



***HYPERICUM UNIGLANDULOSUM* HAUSSKN. EX BORNM.,
ACHILLEA PSEUDOALEPPICA HUB.-MOR. VE *NEPETA NUDA*
SUBSP. *NUDA* L. UÇUCU YAĞLARININ MERKEZİ SİNİR
SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN *IN VIVO* VE *IN SILICO*
MODELLERLE İNCELENMESİ**

Emel AKBABA

Doktora Tezi

**Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Eyüp BAĞCI**

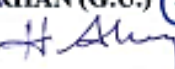
ŞUBAT-2018

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HYPERICUM UNIGLANDULOSUM HAUSSKN. EX BORNH., *ACHILLEA*
PSEUDOALEPPICA HUB.-MOR. VE *NEPETA NUDA* SUBSP. *NUDA* L. UÇUCU
YAĞLARININ MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN *IN VIVO*
VE *IN SILICO* MODELLERLE İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ
Emel AKBABA
122110202

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 25 Ocak 2018
Tezin Savunulduğu Tarih: 21 Şubat 2018

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Eyüp BAĞCI 
Diğer Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Abdullah ASLAN (F.Ü.) 
Doç. Dr. Ebru ÖNALAN (F.Ü.) 
Prof. Dr. İlkey ERDOĞAN ORHAN (G.Ü.) 
Prof. Dr. Hasan AKAN (H.Ü.) 

ŞUBAT-2018

ÖNSÖZ

Doktora çalışması ve diğer araştırmalarımızın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, akademik kişiliği ve çalışma prensipleri ile bana örnek olan değerli danışmanım sayın Prof. Dr. Eyüp BAĞCI'ya teşekkürlerimi sunuyorum.

Bölümünün kapılarını bize açıp, laboratuvarın tüm imkanlarından faydalanmamızı sağlayan sevgili hocam Doç. Dr. Ebru Etem Önalın'a,

Deneysel çalışmalarında yardımını esirgemeyen sevgili arkadaşım Arş. Gör. Ahmet Tektemur'a,

Akademik birikiminden faydalandığım ve laboratuvar teknikleri konusunda bana yardımcı olan, birçok ortak çalışmaya imza attığımız sayın Prof. Dr. Lucian Hritcu'ya,

Biyoinformatik analizler alanında katkılarını sunan ve sabırla sorularımı cevaplayan Lect. Dr. Calin L. Maniu'ya,

Arazi çalışmalarının bir kısmında yardımını aldığım Doç. Dr. Ömer Kılıç'a,

Uçucu yağ çalışmalarında yardımcı olan Arş. Gör. Dr. Gülten Doğan'a,

Araştırma projesine verdiği finansal destekten dolayı FÜBAP birimine teşekkür ederim.

Hayatım boyunca aldığım kararlarda hep yanımda olan ve bana her zaman güvenen sevgili aileme teşekkürlerin en büyüğünü sunuyorum, iyi ki varsınız...

Emel AKBABA

ELAZIĞ-2018

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
TABLolar LİSTESİ	X
SEMBOLLER LİSTESİ	XI
1. GİRİŞ	1
1.1. Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp.....	2
1.1.1. Uçucu Yağlar	4
1.1.2. Aromaterapi.....	6
1.2. Çalışma Kapsamındaki Bitkiler	7
1.2.1. <i>Hypericum uniglandulosum</i> Hausskn. ex Bornm. Türüne ait Genel Bilgiler	7
1.2.2. <i>Achillea pseudoaleppica</i> Hub.-Mor. Türüne ait Genel Bilgiler	9
1.2.3. <i>Nepeta nuda</i> L. subsp. <i>nuda</i> L. Taksonuna ait Genel Bilgiler	10
1.3. Alzheimer Hastalığı	12
1.3.1. Alzheimer Hastalığının Patolojisi	13
1.3.1.1. Amiloid-beta Plakları	13
1.3.1.2. Nörofibriler Yumaklar	14
1.3.2. Alzheimer Hastalığının Semptomları.....	14
1.3.2.1. Hafıza Kayıpları	14
1.3.2.2. Diğer Kognitif Bozukluklar	15
1.3.2.3. Davranışsal ve Psikolojik Semptomlar	16
1.3.3. Alzheimer Hastalığının Risk Faktörleri	17
1.3.4. Alzheimer Hastalığının Genetik Temelleri	19
1.3.5. Alzheimer Hastalığının Teşhisi.....	19
1.3.6. Alzheimer Hastalığında Terapötik Yaklaşımlar.....	20
1.3.6.1. Semptomatik Tedavi	21
1.3.6.2. Tedaviye Yönelik Diğer Çalışmalar.....	24
1.4. Deneysel Alzheimer Hastalığı Modelleri.....	25

1.4.1.	Kimyasallarla İndüklenen Modeller.....	25
1.4.1.1.	Skopolamin Hayvan Modeli	25
1.4.1.2.	Amiloid-beta Peptidi Modeli	26
1.4.1.3.	Ağır Metal Modeli.....	27
1.4.2.	Spontan Modeller	27
1.4.3.	Transgenik Hayvan Modeli.....	27
1.5.	Moleküler Doklama Metodu ile İlaç Geliştirme Çalışmaları.....	28
1.6.	Amaç	30
2.	MATERYAL VE METOT	32
2.1.	Bitkilerin Toplanması.....	32
2.1.1.	Uçucu Yağların Elde Edilmesi.....	33
2.1.2.	Kimyasal Analizler.....	34
2.2.	Deney Hayvanları ve Hayvan Modeli Oluşturulması	35
2.2.1.	Deney Grupları.....	35
2.2.2.	İlaç Uygulaması	36
2.2.3.	Davranış Testleri	37
2.2.3.1.	Y-labirenti Testi	37
2.2.3.2.	Radyal-Kol Labirenti Testi	38
2.2.3.3.	Yükseltilmiş Artı-labirenti Testi	40
2.2.3.4.	Zorunlu Yüzme Testi	41
2.2.4.	Biyokimyasal Analizler.....	41
2.2.4.1.	ACHe, SOD Aktivitesi ve GSH Miktarı Ölçümü	42
2.2.4.2.	MDA Seviyesi Ölçümü	42
2.2.5.	İstatistiksel Analizler.....	43
2.2.6.	Moleküler Doklama Metodu ile Biyoinformatik Analizler	43
3.	BULGULAR	45
3.1.	Uçucu Yağların Kimyasal Kompozisyonu.....	45
3.2.	Uçucu Yağların Hafıza Üzerindeki Etkilerinin Y-labirentinde Değerlendirilmeleri	54
3.3.	Uçucu Yağların Hafıza Üzerindeki Etkilerinin Radyal Kol Labirentinde Değerlendirilmeleri	56
3.4.	Uçucu Yağların Anksiyete Üzerindeki Etkileri	60
3.5.	Uçucu Yağların Depresyon Üzerindeki Etkileri	61

3.6.	Uçucu Yağların AChE Aktivitesi Üzerine Etkileri	62
3.7.	Uçucu Yağların SOD Aktivitesi Üzerine Etkileri	63
3.8.	Uçucu Yağların Toplam GSH Miktarı Üzerine Etkileri	64
3.9.	Uçucu Yağların MDA Seviyesi Üzerine Etkileri	65
3.10.	Biyoinformatik Analizler	66
3.10.1.	AChE Enzimi Moleküler Doklama Çalışmaları	66
3.10.1.1.	<i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>nuda</i> Uçucu Yağ Bileşenlerinin Moleküler Doklama Çalışmaları	71
3.10.1.2.	<i>Hypericum uniglandulosum</i> Uçucu Yağ Bileşenlerinin Moleküler Doklama Çalışmaları	74
3.10.1.3.	<i>Achillea pseudoaleppica</i> Uçucu Yağ Bileşenlerinin Moleküler Doklama Çalışmaları	77
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	89
5.	ÖNERİLER	102
	KAYNAKLAR	103
	ÖZGEÇMİŞ	119

ÖZET

Bu çalışmada *Nepeta nuda* subsp. *nuda* L. (Lamiaceae), *Hypericum uniglandulosum* Hausskn. ex Bornm. (Hypericaceae), ve *Achillea pseudoaleppica* Hub.-Mor. (Asteraceae) uçucu yağlarının merkezi sinir sistemindeki etkileri *in vivo* ve *in silico* modellerle incelenmiştir. Bu bağlamda, Türkiye’de doğal yayılış göstermekte olan bu bitkilerin uçucu yağlarının skopolamin ile oluşturulan Alzheimer tipi demans hayvan modelinde hafıza bozuklukları ve anksiyete ve depresyon-benzeri davranışlar üzerindeki etkileri ve etki mekanizmaları araştırılmıştır. Öncelikle, bu bitki türlerine ait örneklerin uçucu yağları ekstre edilmiş ve karakterizasyonları Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi sistemi kullanılarak yapılmıştır. Hayvanlar davranış testlerinden önce 21 gün boyunca uçucu yağ (%1 ve %3) solunum seanslarına maruz bırakılmıştır. Uçucu yağ uygulanan gruplarda yalnızca skopolamin uygulanan hayvanlara göre Y-labirenti ve radyal kol labirentinde spasyal hafıza becerilerinde olumlu etkiler görülmesinin yanı sıra yükseltilmiş artı labirenti ve zorunlu yüzme testlerinde anksiyete ve depresyon-benzeri davranışlarda anlamlı ölçüde gelişmeler kaydedilmiştir. Davranış testlerinden sonra, ötenazi edilen hayvanların hipokampus ve amigdala beyin homojenatlarında uçucu yağ uygulanmış gruplarda asetilkolinesteraz enzim aktivitesinde ve malondialdehit seviyesinde düşüş, toplam indirgenmiş glutasyon miktarı ve süperoksit dismutaz aktivitesinde ise artış gözlenmiştir. Bunlara ilaveten, uçucu yağ bileşenleri ile asetilkolinesteraz enzimi interaksiyonları moleküler modelleme yöntemi ile değerlendirilmiştir. Moleküler modelleme çalışmaları, uçucu yağ bileşenlerinden bazılarının asetilkolinesteraz ile güçlü interaksiyonları hakkında ipuçları sunmuştur. Bulgular çalışma kapsamındaki uçucu yağların beyin oksidatif stres hasarını azaltarak ve asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek skopolamin’in yol açtığı merkezi sinir sistemi hasarını azalttığını göstermektedir. Sonuç olarak, bulgularımız *N. nuda* subsp. *nuda*, *H. uniglandulosum* ve *A. pseudoaleppica* uçucu yağlarının hafıza bozukluğunu azaltarak ve anksiyolitik ve antidepresan etki göstererek Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu olabileceklerini öne sürmekte ve bu hastalıkları hedef alan yeni ajanlar bulunması konusunda faydalı görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Hypericum*, *Achillea*, *Nepeta*, skopolamin, uçucu yağ, hafıza, depresyon, anksiyete, biyoinformatik, Alzheimer hastalığı

