang, L. Y. (2013c). Effects of *Angelica* polysaccharides on learning and memory ability as well as apoptosis in senile mouse model [J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 6, 68-71.
- Li, Y., Wang, B., Liu, C., Zhu, X., Zhang, P., Yu, H., Li, Y., Li, Z., Li, M. (2019b). Inhibiting c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated apoptotic signaling pathway in PC12 cells by a polysaccharide (CCP) from *Coptis chinensis* against amyloid- β (A β)-induced neurotoxicity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 565-74.
- Li, Y. P., Wang, X. Y., Chen, J. (2015). Influence of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide on β -amyloid peptide and tau's hyperphosphorylation in rat with Alzheimer's disease [J]. *J Chin Prat Diag Ther*, 9, 862-5.
- Li, Y. S., Li, T. Q., Liang, S. (2013d). Effects of *Astragalus* polysaccharides on spatial learning and memory ability in rats with vascular dementia [J]. *Journal of Medical Science Yanbian University*, 2, 92-4.
- Li, Z., Chen, X., Zhang, Y., Liu, X., Wang, C., Teng, L., Wang, D. (2019a). Protective roles of *Amanita caesarea* polysaccharides against Alzheimer's disease via Nrf2 pathway. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 29-37.
- Liang, Y. S., Ma, L. (2007). Effect of *Radix polygoni multiflori* preparata polycose on senile dementia in rabbit model [J]. *Inner Mongolia Medical Journal*, 1, 15-7.
- Lin, Y., Liu, J., Hu, Y., Song, X., Zhao, Y. (2012). An antioxidant exopolysaccharide devoid of pro-oxidant activity produced by the soil bacterium *Bordetella* sp. B4. *Bioresource Technology*, 124, 245-51.
- Liston, D. R., Nielsen, J. A., Villalobos, A., Chapin, D., Jones, S. B., Hubbard, S. T., Shalaby, I. A., Ramirez, A., Nason, D., White, W. F. (2004). Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: Implications for use in Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology*, 486(1), 9-17.

- Liu, C. F., Tseng, K. C., Chiang, S. S., Lee, B. H., Hsu, W. H., Pan, T. M. (2011). Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(12), 2284-91.
- Liu, F., Zhao, W., Zhao, F., Dong, Q., Wang, Y., Wei, W., Jia, L., Li, L., Lu, F. (2020). Dual effect of the acidic polysaccharose ulvan on the inhibition of amyloid- β protein fibrillation and disintegration of mature fibrils. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(37), 41167-76.
- Liu, X., Bian, J., Li, D., Liu, C., Xu, S., Zhang, G., Zhang, L., Gao, P. (2019). Structural features, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of polysaccharides from stem of *Physalis alkekengi* L. *Industrial Crops and Products*, 129, 654-61.
- Liu, Z., Zhou, T., Ziegler, A. C., Dimitrion, P., Zuo, L. (2017). Oxidative stress in neurodegenerative diseases: From molecular mechanisms to clinical applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 2525967.
- Liu, Z. Y., Wan, P., Gao, J. T. (2014). Effects of *Astragalus* polysaccharides on learning and memory in vascular dementia mice [J]. *Journal of Jilin Medical College*, 1, 14-6.
- Loaec, M., Olier, R., Guezennec, J. (1998). Chelating properties of bacterial exopolysaccharides from deep-sea hydrothermal vents. *Carbohydrate Polymers*, 35(1-2), 65-70.
- Lovell, M. A., Markesbery, W. R. (2001). Ratio of 8-hydroxyguanine in intact DNA to free 8-hydroxyguanine is increased in Alzheimer disease ventricular cerebrospinal fluid. *Archives of Neurology*, 58(3), 392-6.
- Lu, A. M., Yu, T. G. (2008). Protective effect of Lentinan on the neuron in the AD mouse induced by glutamate [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 4, 337-9.
- Lu, J., He, R., Sun, P., Zhang, F., Linhardt, R. J., Zhang, A. (2020). Molecular mechanisms of bioactive polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (Lingzhi), a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 765-74.
- Maccioni, R. B., Navarrete, L. P., González, A., González-Canacer, A., Guzmán-Martínez, L., Cortés, N. (2020). Inflammation: A major target for compounds to control Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 76(4), 1199-1213.
- Manczak, M., Kandimalla, R., Fry, D., Sesaki, H., Reddy, P. H. (2016). Protective effects of reduced dynamin-related protein 1 against amyloid beta-induced mitochondrial dysfunction and synaptic damage in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, 25(23), 5148-66.
- Mao, X., Liao, Z., Guo, L., Xu, X., Wu, B., Xu, M., Zhao, X., Bi, K., Jia, Y. (2015). Schisandrin C ameliorates learning and memory deficits by A β ₁₋₄₂-induced oxidative stress and neurotoxicity in mice. *Phytotherapy Research*, 29(9), 1373-80.
- Marambaud, P., Dreses-Werringloer, U., Vingtdeux, V. (2009). Calcium signaling in neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*, 4(1), 1-15.

