



Structure and Functions of Acetylcholinesterase and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Plants

Fatma Gonca KOÇANCI¹, Belma ASLIM¹

Gazi University, Faculty of Science, Department of Biology, 06500 Ankara, Turkey

Abstract

Alzheimer's disease (AD), defined as a neurodegenerative condition, are characterized by progressive loss of memory. Cholinergic loss is one of the most important marker of the accurate diagnosis of AD. Acetylcholinesterase inhibitors (AChEi) is the most important group of drugs for AD. But none of the indentified AChEi's were able to cure the disease. For this reason, studies on the particularly determination of agents that have preventive and therapeutic potential on the AD become an important research field. Researchers have also begun to work on the the discovery of curative and preventive effect of the substance for AD. In this review will be informed about the structure, functions of AChE and AChEi from plants.

Keywords: Acetylcholinesterase (AChE), Alzheimer's disease, Acetylcholinesterase inhibitors (AChEi's) from plants

Asetilkolinesterazın Yapısı ve Fonksiyonları ve Bitkilerin Asetilkolinesteraz İnhibitör Etkileri

Özet

Alzheimer Hastalığı (AH), hafızanın sürekli bir şekilde azalması ile karakterize edilen nörodejeneratif bir durumdur. AH'nin kesin tanısında en önemli belirteçlerden biri kolinerjik kayıptır. AH'ye yönelik en önemli ilaç grubu asetilkolinesteraz inhibitörleridir (AChEi). Fakat mevcut AChEi ilaçların hiçbirinde tam başarı elde edilememiştir. Bu sebeple, AH üzerinde etkili olacak koruyucu ve tedavi edici potansiyeli olan ajanların tespitine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. Bu derlemede AChE'nin yapısı, fonksiyonları ve AChEi bitkiler hakkında bilgi verilecektir.

Anahtar sözcükler: Asetilkolinesteraz (AChE), Alzheimer hastalığı, Biktisel asetilkolinesteraz inhibitörleri (AChEi'leri)

1. GİRİŞ

Merkezi kolinerjik sistem, hücre gövdelerinin ve dendritlerin karmaşık bir bileşenidir. Serebral kan akımı, kortikal aktivite, uyku-uyanıklık döngüsü gibi kortikal plastisite ve bilişsel performansın ve öğrenme-bellek süreçlerinin modülasyonu gibi pek çok farklı işlevi kontrol etmede önemli bir role sahiptir. Bazal ön beyinde kolinerjik nöronların varlığı ilk olarak 1967 yılında Shute ve Lewis [1] tarafından bildirilmiş ve daha sonra diğer araştırmacılar tarafından [2] teyit edilmiştir. Anatomik açıdan bakıldığında, merkezi kolinerjik sistem, memeli merkezi sinir sisteminde geniş bir nöronal ağı temsil eder. Erişkinlerdeki kolinerjik sistem, santral ve periferik sinir sistemi hücreleri arasında uyarıların taşınmasında görevlidir [3]. Kolinasetiltransferaz (ChAT), asetilkolin (ACh), kolinesterazlar (Asetilkolinesteraz (AChE) ve butirikolinesteraz (BChE)), kolinerjik reseptörler (muskarinik reseptörler (MR) ve nikotinik reseptörler (NR)) kolinerjik sistemin bileşenleridir. AChE, nörotransmitter asetilkolini (ACh) kolinerjik sinapslarda ve nöromusküler sinapslarda hızla koline ve asetata hidrolize eden ve böylece kolinerjik sinir iletimde önemli bir rol oynayan, sinir sisteminin en etkili enzimlerinden biridir [4].

AH'li beyinlerde korteks ve hipokampüste, AChE'nin etkinliğinin arttığı, buna bağlı olarak ACh miktarı ve aktivasyonunun düştüğü tespit edilmiştir. Bu gün AH'nin ilaçla tedavisinde en spesifik yaklaşım asetilkolin esteraz inhibitörleridir (AChEi'ler). Bunların çoğunu bitkisel kökenliler oluşturur. Fakat şu ana kadar mevcut AChE inhibitörü ilaçların klinik çalışmalarda ve pratikte yararları minimaldir ve hiçbirinde tam başarı elde edilememiştir. Bu yüzden, AH'nin tedavisine yönelik klinik, epidemiyolojik ve deneysel çalışmalarda alternatif ilaçların ve tedavi yöntemlerinin ortaya konulmasının önemi vurgulanmaktadır. Son yıllarda AH tedavisi ile ilgili çalışmalar, daha etkin ve yan etkisi daha az olan, ayrıca tedavi edici etkisinin yanında koruyucu özelliğe de sahip olabilecek yeni AChEi'lerinin keşfi ve geliştirilmesini hedef alan stratejilere göre planlanmaktadır. Etki mekanizması bilinmeksizin ortaya konulacak yeni AChEi'lerinin, modern ilaç araştırmalarını ve tedavi yaklaşımlarını yetersiz kılacağı düşünülerek, bu derlemede AChE yapısı, fonksiyonları, AChEi'lerinin AH'deki etkisi ve bu güne kadar tespit edilmiş bitkisel AChEi'ler ortaya konulmaya çalışılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Asetilkolin (ACh)

En çok bilinen nörotransmitter olan ACh, mitokondrilerde hücre solunumun bir ürünü olan asetil koenzim A'dan ve lipit metabolizmasında önemli bir rol oynayan kolinden türetilmektedir [5]. ACh sentezi için, ribozomlarda oluşturulan, nöron gövdelerinde lokalize olan ve akson terminaline taşınan, özel bir enzim olan ChAT'ye ihtiyaç vardır. Transmitter ACh, sırayla, akson terminalin sitoplazmasında ChAT tarafından sentezlenir ve veziküler asetilkolin taşıyıcı (VAChT) tarafından sinaptik vesiküller içinde konsantre edilir [6, 7]. ACh, bir eylem potansiyeli sonucunda sinaptik boşluğa salındıktan sonra hem pre hem de postsinaptik membran üzerinde yer alabilen ACh reseptörlerine (AChR) bağlanır. Postsinaptik nörona bağlanan ACh molekülleri, sinir uyarısının diğer nörona iletilmesinin ardından reseptörden ayrılır. Reseptöre bağlanamayan ya da reseptörlerden ayrılan ACh molekülleri, özel bir enzim olan AChE tarafından hidroliz edilerek ortadan kaldırılır ve açığa çıkan kolin yeniden kullanılmak üzere presinaptik nörona gönderilir [8, 9, 10].

2.2. AChE'nin yeri ve yapısı

2.3. AChE, bir saniyede 250,000 asetilkolin molekülünü hidrolize edebilen, 537 amino asit uzunluğunda bir peptid monomerdur. Asetilkolinesteraz enziminin yapısı, ilk olarak *Torpedo californica*'da 1991'de Sussman [11] tarafından X - ışını analizi ile belirlenmiştir. Katalitik mekanizması ve inhibitörlerinin etki tarzının anlaşılması da üç boyutlu yapısının belirlenmesi ile mümkün olmuştur. Bu enzim 1988'de [12] kristalize edilmiştir. AChE'nin moleküler yapısı 14 alfa sarmal ile çevrili 12 beta levhadan oluşmaktadır [12].

İnsan AChE geni, 7. kromozomun uzun kolunun 22. bölgesinde (7q22) bulunmakta ve 100,889,993 ve 100,896,685 bazları arasında yaklaşık 6 kilobaz alanı kaplamaktadır. AChE'nin tüm formları tek bir gen tarafından kodlanmakta, alternatif mRNA işlemesi ve post-translasyonel modifikasyonlar vasıtasıyla yapısal farklılıklar ortaya çıkmaktadır [13].

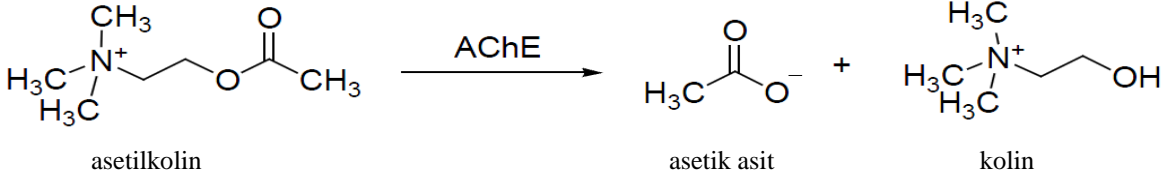
AChE aktif bölgesi, iki adet bağlanma alt ünitesinden oluşur. Bunlardan ilki, "Katalitik anyonik site" (CAS) olarak adlandırılır ve Ser200, His440 ve Glu327'den oluşan katalitik üçlüyü içerir. Bu üçlü ACh'deki ester bağlarının hidrolizinden sorumludur. CAS'ın anyonik alt ünitesi Trp84, Tyr130, Gly199, His441 ve His444 amino asitlerinden oluşur. Trp 84'ün indol yan zinciri ACh kuaterner amino grubu ile bir katyon- π etkileşimi yapar [14]. İkinci bir amino asit olan Phe330, ligandların tanınmasında görevlidir. İkinci bağlanma alt ünitesi olan "periferik anyonik site"nin (PAS) en büyük bileşeni Trp279'dir. Bu bölge Tyr70, ASP72, Tyr121, Trp279 ve Tyr334 amino asitlerini de içerir [15]. Gly118, Gly119, Ala201 amino asitlerin peptidik amino grupları ile oluşturulan oksianyon deliği esteratik alt ünite içinde diğer önemli fonksiyonel birimdir [16, 17].