SUMMARY

Investigation of the Effects of *Hypericum uniglandulosum* Hausskn ex Bornm., *Achillea pseudoaleppica* Hub.-Mor. and *Nepeta nuda* subsp. *nuda* L. Essential Oils on the Central Nervous System with *In Vivo* and *In Silico* Models

In this study, the effects of *Hypericum uniglandulosum* Hausskn. ex Bornm. (Hypericaceae), *Achillea pseudoaleppica* Hub.-Mor. (Asteraceae) and *Nepeta nuda* subsp. *nuda* L. (Lamiaceae), essential oils on the central nervous system were examined with *in vivo* and *in silico* models. In this regard, the effects and mechanism of action of essential oils from these plants, naturally distributed in Turkey, on memory impairment, anxiety and depression-like behavior were investigated in scopolamine-induced Alzheimer's type dementia animal model. Primarily, essential oils of these plant species were extracted and characterized by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) system. The animals were subjected to the essential oils (1% and 3%) for 21 days prior to the behavioral tests. In the essential oil-treated groups, positive effects on spatial memory performances in Y-maze task and radial arm maze tests as well as significant improvements in anxiety and depression-like behaviors in the elevated plus maze and forced swimming tests were observed compared to scopolamine-alone treated rats. Subsequent to the behavioral tests, decreases in the acetylcholinesterase enzyme activity and malondialdehyde level while increases in the total reduced glutathione amount and superoxide dismutase activity were observed in the hippocampus and amygdala brain homogenates of the euthanized animals in the essential oil-treated groups. In addition, interactions between the essential oil components and acetylcholinesterase enzyme were evaluated with molecular modelling method. Molecular modelling studies had provided clues about the strong interactions between some of the essential oil components and acetylcholinesterase. The results demonstrate that the essential oils of the plants decrease scopolamine-induced central nervous system damage by reducing oxidative stress damage and inhibiting the enzyme acetylcholinesterase. In conclusion, our findings suggest that *N. nuda* subsp. *nuda*, *H. uniglandulosum* and *A. pseudoaleppica* essential oils could be protective against neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease by reducing memory impairment and exhibiting anxiolytic and antidepressant activity and are useful to discover new agents targeting these diseases.

Keywords: *Hypericum*, *Nepeta*, *Achillea*, scopolamine, essential oil, memory, depression; anxiety, bioinformatics, Alzheimer's disease

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Bitki taksonlarının Türkiye’deki dağılımları	11
Şekil 1.2. AChE enziminin 3-boyutlu yapısı.....	23
Şekil 1.3. Alzheimer hastalığı için onaylanan ilaçlar	23
Şekil 2.1. <i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>nuda</i> ’nın genel görünüşü	32
Şekil 2.2. <i>Hypericum uniglandulosum</i> ’un genel görünüşü	33
Şekil 2.3. <i>Achillea pseudoaleppica</i> ’nın genel görünüşü	33
Şekil 2.4. Clevenger aparatı ile uçucu yağ eldesi	34
Şekil 2.5. Deney gruplarının bazıları	36
Şekil 2.6. Enjeksiyon işlemi	37
Şekil 2.7. Y-labirenti testi	38
Şekil 2.8. Radyal kol labirenti testi	39
Şekil 2.9. Yüksetilmiş artı labirenti testi	40
Şekil 2.10. Zorunlu yüzme testi	41
Şekil 3.1. <i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>nuda</i> uçucu yağının majör bileşenlerinin dağılımı	45
Şekil 3.2. <i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>nuda</i> uçucu yağının GC kromatogramı.....	46
Şekil 3.3. <i>Hypericum uniglandulosum</i> uçucu yağının majör bileşenlerinin dağılımı	48
Şekil 3.4. <i>Hypericum uniglandulosum</i> uçucu yağının GC kromatogramı	49
Şekil 3.5. <i>Achillea pseudoaleppica</i> uçucu yağının majör bileşenlerinin dağılımı	51
Şekil 3.6. <i>Achillea pseudoaleppica</i> uçucu yağının GC kromatogramı.....	52
Şekil 3.7. Uçucu yağların Y-labirentinde spontan değişim yüzdesi üzerindeki etkileri	55
Şekil 3.8. <i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>nuda</i> uçucu yağının radyal-kol labirentinde hafıza üzerindeki etkisi	57
Şekil 3.9. <i>Achillea pseudoaleppica</i> uçucu yağının radyal-kol labirentinde hafıza üzerindeki etkisi	58
Şekil 3.10. <i>Hypericum uniglandulosum</i> uçucu yağının radyal-kol labirentinde hafıza üzerindeki etkisi	59
Şekil 3.11. Uçucu yağların yükseltilmiş artı labirentinde anksiyete üzerindeki etkileri	61
Şekil 3.12. Uçucu yağların zorunlu yüzme testinde depresyon üzerindeki etkileri	62
Şekil 3.13. Uçucu yağların beyin dokularında AChE aktivitesi üzerine etkileri	63
Şekil 3.14. Uçucu yağların beyin dokularında SOD aktivitesi üzerine etkileri	64

Şekil 3.15. Uçucu yağların beyin dokularında toplam GSH miktarı üzerine etkileri	65
Şekil 3.16. Uçucu yağların beyin dokularında MDA seviyesi üzerine etkileri	66
Şekil 3.17. Moleküllerin AChE'a bağlanma pozisyonları.	82
Şekil 3.18. Moleküllerin 2-boyutlu yapıları	83



TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1. <i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>nuda</i> uçucu yağının GC-MS analizi, yüzde oranı ve PubChem numaraları	47
Tablo 3.2. <i>Hypericum uniglandulosum</i> uçucu yağının GC-MS analizi, yüzde oranı ve PubChem numaraları	50
Tablo 3.3. <i>Achillea pseudoaleppica</i> uçucu yağının GC-MS analizi, yüzde oranı ve PubChem numaraları	53
Tablo 3.4. AChE inhibitörleri ve PubChem numaraları	68
Tablo 3.5. Kristalize edilmiş AChE ligantları	69
Tablo 3.6. AChE inhibitörlerinin doklama verileri	70
Tablo 3.7. <i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>nuda</i> uçucu yağ bileşenlerinin doklama verileri	72
Tablo 3.8. <i>Hypericum uniglandulosum</i> uçucu yağ bileşenlerinin doklama verileri	75
Tablo 3.9. <i>Achillea pseudoaleppica</i> uçucu yağ bileşenlerinin doklama verileri	78
Tablo 3.10. Territrem B'nin AChE enzimi ile yaptığı bağlar	84
Tablo 3.11. Perhidrofarnesil aseton'un AChE enzimi ile yaptığı bağlar	85
Tablo 3.12. α -Pinen'in AChE enzimi ile yaptığı bağlar	86
Tablo 3.13. Kafur'un AChE enzimi ile yaptığı bağlar	86
Tablo 3.14. <i>cis</i> -Kalamenen'in AChE enzimi ile yaptığı bağlar	87
Tablo 3.15. <i>trans-cis</i> -Nepetalakton'un AChE enzimi ile yaptığı bağlar	88
Tablo 4.1. <i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>nuda</i> uçucu yağ bileşenlerinin karşılaştırması	91
Tablo 4.2. <i>Achillea pseudoaleppica</i> uçucu yağ bileşenlerinin karşılaştırması	91
Tablo 4.3. <i>Hypericum uniglandulosum</i> uçucu yağ bileşenlerinin karşılaştırması	92

SEMBOLLER LİSTESİ

ACh	: Asetilkolin
ACH	: <i>Achillea pseudoaleppica</i>
AChE	: Asetilkolinesteraz
APO E	: Apolipoprotein E
APP	: Amyloid precursor protein
Aβ	: Amyloid-beta
BPSD	: Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia
BüChE	: Bütirilkolinesteraz
GABA	: Gama-aminobütirik asit
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
GSH	: Glutasyon
HYP	: <i>Hypericum uniglandulosum</i>
i.p.	: Intraperitoneal
Ki	: İnhibisyon sabiti
LDL	: Low density lipoprotein
MCI	: Mild cognitive impairment
MDA	: Malondialdehit
MRI	: Magnetic resonance imaging
MSS	: Merkezi sinir sistemi
NMDA	: N-Metil-D-aspartat
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
NPT	: <i>Nepeta nuda</i> subsp. <i>nuda</i>
PSEN	: Presenilin
RI	: Retention Index
ROS	: Reactive oxygen species
SEM	: Standart error of mean
Sko	: Skolopamin
SOD	: Süperoksit dismutaz
TRM	: Tramadol