- Marshall, V. M., Rawson, H. L. (1999). Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. *International Journal of Food Science & Technology*, 34(2), 137-43.
- Martinez Martinez, L., Timmerman, C. P., Fleer, A., Verhoef, J. (1993). Chemiluminescence of human polymorphonuclear leucocytes after stimulation with whole cells and cell-wall components of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology*, 39(3), 196-203.
- Matsumura, Y., Egami, M., Satake, C., Maeda, Y., Takahashi, T., Nakamura, A., Mori, T. (2003). Inhibitory effects of peptide-bound polysaccharides on lipid oxidation in emulsions. *Food Chemistry*, 83(1), 107-19.
- Mattson, M. P. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(2), 120-30.
- McDonald, D. R., Bamberger, M. E., Combs, C. K., Landreth, G. E. (1998). β -Amyloid fibrils activate parallel mitogen-activated protein kinase pathways in microglia and THP1 monocytes. *Journal of Neuroscience*, 18(12), 4451-60.
- Mebrek, S., Djeghim, H., Mehdi, Y., Meghezzi, A., Anwar, S., Awadh, N. A., Benali, M. (2018). Antioxidant, anti-cholinesterase, anti- α -glucosidase and prebiotic properties of beta-glucan extracted from Algerian barley. *International Journal of Phytomedicine*, 10(1), 58-67.
- Mavioğlu, H. (2007). Memantin'in bellek bozuklukları tedavisindeki yeri. *Türkiye Klinikleri Dahili Tıp Bilimleri Dergisi*, 3(40), 29-33.
- Melo, J. B., Agostinho, P., Oliveira, C. R. (2003). Involvement of oxidative stress in the enhancement of acetylcholinesterase activity induced by amyloid beta-peptide. *Neuroscience Research*, 45(1), 117-27.
- Mende, S., Rohm, H., Jaros, D. (2016). Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products. *International Dairy Journal*, 52, 57-71.
- Mendiola Precoma, J., Berumen, L. C., Padilla, K., Garcia-Alcocer, G. (2016). Therapies for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *BioMed Research International*, 2016, 2589276.
- Migheli, A., Cavalla, P., Marino, S., Schiffer, D. (1994). A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after in situ end-labeling of DNA strand breaks. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 53(6), 606-16.
- Mizuno, T. (1999). The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1(1), 9-29.
- Moreira, P. I. (2010). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease. *European Neurological Review*, 5(1), 17-21.

- Moslemnezhad, A., Mahjoub, S., Moghadasi, M. (2016). Altered plasma marker of oxidative DNA damage and total antioxidant capacity in patients with Alzheimer's disease. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 7(2), 88.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Mullauer, F. B., Kessler, J. H., Medema, J. P. (2009). Betulinic acid induces cytochrome c release and apoptosis in a Bax/Bak-independent, permeability transition pore dependent fashion. *Apoptosis*, 14, 191-202.
- Munoz, L., Ammit, A. J. (2010). Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 58(3), 561-8.
- Muthaiyah, B., Essa, M. M., Chauhan, V., Chauhan, A. (2011). Protective effects of walnut extract against amyloid beta peptide-induced cell death and oxidative stress in PC12 cells. *Neurochemical Research*, 36(11), 2096-103.
- Nambiar, R. B., Sellamuthu, P. S., Perumal, A. B., Sadiku, E. R., Phiri, G., Jayaramudu, J. (2018). Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* HM47 isolated from human breast milk. *Process Biochemistry*, 73, 15-22.
- Nimgampalle, M., Kuna, Y. (2017). Anti-Alzheimer properties of probiotic, *Lactobacillus plantarum* MTCC 1325 in Alzheimer's disease induced albino rats. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 11(8), 1-5.
- Nwodo, U. U., Green, E., Okoh, A. I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14002-15.
- Olasehinde, T. A., Mabinya, L. V., Olaniran, A. O., Okoh, A. I. (2019a). Chemical characterization, antioxidant properties, cholinesterase inhibitory and anti-amyloidogenic activities of sulfated polysaccharides from some seaweeds. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 18, 100182.
- Olasehinde, T. A., Mabinya, L. V., Olaniran, A. O., Okoh, A. I. (2019b). Chemical characterization of sulfated polysaccharides from *Gracilaria gracilis* and *Ulva lactuca* and their radical scavenging, metal chelating, and cholinesterase inhibitory activities. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 100-10.
- Ooi, V. E., Liu, F. (2000). Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current Medicinal Chemistry*, 7(7), 715-29.
- Öke Altundaş, F. (2012). *Türkiye'de endemik olarak bulunan Prangos Lindl. (Umbelliferae) türlerinin moleküler sistematigi ve biyolojik aktiviteleri*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-179.
- Özkan, İ. (2006). *Nanoteknolojik yöntemler ve malzemenin yüzey özelliklerinin iyileştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 1-74.