2.4. AChE'nin fonksiyonları

Çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda AChE enziminin çeşitli morfolometrik süreçlerde, sinir sistemindeki hücre farklılaşması ve sinaptogenezde, hücre adezyonunda ve göçünde, apoptotik yollarda etkili olduğu gösterilmiştir.

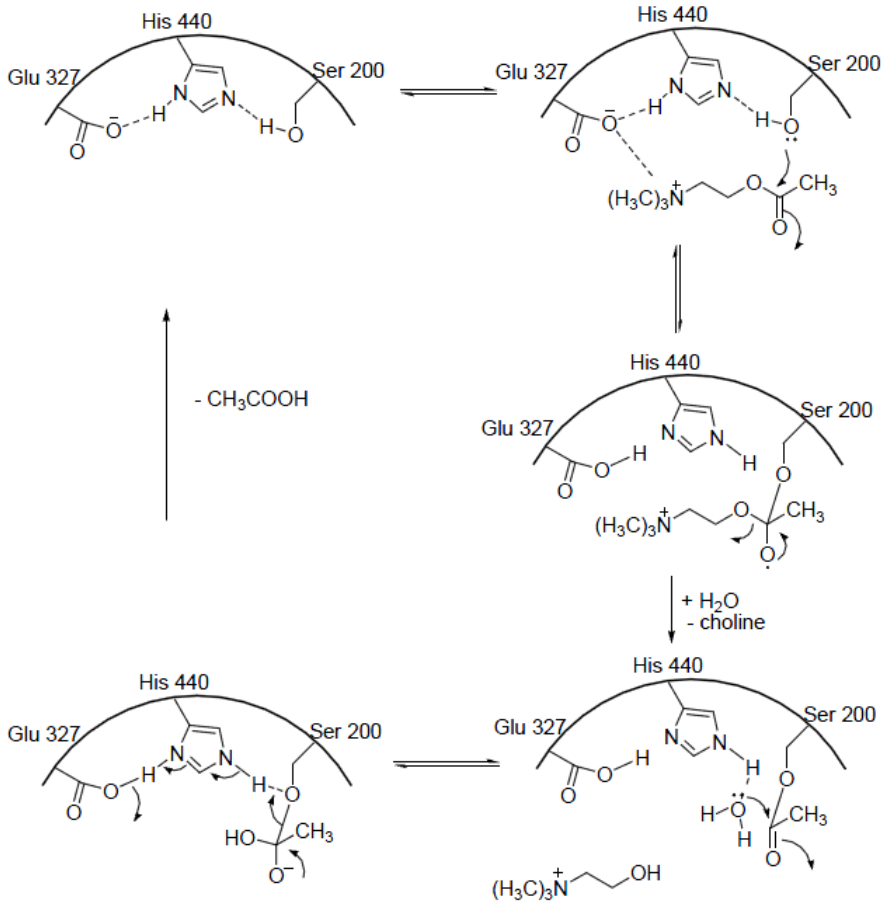
AChE'nin ACh hidrolizindeki görevi

AChE'nin birincil biyolojik rolü; ACh'nin sinaptik boşlukta serbest bırakıldığında oluşan sinirsel impulsu hızla sonlandırmaktır. AChE, ACh'nin asetat ve koline hidrolizini katalize ederek sinaptik boşluktan ACh'yi kaldırır (Şekil 1) [18].



Şekil 1. *ACh*'nin *AChE* tarafından hidrolizi [18].

ACh'nin *AChE* tarafından hidrolizi, asetilasyon ve deasetilasyon işlemlerinin dahil olduğu asit-baz katallı reaksiyon sonucunda oluşur. Esterik alt ünite içindeki serin hidroksilin (Ser 200) asetilasyonu, His440 içindeki temel imidazol parçası ve Glu327 içindeki asidik kısım ile katalize edilmektedir [19]. Ser 200 geçici bir kovalent tetrahedral geçiş durumu oluşturabilmek için *ACh*'nin karbonil karbonu üzerinde nükleofilik bir bağ yapar ve His 440 serin hidroksil gruptan proton alır. Ester bağının kopması ve protonun His 440'dan kolin oksijene transfer edilmesiyle tetrahedral geçiş durumu, trigonal asetil enzim formuna geri döner. Sonuçta meydana gelen asetil serin ara maddesi, ikinci bir tetrahedral geçiş durumu oluşturabilmek için bir su molekülü ile bağ yapar. Tetrahedral geçiş durumunun çöküşü, asetatı meydana getirir. Daha sonra aktif bölge eski durumuna geri döner. *AChE* aktif bölgesinin *ACh* ile etkileşiminin bir temsili, Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. ACh'nin AChE tarafından hidroliz mekanizması [19].

AChE'nin hücre adezyonundaki görevi

AChE'nin klasik hidroliz fonksiyonunun yanında bir adezyon proteini olma özelliği de vardır. Bu özelliğinin moleküler temeli yeni bir sınıf protein olan kolinesteraz benzeri adezyon moleküllerinin tespit edilmesinin ardından ortaya çıkmıştır [20, 21]. AChE'nin adezyon protein olarak işlev gördüğü Sharma ve arkadaşları [22] tarafından bir mikro-titre plaka yapışma tahlili kullanılarak kanıtlanmıştır. Elektrikli bir hücre alt-tabaka empedansı algılama yöntemi kullanılarak, nöroblastoma hücrelerinin tabana yapışma seviyelerinin AChE ifade düzeyleri ile doğrudan ilişkili olduğunu gösterilmiştir. Nöronal hücrelerde ve aynı zamanda astrositler ve fibroblastlarda, AChE'nin morfolojik düzenleyici etkisi vardır [23]. Benzer şekilde, AChE, osteoblastların adezyonunda da rol oynar [22, 24]. AChE'nin adezyon özelliği göstermesini sağlayan alanlarının bloke edilmesi, osteoblastik hücre adezyonunda konsantrasyona bağlı bir azalmaya neden olmuştur. Bu durum AChE'nin kemikte hücre-matris etkileşimlerini düzenleyen bir özellikte olabileceğini de düşündürmektedir [25].

AChE'nin nörit gelişimindeki görevi

Hücre adezyonu, nöritik büyüme için önemli bir mekanizmadır. AChE'nin bir diğer rolü de nöritik büyümeyi düzenlemektir [26]. AChE ekspresyonunun post mitotik nöronlarda çok erken gerçekleştiğini gösteren gözlemler [27], buna kanıt oluşturmaktadır. Hücre kültürlerinde, AChE sinir hücrelerinde akson büyümesini teşvik etmiştir. Bu etki AChE'nin enzim aktivitesinden bağımsızdır, çünkü aktif bölge inhibitörleri bu etkiyi azaltmakta başarısızdırlar [26]. Ayrıca, AChE'nin aşırı ekspresyonu, nöroblastoma hücrelerinde [28], feokromositom (PC12) hücrelerinde [29] ve birincil dorsal kök ganglion nöronlarında [30] nöritojenik aktivite göstermiştir. AChE'nin laminin-1 gibi proteinler ile yaptığı etkileşimler sonucu nörit gelişimine sebep olabileceği bildirilmiştir. Bu durum, AChE'nin herhangi bir transmembran ve hücre içi etki alanı içermeksizin, enzimatik olmayan bir şekilde nörit gelişimini düzenleyebileceğinin göstergesidir [31].

AChE'nin sinir ağı oluşumundaki görevi

Erken postnatal gelişim sırasında meydana gelen değişiklikler, kortikal ontogenezin çeşitli özelliklerini etkileyebilir [32, 33]. Hücre kültürü çalışmaları AChE'nin akson oluşumunu destekleyici bir rolü olduğunu göstermiştir [26, 28, 29, 30]. Retinal hücreler ile yapılan çalışmalarda, AChE'nin overekspresyonun, iç çekirdek katmanı gibi alanlarda büyük nöritik gelişmelere yol açtığı ve fotoreseptör sağkalımını etkilediği gösterilmiştir [34, 35, 36]. AChE'nin gelişimsel fonksiyonlarını değerlendirmek için AChE nakavt farelerle *in vivo* model oluşturulmuştur [37]. Bu fare modelleri kapsamlı davranışsal açıklar göstermiştir. Bu farelerde kolinerjik beyin yapılarının ifadesinde genel olarak değişim olmadığı [38], fakat retina oluşumunda ve uzun süreli sağ kalımında [39] köklü değişiklikler olduğu belirlenmiştir. İlk 20 postnatal gün boyunca, retinada sinaptik alt tabakanın oluşumunda ciddi bozuklukların varlığı, AChE'nin retinal sinir ağı oluşumunda bir rolü olduğunun kanıtıdır. Bu farelerde bütün fotoreseptörlerin 180 günlük bir dönemde apoptoza girdiği gözlenmiştir. Bu bulgular, AChE'nin fotoreseptörlerin sağkalımında ve uzun süre hücre canlılığının sağlanmasında etkili olduğunu kanıtlamaktadır.