1. GİRİŞ

Demans hafızada ve konuşma, dil becerisi, düşünme, mantık kurma gibi diğer kognitif fonksiyonlarda azalma veya kayıp ile karakterize edilen bir sendromdur. Bu fonksiyonlardaki bir değişiklik günlük aktivitelerde zorlanmalara yol açar. 2015 yılı verilerine göre dünyada 46.8 milyondan fazla insanın demans hastası olduğu ve bu sayının her 20 yılda iki katına çıkarak 2050 yılında 131.5 milyona ulaşacağı düşünülmektedir. Hatta bu rakamlar hastalığın başındaki bireyleri kapsamadığı için ve birçok vakanın da teşhis edilemediği düşünüldüğünde durumun çok daha trajik olduğu bilinmelidir. Bu nedenlerden dolayı demans günümüzde dünyadaki en önemli sağlık problemi olarak görülmektedir. Alzheimer hastalığı ise demansın en yaygın türü olup vakaların %60-80'inden sorumludur. Alzheimer hastalığında beyindeki değişimlerin herhangi bir klinik belirti görülmeden yaklaşık 10-20 yıl önce başladığı düşünülmektedir. Hastalığın son aşamalarında hasta, ailesini ve yakınlarını hatırlayamaz ve yutma, yürüme ve uyuma gibi aktiviteleri bile yerine getirmekte zorlanarak tamamen hasta bakıcılara bağlı hale gelir. Hastalığın ortaya çıkış nedenleri tam olarak bilinmemekte olup multifaktöriyel bir hastalık olduğu düşünülmektedir. Birçok risk faktörü hastalığın gelişiminde yol oynamaktadır ve hastalığın teşhisinde bu risk faktörleri göz önünde tutulur. Bunlar içerisinde ilerleyen yaş en önemlisi olarak görülmektedir. Şuan itibariyle tam bir tedavisi bulunmayan Alzheimer hastalığına yalnızca semptomatik yaklaşımlar getirilmiştir (Barrera-Ocampo ve Lopera, 2016).

Geleneksel tıp, son yıllarda tekrar araştırmacıların ilgisini çekmiş olup tamamlayıcı veya integratif tıp adı altında değerlendirilmektedir. Bu alanda özellikle tıbbi ve aromatik bitkiler büyük paya sahiptir. Ülkemizde yaklaşık 12.000 bitki taksonunun bulunması ve bunların yaklaşık üçte birinin endemik olması (Tekeli ve Gokce, 2016) (Uludag vd., 2017) sebebiyle fitoterapi çalışmaları ülkemizde de hız kazanmıştır.

Demans tedavisinde, tamamlayıcı tedavi yöntemleri içerisinde en fazla ilgiyi aromaterapi ve uçucu yağların kullanımı çekmektedir. Daha az yan etkiye yol açtığı düşünülen aromaterapi araştırmacılar tarafından her yönüyle değerlendirilmekte ve birçok farklı bitkiye ait uçucu yağlar hem deney hayvanları üzerinde araştırılmakta hem de klinik çalışmaları yapılmaktadır (Forrester vd., 2014).

Alzheimer hastalığının önlenmesi veya etkili bir şekilde tedavi edilebilmesi için 2025 yılı politikacılar tarafından hedef olarak konmuştur (Cummings vd., 2016). Şu an itibariyle

onaylanmış 5 tane ilaçtan hiçbirisi hastalığı önlemek veya durdurmak konusunda başarılı olamamıştır; bu ilaçlar hastalığın yalnızca semptomlarını düşürürken hastaların yaşam kalitelerini az da olsa yükseltmektedirler. Bununla birlikte 2025 yılı hedefine ulaşabilmek için ilaç geliştirme çalışmaları hız kesmeden sürmektedir. İlaç geliştirme çalışmalarında zaman ve kaynakların ekonomik kullanımı için öncelikli olarak teorik yöntemlerden faydalanılmaktadır. Bu yöntemlerin başını moleküler doklama (yerleştirme /yanaşma/docking) adı verilen modelleme metodu çekmektedir. Moleküler doklama metodolojisi hedef proteinin bağlanma bölgesindeki küçük moleküllerin davranışını inceler. X-ışını kristalografisi veya nükleer manyetik rezonans (NMR) kullanılarak proteinlerin yapısının keşfedilmesiyle, ilaç tasarımı güçlü bir araç olan moleküler doklama'dan daha çok faydalanılmakta ve Alzheimer hastalığını önlemek ve/veya tedavi etmek için yeni ve etkili ilaçların tasarlanması için araştırmalar sürmektedir (Pagadala vd., 2017).

1.1. Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp

Geleneksel tıp veya halk tıbbı, coğrafi bir bölgeye ve belirli bir kültüre ait olan bir grup sağlık hizmeti sistemleri, uygulamaları ve ürünleridir. Tamamlayıcı veya integratif tıp ise dünyada kabul görmüş ve mevcut tedavi uygulamalarına tamamlayıcı olarak yapılan tedavi uygulamalarıdır.

Geleneksel Çin Tıbbı ve Ayurveda ile batı kültürlerinde doğmuş olan homeopati ve naturapati uygulamaları, “bütüncül (holistik) tıbbi sistemler” adı verilen vücudun genel sağlığını korumaya yönelik yaklaşımlara örnek teşkil etmektedirler. Aromaterapi, besin takviyeleri, akupunktur, oksijen terapisi, meditasyon, refleksoloji, kinezyoloji, detoksifikasyon gibi beslenmeye bağlı terapiler ve daha pek çok uygulama tamamlayıcı tıp uygulamaları arasına girmektedir. Avrupa, Amerika ve Uzakdoğu ülkelerinde yalnızca bu tür uygulamaların yapıldığı birçok klinik bulunmaktadır (Sutton, 2010). Bununla birlikte, tamamlayıcı veya integratif tıbbın, klasik tıptan tamamen ayrılmasının doğruluğu tartışmalıdır.

Doğa biyolojik ve kimyasal çeşitlilik açısından zengin bir kaynaktır. Çeşitli bitkisel ve hayvansal ürünün tıbbi olarak kullanılmaları açısından birçok potansiyeli bulunmaktadır. Hayvanlardan elde edilen doğal ürünler modern tıba çoktan entegre edilmişlerdir. Örneğin sülükler plastik cerrahide, yılan zehri ise alternatif opioit olarak kullanılmaktadırlar.

Bitkilere ve bitkisel ekstrelelere dayanan geleneksel tıp uygulamasına ise “fitoterapi” denilir. Bitkisel tıp da kökenlerini eski kültürlerden almıştır. Antik Mısır, Hindistan ve Çin fitoterapinin yoğun bir şekilde kullanıldığı yerler olarak bilinir. Tıbbi bitkiler genel vücut sağlığını korumak ve çeşitli hastalıkları tedavi etmek amacıyla binlerce yıl boyunca kullanılmış ve bu bilgi nesiller boyu aktararak günümüze kadar gelmiştir. Aslında birçok ilacın etken maddesinin kökeni bitkilerde bulunan doğal bileşenlere dayanmaktadır. Son yıllarda, doğal ürünlere olan ilgi tekrar artmış ve bitkilerin tıbbi amaçlı olarak kullanımları hız kazanmıştır. Bunun nedenlerinden biri doğal ürünlerin kendilerine has ve kompleks yapılarının kimyasal sentezle kolayca elde edilememesidir.

Geleneksel uygulamalarda birçok bitki nörodejeneratif hastalıkları da içeren kognitif hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılmıştır. Etnofarmakolojik çalışmalar Alzheimer hastalığı gibi kognitif hastalıkların tedavisiyle ilişkili bitkilerin ve potansiyel yeni ilaçların ortaya konmasında önemli bir basamak teşkil etmekte olup Alzheimer hastalığı tedavisi için kullanılabilecek ilaçlar açısından birçok seçenek sunmaktadırlar (Natarajan vd., 2013). Antioksidan, antiinflamatuvar ve antiamiloidojenik aktivitelere sahip olan tıbbi bitkiler Alzheimer hastalığı üzerinde etkili olabilecek önemli adaylardır. Alzheimer hastalığı ve hafıza üzerinde olumlu etkilere sahip olan birçok tıbbi bitki literatür kaynaklarında yerini almıştır. Farklı kültürler tarafından hafıza geriliği tedavisinde kullanıldığı bildirilen bu bitkilerden bazıları şunlardır: *Valeriana officinalis* L., *Salvia officinalis* L., *Myristica fragrans* Houtt., *Centella asiatica* (L.) Urb., *Evolvulus alsinoides* L., *Musa sapientum* L., *Bryophyllum pinnatum* L., *Abrus precatorius* L., *Ficus exasperate* Vahl., *Dioscorea mangelotiana* J. Miede, *Jatropha curcas* L., *Spondia smombin* L. (Akram ve Nawaz, 2017). Alzheimer hastalığı ve demans üzerinde etkili bulunan bitkiler arasında da *Ocimum basilicum* L. (Elufioye vd., 2012), *Juglans regia* L. (Haider vd., 2011), *Cuminum cyminum* L. (Koppula ve Choi, 2011), *Melissa officinalis* L. (Kennedy ve Scholey, 2006), *Rosmarinus officinalis* L. (Ozarowski vd., 2013), *Piper nigrum* L. (Hritcu vd., 2014), *Ginkgo biloba* L. (Tan vd., 2015), *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. (Roodenrys vd., 2002), *Embllica officinalis* Gaertn. (Thenmozhi vd., 2016) yer almaktadır. Antikolinesteraz aktivitesine sahip oldukları bildirilen bitkilerin bazıları ise şunlardır: *Brassica alba* (L.) Rabenh., *Brassica nigra* (L.) W. D. J. Koch., *Camellia sinensis* (L.) Kuntze., *Cinchona officinalis* L., *Citrus aurantifolia* L., *Citrus aurantium* L., *Ferula assafoetida* L., *Humulus lupulus* L., *Juglans regia* L., *Juniperus sabina* L., *Myristica fragrans* Houtt., *Punica granatum* L., *Rheum officinale* L., *Salix alba* L., *Zizyphus vulgaris* L. (Jazayeri vd., 2014).