- Özpak, L., Pazarbaşı, A., Keser, N. (2017). Alzheimer hastalığının genetiği ve epigenetiği. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 26(1), 34-49.
- Peluso, I., Raguzzini, A. (2016). Salivary and urinary total antioxidant capacity as biomarkers of oxidative stress in humans. *Pathology Research International*, 2016, 5480267.
- Peng, X., Meng, J., Chi, T., Liu, P., Man, C., Liu, S., Guo, Y., Jiang, Y. (2014). *Lactobacillus plantarum* NDC 75017 alleviates the learning and memory ability in aging rats by reducing mitochondrial dysfunction. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 8(6), 1841-6.
- Persson, T., Popescu, B. O., Cedazo-Minguez, A. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease: Why did antioxidant therapy fail?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 427318.
- Popugaeva, E., Chernyuk, D., Bezprozvanny, I. (2020). Reversal of calcium dysregulation as potential approach for treating Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 17(4), 344-54.
- Pradeepkiran, J. A., Reddy, P. H. (2019). Structure based design and molecular docking studies for phosphorylated tau inhibitors in Alzheimer's disease. *Cells*, 8(3), 260.
- Prasad, M. D., Krishna, M. G. (2014). Facile green chemistry-based synthesis and properties of free-standing Au-and Ag-PMMA films. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(6), 1453-60.
- Puertas, M. C., Martinez-Martos, J. M., Cobo, M. P., Carrera, M. P., Mayas, M. D., Ramirez-Exposito, M. J. (2012). Plasma oxidative stress parameters in men and women with early stage Alzheimer type dementia. *Experimental Gerontology*, 47(8), 625-30.
- Quan, Y., Ma, A., Yang, B. (2019). Preventive and therapeutic effect of *Ganoderma* (Lingzhi) on brain injury, Singapore: Springer, 159-80.
- Rajoka, M. S. R., Zhao, H., Lu, Y., Lian, Z., Li, N., Hussain, N., Shao, D., Li, M., Shi, J. (2018). Anticancer potential against cervix cancer (HeLa) cell line of probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* strains isolated from human breast milk. *Food & Function*, 9(5), 2705-15.
- Rani, R. P., Anandharaj, M., Ravindran, A. D. (2018). Characterization of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus gasseri* FR4 and demonstration of its *in vitro* biological properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 772-83.
- Rao, V. K., Carlson, E. A., Yan, S. S. (2014). Mitochondrial permeability transition pore is a potential drug target for neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(8), 1267-72.

- Reddy, P. H., Beal, M. F. (2008). Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: Implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine*, 14(2), 45-53.
- Reitz, C., Brayne, C., Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 7(3), 137-52.
- Rissman, R. A., Poon, W. W., Blurton-Jones, M., Oddo, S., Torp, R., Vitek, M. P., LaFerla, F. M., Rohn, T. T., Cotman, C. W. (2004). Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(1), 121-30.
- Rizzuto, R., Bernardi, P., Pozzan, T. (2000). Mitochondria as all-round players of the calcium game. *The Journal of Physiology*, 529(1), 37-47.
- Robinson, M., Lee, B. Y., Hane, F. T. (2017). Recent progress in Alzheimer's disease research, part 2: Genetics and epidemiology. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(2), 317-30.
- Rodriguez Martinez, M. A., Ruiz Torres, A. (1992). Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 66(2), 213-22.
- Roth, K. A. (2001). Caspases, apoptosis, and Alzheimer disease: Causation, correlation, and confusion. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 60(9), 829-38.
- Saravanan, C., Rajesh, R., Kaviarasan, T., Muthukumar, K., Kavita, D., Shetty, P. H. (2017). Synthesis of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its application for degradation of azo-dyes. *Biotechnology Reports*, 15, 33-40.
- Sarıkaya, H. (2014). *Laktik asit bakterilerinin kültür filtratları ve ekzopolisakkaritlerinin (EPS) bifidobakterilerin gelişimini düzenleyici (BGD) ve antibiyofilik etkilerinin belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-126.
- Sasahara, K. C., Zottola, E. A. (1993). Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. *Journal of Food Protection*, 56(12), 1022-8.
- Sathiyarayanan, G., Dineshkumar, K., Yang, Y. H. (2017). Microbial exopolysaccharide-mediated synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(6), 731-52.
- Saxena, M., Dubey, R. (2019). Target enzyme in Alzheimer's disease: Acetylcholinesterase inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19(4), 264-75.
- Schenk, D. (2002). Amyloid- β immunotherapy for Alzheimer's disease: The end of the beginning. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(10), 824-8.

- Schmittgen, T. D., Livak, K. J. (2008). Analyzing Real-time PCR Sata by the Comparative CT Method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-08.
- Schultz, D. R., Harrington Jr, W. J. (2003). Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 32(6), 345-69.
- Schwartz, P. J., Blundon, J. A., Adler, E. M. (2007). A biochemical assay for acetylcholinesterase activity in PC12 cells. *Science Signaling*, 2007(394), tr2.
- Shahnawaz Khan, M., Amjad Kamal, M., Tabrez, S. (2017). Elucidating treatment of Alzheimer's Disease via different receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(12), 1400-7.
- Shao, B. M., Dai, H., Xu, W., Lin, Z. B., Gao, X. M. (2004). Immune receptors for polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323(1), 133-41.
- Sırmatel, F., Duygu, F., Çelik, H., Selek, Ş., Sırmatel, Ö., Gürsoy, B., Eriş, F. N. (2009). Kronik viral hepatit olgularında total oksidatif seviye ve total antioksidan kapasitenin değerlendirilmesi. *Klinik Dergisi*, 22(3), 92-6.
- Simunkova, M., Alwasel, S. H., Alhazza, I. M., Jomova, K., Kollar, V., Rusko, M., Valko, M. (2019). Management of oxidative stress and other pathologies in Alzheimer's disease. *Archives of Toxicology*, 93(9), 2491-513.
- Smith, M. A., Zhu, X., Tabaton, M., Liu, G., McKeel Jr, D. W., Cohen, M. L., Wang, X., Siedlak, S. L., Dwyer, B. E., Hayashi, T., Nakamura, M., Nunomura, A., Perry, G. (2010). Increased iron and free radical generation in preclinical Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19(1), 363-72.
- Srinivasan, M., Lahiri, D. K. (2015). Significance of NF-κB as a pivotal therapeutic target in the neurodegenerative pathologies of Alzheimer's disease and multiple sclerosis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 19(4), 471-87.
- Stanciu, G. D., Luca, A., Rusu, R. N., Bild, V., Beschea Chiriac, S. I., Solcan, C., Bild, W., Ababei, D. C. (2020). Alzheimer's disease pharmacotherapy in relation to cholinergic system involvement. *Biomolecules*, 10(1), 40.
- Su, Y., Li, L. (2020). Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from four auriculariales. *Carbohydrate Polymers*, 229, 115407.
- Su, Y. N., Chen, L. Q., Zhang, X. B. (2013). Effect of polysaccharide from *Comus officinalis* on GSK-3β and phosphorylated GSK-3β in Alzheimer's disease mouse [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 9, 2092-4.
- Suarez, E. R., Kralovec, J. A., Nosedá, M. D., Ewart, H. S., Barrow, C. J., Lumsden, M. D., Grindley, T. B. (2005). Isolation, characterization and structural determination of a unique type of arabinogalactan from an immunostimulatory extract of *Chlorella pyrenoidosa*. *Carbohydrate Research*, 340(8), 1489-98.