AChE'nin apoptozdaki görevi

AChE, kolinerjik nöronlarda, nöromusküler kavşaklarda, eritrositleri [40] ve mega karyositleri [41, 42] içeren hematopoietik hücrelerde ifade edilir. Hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalar, AChE düzeylerinin apoptotik hücrelerde arttığını göstermiştir. Normalde AChE'yi ifade etmeyen insan akciğer fibroblast hücreleri (HLF) ve sıçan böbrek hücrelerinin (NRK), apoptoz sırasında yüksek seviyede AChE ifade ettikleri gösterilmiştir [43, 44]. Normalde, PC12 gibi düşük seviyelerde AChE ifadesi gösteren hücrelerde, apoptoz durumunda AChE seviyelerinde artış olduğu kaydedilmiştir [45, 46, 47].

AH'de de kolinesterazların etkisi görülmüştür [47]. Toiber ve arkadaşları [48], transfekte edilmiş primer beyin kültürlerinde, alternatif AChE'nin N terminali alternatif kırılması (N-AChE-S) hücre ölümünü, morfolojik bozuklukları ve kaspaz-3 aktivasyonunu tetiklediğini göstermiştir. Başka bir çalışmada, fokal serebral iskemik sıçanların beyinlerinde ve çevresel bağışıklık sistemlerinde AChE ve kaspaz-3'ün artan düzeyleri gösterilmiştir [49]. Xiao ve arkadaşları [50], apoptoz belirteçleri olarak Bax, c-fos ve p53 geni ile birlikte AChE'yi kullanılmışlardır.

AChE'nin tümör baskılanmasındaki görevi

Onkogenез veya tümör gelişiminde AChE'nin kesin rolü hala belirsizdir ancak, bir dizi çalışmada [51, 52, 53] çeşitli tümörlerde AChE geninin genetik lokusu olan 7. kromozomun uzun kolunda, genetik değişiklikler gösterilmiştir. Ayrıca, AChE inhibitörlerinin tarımsal kullanımının çeşitli tümörleri indüklediği bilinmektedir [54, 55, 56]. Stephenson ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [57], miyelodisplastik sendrom (MDS) ve akut miyeloid lösemi (AML) hastalıklarında AChE gen kopya sayısı değişiklikleri incelenmiştir. Bu veriler AChE proapoptotik rolünün, tümör baskılayıcı bir rol olma olasılığını göstermektedir.

Kolinesterazlar, hepatoselüler karsinomada (HCC) [58], skuamöz hücreli karsinomada ve retinoblastomada [59] baskılanmıştır. Zhao ve ark. [60], HCC hastalarının % 69,2'sinin kanser dokularında, AChE'nin önemli ölçüde baskılanmış olduğunu ve AChE'nin düşük seviyelerde ifade edilmesinin tümör yayılması, ameliyat sonrası tekrar nüks etme riski ve düşük sağ kalım oranı ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

Çalışmalar, AChE'nin hücre çoğalmasını, ilgili sinyal yollarını ve HCC hücrelerinin duyarlılıklarını düzenlemek suretiyle, tümör gelişimini baskılayan bir işlevinin olduğunu vurgulamaktadır [58].

AChE'nin sperm-yumurta etkileşimindeki görevi

Spermde bir dizi kolinerjik molekül ve reseptör, sperm hareket ve fertilizasyon yeteneklerini artırıcı düzenlemelerin olduğu bölgelerde lokalize olmuştur. Nelson [61, 62, 63], sperm motilitesinin, kamçıda lokalize olan bazı moleküller vasıtasıyla düzenlendiğini bildirmiştir. Sperm, akrozomun yüzeyinde, flagella içinde [64, 65] ve boyun bölgesinde AChE aktivitesi gösterir [61, 62, 63].

Yumurta oluşumu ile ilgili olarak, AChE aktivitesinin ovogonia içinde farklı olgunlaşma dönemlerinde lokalize olduğu belirlenmiştir [66]. AChE proteinin, erken olgunlaşma aşamalarında çekirdeğin etrafında ve oosit yüzeyine yakın bölgelerde lokalize olduğu; olgunlaşma döneminde ise perinükleer sisternada, golgi veziküllerinde, kortikal granüller de dahil olmak üzere yüzeye yakın vesiküllerde lokalize olduğu elektron mikroskobu görüntüleri ile kanıtlanmıştır [67].

AChE aktivitesinin polispermiyi önlemede de rolünün olduğu gösterilmiştir. Aktif spermlerin yumurtadaki zarf katmanını geçme sırasında ChAT içeren post akrozomal membrana maruz kaldıkları [68], bu durumun, yumurta zarındaki nikotinik reseptörlere bağlanan ACh'nin sentezine neden olduğu [69], hemen ardından ise kortikal granüller ve diğer zar vezikülleri içinde depolanmış olan AChE'ın, perivitellin aralığa bırakıldığı, böylece, ACh'nin hızlı bir şekilde hidrolizinin gerçekleştiği bildirilmiştir [67]. Bu durumun AChE'nin polispermi için hızlı bir bloklama gerçekleştirdiğinin kanıtı niteliğindedir.

AChE'nin hücre göçüne etkisi

İlk olarak, Drews [70], gastrulasyon sırasında denizkestanesi, amfibi ve civciv embriyolarında göç eden hücrelerde AChE aktivitesinin varlığını bildirmiştir. *Oryzias latipes* mezoderm hücre kültürlerinde de, aynı lokalizasyonlarda AChE aktivitesi rapor edilmiştir [71, 72]. Bu keşiflerin ardından AChE aktivitesinin varlığı, gastrulasyon aşamasında nöral hücrelerin göç edişinin [73] ve epiblast hücrelerin girişinin [74] iyi bir belirteci olarak kabul edilir. Eserin gibi AChE inhibitörlerine maruz kalmanın, deniz kestanelerinde iskelet çubuklarında uzamayı bozabildiği gösterilmiştir [75]. Hücre hareketinde AChE'nin fonksiyonel mekanizması, AChE'nin laminin ve fibronektin gibi hücre membran ortomatrix bileşenlerine yapışma bölgeleri içermesi ile açıklanabilir [76, 77]. AChE moleküllerinin, hem omurgalı hem de omurgasız embriyolarında morfojenetik hareketler sırasında göç yollarında lokalize olan fibronektin ile direkt olarak etkileşime girebildiği bildirilmiştir [78, 79].

2.3. Alzheimer hastalığı ve AChE enziminin Alzheimer hastalığı ile ilişkisi

AH, 1906 yılında Dr. Alois Alzheimer [80] tarafından karakterize edilen, merkezi sinir sisteminin (MSS) çeşitli kısımlarında nöron ve sinaps kayıpları nedeni ile ortaya çıkan; bilişsel işlevlerde azalma, öz bakım yetersizlikleri, çeşitli nöropsikiyatrik ve davranışsal bozukluklar ile karakterize progresif nörodejeneratif bir hastalıktır [81]. AH, halk arasında "bunama" diye adlandırılan demansın en sık nedenidir [82]. 2015 Dünya Alzheimer Raporunda [83] belirtildiği üzere, bu gün dünya çapında yaklaşık 46 milyon kişinin Alzheimer ya da demans ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu rakamın 2030 yılında 74.7 milyon; 2050 yılında ise 131 milyon olması beklenmektedir. Günümüzde, özellikle ortalama yaşam beklentisinin giderek arttığı gelişmiş ülkelerde, henüz etyolojisinin aydınlatılmamış ve kesin tedavisinin bulunamamış olması nedenleriyle de, en önde gelen morbidite ve mortalite nedenlerinden biri olmaktadır. Alzheimer ve demansın küresel maliyetinin tüm dünyanın gayri safi milli hasılanın

%1'ine denk geldiği tahmin edilmektedir. Bu rakam, depresyon, hipertansiyon, diyabet ve iskemik kalp hastalığına harcanan maliyetin üzerindedir [83].