Enflamasyonun nörodejeneratif hastalıkları ilerlettiği bilinmektedir. Dolayısıyla enflamasyonun önlenmesi ile Alzheimer hastalığının başlamasının geciktirilebileceği düşünülmektedir. Normal yaşlanma sürecinde beyinde uzun zincir omega-3 yağ asitlerinin azaldığı görülmektedir. Alzheimer hastalarında da beyin dokosahekzaenoik asit (DHA) düzeyinde düşüş görüldüğü bildirilmiştir. Thomas (2015) DHA takviyesinin inflamasyonu düşürdüğünü göstermiştir. Uzun zincir yağ asitlerinin diyetle veya besin takviyesi olarak alınmasının Alzheimer hastalığını önleme veya geciktirmede etkili olabileceği düşünülmektedir (Cooper ve Ma, 2017). Bitkisel sekonder metabolitlerden olan fenilpropanoitler de antiinflamatuvar özellikleri ile bilinen bileşiklerdendir (Korkina vd., 2011).

Nörotrofinler bilindiği gibi nöronların hayatta kalmalarını, gelişmelerini ve fonksiyon göstermelerini kontrol eden protein ailesidir (Skaper, 2012). Nörotrofinlerin tükenmesi Alzheimer hastalığının gelişmesini hızlandırmaktadır. Venkatesan (2015), terpenoitler, alkaloidler ve steroidal saponinlerin nörotrofin-bağımlı nöroprotektif etki gösterdiklerini bildirmiştir (Cooper ve Ma, 2017).

Nörodejeneratif hastalıklardan korunmak ve yeni ve etkili ilaçların üretilmesi için binlerce yıllık deneyimlerin sonucu olarak oluşan birikimin gözardı edilmemesi faydalı olacaktır. Bu bağlamda yeni anti-Alzheimer ajanlarının bulunması amacıyla özellikle yöresel olarak kullanılmakta olan bitkiler değerlendirilmelidir.

1.1.1. Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar bilim insanlarının dikkatini ilk çektiği yıllarda “bitkilerden distilasyonla elde edilen ve oda sıcaklığında buharlaşan kokulu maddeler” olarak tanımlanmıştır. Uçucu yağların antibakteriyel ve antiviral özellikleri nedeniyle uzun yıllar Avrupa’da kullanıldığı bildirilmiştir (Tisserand, 1988). Uçucu yağlar çok çeşitlidir ve birçok biyolojik etkileri bulunmaktadır. Bunlar arasında sakinleştirici, uyumayı kolaylaştırıcı, ağrı giderici ve antidepresan özellikleri başta gelmektedir. Uçucu yağlar denildiğinde rahatlatıcı ve stresi azaltıcı maddeler akla gelmektedir.

Uçucu yağlar düşük moleküler ağırlıklı (genelde 500 daltondan küçük) bileşiklerden oluşan karışımlardır. Bitkilerden, buhar distilasyonu, hidrodistilasyon veya çözücü ile elde edilirler. Uçucu yağlar genelde bitkilerin yağ kanalı, reçine kanalı, bez veya trikom gibi yapılarında depolanırlar. Monoterpenler, seskiterpenler ve bu ikisinin oksijenli türevleri ile

fenilpropanoitler uçucu yağların en büyük gruplarını oluşturur (Carvalho vd., 2015). Fenilpropanoitler, bitki fizyolojisinde birçok role sahip olan ve yapı ve fonksiyon olarak çok çeşitli bitki polifenollerinin sentezinde kullanılan bileşenlerdir (Korkina vd., 2011).

Çoğunlukla bir uçucu yağın biyolojik aktivitelerine major bileşenlerine bakılarak karar verilir. Bununla birlikte, bazen genel aktivite tek başına hiç bir bileşene atfedilemeyebilir; bu durumda bütün moleküllerin kombinasyonu ile aktivite görüldüğü düşünülür. Örneğin biberiye yağının böcek larvasına karşı inhibitor aktivitesi bildirilmiş olup, yağ bileşenlerinin tek başına etki göstermedikleri, birçok bileşenin birlikte sinerjistik etki meydana getirdikleri rapor edilmiştir (Isman vd., 2008). Uçucu yağların biyolojik etkileri arasında antimikrobal, antiviral, antimitojenik, antikanser, antioksidan, antiinflamatuvar, immunomodülatör, antiprotozoal aktiviteleri bulunmaktadır ve her geçen gün farklı biyolojik aktiviteleri üzerinde çalışmalar bildirilmektedir (Properzi vd., 2013). Uçucu yağ taşıyan yaklaşık 60 familya bulunmaktadır. Tıbbi ve endüstriyel değeri olan uçucu yağlarca zengin familyaların başlıcaları ise şunlardır: Alliaceae, Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Poaceae ve Rutaceae (Raut ve Karuppayil, 2014).

Uçucu yağlar, çeşitli bitki materyallerinde bulunan sekonder metabolitleri içeren geniş bir kimyasal bileşik dizisinden meydana gelir. Bunlar uçucu olup karakteristik kokular üretmektedirler. Farklı uçucu yağlar bu bileşenlerin farklı kombinasyonlarından oluşur ve bu da yağa kendisine has kokusunu ve terapötik karakteristiğini verir. Aynı türün farklı varyeteleri bile farklı kemotipe sahip olabilir (Bethesda, 2017). Uçucu yağlar bitkilerin dal, çiçek, kabuk, yaprak, tohum ve kök gibi çeşitli kısımlarında bulunabilir. Birçok uçucu yağ kozmetikte, gıda katkı maddesi olarak, sabun ve parfüm yapımında kullanılır (Pandey vd., 2016). En az 2000 bitki türünden şu ana kadar yaklaşık 3000 uçucu yağ elde edilmiş olup, bunlardan 300 kadarı ticari olarak öneme sahiptir (Raut ve Karuppayil, 2014).

Uçucu yağın içeriği ve bileşenlerin konsantrasyonları ise genetik varyasyon, bitki besini, gübreleme uygulamaları, bitkinin bulunduğu coğrafi lokasyon, iklim, mevsimsel değişimler, büyüme ve gelişme sürecinde stres, hasat sonrası kurutma, depolama ve işleme gibi birçok faktöre bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Ayrıca kullanılan bitki materyalinin tipi ve ekstre edilme yöntemi de uçucu yağın verimini ve kompozisyonunu etkiler ve bu da biyolojik özelliklerini belirler. Örneğin, farklı bitki materyallerinden elde edilen uçucu yağlar farklı biyolojik etkiler gösterebilir. Aynı şekilde farklı polaritelerdeki çözücüler de farklı grup bileşiklerini ekstre edebilir. Bu faktörler bir diğerini de etkileyebileceğinden sonuçları analiz etmek kolay olmayabilir (Raut ve Karuppayil, 2014).

1.1.2. Aromaterapi

Tamamlayıcı veya integratif tıp son on yılda daha yaygın hale gelmiş olup Alzheimer hastalığı da aralarında olmak üzere geniş skalada sağlık problemlerine karşı uygulanmaktadırlar. Tamamlayıcı tıp dünyanın birçok yerinde artık sağlık hizmetlerinin büyüyen bir parçası haline gelmiştir. Aromaterapi ise tamamlayıcı tedaviler içerisinde başta gelen uygulamalardan biridir. Nispeten invaziv-olmayan bir prosedür olarak görülen aromaterapi, hastalara diğer uygulamalara göre daha güvenilir gelmektedir. Aromaterapi fitoterapinin bir parçası olup sağlık problemlerini azaltmak ve kişinin genel sağlığını iyileştirmek amacıyla uygulanmaktadır. Uçucu yağların kullanımlarına dayanan aromaterapi “demansın davranışsal ve psikolojik semptomları (behavioral and psychological symptoms of dementia, BPSD)” için kullanılmakta olup uyumayı kolaylaştırmakta, motivasyonu artırmakta ve huzursuz davranışı azaltmaktadır. Aromaterapi için seçilen uçucu yağlar çok düşük toksik profile sahiptir ve klasik farmakolojik ilaçlara oranla güvenilir bir seçenek sunmaktadırlar. Bununla birlikte, uçucu yağlar konvansiyonel ilaçlar gibi standart formülasyonlara sahip olamayacakları yönünde eleştiri de almaktadırlar, fakat çok iyi kurulmuş kalite kontrol sistemleri ve kullanılan standardizasyon teknikleri uçucu yağların formülasyonlarını istenen başarıya yaklaştırmıştır.

Aromaterapi aktivitesi, koku molekülü ve buna duyarlı koku reseptörü ile başlamaktadır. Koku molekülü nazal boşluktan geçer ve burun epiteline tutunur. Uyarı burun epiteline konsantre olmuş koklama sinir sistemi ile limbik sistemdeki hipokampus veya amigdalaya iletilir. Koku tanınır ve uyarı hipotalamusa iletilir ve ardından otonomik sinir sistemi ve iç salgı sistemi ayarlanarak hipokampüste ve amigdalada nörotransmitter salınması gibi bir seri reaksiyonu başlatır (Jimbo vd., 2009).

Aromaterapide kullanılan uçucu yağlar çoğunlukla elektrik difüzörler ve buharlaştırıcılar ya da deriye masaj yapılarak uygulanır, böylece uçucu yağın aroması buharlaşır ve koku duyusunu uyarır. (Forrester vd., 2014). Koku uyarısının fiziksel ve psikiyatrik etkileri birçok çalışma ile doğrulanmıştır, fakat hayvanlarda aromaterapi çalışmaları sonucu gözlenen etkilerin insanlarda ne ölçüde gözlenebileceği bilinmemektedir (Nagai vd., 2017).