- Sullivan Gunn, M. J., Lewandowski, P. A. (2013). Elevated hydrogen peroxide and decreased catalase and glutathione peroxidase protection are associated with aging sarcopenia. *BMC Geriatrics*, 13(1), 104.
- Sun, X. Z., Liao, Y., Li, W., Guo, L. M. (2017). Neuroprotective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides against oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *Neural Regeneration Research*, 12(6), 953-8.
- Şen, Y. T. (2017). *Altın nanopartiküllerde polimer kaplamanın oksidatif stres ve DNA hasarı üzerine etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-127.
- Takahashi, H., Kosaka, M., Watanabe, Y., Nakade, K., Fukuyama, Y. (2003). Synthesis and neuroprotective activity of bergenin derivatives with antioxidant activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11(8), 1781-8.
- Talesa, V. N. (2001). Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122(16), 1961-9.
- Tallon, R., Bressollier, P., Urdaci, M. C. (2003). Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, 154(10), 705-12.
- Tamagno, E., Parola, M., Guglielmotto, M., Santoro, G., Bardini, P., Marra, L., Tabaton, M., Danni, O. (2003a). Multiple signaling events in amyloid β -induced, oxidative stress-dependent neuronal apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(1), 45-58.
- Tamagno, E., Robino, G., Obbili, A., Bardini, P., Aragno, M., Parola, M., Danni, O. (2003b). H_2O_2 and 4-hydroxynonenal mediate amyloid β -induced neuronal apoptosis by activating JNKs and p38MAPK. *Experimental Neurology*, 180(2), 144-55.
- Tang, C. R., Cao, G. Z., Ye, X. L. (2012). Effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide on the ethology and expressions of Bcl-2 and Bax in brain tissue for Alzheimer's disease rat model [J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 8, 1832-4.
- Tang, W., Dong, M., Wang, W., Han, S., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., Zhang, Q, Wu, J., Li, W. (2017). Structural characterization and antioxidant property of released exopolysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* SRFM-1. *Carbohydrate Polymers*, 173, 654-64.
- Thakur, N., Rokana, N., Panwar, H. (2016). Probiotics, selection criteria, safety and role in health and disease. *Journal of Innovative Biology*, 3(1), 259-70.
- Tian, S. M., Ma, Y. X., Sun, L. Z., Tan, L., Liu, J., Li, G. Y. (2012). Effects of different fractions of *Acori graminei rhizoma* extracts on learning and memory abilities in A β -induced Alzheimer disease mice. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 28, 159-62.

- Tian, Y., Zhao, Y., Zeng, H., Zhang, Y., Zheng, B. (2016). Structural characterization of a novel neutral polysaccharide from *Lentinus giganteus* and its antitumor activity through inducing apoptosis. *Carbohydrate Polymers*, 154, 231-40.
- Tiptiri Kourpeti, A., Spyridopoulou, K., Santarmaki, V., Aindelis, G., Tompoulidou, E., Lamprianidou, E. E., Ypsilantis, P., Lampri, E. S., Simopoulos C., Kotsianidis, I., Galanis, A., Kourkoutas, Y., Dimitrellou, D., Chlichlia, K. (2016). *Lactobacillus casei* exerts anti-proliferative effects accompanied by apoptotic cell death and up-regulation of TRAIL in colon carcinoma cells. *PloS One*, 11(2), e0147960.
- Topçuoğlu, E. S., Selekler, K. (1998). Alzheimer disease. *Turkish Journal of Geriatrics*, 1(2), 63-7.
- Tosun, F. (2016). *Ekzopolisakkarit üreten laktik kültürlerin tereyağı, yayık tereyağı ve kaymağın kalite özellikleri üzerine etkisi*, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 1-193.
- Tramutola, A., Lanzillotta, C., Perluigi, M., Butterfield, D. A. (2017). Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain Research Bulletin*, 133, 88-96.
- Tsai, C. H., Yen, Y. H., Yang, J. P. W. (2015). Finding of polysaccharide-peptide complexes in *Cordyceps militaris* and evaluation of its acetylcholinesterase inhibition activity. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(1), 63-70.
- Tsuda, H., Hara, K., Miyamoto, T. (2008). Binding of mutagens to exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* mutant strain 301102S. *Journal of Dairy Science*, 91(8), 2960-6.
- Tükenmez, U., Aktas, B., Aslim, B., Yavuz, S. (2019). The relationship between the structural characteristics of lactobacilli-EPS and its ability to induce apoptosis in colon cancer cells *in vitro*. *Scientific Reports*, 9(1), 1-14.
- Tükenmez, Ü., Aslim, B. (2018). Probiyotik kaynaklı, muhtemel prebiyotik özelliğe sahip ekzopolisakkarit (EPS)'lerin biyolojik ve fonksiyonel özellikleri. *Medical Journal of Suleyman Demirel University*, 25(4), 487-97.
- Twiddy, D., Brown, D. G., Adrain, C., Jukes, R., Martin, S. J., Cohen, G. M., MacFarlane, M., Cain, K. (2004). Pro-apoptotic proteins released from the mitochondria regulate the protein composition and caspase-processing activity of the native Apaf-1/caspase-9 apoptosome complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 19665–19682.
- Ullah, S., Khalil, A. A., Shaukat, F., Song, Y. (2019). Sources, extraction and biomedical properties of polysaccharides. *Foods*, 8(8), 304.
- Ural, S. (2016). *Lactobacillus cinsi bakterilerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-72.
- Urpayıl, S., Thayyil, M. S. (2012). Dielectric and spectroscopic investigations of amorphous captopril. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2, 479-84.