AH konusunda rasyonel tedavi müdahalelerin gelişimi için temel sağlayacak açık bir şekilde tanımlanmış nörokimyasal anormalliklerin tespit edilmesi umudu ile 1960'ların sonu, 1970'lerin başı arasında biyokimyasal incelemeler başlatılmıştır [84]. 1970'lerin ortalarında, çeşitli araştırmacılar, ACh ve ChAT'nin sentezinden sorumlu enzimde önemli neokortikal eksiklikler olduğunu göstermişlerdir [84, 85, 86]. Daha sonra, indirgenmiş kolin alımının [87], ACh sentezinin [88] ve çekirdek bazalinde kolinerjik perikarya kaybının [89] keşfi presinaptik kolinerjik açığı doğrulamıştır. Sonuç olarak, AH'nin "kolinerjik hipotezi" öne sürülmüştür. Bu, iki merkezi kavrama dayanmaktadır: İlki, ön beyin kolinerjik sistemin, bilişsel süreçleri geniş bir yelpazede sürdürmekte olduğudur; ikincisi, beyindeki kolinerjik nöronların disfonksiyonunun AH'deki bilişsel kayba önemli ölçüde katkıda olduğudur [90]. Bilişsel işlevlerde (öğrenme ve bellek) kolinerjik sistemin etkisi hayvan ve insan araştırmalarıyla belgelenmiştir. Örneğin, skopolamin ve atropin gibi anti-muskaridik maddelerin, kemirgenlerde çeşitli davranış paradigmalarındaki bellek performansını bozabildiği gösterilmiştir. Benzer şekilde, nikotin veya nikotinik maddeler ile yapılan akut veya kronik tedavilerin, sıçanlarda bellek performansını arttırdığı [90, 91, 92]; nikotinik antagonistlerin ise bellek ve öğrenme bozuklukları yapabildiği bildirilmiştir [90]. Ölüm sonrası AH'lilerin beyinlerinde yapılan analizlere dayanarak AH'nin fizyopatolojik bulgularında öne çıkan belirteçler şu şekildedir:

- **Asetilkolinesteraz (AChE)'in aşırı ifade edilmesi:** AChE, hipokampusu serebral kortekse bağlayan bir nörotransmitter olan ACh'yi "asetat" ve "kolin"e hidrolize ederek ACh'nin post-sinaptik aktivitesini durduran bir enzimdir. AH'li beyinlerde AChE seviyesinin arttığı tespit edilmiştir.
- **Amiloid β ($A\beta$) proteinin, amiloid plaklar şeklinde birikimi:** Amiloid prekürsör protein (APP) molekülünün yanlış kesim işlemleri sonrasında $A\beta$ proteinin özellikle kortekste hücre dışı nöritik plakların 'amiloid plak' adı verilen noktalar şeklinde biriktiği tespit edilmiştir.
- **Hücrede fosforile tau (p-tau) proteinlerinin birikimi:** Mikrotübüllerin stabilizasyonu, hücre iskeletinin bütünlüğü ve aksonal transportta önemli rol alan tau proteininin, AH patogeneğinde hiperaktif kinazlar ve/veya hipoaktif fosfatazlar aracılığıyla hiperfosforilasyona uğradığı ve mikrotübüllere bağlanma yeteneğinin bozulduğu ve bunların hücre içi nörofibriler yumaklar (NFY) şeklinde biriktiği tespit edilmiştir.
- **İnflamasyon oluşumu:** AH'de NFY'ye, astroglial ve mikroglial aktivasyonun eşlik etmesi ve plakların çevresinde akut faz proteinleri, sitokinler, kompleman elemanları ve proteazlar gibi inflamasyon sürecine katılan birçok maddenin varlığının saptanmış olması, AH'de inflamatuvar süreçlerin etkisini kanıtlamaktadır.
- **Hücrenin apoptoza sürüklenmesi:** AH'li beyinlerin belirli beyin bölgelerinde sinaps ve nöron kaybı, apoptozis (programlanmış hücre ölümü) ile ilişkili bulunmuştur [93-100].

AH'de serebral kortekste kolinerjik belirteçlerin ciddi bir kayba uğradığı (% 95 kadar) bağımsız iki araştırma grubu [101, 102] tarafından rapor edilmiştir. Daha sonraki çalışmalar AH'lilerin kolinerjik nöron sayısında % 15 ve % 95 arasında değişen oranlarda düşüşler olduğunu göstermiştir [103-107]. Ayrıca, AH'deki kolinerjik açıkların şiddetinin AH'nin ilerlemesi ve süresi ile ilişkili olduğu saptanmıştır [84, 108]. Drachman ve Leavitt [109], genç ve sağlıklı bireylerde kolinerjik reseptörlerin blokajının, AH'li bireylerde görülene benzer bir hafıza eksikliğine sebep olduğunu göstermiştir.

AH'de nöronal ölüm mekanizması, tam olarak açıklanamamakla birlikte nöronal kaybın, apoptik yolağın aktivasyonu ile gerçekleştiği bildirilmiştir [110]. Beyinde nöron kaybının yoğunluğunun, demansın şiddeti ile direkt ilişkili olduğu da gösterilmiştir [48]. Tüm bu çalışmalara AH ile merkezi kolinerjik sistem ilişkisini açığa

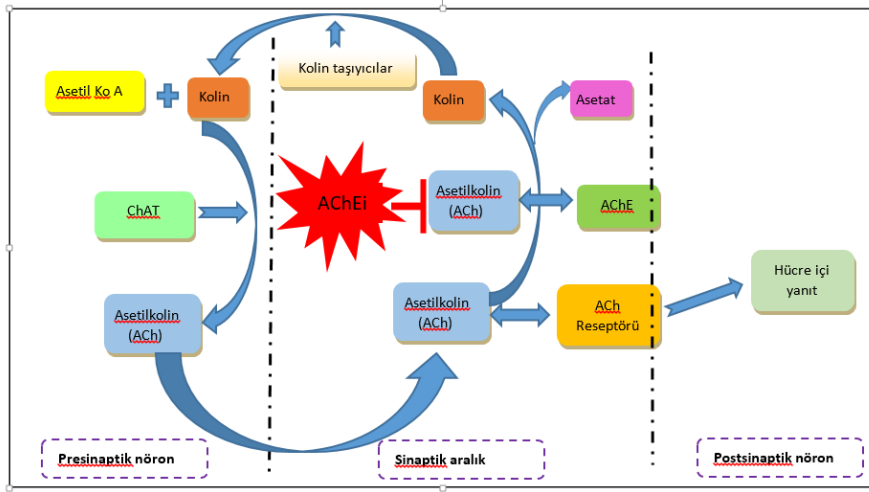
çıkarmıştır. Artan AChE aktivitesinin, hücrel çoğalma, göç, iltihap ve bağışıklık gibi olaylarda pro-inflamatuar sitokin ve interlökin üretimi de dahil olmak üzere, çeşitli protein kinazlar aracılığıyla adaptif değişiklikler, hücre çoğalması, ve hücre içi sinyal yollarını etkileyerek glukoz regülasyonu ve apoptoz başta olmak üzere hem periferde hem de merkezi sinir sisteminde etkili olan Glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3)'ü harekete geçirerek apoptozla ilişkili proteinlerin (kaspaz3 ve kaspaz 9) artışına sebep olduğu ve hücreleri apoptoza sürüklediği de gösterilmiştir [48]. AH beyinlerinde yapılan incelemelerde proapoptotik (Bax, Bac, Bad) ve antiapoptotik (Bcl-2 ve Bcl-x_L) proteinler gibi bazı apoptotik belirteçlerin seviyesindeki dengesizlik ve öncül kaspaz 8, 9 ve efektör kaspaz 3, 6'nın varlığı tespit edilmiştir. AH'deki apoptotik hücre ölümünün, diğer nöron tiplerinden çok daha fazla AChE ifade eden kolinerjik nöronların masif kaybı ile sonuçlandığı ve AH beyinlerinde kortikal küçülmeye sebep olduğu tespit edilmiştir [48]. AChE ile tau hiperfosforilasyonu arasındaki ilişki henüz tam olarak keşfedilememiş olmasına rağmen, p-tau'nun AChE ekspresyonunda bir artışı tetikleyebildiğinin gösterildiği çalışmalar mevcuttur [111]. P-tau'nun yüksek düzeyde ifade edildiği transgenik fare modellerinde AChE aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir. Sonuçlar, NFY'lerin etrafında da AChE ifade artışının olduğu belirlenmiştir [111]. Yine artan AChE'nin, glikojen sentetaz kinaz 3 beta (GSK3 β) proteininde artışa sebep olarak tau hiperfosforizasyon yollarında etkili olabildiğine dair kanıtlar vardır [112].

21. kromozomda kodlanan ve bir transmembran protein olan amiloid prekürsör proteininin (APP) metabolizma ürünlerinden olan A β 'nin da AChE ile çok yönlü ilişkili olduğu gösterilmiştir: APP oluşurken, β ve γ sekretazların aktiviteleri sonucunda, belirgin derecede bölgesel nörotoksik etkilere sebep olan katı ne nöritik β kıvrımlı plaklar (A β -42) oluşturmaktadır. Beyin dokularında A β -42'nin birikiminin AH belirteçlerinden olan oligomerler ve amiloid fibrillerin oluşumu ile sonuçlandığı ve AChE seviyelerini arttırdığı [113] aynı zamanda artan AChE'nin, 14. kromozomda kodlanan ve AH gelişiminde etkili olan *PSENI* geninin mutasyonu sonucu oluşan Presenilin 1 (PS1), protein düzeylerini modüle ederek APP işlenmesini ve dolaylı olarak A β üretimini etkilediği gösterilmiştir [111, 112].