1.2. Çalışma Kapsamındaki Bitkiler

1.2.1. *Hypericum uniglandulosum* Hausskn. ex Bornm. Türüne ait Genel Bilgiler

Hypericum L. Hypericaceae familyasına ait en geniş cins olup yaklaşık 450 tür barındırmaktadır. Dünyanın birçok bölgesinde dağılmış olan cins üyelerine yalnızca kutuplarda, çöllerde ve tropikal bölgelerin düşük rakımlı alanlarında rastlanmamaktadır (Tekin, 2017). Türkiye Florası'nda 96 *Hypericum* taksonu yer almakta olup bunlardan 46'sı endemiktir (Bertoli vd., 2017).

Hypericum türleri Türkiye'de "binbirdelik otu", "kanotu", "peygamber çiçeği" ve çoğunlukla "sarı kantaron" isimleriyle tanınmakta olup halk arasında mide hastalıklarına, ülser ve diyabete karşı koruyucu olarak kullanılmaktadır (Tekin, 2017).

Cins ekstreleri üzerinde onlarca çalışma mevcut olup, çok çeşitli biyolojik aktiviteleri bildirilmiştir. Bunlar arasında antibakteriyel, antidepresan, antiviral, antiinflamatuvar ve antioksidan aktiviteleri göze çarpmaktadır (Zhao vd., 2015). Ayrıca cins üyelerinin sedatif, antiseptik, yara-iyileştirici, anti-astmatik, analjezik, hepatoprotektif ve anti-spazmotik etkileri bildirilmiştir. *Hypericum* türlerinin uçucu yağların da aralarında bulunduğu birçok biyoaktif bileşeni içerdiği bildirilmiştir (Bagci ve Yuce, 2011).

Cinsin birçok türü dünyanın çeşitli bölgelerinde geleneksel tıbbi bitki olarak değerlendirilmektedir. *Hypericum perforatum* L. (Sarı kantaron, St. John's Wort) hafif ve orta şiddetli depresyon üzerindeki olumlu etkileriyle ün kazanmış olup, cinsin diğer türlerine yönelik araştırmaların da artmasını sağlamıştır. Sarı kantaron, depresyon tedavisinde klasik sentetik ilaçların en önemli bitkisel alternatifidir. Tür üyelerinin toprak üstü kısımlarıyla hazırlanan ekstreler birçok ülkede ve Türkiye'de antidepresan olarak kullanılmaktadır (Yuce ve Bagci, 2011).

Hypericum perforatum ekstresinin Alzheimer hastalığı hayvan modelinde kognitif fonksiyonları geliştirdiği, asetilkolinesteraz inhibitörü olduğu ve ayrıca, hipokampüste amiloit-beta plaklarını azaltıp, oksidatif stresi ve nöroenflamatuvar faktörleri engellediği bildirilmiştir (Cao vd., 2017). *Hypericum perforatum* ekstresinin ayrıca siyatik sinir hasarı oluşturulmuş ratlarda lipit peroksidasyonu ve apoptozisi azaltıp, plazma antioksidan parametrelerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Uslusoy vd., 2017). Cins üyelerinden *Hypericum lydiu*m Boiss. etanol ekstraktının antimutajenik ve antioksidan aktivitesi *in vitro* yöntemlerle gösterilmiştir (Boran ve Ugur, 2017). *Hypericum scabrum* L. ekstresinin

yüksek-yagli diyetle beslenen ratlarda malondialdehit (MDA) seviyesini düşürüp katalaz düzeyini artirdigi ve öğrenme ve hafizayi geliştirdigi görülmüştür (Ganji vd., 2017). Türkiye'ye endemik tür olan *H. capitatum* var. *capitatum* Choisy bitkisinin metanol ekstresinin antioksidan, antimikrobiyal, antikolinesteraz ve DNA hasari inhibitör aktiviteleri bildirilmiştir (Boga vd., 2016). Bu çalışmalara paralellik göstermeyen başka bir çalışmada ise *Hypericum humifusum* L. yaprak ekstresinin ratlara uzun süreli olarak uygulanması neticesinde testis dokularında MDA değerleri artmış, katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) ise azalmıştır. Dolayısıyla uzun süreli *H. humifusum* uygulaması rat testis dokularında oksidan etki göstermiştir (Hammami vd., 2017).

Muğla'da yürütölen bir etnobotanik çalışmada “yer piren” yöresel ismi ile bilinen *Hypericum empetrifolium* romatoite karşı, “kantaron otu” ismi ile bilinen *Hypericum montbrettii* yara ve yanıklara karşı ve ağrı kesici olarak, “kızılıclık” veya “püren” adıyla tanınan *Hypericum triquetrifolium* Turra bitkisinin ise karın ağrısına karşı kullanıldığı bildirilmiştir (Gürdal ve Kültür, 2013).

Bosna Hersek'te yürütölen etnobotanik bir çalışmada *Hypericum montanum* L., *Hypericum perforatum* ve *Hypericum tetrapterum* Fries bitkilerinin kaynatılarak tüketilmesinin üriner sistem iltihaplanmalarına karşı ve balgam söktürücü olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Šarić-Kundalić vd., 2010).

Birçok *Hypericum* türüne ait uçucu yağlar hem kimyasal bileşenleri hem de biyolojik aktiviteleri açısından çalışılmıştır. *Hypericum coris* L. uçucu yağının antifungal etkisi gösterilmiştir (Schwob vd., 2002). *Hypericum hyssopifolium* Chaix var. *microcalycinum* Boiss et Heldr ve *Hypericum lysimachioides* Boiss et Noe var. *lysimachioides* Boiss et Noe uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri saptanmıştır (Toker vd., 2006).

Hypericum uniglandulosum Hausskn. ex Bornm. Türkiye'ye endemik bir türdür ve “Kemaliye kantaronu” olarak bilinmektedir (URL-3, 2017). İran-Turan elementi olan türün yetiştirme ortamı 780-1400 metre yükseklikte volkanik tepeler, step ve dağ yamaçları ve *Pinus* sp. altı şeklindedir. Haziran ayında çiçeklenen tür üyelerinin yayılış alanı Elazığ, Erzincan, Malatya ve Tunceli ile sınırlıdır (Yuce, 2009). *H. uniglandulosum* türünün dağılımı Şekil 1.1a'da gösterilmiştir.

Hypericum uniglandulosum türünün endemik olmasından dolayı üzerinde yapılmış fazla çalışma bulunmamaktadır. Bir çalışmada türün ekstresinin antimikrobiyal aktivitesi bildirilmiştir (Turkoglu vd., 2015).

1.2.2. *Achillea pseudoaleppica* Hub.-Mor. Türüne ait Genel Bilgiler

Achillea L., Asteraceae familyası içerisindeki en önemli cins olup, dünyanın farklı bölgelerinde doğal olarak yayılış gösteren 100'den fazla türü barındırmaktadır. Kuzey Amerika, Avrupa'nın çeşitli bölgeleri, Doğu ve Batı Asya, Avusturalya, Yeni Zelanda ve Orta Doğu bölgelerinde endemik *Achillea* türleri yayılış göstermektedir. Bununla birlikte, cinsin esas habitatları Türkiye, İran, Sırbistan ve Doğu Avrupa olarak bilinmektedir (Mohammadhosseini vd., 2017). Cins Türkiye'de 54 taksona ait 48 türle temsil edilmekte olup bunlardan 24 tanesi endemiktir. Cins üyeleri Türkiye'de "civanperçemi ve ayvadanası" gibi isimlerle bilinmektedir (Zengin vd., 2017).

Achillea üyeleri oldukça aromatik olup halk tıbbında en çok adı geçen bitkilerdendir (Bessada vd., 2015). Geleneksel Çin, İran ve Antik Yunan tıbbında sıklıkla kullanılan ve değer gören bitkilerdendir. Antik Yunan kahramanı olarak bilinen Achilles'in cephede savaşan askerlerin yaralarını tedavi etmek amacıyla bu bitkiyi kullandığına dair rivayetler vardır Ayrıca, Kızılderililerin *Achillea* türlerini yara ve kesik tedavisinde kullandıkları rapor edilmiştir. Cins üyelerinin kaynatılmasıyla elde edilen çayların ise kanama ve ateş tedavisinde, ayrıca besinleri iyi sindirmek ve genel olarak vücudun güçlenmesi amacıyla kullanıldığı bilinmektedir. Geleneksel Pers tıbbında ise zatürre, romatoit ve visceral ağrılara, pnomoni, anfiem ve hemorajiye karşı kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca *Achillea* türlerinin analjezik, antipiretik, spazmolitik, sitoprotektif, antienflamatuvar, anti-nöroenflamatuvar, antinosiseptif, antihelmintik, antiülser, antioksidan ve antihipertansif etkileri bildirilmiştir (Mohammadhosseini vd., 2017).

Tür bazında değerlendirmek gerekirse cinsin en önemli türlerinden biri olan *Achillea millefolium* L. ekstresinin, antimikrobiyal, antioksidan (Candan vd., 2003), damar koruyucu (Dall'Acqua vd., 2011), antitümör (Dias vd., 2013) ve hipotansif (Souza vd., 2011) aktiviteleri bildirilmiştir. Ayrıca, farelerde *A. millefolium* ekstresinin uygulanması sonucunda anksiyolitik etkinin görüldüğü bildirilmiştir (Baretta vd., 2012). *Achillea biebersteinii* Afan ve *Achillea fragrantissima* (Forssk.) Sch. Bip. türlerinin antioksidan (Shahat vd., 2014) ve antimikrobiyal (Almadiy vd., 2016) aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir.