- Ülger, U. D. Z., Arioğul, S. (2007). Demans tedavisi. *İç Hastalıkları Dergisi*, 14, 33-8.
- Van Calsteren, M. R., Gagnon, F., Nishimura, J., Makino, S. (2015). Structure determination of the neutral exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Carbohydrate Research*, 413, 115-22.
- Vassar, R. (2014). BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 6(9), 89.
- Vinusha, K. S., Deepika, K., Johnson, T. S., Agrawal, G. K., Rakwal, R. (2018). Proteomic studies on lactic acid bacteria: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 14, 140-8.
- Xiang, Q., Zhou, W. Y., Hu, W. X., Wen, Z., He, D., Wu, X. M., Wei, H., Wang, W., Hu, G. Z. (2015). Neuroprotective effects of *Rhizoma doscoreae* polysaccharides against neuronal apoptosis induced by in vitro hypoxia. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 10(6), 2063-2070.
- Xiao, F., Li, X. (2009). The inhibition of amyloid β -protein production in M146L cell by *Kadsura heteroclita* polysaccharide. *Chinese Journal of Gerontology*, 29(19), 2458-60.
- Xiaoyan, Y. (2005). The effects of refined *Polygonum multiflorum* Thunb. polysaccharide on learning memory and the activities of enzymes in the brain for the experimental mice with dementia. *Progress in Pharmaceutical Sciences*, 29(12), 557-9.
- Xiong, C., Li, Q., Chen, C., Chen, Z., Huang, W. (2016). Neuroprotective effect of crude polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Morchella importuna* against H_2O_2 -induced PC12 cell cytotoxicity by reducing oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 569-76.
- Xu, A. X., Wang, C. Q., Yang, S. H., Ge, B., Zhang, Z. M. (2005). The synergistic effect on antisenility and its mechanism of PFR and PB WF [J]. *Journal of Lanzhou Medical College*, 2, 13-6.
- Xu, J., Liu, W., Yao, W., Pang, X., Yin, D., Gao, X. (2009). Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 78(2), 227-234.
- Xu, J., Yuan, Y., Zhang, R., Song, Y., Sui, T., Wang, J., Chen, Y., Guan, S., Wang, L. (2019b). A deuterohemin peptide protects a transgenic *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease by inhibiting $A\beta_{1-42}$ aggregation. *Bioorganic Chemistry*, 82, 332-9.
- Xu, L., Cheng, Y., Li, J., Mei, Z. (2008). Neuroprotective effect of polysaccharides from Erjingling prescription on hippocampal neuron apoptosis induced by glutamate. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 22(2), 124-8.
- Xu, R., Shen, Q., Ding, X., Gao, W., Li, P. (2011). Chemical characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide fraction isolated from *Bifidobacterium animalis* RH. *European Food Research and Technology*, 232(2), 231-40.

- Xu, Y., Wu, Y. J., Sun, P. L., Zhang, F. M., Linhardt, R. J., Zhang, A. Q. (2019a). Chemically modified polysaccharides: Synthesis, characterization, structure activity relationships of action. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132(2019), 970-7.
- Xu, Y., Zhao, M., Han, Y., Zhang, H. (2020). GABAergic inhibitory interneuron deficits in Alzheimer's disease: Implications for treatment. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 660.
- Wang, C., Santhanam, R. K., Gao, X., Chen, Z., Chen, Y., Wang, C., Xu, L., Chen, H. (2018). Preparation, characterization of polysaccharides fractions from *Inonotus obliquus* and their effects on α -amylase, α -glucosidase activity and H₂O₂-induced oxidative damage in hepatic L02 cells. *Journal of Functional Foods*, 48(4), 179-89.
- Wang, D., Luo, X., Zhong, Y., Yang, W., Xu, M., Liu, Y., Meng, J., Yao, P., Yan, H., Liu, L. (2012). Pu-erh black tea extract supplementation attenuates the oxidative DNA damage and oxidative stress in sprague-dawley rats with renal dysfunction induced by subchronic 3-methyl-2-quinoxalin benzenevinylketo-1, 4-dioxide exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 50(2), 147-54.
- Wang, J., Fang, X., Wu, T., Fang, L., Liu, C., Min, W. (2019a). *In vitro* immunomodulatory effects of acidic exopolysaccharide produced by *Lactobacillus planetarium* JLAU103 on RAW264.7 macrophages. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 1308-15.
- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y., Yang, Z. (2015a). Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 125, 16-25.
- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., He, C., Yang, Y., Yang, Z. (2015c). Isolation and characterization of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus plantarum* SKT109 from Tibet kefir. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 65(4), 269-280.
- Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A., Yang, Z. (2015b). Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 119-26.
- Wang, K., Niu, M., Yao, D., Zhao, J., Wu, Y., Lu, B., Zheng, X. (2019b). Physicochemical characteristics and *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity of a cell-bound exopolysaccharide produced by *Lactobacillus fermentum* S1. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 252-61.
- Wang, P., Liao, W., Fang, J., Liu, Q., Yao, J., Hu, M., Ding, K. (2014b). A glucan isolated from flowers of *Lonicera japonica* Thunb. inhibits aggregation and neurotoxicity of A β ₄₂. *Carbohydrate Polymers*, 110, 142-7.
- Wang, X., Shao, C., Liu, L., Guo, X., Xu, Y., Lu, X. (2017). Optimization, partial characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* KX041. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 1173-84.

- Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H. G., Zhu, X. (2014a). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(8), 1240-7.
- Wang, Y., Li, C., Liu, P., Ahmed, Z., Xiao, P., Bai, X. (2010). Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 895-903.
- Wasser, S. P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3), 258-74.
- Wei, D., Chen, T., Yan, M., Zhao, W., Li, F., Cheng, W., Yuan, L. (2015). Synthesis, characterization, antioxidant activity and neuroprotective effects of selenium polysaccharide from *Radix hedysari*. *Carbohydrate Polymers*, 125, 161-8.
- Wei, W., Wang, X., Kusiak, J. W. (2002). Signaling events in amyloid β -peptide-induced neuronal death and insulin-like growth factor I protection. *Journal of Biological Chemistry*, 277(20), 17649-56.
- Wojda, U., Salinska, E., Kuznicki, J. (2008). Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life*, 60(9), 575-90.
- Woo, J. Y., Gu, W., Kim, K. A., Jang, S. E., Han, M. J., Kim, D. H. (2014). *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* C29 ameliorates memory impairment and inflammaging in a D-galactose-induced accelerated aging mouse model. *Anaerobe*, 27, 22-6.
- Wong, M. L., Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-88.
- Wu, F., Huang, H. (2020). Surface morphology and protective effect of *Hericium erinaceus* polysaccharide on cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *Carbohydrate Polymers*, 251, 116930.
- Wu, F., Zhu, D. N., Lin, Z. H., Yan, Y. Q. (2007). Study on material basis and mechanism of action of dangguishaoyaosan in the prevention and treatment of senile dementia IX: The anti-oxidative activity of the polysaccharides of FBD [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 7, 23-6.
- Wu, K. L., Hsu, C., Chan, J. Y. (2007). Impairment of the mitochondrial respiratory enzyme activity triggers sequential activation of apoptosis-inducing factor-dependent and caspase-dependent signaling pathways to induce apoptosis after spinal cord injury. *Neurochemistry*, 101, 1552-1566.
- Wu, S., Zhang, B., Liu, Y., Suo, X., Li, H. (2018). Influence of surface topography on bacterial adhesion: A review. *Biointerphases*, 13(6), 060801.
- Wyss Coray, T. (2005). Killing pain, killing neurons?. *Nature Medicine*, 11(5), 472-3.

- Yan, F., Wang, B., Zhang, Y. (2014). Polysaccharides from *Cordyceps sinensis* mycelium ameliorate exhaustive swimming exercise-induced oxidative stress. *Pharmaceutical Biology*, 52(2), 157-61.
- Yan, T., Chen, S. B., Xu, L., Yang, L. (2011). Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharide on learning and memory ability and oxygen stress of model rats with Alzheimer's disease. *Shaanxi Medical Journal*, 40(4), 387-9.
- Yang, F., Zhou, Y., Sheng, L. (2015a). Effect of polysaccharide from *Vitis vinifera* on expression of APP in Alzheimer's disease cell model [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 21(18), 107-10.
- Yang, H., Deng, J., Yuan, Y., Fan, D., Zhang, Y., Zhang, R., Han, B. (2015b). Two novel exopolysaccharides from *Bacillus amyloliquefaciens* C-1: Antioxidation and effect on oxidative stress. *Current Microbiology*, 70(2), 298-306.
- Yang, J., Sun, Y., Xu, F., Liu, W., Hayashi, T., Hattori, S., Ushiki-Taku, Y., Onodera, S., Tashiro, S., Ikejima, T. (2019). Silibinin protects rat pancreatic β -cell through up-regulation of estrogen receptors' signaling against amylin-or $A\beta_{1-42}$ -induced reactive oxygen species/reactive nitrogen species generation. *Phytotherapy Research*, 33(4), 998-1009.
- Yang, W., Fang, Y., Liang, J., Hu, Q. (2011). Optimization of ultrasonic extraction of *Flammulina velutipes* polysaccharides and evaluation of its acetylcholinesterase inhibitory activity. *Food Research International*, 44(5), 1269-75.
- YanJun, G., Hua, Y., Lina, Z., Shengwei, G. (2006). Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on antioxidant ability and modality in the hippocampus of AD rats. *Acta Anatomica Sinica*, 37(5), 509-13.
- Yao, H. T., Ma, J. L., Zhang, X. B. (2013). Effect of polysaccharide from *Comus officinalis* on tau protein in Alzheimer's disease mouse [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 12, 2838-41.
- Yarza, R., Vela, S., Solas, M., Ramirez, M. J. (2016). c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 321.
- Yeon, S. W., You, Y. S., Kwon, H. S., Yang, E. H., Ryu, J. S., Kang, B. H., Kang, J. H. (2010). Fermented milk of *Lactobacillus helveticus* IDCC3801 reduces beta-amyloid and attenuates memory deficit. *Journal of Functional Foods*, 2(2), 143-52.
- Yıldız, H., Karatas, N. (2018). Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. *Process Biochemistry*, 72, 41-6.
- Yi, Y., Wu, S., Ye, M., Zeng, Y., Zhang, P., Xie, Y. (2014). Effect of $A\beta_{1-42}$ injection on hippocampus cells in rats and protective role of polygona-polysaccharose for Alzheimer's disease. *Journal of Central South University Medical Sciences*, 39(4), 344-8.