AH'li beyinlerde nöronal faaliyetlerin eksikliği, anti-inflamatuar sürecin aktivitesinin azalmasına, buna bağlı olarak da inflammatuar aktivitenin artmasına sebep olur. AH'li kişilerin beyin, kan ve beyin omurilik sıvılarında (BOS) inflamuar etkiyi arttırdığı bilinen sitokin seviyelerinde değişiklikleri gösteren çalışmalar vardır. AH'lilerde BOS interlökin 1 beta (IL-1 β) düzeyleri, vasküler demans hastaları ile kontrol grubuna göre belirgin ölçüde yüksek bulunmuştur [114, 115]. Ayrıca Walker ve McGeer [116], AH'li beyin dokularında proinflammatuar sitokinler olan interlökin 1 alfa (IL-1 α), IL-1 β , interlökin 6 (IL-6), tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), seviyelerinde artış olduğunu kanıtlamışlardır [116, 117]. ACh'nin anti-inflamatuar etkiye sahip olmasından dolayı, AH'li beyinlerde meydana gelen AChE artışının inflammatuar süreçleri başlatarak AH'nin ilerlemesine katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir [118].

2.4. AChE inhibitörlerinin Alzheimer hastalığını önleyici etkisi

Beyindeki kolinerjik sistemin bozulması ile bellek arasındaki ilişkiye ve AChE'nin AH'nin diğer belirteçleriyle bağlantılı olduğunu gösteren bulgulara dayanılarak, AChEi'ler, antikolinesterazlar, AH tedavisinde en etkili ilaç grubu olarak kullanılmaktadır. Antikolinesteraz ilaçlar, AChE'yi geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz şekilde inhibe ederek, merkezi sinir sisteminin önemli bir nöromedyatörü olan asetilkolinin hidrolizini engeller ve reseptörler üzerinden artmış bir etkinin ortaya çıkmasına neden olurlar (Şekil 3) [119].



Şekil 3. AChE inhibitörlerinin fonksiyonları [119].

Oksidatif stres kaynağı olan hidrojen peroksitin (H_2O_2) hücre kültürlerine uygulanmasının ardından konsantrasyona bağlı olarak hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarında artış olduğu, nöral ölüm yolları üzerindeki etkili olan proteinlerden GSK3 β 'nin fosforile GSK3 β 'ye (p-GSK3 β (S9)); *p-Tau* (Ser 396) ve *p-Tau* (Thr 212) protein seviyelerinin ise fosforile olmayan tau (A12)'ya göre artırdığı belirlenmiştir [123,124]. GSK3 inhibitörlerinin ve AH'nin semptomatik tedavisinde kullanılan AChE inhibitörlerinin p-tau oluşumunu ve apoptozu baskıladığı bilinmektedir [48]. Huperzin B, hopeahainol A, salvianolik asit, biruloquinone ve asetil şikinin gibi AChE inhibitörü olduğu bilinen maddelerin, nöron model hücrelerini H_2O_2 'in sebep olduğu sitotoksik etkilere karşı koruduğu ve hücrelerdeki apoptoz oranını azattığı bildirilmiştir [125-129].

AChE inhibitörlerinin, aktive olmuş mikroglial hücreler ile astrositleri baskılayarak sitokin üretimini durdurdukları da bilinmektedir [130]. Yapılan çeşitli çalışmalarda AChEi'leri ile yapılan tedavinin periferik kan mononükleer hücreler üzerine etkileri incelenmiş ve tedavi sonrasında inflamasyonu baskılama yeteneğine sahip olan MCP-1 ve IL-4 üretiminin belirgin ölçüde arttığı, buna karşılık hastalığa bağlı olarak periferik kanda yükselen IL-1 β , IL-6, TNF- α ve *oncostatin-M* düzeylerinin ise belirgin ölçüde baskılandığı gösterilmiştir [131-133].

Şu ana kadar tespit edilmiş AChEi'leri, AH için tam anlamıyla bir koruma ve tedavi sağlayamamakta, ancak semptomları yavaşlatarak hastalığın ilerlemesini geciktirmektedir [134]. Bu sebeple, son yıllarda AH mekanizmasının araştırılmasına ve özellikle bu mekanizma üzerinde etkili olabilecek koruyucu ve tedavi edici potansiyeli olan yeni ve doğal kaynaklı AChEi ajanların tespitine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır.

2.5. Bitkiler ve AChE inhibitör etkileri

Bu gün Amerikan İlaç Dairesi (FDA) onaylı asetilkolin esteraz inhibitörleri Rivastigmin (Exelon®), Takrinin (Cognex®), Donepezil (Aricept®) ve Galantamin (Razadyne™)'dir. Bunlardan rivastigmin ve galantamin bitkisel kaynaklı iken; takrinin ve donepezil sentetik ilaçlardır.

Yıllardır, bitki kaynaklı kimyasallar birçok hastalık ve bozukluğun tedavisi için, geleneksel ilaç olarak kullanılmaktadır. Bitki kimyasalları primer ve sekonder metabolitler olarak ikiye ayrılır. Sekonder metabolitler, organizma herhangi bir stres durumuyla karşılaştığı zaman faaliyete geçen özelleşmiş metabolik yollar tarafından üretilirler [134]. Meyve, sebze ve tıbbi bitkilerin biyolojik olarak sentezlediği aktif bileşikler esas olarak indol, steroidal-piperidin-alkaloidler, furanokumarinler, xanthonlar, flavonoidler ve diterpen türevleridirler. Bu sekonder metabolitler AH gibi pek çok nörodejeneratif rahatsızlığın patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır [135-137].

Buna ek olarak yapılan çalışmalar, bitkisel kaynaklı sekonder metabolitlerin, serbest radikaller ve geçiş metalleri ile etkileşime girip antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak yaşla ilişkili nörolojik bozuklukların tedavisinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir [138-141].

AH'de AChE inhibitörlerinin klinik uygulamasına, 1980'lerin başında oral ve intravenöz olarak fizostigmin (ezerin) kullanılmasıyla başlanmıştır. Fizostigmin, *Physostigma venenosum* Balf. (Kalabar baklası) (Fabaceae) bitkisinden izole edilen bir alkaloiddir. Kısa süreli bir AChE inhibitörüdür ve hem normal hem de AH'li kişilerde bilişsel fonksiyonunu geliştirdiği *in vivo* olarak gösterilmiştir [135, 142-146]. Fizostigminin karbonil grubu, AChE'deki serin ile etkileşime girerek enzimin katalitik bölgesi ile kovalent bir bağ kurar. Bu sayede enzim inhibisyonu gerçekleşir. Marta Weinstock-Rosin tarafından keşfedilen fizostigminin yarı-sentetik türevi olan rivastigmin molekülü, 2000 yılında Exelon® adı ile FDA tarafından orta ve hafif demans tedavisi için onaylanmış ilk üründür [147].

Galantamin, AH tedavisi için büyük terapötik değere sahip önemli bir *Amaryllidaceae* alkaloididir. Bu bileşiğin %80-100 oranında AChE inhibitör etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Galantamin, asetilkolinin nikotinik reseptörler üzerindeki intrinsik etkisini artırır. AChEi etki göstererek AH'de kolinerjik etkinlinin artmasını ve kognitif fonksiyonların düzeltilmesini sağlamaktadır [142, 145]. Bu özelliği nedeniyle Galantamin'in (Razadyne™), AH tedavisinde kullanılabilir olduğu 2001 yılında FDA tarafından onaylanmıştır.

Özellikle bitkiler üzerinde yapılan araştırmalarla keşfedilen ve asetilkolinesteraz inhibitörü aktivite gösteren bileşikler içinde günümüzde en önemlisi huperzin A'dır. Huperzin A [(5R, 9R, 11E)-5-amino-11-etilidin-5,6,9,10-tetrahidro-7-metil-5,9-metanosikloocta-[b]-piridin-2(1H)-on], geleneksel Çin tıbbında "Qing Ceng Ta" adıyla bilinen ve yüzyıllardır şizofreni, unutkanlık ve hafıza kaybı tedavisinde kullanılan *Lycopodium serratum* Thunb. (syn. *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev) (Lycopodiaceae) bitkisinden izole edilen bir alkaloiddir. Huperzin A, dönüşümlü ve seçici olan bir asetilkolinesteraz enzim inhibitörüdür, ayrıca, beyinde glutamatın neden olduğu hasarı azaltabilen bir N-Metil-D-Aspartik Asit (NMDA) reseptör antagonistidir [148-150]. Bu özelliklerinden dolayı AH'de ilaç olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Curcuma longa bitkisinden elde edilen ve hint safranına sarı rengini veren kurkuminin de AH tedavisi için kullanılabileceğine dair kanıtlar vardır. Kurkuminin demans önleyici etkisine yönelik klinik çalışmalar henüz tamamlanmamış olmasına rağmen, hint safranının çok tüketildiği Hindistan'da yaşayan insanlarda demans gelişme olasılığının düşük olduğu tespit edilmiştir [151, 152]. Bir başka çalışmada daha fazla köri yiyen sağlıklı Asya erişkinlerinin, standart beslenenlere göre daha iyi bilişsel fonksiyonlar gösterdiği tespit edilmiştir [153].