Achillea pseudoaleppica Hub. –Mor. (Harput perçemi) (URL-5, 2017) endemik bir tür olup, 600-1300 metre yüksekliklerde, step, kalkerli yamaç, konglomera kaya ve çağılıklarda

yetişmektedir. İran-Turan elementi olan tür yalnızca Elazığ'da yayılış göstermektedir (URL-2, 2017). *A. pseudoaleppica* türünün dağılımı Şekil 1.1b'de gösterilmiştir.

A. pseudoaleppica endemik bir tür olmasından dolayı üzerinde yeterince çalışma yapılmamış olup, literatür taramasına göre yalnızca kimyasal bileşenlerine yönelik birkaç çalışma bulunmaktadır (Appendino vd., 1993), (Özen vd., 2003).

1.2.3. *Nepeta nuda* L. subsp. *nuda* L. Taksonuna ait Genel Bilgiler

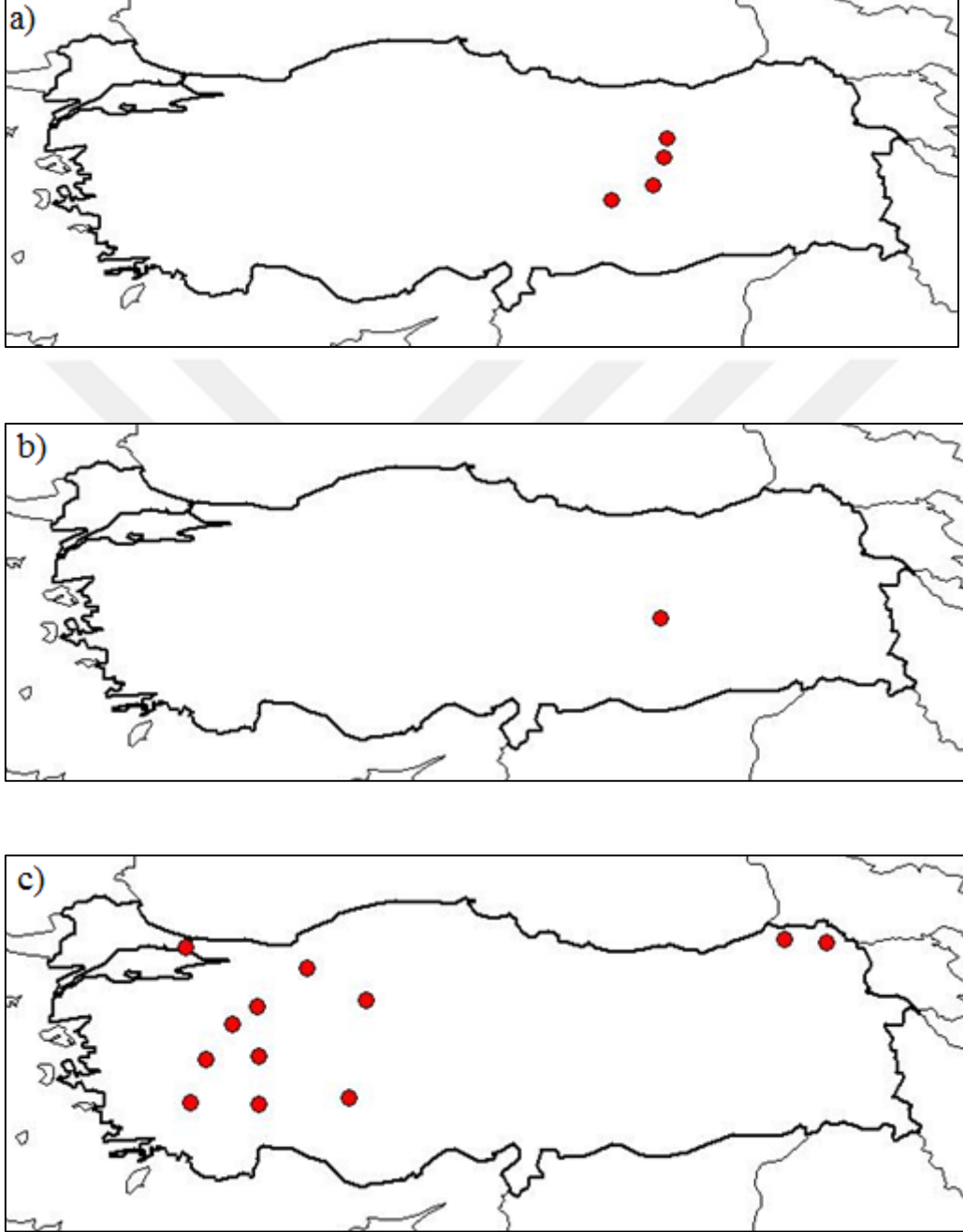
Nepeta L. (Lamiaceae) tek yıllık veya çok yıllık olup, Asya, Avrupa ve Kuzey Afrika'da yayılış gösteren ve yaklaşık 300 tür ile temsil edilen bir cinstir. Türkiye'de 33 türü bulunmakta olup, bunlardan 17'si endemiktir. *Nepeta* yaprakları yemek, salata ve çorbalarda tat vermesi için kullanılmaktadır. Kurutulmuş yaprakları çay olarak tüketilmektedir. *Nepeta* uçucu yağları ayrıca parfümeride de kullanılmaktadır (Kilic vd., 2011). *Nepeta* türlerinin halk hekimliğinde antispazmodik, balgam sökücü, diüretik, antiseptik, öksürük giderici, antiastmatik ve ateş düşürücü olarak kullanıldığı bilinmektedir (Alim vd., 2009).

Nepeta cins üyeleri aynı zamanda halk tıbbında sinir sistemi hastalıkları için de kullanılmaktadır. *Nepeta menthoides* Boiss. & Buhse türünün anksiyeteye karşı kullanıldığı bildirilmektedir. *Nepeta nuda* L. subsp. *albiflora* (Boiss.) Gams uçucu yağının antibakteriyel ve zayıf antioksidan aktiviteleri bildirilmiştir (Alim vd., 2009). Adana'da yürütülen bir etnobotanik çalışmada *N. nuda* subsp. *albiflora* toprak üstü kısımlarının ateş düşürücü ve yara iyileştirici etkileri bildirilmiştir (Güneş vd., 2017).

Nepeta rtanjensis Diklic et Milojevic uçucu yağının kanser hücre hattında sitotoksik aktivitesi gösterilmiştir. *N. rtanjensis* uçucu yağının bu aktivitesi antikanser terapisinde etkili olabileceğini düşündürmektedir (Skoric vd., 2017). *Nepeta hormozganica* Jamzad uçucu yağının antibakteriyel aktivitesi tespit edilmiştir (Sonboli vd., 2017). *Nepeta hindostana* (B.Heyne ex Roth) Haines uçucu yağının antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri gösterilmiştir (Pandey vd., 2015).

Endemik olmayan bir tür olan *Nepeta nuda* L. subsp. *nuda* L. (morküncü) (URL-4, 2017) 1100-2250 metre yüksekliklerde, çayırliklar, kaya yamaçları, *Juniperus* çalılıkları ve *Pinus* koruluklarında bulunmaktadır. Genel dağılımı G. ve O. Avrupa, Balkanlar, Sibirya, Kafkasya, Kırım, K. ve KB. İran ve Lübnan olan türün Türkiye'deki yayılışı batı Anadolu (Bolu, İstanbul, Ardahan, Afyonkarahisar, Ankara, Denizli,

Eskişehir, Isparta, Konya, Kütahya, Uşak) ve doğuda Artvin şeklindedir. *N. nuda* subsp. *nuda* türünün Türkiye’deki dağılımı Şekil 1.1c’de gösterilmiştir.



Şekil 1.1 Bitki taksonlarının Türkiye’deki dağılımları a) *Hypericum uniglandulosum* (Elazığ, Erzincan, Malatya, Tunceli), b) *Achillea pseudoaleppica* (Elazığ), c) *Nepeta nuda* subsp. *nuda* (Bolu, İstanbul, Ardahan, Afyonkarahisar, Ankara, Artvin, Denizli, Eskişehir, Isparta, Konya, Kütahya, Uşak)

N. nuda subsp. *nuda* *Herpes simplex* virüs tip 1 ve 2'ye karşı antiviral aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Todorov vd., 2015). *N. nuda* subsp. *nuda* bitkisi antimikrobiyal, spazmolitik ve sakinleştirici etkileriyle bilinmektedir, hatta sepsise karşı da etkili olduğu bildirilmiştir. Bir çalışmada *N. nuda* subsp. *nuda* uçucu yağının lipit peroksidasyonuna karşı oldukça güçlü etkileri gösterilmiştir (Kozuharova vd., 2014).

Görüldüğü gibi *Hypericum*, *Achillea* ve *Nepeta* cins üyelerinin biyolojik etkilerine yönelik birçok çalışma bulunmaktadır, fakat skopolamin hayvan modelinde *Hypericum uniglandulosum*, *Achillea pseudoaleppica* ve *Nepeta nuda* subsp. *nuda* uçucu yağlarının hafıza, depresyon, anksiyete ve beyin dokularında oksidatif stres üzerinde etkileri üzerine bir çalışma bulunmamaktadır.

1.3. Alzheimer Hastalığı

20. yüzyılda sağlık alanındaki en büyük gelişme ortalama yaşam ömrünün 30 yıl kadar artması olmuştur. Günümüzde 85 ve üzeri yaş grubu popülasyonun hızlı büyüyen segmenti olmakla birlikte, bu durum beraberinde yeni sağlık problemlerini getirmiştir. 85 yaş ve üzeri her 3 kişiden birinde Alzheimer hastalığı görülmektedir ve bu sayı gün geçtikçe artmaktadır (Santos vd., 2017).