- Yi, Y. X., Wu, S. X., Ye, S. M. (2015). Effect of *Polygonatum* polysaccharide on the apoptosis of hippocampal cells in Alzheimer's disease mouse induced by A β ₁₋₄₂ [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 4, 1044-5.
- Yin, G., Gong, D. K., Liu, B. H. (2013a). Effect of polysaccharides of *Cistanche deserticola* on learning and memory ability and Bcl-2 and caspase-3 expression in hippocampal neuron of model rats with Alzheimer's disease [J]. *Lishizhen Medicine Materia Medica Research*, 5, 1091-2.
- Yin, G., Gong, D. K., Liu, B. H. (2014). Effect of polysaccharides of *Cistanche deserticola* on learning and memory ability and cholinergic system of model rats with Alzheimer's disease [J]. *Neur Injur Funct Reconst*, 5, 426-7.
- Yin, G., Gong, D. K., Liu, B. H., Yao, C. J. (2013b). Effect of polysaccharides of *Cistanche deserticola* on learning and memory ability and oxygen stress of model rats with Alzheimer's disease [J]. *Journal of Apoplexy and Nervous Diseases*, 6, 504-7.
- Ying, Y. U., Wei, H. E. (2017). Effects of Imperatorin on the learning and memory impairment of A β ₁₋₄₂-induced model of Alzheimer's disease in mice. *Natural Product Research and Development*, 29(6), 1030.
- You, R., Wang, K., Liu, J., Liu, M., Luo, L., Zhang, Y. (2011). A comparison study between different molecular weight polysaccharides derived from *Lentinus edodes* and their antioxidant activities *in vivo*. *Pharmaceutical Biology*, 49(12), 1298-1305.
- Yu, J. T., Chang, R. C. C., Tan, L. (2009). Calcium dysregulation in Alzheimer's disease: From mechanisms to therapeutic opportunities. *Progress in Neurobiology*, 89(3), 240-55.
- Yu, L., Zhai, Q., Tian, F., Liu, X., Wang, G., Zhao, J., Zhang, H., Narbad, A., Chen, W. (2017). *Lactobacillus plantarum* CCFM639 can prevent aluminium-induced neural injuries and abnormal behaviour in mice. *Journal of Functional Foods*, 30, 142-50.
- Yu, M. S., Lai, S. W., Lin, K. F., Fang, J. N., Yuen, W. H., Chang, R. C. C. (2004). Characterization of polysaccharides from the flowers of *Nerium indicum* and their neuroprotective effects. *International Journal of Molecular Medicine*, 14(5), 917-24.
- Yu, M. S., Leung, S. K. Y., Lai, S. W., Che, C. M., Zee, S. Y., So, K. F., Yuen, W. H., Chang, R. C. C. (2005). Neuroprotective effects of anti-aging oriental medicine *Lycium barbarum* against β -amyloid peptide neurotoxicity. *Experimental Gerontology*, 40(8-9), 716-27.
- Yu, M. S., Wong, A. Y. Y., So, K. F., Fang, J. N., Yuen, W. H., Chang, R. C. C. (2007). New polysaccharide from *Nerium indicum* protects neurons via stress kinase signaling pathway. *Brain Research*, 1153, 221-30.