AH tedavisinde önemli bir tedavi stratejisi olan AChEi'lerinin bitkisel kaynaklardan elde edilebileceğini gösteren bu kanıtlar, AChE inhibe edebilme yetenekleri ile karakterize daha etkili yeni bitkisel metabolitlerin ve keşfine yönelik çalışmaların artmasına sebep olmuştur. FDA onaylı ve AH tedavisi için klinik çalışmaları devam eden bitki türevi AChE inhibitör bileşiklerin özellikleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. FDA onaylı ve AH tedavisi için klinik çalışmaları devam eden bitki türevi AChE inhibitör bileşiklerin özellikleri [154]

İlaç	Ticari Adı	Bitkisel Kaynağı	Yapısı	FDA Onay Yılı	Klinik Çalışmaları	Etkileri
Rivastigmine	Exelon	<i>Physostigma venenosum</i> Balf. (Leguminosae)	Karbamat	2000	-	Korteks ve hipokampal bölgede AChE inhibisyonu

Galantamin	Razadyn e	<i>Lycoris radiata</i> (L'Her.) Herb (Amaryllidaceae)	Alkaloid	2001	-	AChE'nin geridönüşümlü inhibisyonu ve nikotini ACh reseptörlerinin allsterik potansiyeli
Huperzine A	-	<i>Huperzia serrata</i> (Thumb) Trevis (Lycopodiaceae)	Alkaloid	-	Faz 3	AChE'nin geridönüşümlü inhibisyonu
Kurkumin	Longvida	<i>Curcuma longa</i> L. (Zingiberaceae)	Pigment	-	Faz 2	Anti- ChE, anti-inflamatuar

3. SONUÇ

Bu derlemede AChE hiperaktivasyonun AH belirteçlerinden biri olduğu ve tau hiperfosforilasyonu ve A β aracılı nörodejenerasyon, sinaptik plastisite, nöral inflamasyon ve hücre ölümü gibi AH patofizyolojik süreçleri ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. AChE inhibitörlerinin, NFY ve senil plak oluşumunu engelleyici, anti-inflamatuar ve anti-apoptotik aktiviteleri gibi çok yönlü etkileri sebebiyle AH tedavisinde bu güne kadar en spesifik tedavi yaklaşımı olduğundan bahsedilmiştir. Fakat mevcut AChEi'lerin tam anlamıyla bir koruma ve tedavi sağlayamadığı, ancak semptomları yavaşlatarak hastalığın ilerlemesini geciktirebildikleri vurgulanmıştır. Geliştirilen ilaçların etki mekanizmalarının bilinmeksizin sadece belirteçler üzerinde pozitif sonuç vermesinin baz alınması, etkin ilaç araştırmalarını ve bu ilaca yönelik tedavi yöntemlerini yetersiz kılacaktır. Bu nedenle derlemede AChE yapısı ve fonksiyonlarına dair bilgiler de sunulmuştur. Son zamanda yapılan çalışmalar, AH tedavisinde ve/veya önlenmesinde tam başarı sağlayamayan ilaçların yerine, yeni, daha etkin ve yan etkisi daha az ajanların tespitine yönelik doğal kaynaklar üzerinde yoğunlaşmıştır. Doğal kaynaklı etken maddelerin keşfi, modern ilaç araştırmaları için önemli ve yararlı bir kaynak oluşturmaktadır. Bu çalışmalar, antikolinesteraz aktivitesi olan bitki özlerinin ve ara bileşiklerin özgün AChEi ilaçların sentezi için yararlanılabilir olduğunu kanıtlamaktadır. İlaç geliştirmenin, çok uzun ve pahalı bir süreç olduğu göz önüne alındığında, uzun yıllar boyunca geleneksel olarak kullanılan bitkisel kaynaklı ajanların değerlendirilmesi doğru bir yaklaşım olacaktır. Bu yaklaşım, insan kullanım öyküsü olan bitki türlerinden elde edilecek aktif maddelerin daha güvenli olacağına varsayımına dayanır. Ayrıca, başlangıç materyali olarak doğal kaynaklar seçildiğinde, asıl molekülün herhengi bir sınırlayıcı etkisinin bulunması durumunda, yarı-sentetik türevlerin geliştirilerek etkinin artırılması da sözkonusu olabilmektedir. Öte yandan, doğal kaynaklardan ilaç geliştirme, belirli dezavantajları da beraberinde getirmektedir: Doğal ürünlerle ilgili fikri mülkiyet haklarının korunması ve ticari aşamada yarar paylaşımı birçok ülkede son derece karmaşıktır. Bu süreçlerde oluşan endişeler keşif sürecini engellemektedir. Ayrıca, bitkisel kaynaklardan elde edilecek aktif molekülün elde edilmesi de sorun teşkil etmektedir. Aktif molekülün sentezi bir seçenek olabilir iken, her molekülün tam olarak sentezi her zaman mümkün olmamaktadır. Bu nedenle bazı durumlarda bitki kaynaklarına bağımlılık devam etmektedir. Bu da bitki kaynaklarının tükenmesini beraberinde getirmektedir [155]. Öte yandan, tespit edilecek etken maddelerin bir hastalığın tedavisinde ve/veya önlenmesinde ilaç olarak kullanılabilmesi için, prelinik ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Deneysel hayvanlarından elde edilen dokular ve organlarda, çeşitli hücre kültürlerinde ya da deneysel hayvan

modellerinde etkinliği ve güvenilirliği tespit edilmiş ilaç adayları, faz1, 2 ve 3 klinik araştırmalardan geçirilir. Faz 1; araştırma ürününün farmakokinetik özelliklerinin, toksisitesinin ve vücut fonksiyonlarına etkisinin tespit edilebilmesi için, araştırmanın niteliğine ve mahiyetine göre seçilmiş yeterli sayıda sağlıklı gönüllüye veya sağlıklı gönüllülerde çalışılmasına imkn olmayan durumlarda hasta gönüllülere uygulanmak suretiyle denendiği klinik araştırma safhasıdır. Faz 2; araştırma ürününün; terapötik doz sınırlarının, klinik etkililiğinin ve emniyetinin araştırılması amacıyla, araştırmanın niteliğine ve mahiyetine göre seçilmiş yeterli sayıda gönüllü hastaya uygulanmak suretiyle denendiği klinik araştırma safhasıdır. Faz 3 ise araştırma ürününün; araştırmanın niteliğine ve mahiyetine göre seçilmiş, yeterli sayıda gönüllü hastaya uygulanarak; etkinliği, emniyeti, yeni bir endikasyon araştırması, farklı dozları, yeni verilif yolları ve yöntemleri, yeni bir hasta popülasyonu ve yeni farmasötik Őekiller yönünden denendiği klinik araştırma safhasıdır [156]. Ancak bu araştırmalardan başarıyla geçen etken meddeler, ilaç olarak insanlık hizmetine sunulabilmektedir. Bu nedenle tespit edilecek etken maddelerin AH tadavisi ve/veya önlenmesinde ilaç olarak kullanılabilmesi için sadece AChEi etkisinin gösterilmesi yeterli olmamakta, ileri düzey moleküler çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Shute CCD, Lewis PR, Brain. 90 (1967) 497-520.
- [2] Semba K, Behav Brain Res 115 (2000) 117-141.
- [3] Sulak O, Malas MA, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi:9-(3) (2002) 14 - 17.
- [4] Tripathi A, Srivastava UC, Annals of Neurosciences 15, (2008) 4.
- [5] Bear MF, Connors BW, Paradiso MA, Lippincott William & Wilkins, Baltimore, 22-49, (2001) 791-795.
- [6] Erickson JD, Varoqui H, Schafer MK, Modi W, Diebler MF, Weihe E, Rand J, Eiden LE, Bonner TI and Usdin TB, J.Biol.Chem. 269, (1994) 21929-21932.
- [7] Weihe E, TaoCheng JH, Schafer MK, Erickson JD and Eiden LE, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 93, (1996) 3547-3552.
- [8] Serdaroğlu P, Deymeer F, Kas ve Nöromüsküler Kavşak Hastalıkları. Nöroloji Ders E-Kitabı, ge, A.E., Baykan, B. Editörler, <http://www.itfnoroloji.org/kas/kas.html> (Son erişim tarihi: 15.02.2011)
- [9] Thacker PD, Drug Discovery Today, 1: (2003) 8- 9.
- [10] Pillay R, Maharaj DS, Daniel S, Daya S, Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 27: (2003) 61-64.
- [11] Sussman JL, Hare M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I, Science 253: (1991) 872-9.
- [12] Sussman JL, Harel M, Frolow F, Varon L, Toker L, Futerman AH, and Silman I, C. J. Mol. Biol. 203 (1988) 821-823.
- [13] Taylor P, J. Biol. Chem, 266 (1991) 4025-4028.
- [14] Ma JC, Dougherty DA, Chem. ReV, 97 (5): (1997) 1303-1324.
- [15] Harel M, Schalkt I, Ehret-Sabatiert L, Bouett F, Goeldnert M, Hirtht C, Axelsen PH, Silmanii I, Sussman JL, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90 (19): (1993) 9031-9035.
- [16] Wiesner J, Kriz Z, Kuca K, Jun D, Koa J, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 22:4 (2007) 417-424.
- [17] Dan C, Ya-fei P, Chuan-jun L, Yun-feng X, Yu-ren J, 978 (2012) 953-51.