Alzheimer hastalığı ilk olarak yüz yıldan fazla bir zaman önce Dr. Alois Alzheimer tarafından tanımlanmıştır. 1901 yılında Almanya'da, Frankfurt hastanesinde Alzheimer'ın hastası olan Auguste D. kavrama bozukluğu, hafıza kaybı, dezoryantasyon ve halusinasyonlar gibi semptomlar göstermekteydi. 5 Yıl sonra yaşamını yitiren hastanın beyinde otopsi sonucu yoğun amiloit plaklar ve nörofibriller yumaklar göze çarpmıştı. Birkaç sene sonra ikinci bir hastada aynı semptomlar ve patolojik durumla karşılaşılması hastalığı kesinleştirmiş oldu (Tse ve Herrup, 2016). Teşhis eden doktorun ismiyle anılan hastalık, "Alzheimer hastalığı (AH)" olarak literatüre girdi.

AH tanım olarak episodik bellek ve diğer kognitif becerilerde bozulma ve patolojik olarak beyinde beta amiloit plak ve tau proteini hiperfosforilasyonu ile oluşan nörofibriller yumaklar ile karakterize edilen yaş-bağımlı bir hastalıktır. Hastalığın progresif olması da yine önemli bir karakteristik özelliğidir (Han vd., 2017).

AH, demansın en yaygın türü olup demans vakalarının % 60-80'inden sorumludur. Hastalığın en yaygın görüldüğü yerler ABD, batı Avrupa ve Çin olmakla birlikte gelişmekte

olan ülkelerde de hastalığın prevalansı artmaktadır (Barrera-Ocampo ve Lopera, 2016). Türkiye’de ise 600.000 dolayında hastanın Alzheimer hastalığıyla mücadele ettiği belirtilmektedir (URL-1, 2017).

1.3.1. Alzheimer Hastalığının Patolojisi

Alzheimer hastalarının beyinlerinde görülen iki patolojik durum amiloit-beta (A β) plakları ve nörofibriler yumaklardır.

1.3.1.1. Amiloit-beta Plakları

AH patogenezinde en önemli karakteristik özellik amiloit beta proteini ile oluşan plaklardır. A β peptidi çoğunlukla 39-43 amino asit uzunluğundadır ve amiloit öncü proteininin (APP) α , β , ve γ -sekretazlarla proteolitik kesim aşamalarından sonra oluşur. Peptidin 2 predominant formu bulunmaktadır. A β plaklarının nöronal hasara yol açtığı bilinmektedir, fakat bu hasarın nasıl olduğu hala tam aydınlatılabilmemiş değildir. Bir hipoteze göre A β plakları reaktif oksijen türlerini artırarak protein ve lipid peroksidasyonunu tetiklemekte ve nöronal ölüme yol açmaktadır (Aleksis vd., 2017). Birçok genetik ve biyokimyasal çalışma göstermiştir ki hem ailevi, hem de sporadik vakalarda A β seviyesinde bir artışın veya A β türlerinin oranındaki bir değişikliğin hastalığın gelişiminde kritik etkileri vardır (Kizuka vd., 2017).

Alzheimer hastalarının tamamının beyinlerinde A β plakları görülmekte olduğundan bu patolojik durum hastalığın ilk teşhis edildiği yıllardan itibaren dikkati çekmiştir ve bundan dolayı da nedensel faktörler arasında A β proteinleri başı çekmektedir. Bundan dolayı amiloit beta hipotezi üzerinden geçen yıllara rağmen bilim çevrelerinde hala kabul görmektedir. Bu hipoteze göre A β birikimi, ardından gelişen durumları tetiklemektedir. Ailevi Alzheimer hastalığında görülen bütün genetik mutasyonların A β üretiminde rol oynayan genler olması hipotezi doğrulayan nedenlerden bir tanesidir. Ayrıca A β birikimi nörofibriler yumakların gelişimini ve klinik semptomları da tetiklemektedir. A β plakları sinapslarda, sinirsel dolaşım ve ağlarda fonksiyon kayıplarına yol açar. A β oligomerlerinin hem sinaptik fonksiyonu hem de sinaptik yapıyı bozduğu bildirilmiştir (Selkoe ve Hardy, 2016).

1.3.1.2. Nörofibriler Yumaklar

Hastalığın önemli patolojik durumlarından biri olan mikrotübül-ilişkili *tau* proteinlerinin oluşturduğu yumaklar hastalığın klinik semptomlarının başlamasından yıllar önce oluşmaktadır. Fizyolojik koşullarda *tau* proteini nöronlarda ifade edilir ve çoğunlukla akson bölgesinde lokalize olur ve burada mikrotübüllerle interaksiyon kurarak stabilizasyon sağlar. *Tau* proteininin yanlış-katlanması ve oligamerizasyonu neticesinde çözünmeyen *tau* yumakları oluşur (Guo vd., 2017). Bu durum *tau* proteinindeki bazı amino asitlerin hiperfosforilasyonu neticesinde meydana gelir. Proteinlerin mikrotübüllerden ayrılması taşıma yapısına zarar verir ve sonunda nöronların hücresel fonksiyonları zarar görür ve hücre ölümüne yol açar (Kocahan ve Doğan, 2017).

1.3.2. Alzheimer Hastalığının Semptomları

Birçok çalışma göstermiştir ki Alzheimer hastalığında belirli beyin bölgelerinde spesifik nöron popülasyonlarında kayıp görülür. MRI ve elektrofizyolojik teknikler göstermiştir ki AH'nda anormal sinirsel aktiviteler sinirsel dolaşımı değiştirebilmekte ve nöron ve sinapsların yapı ve fonksiyonları bozulmaktadır. AH'nda yalnızca nöronların ölümü görülmez; hastalık aynı zamanda anormal sinir ağı aktivitesine yol açarak hafıza, öğrenme ve diğer kognitif fonksiyonları bozar (Yang vd., 2017). AH'nın semptomlarını hafıza kaybı başta olmak üzere kognitif semptomlar ve davranışsal ve psikolojik semptomlar olarak sıralayabiliriz.

1.3.2.1. Hafıza Kayıpları

Hafıza 3 aşamada incelenir: bilgiyi edinme, depolama ve hatırlama. AH'nda en sık görülen semptomlar bu aşamaların herhangi birinde görülebilecek başarısızlıklar, hafıza sistemine bilgiyi yerleştirememeye veya okuyamama ya da yanlış hafızaya sahip olma şeklindedir.

Hafıza çeşitli kategorilere ayrılabilir: kısa süreli hafıza ve uzun süreli hafıza veya örtülü hafıza ve bildirimsel (deklaratif) hafıza gibi. Kısa süreli hafıza birkaç saniye ile dakika arasında sınırlı olup ön lop ve yan lopa bağlıdır. Buna karşın, uzun süreli hafıza hemen hemen limitsiz görülmektedir. Bildirimsel hafızayı da ikiye ayırmak mümkündür: içerikten-

bağımsız olan, anlamsal (semantik) hafıza ve bilgiyi zaman ve mekan gibi belirli bir içeriğe depolayan, eylemsel (episodik) hafıza. Episodik hafıza kısaca otobiyografik olaylar denilen belirli bir yer ve zamanda meydana gelen kişisel deneyimlerin toplamıdır. Semantik hafızaya örnek olarak brokolinin renginin veya çatalın kullanım amacının hatırlanması verilebilir. Bir arkadaşla yenen öğle yemeğini hatırlamak ise episodik hafıza örneğidir. Hastalığın en erken ve en tipik klinik semptomu episodik hafızanın oluşmasında ve korunmasında bozulmalardır. Başlarda kaçırılan randevular ve geç ödenen faturalarla karşımıza çıkan hastalık, ileride fırının kapatılmasının unutulması ve ilaçların alınıp alınmadığının hatırlanamaması gibi durumlarla daha ciddi bir hal alır ki bütün bunlar episodik hafıza ile ilişkili olup Alzheimer hastalarında sık görülmektedirler (Gold ve Budson, 2008).

Hastalarda kognitif fonksiyonlarda gerilemeler ve hafıza kaybı beyindeki sinaps ve plastisite kaybı ve bozulmaları neticesinde gerçekleşir. Uzak geçmişe ilişkin hafıza ise genelde korunmaktadır. Hastalığın ilerlemesiyle birlikte episodik hafıza tamamen etkilenir. Semantik hafıza ve işleyen hafıza ise hastalığın ilerleyen dönemlerinde etkilenmektedir. Alzheimer hastalarında semantik hafıza ilk önce dil becerisinde görülerek konuşmada akıcılığı etkiler. Semantik bellek kaybı daha ileri zamanlarda, hastalığın teşhisinden birkaç yıl önce görülebilir (Holger, 2013).

Beynin hipokampus bölgesinin hafızada önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. Hipokampus kısa ve uzun süreli hafıza için gereklidir. Araştırmalar hipokampusun hem bilgiyi edinmede hem de hatırlamada rol oynadığını göstermektedir. Hipokampusteki tahribat yeni hafızaların depolanmasını imkansız kılar (Yang vd., 2017). Hipokampus Alzheimer hastalarında ilk ve en fazla dejenere olan beyin bölgelerinden biridir. Çalışmalar Alzheimer hastası olan bireylerde, aynı yaşta fakat hasta olmayanlara göre hipokampus atrofsi ve hipokampüste şekil ve yapı değişimleri görüldüğünü göstermektedir (Gold ve Budson, 2008).

1.3.2.2. Diğer Kognitif Bozukluklar

AH'nın en önemli semptomu hafızada düşüş olsa da diğer kognitif semptomlar hastalığın başlarından itibaren görülebilir ve belirleyici olmaktadır. Bunlar afazi (konuşma bozukluğu), dezoryantasyon (zaman ve yer bilincinin bozulması) ve yönetimsel işlev bozukluğu olarak sıralanabilir. Dil ve konuşma problemleri, özellikle de kelimeleri hatırlayamama AH'nda görülen ilk semptomlardan biridir, fakat genellikle hafif seyreder.