- Yuan, D. J., Zhang, Y. F., Yao, C. X. (2011). Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on synapsis and hippocampal synaptophysin expression in Alzheimer's rats model. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 17(3), 151-5.
- Yuan, F., Xi, Q., Sheng, L. (2015). The effects of polysaccharides from *Vitis vinifera* L. on apoptosis of PC12 cells induced by A β ₂₅₋₃₅ [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 19, 5372-3.
- Yueping, Z., Hua, Y., Li, L., Xiaoyun, W. (2008). Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on caspase-3 and FasL expressions in the hippocampus of Alzheimer disease model rats [J]. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 5, 016.
- Yurinskaya, M. M., Mitkevich, V. A., Kozin, S. A., Evgen'ev, M. B., Makarov, A. A., Vinokurov, M. G. (2015). HSP70 protects human neuroblastoma cells from apoptosis and oxidative stress induced by amyloid peptide isoAsp7-A β (1-42). *Cell Death & Disease*, 6(11), e1977.
- Zarour, K., Llamas, M. G., Prieto, A., Ruas-Madiedo, P., Dueñas, M. T., de Palencia, P. F., Aznar, R., Kihal, M., Lopez, P. (2017). Rheology and bioactivity of high molecular weight dextrans synthesised by lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 174, 646-57.
- Zhan, L. B., Zhong, J. H., Lu, X. G. (2007). Protective effects of serum containing zibu piyin recipe on neuron in endoplasmic reticulum and its mechanism study [J], *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 5(4), 445-50.
- Zhang, H., Cao, Y., Chen, L., Wang, J., Tian, Q., Wang, N., Wang, X., Sun, P., Wang, L. (2015). A polysaccharide from *Polygonatum sibiricum* attenuates amyloid- β -induced neurotoxicity in PC12 cells. *Carbohydrate Polymers*, 117, 879-86.
- Zhang, J., Shi, R., Li, H., Xiang, Y., Xiao, L., Hu, M., Ma, F., Ma, C. W., Huang, Z. (2016). Antioxidant and neuroprotective effects of *Dictyophora indusiata* polysaccharide in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 192, 413-22.
- Zhang, J., Zhao, X., Jiang, Y., Zhao, W., Guo, T., Cao, Y., Teng, J., Hao, X., Zhao, J., Yang, Z. (2017). Antioxidant status and gut microbiota change in an aging mouse model as influenced by exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from tibetan kefir. *Journal of Dairy Science*, 100(8), 6025-41.
- Zhang, L., Liu, C., Li, D., Zhao, Y., Zhang, X., Zeng, X., Yang, Z., Li, S. (2013). Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54, 270-5.
- Zhang, Y., Li, H., Yang, X., Jin, G., Zhang, Y. (2018). Cognitive-enhancing effect of polysaccharides from *Flammulina velutipes* on Alzheimer's disease by compatibilizing with ginsenosides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 788-95.

- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Ganzle, M. G., Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-58.
- Zeng, K. W., Wang, X. M., Ko, H., Kwon, H. C., Cha, J. W., Yang, H. O. (2011). Hyperoside protects primary rat cortical neurons from neurotoxicity induced by amyloid β -protein via the PI3K/Akt/Bad/BclXL-regulated mitochondrial apoptotic pathway. *European Journal of Pharmacology*, 672(1-3), 45-55.
- Zhao, L., Jiang, Y., Ni, Y., Zhang, T., Duan, C., Huang, C., Zhao, Y., Gao, L., Li, S. (2017). Protective effects of *Lactobacillus plantarum* C88 on chronic ethanol-induced liver injury in mice. *Journal of Functional Foods*, 35, 97-104.
- Zhao, T. T., Zhang, Q. B., Zhang, Z. S., Wang, J., Li, Z. E., Xu, Z. H. (2010). Effect of fucoidan on cognitive ability and cerebral cholinergic system in mice with Alzheimer's disease [J]. *Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology*, 2, 160-3.
- Zhong, J., Qiu, X., Yu, Q., Chen, H., Yan, C. (2020). A novel polysaccharide from *Acorus tatarinowii* protects against LPS-induced neuroinflammation and neurotoxicity by inhibiting TLR4-mediated MyD88/NF- κ B and PI3K/Akt signaling pathways. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 464-75.
- Zhong, L., Wang, Z. F. (2015). Effects of yarn polysaccharide on antioxidant capacity of mice with Alzheimer disease. *Chinese Journal of Applied Physiology*, 31(1), 42-3.
- Zhou, K., Zeng, Y., Yang, M., Chen, S., He, L., Ao, X., Zou, L., Liu, S. (2016). Production, purification and structural study of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* BC-25. *Carbohydrate Polymers*, 144, 205-14.
- Zhou, X., Hong, T., Yu, Q., Nie, S., Gong, D., Xiong, T., Xie, M. (2017). Exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* NCU116 induce c-Jun dependent Fas/FasL-mediated apoptosis via TLR2 in mouse intestinal epithelial cancer cells. *Scientific Reports*, 7(1), 1-13.
- Zhou, Y., Cui, Y., Qu, X. (2019). Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review. *Carbohydrate Polymers*, 207, 317-32.
- Zhou, Y., Duan, Y., Huang, S., Zhou, X., Zhou, L., Hu, T., Yang, Y., Lu, J., Ding, K., Guo, D. Cao, X., Pei, G. (2020). Polysaccharides from *Lycium barbarum* ameliorate amyloid pathology and cognitive functions in APP/PS1 transgenic mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, 1004-12.
- Zhou, Y., Sun, Y., Ma, Q. H., Liu, Y. (2018). Alzheimer's disease: Amyloid-based pathogenesis and potential therapies. *Cell Stress*, 2(7), 150-61.

- Zhu, L., Zhang, L., Zhan, L., Lu, X., Peng, J., Liang, L., Liu, Y., Zheng, L., Zhang, F., Liu, Q. (2014). The effects of zibu piyin recipe components on scopolamine-induced learning and memory impairment in the mouse. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 576-82.
- Zhu, W., Xue, X., Zhang, Z. (2017). Structural, physicochemical, antioxidant and antitumor property of an acidic polysaccharide from *Polygonum multiflorum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 494-500.
- Zhu, Y., Wang, X., Pan, W., Shen, X., He, Y., Yin, H., Zhou, K., Zou, L., Chen, S., Liu, S. (2019). Exopolysaccharides produced by yogurt-texture improving *Lactobacillus plantarum* RS20D and the immunoregulatory activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 342-9.
- Zong, A., Cao, H., Wang, F. (2012). Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate Polymers*, 90(4), 1395-410.



GAZİ GELECEKTİR...