- [18] Schumacher M, Camp S, Maulet Y, Newton M, MacPhee-Quigley K, Taylor SS, Friedmann T, Taylor P, *Nature* 319 (1986) 407-9.
- [19] Guo L, Theses, Dissertations, Professional Papers (2008) 421.
- [20] Botti SA, Felder CE, Sussman JL, Silman I, *Protein Eng* 11, (1998) 415–420.
- [21] Scholl FG, Scheiffele P, *Trends Neurosci*, 26 (2003) 618–624.
- [22] Sharma KV, Koenigsberger C, Brimijoin S, Bigbee JW, *J Neurosci Res* 63, (2001) 165–175.
- [23] Anderson AA, Ushakov DS, Ferenczi MA, Saffel JL, *J Cell Physiol* (2007) doi:10.1002/jcp.21288.
- [24] Genever PG, Birch MA, Brown E, Skerry TM, *Bone* 24, (1999) 297–303.
- [25] Inkson CA, Brabbs AC, Grewal TS, Skerry TM, Genever PG, *Bone* 35, (2004) 819–827.
- [26] Layer PG, Weikert T, Alber R, *Cell Tissue Res* 273, (1993) 219–226.
- [27] Layer PG, Sporns O, *Proc Natl Acad Sci USA* 84, (1987) 284–288.
- [28] Koenigsberger C, Chiappa S, Brimijoin S, *J Neurochem* 69, (1997) 1389–1397.
- [29] Grifman M, Galyam N, Seidman S, Soreq H, *Proc Natl Acad Sci USA* 95, (1998) 13935–13940.
- [30] Bigbee JW, Sharma KV, Chan EL, Bogler O, *Brain Res* 861, (2000) 354–362.
- [31] Paroanu LE, Layer PG, *FEBS J* 275, (2008) 618–624.
- [32] Hohmann CF, Berger-Sweeney J, *J Neurobiol* 37, (1998) 595–606.
- [33] Hohman, CF, *Neurosci Biobehav Rev* 27, (2003) 351–363.
- [34] Robitzki A, Mack A, Hoppe U, Chatonnet A, Layer PG, *Eur J Neurosci* 9, (1997) 2394–2405.
- [35] Robitzki A, Mack A, Hoppe U, Chatonnet A, Layer PG, *J Neurochem* 71, (1998) 413–420.
- [36] Layer PG, Robitzki A, Rothermel A, Willbold E, *Trends Neurosci* 25, (2002) 131–134.
- [37] Xie W, Stribley JA, Chatonnet A, Wilder PJ, Rizzino A, McComb RD, Taylor P, Hinrichs SH, Lockridge O, *J Pharmacol Exp Ther* 293, (2000) 896–902.
- [38] Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen EG, Lockridge O, *Neuroscience* 110, (2002). 627–639.
- [39] Bytyqi AH, Lockridge O, Duysen E, Wang Y, Wolfrum U, Layer PG, *Eur J Neurosci* 20, (2004) 2953–2962.
- [40] Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H, *Eur.J.Biochem.* 264, (1999) 672–686.
- [41] Paulus JM, Maigne J, Keyhani E, *Blood* 58, (1981) 1100–1106.
- [42] Trandumjensen J, Behnke O, *Eur.J.CellBiol.* 24, (1981) 281–286.
- [43] Zhang XJ, Yang L, Zhao Q, Caen JP, He HY, Jin QH, Guo LH, Alemany M, Zhang LY, Shi YF, *Cell Death Differ.* 9, (2002) 790–800.
- [44] Jin QH, He HY, Shi YF, Lu H, Zhang XJ, *Acta Pharmacol. Sin.* 25, (2004) 1013–1021.
- [45] Yang L, He HY, Zhang XJ, *Neurosci.Res.* 42, (2002) 261–268.
- [46] Jing P, Jin Q, Wu J, Zhang XJ, *J. Neurochem.* 104, (2008) 409–419.
- [47] Steinritz D, Emmler J, Hintz M, Worek F, Kreppel H, Szinicz L, Kehe K, *Life Sci.* 80, (2007) 2199–2201.
- [48] Toiber D, Berson A, Greenberg D, Melamed-Book N, Diamant S, Soreq H, *PLoS ONE* 3, (2008) e3108. doi:10.1371/journal.pone.0003108N.
- [49] Hu T, Fu Q, Liu X, Zhang H, Dong M, *J. Neuroimmunol.* 211, (2009) 84–91.
- [50] Xiao R, Qiao JT, Zhao HF, Liang J, Yu HL, Liu J, Guo AM, Wang W, *Neurotoxicology* 27, (2006) 478–484.
- [51] Gearhart JD, Mintz B, *Proc. Natl. Acad.Sci.U.S.A.* 71, (1974) 1734–1738.
- [52] Takahashi S, Shan AL, Ritland SR, Delacey KA, Bostwick DG, Lieber MM, Thibodeau SN, Jenkins RB, *Cancer Res.* 55, (1995) 4114–4119.
- [53] Johnson E, Cotter FE, *Blood Rev.* 11, (1997) 46–55.
- [54] Dich J, Zahm SH, Hanberg A, Adami HO, *Cancer Causes Control* 8, (1997) 420–443.

- [55] Cabello G, Valenzuela M, Vilaxa A, Durán V, Rudolph I, Hrepic N, Calaf G, *Environ. Health Perspect.* 109, (2001) 471–479.
- [56] Abou-Donia MB, *Arch. Environ. Health* 58, (2003) 484–497.
- [57] Stephenson J, Czepulkowski B, Hirst W, Mufti GJ, *Leuk. Res.* 20, (1996) 235–241.
- [58] Montenegro, MF, Ruiz-Espejo F, Campoy FJ, Muñoz-Delgado E, de la Cadena MP, Rodríguez- Berrocal FJ, Vidal CJ, *Cell. Mol. Life Sci.* 63, (2006) 2175–2182.
- [59] Qavi H, Al-Rajhi AA, *In vivo* 23, (2009) 679–683.
- [60] Zhao YJ, Wang X, Wang T, Hu X, Hui X, Yan M, Gao Q, Chen T, Li J, Yao M, et al., *Hepatology* 53, (2011) 493–503.
- [61] Nelson L, *Fed. Proc.* 37, (1978) 2543–2547.
- [62] Nelson L, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 45, (1990) 876–882.
- [63] Nelson L, McGrady V, Fangboner ME, New York, NY: Academic Press, (1970) 465–478.
- [64] Chakraborty J, Nelson L, *Biol. Reprod.* 15, (1976) 579–585.
- [65] Cariello, L, Romano G, Nelson L, *Gamete Res.* 14, (1986) 323–332.
- [66] Cangialosi MV, Puccia E, Mansueto V, D’Agati P, *Caryologia* 59, (2006) 366–370.
- [67] Falugi C, *Eur. J. Histochem.* 37, (1993) 287–294.
- [68] Angelini C, Baccetti B, Piomboni P, Trombino S, Aluigi MG, Stringara S, Gallus L, Falugi C, *Eur. J. Histochem.* 49, (2004) 235–244.
- [69] Ivonnet PI, Chambers EL, *Zygote* 5, (1997) 277–287.
- [70] Drews U, *Prog. Histochem. Cytochem.* 7, (1975) 1–52.
- [71] Fluck RA, Shih TM, *Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol.* 70, (1981) 129–130.
- [72] Fluck RA, Wynshaw-Boris AJ, Schneider LM, *Comp. Biochem. Physiol. C.* 67C, (1980) 29–34.
- [73] Le Douarin NM, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 486, (1986) 66–86.
- [74] Weinberger C, Penner PL, Brick IY, *Am. Zool.* 24, (1984) 545–554.
- [75] Ohta K, Takahashi C, Tosuji H, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 153, (2009) 310–316.
- [76] Bigbee JW, Sharma KV, *Neurochem. Res.* 29, (2004) 2043–2050.
- [77] Anderson AA, Ushakov DS, Ferenczi MA, Mori R, Martin P, Saffell JL, *J. Cell. Physiol.* 215, (2008) 82–100.
- [78] Massoulié J, Perrier N, Noureddine H, Liang D, Bon S, *Chem. Biol. Interact.* 175, (2008) 30–44.
- [79] Liang D, Blouet JP, Borrega F, Bon S, Massoulié J, *Febs J.* 276, (2009) 94–108.
- [80] Arsava M, Selekler K (Ed), Güneş Kitabevi, (2003) pp 1-3.
- [81] Liew A, Greenberg S, Growdon J, *Annu. Rev. Med.* 57, (2006) 513–533.
- [82] Mayo Clinic. “Alzheimer's disease”. <http://mayoclinic.com/health/alzheimers-disease/DS00161>, Son erişim tarihi: 20 Aralık 2013.
- [83] World Alzheimer Report (2015) <http://www.alz.co.uk/research/world-report-2015>
- [84] Francis PT, Palmer A, Snape M, Wilcock GK, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66, (1999) 137-147.
- [85] Bowen DM, Smith CB, White P, Davison AN, *Brain* 99, (1976) 459-496.
- [86] Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE *Neuropathol Appl Neurobiol* 4, (1978) 273-277.
- [87] Rylett RJ, Ball MJ, Colhoun EH, *Brain Res* 289, (1983) 169-175.
- [88] Nilsson L, Nordberg A, Hardy J, Wester P, Winblad B, *J Neural Transm* 67, (1986) 275-285.
- [89] Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR, *Science* 215, (1982) 1237-1239.
- [90] Fodale V, Quattrone D, Trecroci C, Caminiti V, Santamaria LB, *Br J Anaesth* 97, (2006) 445-452.
- [91] Levin ED, Toll K, Chang G, *Med Chem Res* 6, (1996) 543-554.
- [92] Levin ED, Dama MJ, Glassco W, May EL, Martin BR, *Drug Dev Res* 46, (1999) 107-111.

- [93] Musial A, Bajda M, Malawska B, *Curr Med Chem* 14, (2007) 2654-2679.
- [94] Kar S, Slowikowski SP, Westaway D, Mount HT, *J Psychiatry Neurosci* 29, (2004) 427-441.
- [95] Savioz A, Leuba G, Vallet PG, Walzer C, *Brain Res Bull* 80, (2009) 309-314.
- [96] Rosato Siri, M, Cattaneo A, Cherubini E, *J Physiol* 576, (2006) 361-377.
- [97] Lee VM, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, (2001) 8931-8932.
- [98] Schubert P, Ogata T, Marchini C, Ferroni S, *Mech Ageing Dev* 123, (2001) 47-57.
- [99] Selkoe DJ, *Physiol Rev* 81, (2001) 741-766.
- [100] Erdoğan B, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2014) 31-37.
- [101] Davies P, Maloney AJ, *Lancet* 2 (1976) 1403.
- [102] Smith CB, Bowen DM, *J Neurochem* 27 (1976) 1521-1528.
- [103] Arendt T, Bigl V, Tennstedt A, Arendt A, *Neuroscience* 14 (1985) 1-14.
- [104] Geula C, Mesulam MM, Raven Press, New York. (1994) 263-291.
- [105] Iraizoz I, de Lacalle S, Gonzalo LM, *Neuroscience* 41 (1991) 33-40.
- [106] Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR, *Science* 215 (1982a) 1237-1239.
- [107] Whitehouse PJ, Struble RG, Clark AW, Price DL *Ann Neurol* 12 (1982b) 494.
- [108] Perry EK, Marshall EF, Blessed G, Tomlinson BE, Perry RH, *Br J Psychiatry* 142 (1983) 188-192.
- [109] Drachman DA, Leavitt J, *J Exp Psychol* 93 (1972) 302-308.
- [110] Carol M, Troy GS, *Journal of Neuroscience Research*, 69 (2002) 145-150.
- [111] Silveyra M X, García-Ayllón M S, de Barreda EG, Small DH, Martínez S, Avila J, Sáez-Valero J, *Neurobiol. Aging*, 33(3) (2011) 624.e23-34.
- [112] García-Sierra F, *J Alzheimers Dis*, 14 (2008) 401-9.
- [113] Sberna G, Sáez-Valero J, Beyreuther K, Masters CL, Small DH, *J. Neurochem*, 69, (1997) 1177-1184.
- [114] Cacabelos R, Barquero M, Garcia P, Alvaez XA, Varela de Seijas E, *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 13 (1991) 455-458.
- [115] Blum-Degen D, Muller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P, *Neurosci Lett*, 29(202): (1995) 17-20.
- [116] Walker D, McGeer E, McGeer P, *Clinical Neuroimmunology*. Oxford, UK: Blackwell Scientific (1997) 172-188.
- [117] McGeer P, *CNS Drugs*. 7: (1997) 214-287.
- [118] Hori K, Konishi K, Tomioka H, Tani M., Minegishi G, (2012) Review, S4:001. doi:10.4172/2161-0479.S4-001
- [119] Jeger RV, *European Heart Journal* 34 (2013) 2580-2581.
- [120] Watkins PB, *Pharmacogenetics*. 4: (1994) 171-184.
- [121] Wells BG, DiPiro JT, Schwinghammer TL, Hamilton CW, editors. *Pharmacotherapy handbook*. Stamford (CT): Appleton & Lange, (1998) 203-217.
- [122] Ercan S, *Demans Dergisi* 2: (2002) 5-9.
- [123] Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart G W, Gong CX, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 10804-10809.
- [124] Liu J, Zhao ML, Brosnan CF, Lee SC 157(8): (1996) 3569-3576.
- [125] Zhang HY, Tang XC, *Neurosci Lett* 292; (2000) 41-44.
- [126] Shi DH, Wu JH, Ge HM, Tan RX, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 28 (1): (2009) 30-36.

- [127] Jun G, Aichun J, Dazheng Z, Dekun L, Wei Z, Wanli G, Bing L, Li L, Yanjie L, Ying H, Meizhen S, Yunhua W, Zhengliang Y, Ruichao L, *Molecules*. 20, (2015) 683-692.
- [128] Luo H, Li C, Kim JC, Liu Y, Jung JS, Koh YJ, Hur JS, *J Microbiol Biotechnol*. 23(2): (2013) 161-166.
- [129] Wang Y, Pan W, Liang W, Law W, Tsz-Ming Ip D, Ng T, Miu-Yee Waye M, Chi-Cheong Wan D, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (2013)
- [130] Tabet N, *Ageing*, 35(4): (2006) 336-338.
- [131] Gambi F, Reale M, Iarlori C, Salone A, Toma L, Paladini C, De Luca G, Feliciani C, Salvatore M, Salerno RM, et al, *J Clin Psychopharmacol*, 24(3): (2004) 314-321.
- [132] Reale M, Iarlori C, Gambi F, Lucci I, Salvatore M, Gambi D, *Exp Gerontol* 40: (2005) 165–171.
- [133] Reale M, Iarlori C, Gambi F, Feliciani C, Lucci I, Gambi D, *Neuropharmacology*, 50(5) (2006) 606-613.
- [134] https://www.alzheimers.org.uk/site/scripts/documents_info.php?documentID=147
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Jimenez L, *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, (2004) 727–747.
- [135] Houghton PJ, Howes MJ, *Neurosignals*.14 (1–2): (2005) 6–22.
- [136] Wszelaki N, Kuciun A, Karolina Kiss A, *Acta Pharm*, 60: (2010) 119–128.
- [137] Rehman EU, *Ethno Leaflets*, 10: (2006) 254–264.
- [138] Syad AN, Devi KP, *Targets and Therapy* 4: (2014) 11–26.
- [139] Bhullar KS, Rupasinghe HPV, *Oxid Med Cell Longev*. (2013) 1–18.
- [140] Weinreb O, Mandel S, Amit T, Youdim MB, *J Nutr Biochem*.15(9): (2004) 506–516.
- [141] Albarracin SL, Stab B, Casas Z, *Nutr. Neurosci*.15(1) (2012) 1–9.
- [142] Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ. *Phytomedicine*, 14 (2007) 289-300.
- [143] Birks J, Grimley Evans J, Iakovidou V, Tsolaki M. *Rev.;*2: (2009) CD001191.
- [144] Pettenati C, Annicchiarico R, Caltagirone C, *Fundam Clin Pharmacol*.17(6): (2003) 659–672.
- [145] Mehta M, Adem A, Sabbagh M, *J Alzheimers Dis*” (2012) 728983.
- [146] Orhan G, Orhan I, Öztekin-Subutay N, Ak F, Sener B, *Recent Pat CNS Drug Discov*. 4(1): (2009) 43–51.
- [147] Approves the First Treatment for Dementia of Parkinson's Disease U.S. FDA News Release. (2016). <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm498442.htm>
- [148] Tang XC, Han Y, *CNS Drug Rev*. 5(3): (1999) 281–300.
- [149] Tang XC, He XC, Bai DL, *Drugs Future*. 24(6): (1999) 647–663.
- [150] Saxena A, Qian N, Kovach IM, *Protein Sci*. 3(10): (1994) 1770–1778.
- [151] Chandra V, Pandav R, Dodge HH, Johnnton M, Belle SH, DeKosky ST, Maay Gnaguli. *Neurology*. 57(6): (2001) 985-989.
- [152] Vas CJ, Pinto C, Panikker D, Noronha S, Deshpande N, Kulkarni L, et al, *Int Psychogeriatr*. 13(4): (2001) 439-450.
- [153] Ng TP, Chiam PC, Lee T, Chua HC, Lim L, Kua EH. *Am J Epidemiol*. 164(9): (2006) 898-906.
- [154] Syad AN, Devi KP, *Bot Targets Ther*. 4: (2014) 11–26.
- [155] Katiyar C, Gupta A, Kanjilal S, Katiyar S, *Ayu*. 33(1): (2012) 10-9.
- [156] Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik (2011) R.G. No: 28617.