Yönetimsel işlev bozukluğu ise afaziden daha erken ortaya çıkıp zamanla ilerler (Apostolova, 2016).

1.3.2.3. Davranışsal ve Psikolojik Semptomlar

Alzheimer hastalarının % 50-90'ında BPSD olarak adlandırılan anksiyete, depresyon, ajitasyon, apati (çevrede gelişen olay ve durumlara karşı kişinin ilgisinin azalması), hezeyanlar, halüsinasyonlar ve saldırganlık gibi nöropsikiyatrik semptomlar görülmektedir (Levy vd., 2012). AH'nda BPSD önceleri fazla önemsenmeyen fakat günümüzde oldukça önemli olduğu kabul edilen semptomlardır. Verilen önem açısından kognitif bozukluklardan sonra gelen BPSD, AH'nın teşhisinde kendisine fazla yer bulmaz. BPSD'nin her hastada aynı şekilde görülmemesi, nispeten lineer bir düşüş gösteren kognitif bozukluklar gibi ortaya çıkmaması ve fiziksel ve çevresel faktörlerden etkilenecek heterojen bir yapı kazanması gibi nedenler BPSD'yi uzun yıllar AH ve demans çalışmalarında geri plana itmiştir. Bununla birlikte BPSD aslında demans teşhisinde ve kontrolünde önemli ipuçları sunmaktadır. BPSD Alzheimer hastalarında yalnızca ilerleyen süreçte değil, hastalığın hafif fazlarında da görülebilmektedir. Bu semptomlar, kognitif fonksiyonları da etkileyebilmektedir. BPSD'nin tedavisi AH'nda kognitif semptomları da iyileştirip hem hasta hem de hasta yakınlarının yaşam kalitesini arttıracığından önemli ve gerekli bir yaklaşım olacaktır (Piccininni vd., 2005).

Anksiyete ve depresyonun, hastalığın semptomları olmakla birlikte risk faktörleri de olabileceğine dair çalışmalar vardır. Bu konuda bir kesinlik olmasa da birçok araştırmacı AH ve anksiyete ve depresyonun bağlantılı olduklarını düşünmektedirler (Burke vd., 2017).

Anksiyete, nörolojik sistemlerdeki bozukluktan kaynaklanmaktadır. Anksiyetenin mekanizması kısmen bilinmektedir. Gama-aminobütirik asit (GABA) uyarıcı nörotransmitter olan glutamatın aktivitesini baskılamak için bilinen temel inhibitör nörotransmitterdir (Lydiard, 2003). GABA, MSS'de oldukça yaygındır ve iki temel sınıftan bir tanesi olan GABA_A reseptörüne bağlanır. Bu reseptör Cl⁻ iyonu kanalı ile kompleks oluşturmuştur. Yakın zaman önce GABA_A reseptörünün allosterik bağlanma bölgeleri bildirilmiştir (Puthenkalam vd., 2016). Reseptörün bağlanma bölgelerine benzodiazepinler, barbituratlar, etil alkol, anestetikler ve hatta penisilin bile bağlanabilir ve reseptörün GABA'ya olan cevabını etkilerler. En önemli agonistler ise benzodiazepinlerdir. Benzodiazepinlerin iyon kanalı açılma sıklığını arttırdığı bilinmektedir. (Olsen ve DeLorey,

1999). Reseptör, memelilerde 19 alt birimin çeşitli kombinasyonlarıyla homo veya heteropentamerler şeklinde düzenlenmektedir. Bu da reseptörün birçok alttipi olduğu ve farklı özellikler gösterdiği anlamına gelmektedir. Reseptörün alt birimlerinin arayüzlerinde çeşitli bağlanma bölgeleri olmakla birlikte, bu arayüzlerin birçoğu çalışılmamıştır (Puthenkalam vd., 2016). Anksiyolitik ve sedatif etkileri bilinen birçok uçucu yağdan bir kısmının GABA reseptörlerini aktive ettiği bilinmektedir.

1.3.3. Alzheimer Hastalığının Risk Faktörleri

AH'nı kontrol etmek yüzyılın en büyük tıbbi problemlerinden bir tanesi olup, bu ölümcül hastalığın risk faktörlerini değerlendirip bireylerin hastalığa ne kadar yatkın oldukları konusunda bir fikir sahibi olmak hem erken teşhis hem de mümkünse hastalığın oluşumunun önüne geçmek için oldukça önemlidir. Hastalığa karşı biyomarkör geliştirme çabaları sürerken, risk faktörü taşıyan insanların ilerleyen yıllarda belirli aralıklarla test edilmeleri umulmaktadır.

İlerleyen yaş: Dünyada hemen hemen her ülkede 60 yaş üstü insanların oranı giderek artmaktadır. Normal yaşlanmada tipik olarak hafıza ve yönetimsel fonksiyonlarda gerilemeler görülür. Yaşlanma, hafif kognitif bozukluk (MCI) ve AH için en önemli risk faktörüdür. Hafif kognitif bozukluk hasta tarafından farkedilecek kadar ciddi hafıza, dil, düşünme ve karar verme fonksiyonlarındaki bozukluklar olarak tanımlanırken bu problemler hastanın günlük yaşamını fazla etkilemez. Demans ise kognitif ve davranışsal problemler günlük yaşamı etkilediğinde teşhis edilir. İlerleyen yaşla birlikte sinapslarda kayıp görülür. Hipokampüsteki sinaps kayıpları ise kognitif gerilemeye neden olur. Yaşlanmanın bütün genlerin yaklaşık % 3-5 kadarının ifadesini etkilediği düşünülmektedir. Alzheimer hastalarında ise daha fazla sayıda gende değişiklik olduğu ve değişikliklerin daha büyük olduğu görülmektedir. Bununla birlikte yaşlanma ile AH ilişkisinin hücresel ve moleküler mekanizmaları tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Yaşlanmış bir beyinde görülen değişiklikler (mitokondrial fonksiyon kaybı, protein homeostasisinde fonksiyon kaybı, oksidatif stres, inflamasyon gibi) AH'nda da görülmekte fakat bu spektrumun dışında ve patolojik bir durum teşkil etmektedir (Hullinger ve Puglielli, 2017).

Down sendromu: Trisomi 21 olarak karakterize edilen down sendromu en yaygın kromozomal anomali olup her 733 canlı doğumdan birinde görülmektedir. APP geni 21. kromozomda kodlandığından, trizomi 21 durumunda bu genden 3 kopya olacaktır. APP

ifadesinin fazlalığı A β sentezini arttırdığından birçok down sendromlu insanda AH gelişmektedir. Günümüzde down sendromlu hastaların yaşam ömürleri 55-60 yıl arasında değişmekte olup, hastaların yaklaşık % 70'i AH'na yakalanmaktadır.

Kardiyovasküler sistem: Kardiyovasküler hastalıkların demans riskini artırdığına dair bazı kanıtlar bulunmaktadır. Klinik ve klinik öncesi kardiyovasküler hastalıklar taşıyan hastaların olmayanlara göre daha düşük kognitif becerilere sahip olduğu bildirilmiştir. Hipertansiyon ve düşük kognitif fonksiyonlar arasında da ilişki kurulmuştur.

Diyabet: Diyabetin kognitif düşüş ve ilerleyen yaşlarda AH'na yakalanma riskini artırdığı düşünülmektedir. Tip 2 diyabetin AH riskini 2 katına çıkardığına dair çalışmalar vardır. Başka çalışmalarda da diyabet ile AH arasında ilişki kurulmuştur. Alzheimer ve diyabet hastası kişilere uygulanan antidiyabetik tedavi kognitif fonksiyonları da geliştirmektedir.

Travmatik beyin hasarı: Travmatik beyin hasarının AH için ciddi bir risk oluşturduğu düşünülmektedir. Travmatik beyin hasarı, amiloit seviyelerini artırmaktadır. Bunun birkaç nedeni vardır. Öncelikle APP ifadesi travmatik beyin hasarı sonrası artış gösterir. Ayrıca, APP'nin parçalanıp A β oluşumunu sağlayan enzimler olan β ve α -sekretazlar, travmatik beyin hasarı sonrasında upregüle edilir. Bu enzim ve substratların artışı aksonda amiloit artışına yol açar ve bu da travmatik beyin hasarının AH için neden bir risk faktörü olduğunu açıklayabilir.

Amiloide maruz kalma: Son yıllarda prion hastalığı gibi amiloidin de bulaşıcı olabileceğine dair bazı kanıtlar sunulmaktadır. Hem hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda, hem insanlarda amiloit birikiminin tetiklenebildiği görülmüştür. Amiloidin metallerden temizlenemediği ve bundan dolayı cerrahi ekipmanlarla birlikte sağlıklı insanlara bulaşabileceği yönünde endişeler oluşmaktadır. Bununla birlikte amiloit enfeksiyonu ile ilgili daha fazla veriye ihtiyaç vardır.

Çevresel faktörler ve beslenme: Genel olarak antiinflamatuvar etkiye sahip maddeler AH için koruyucu olmaktadır. Düşük-kalorili beslenme genelde daha az serbest radikal ile ilişkilendirilir ki bütün bunlar beynin daha sağlıklı kalmasını sağlar. Antioksidan ve çoklu-doymamış yağ asitleri ile beslenmenin AH riskini düşürdüğüne dair çalışmalar vardır. Ayrıca, eğitim düzeyinin yüksek olması ve fiziksel egzersizin bireylerde kognitif fonksiyonları güçlendirdiği, bunun da AH riskini düşürdüğüne dair bazı kanıtlar mevcuttur (Hickman vd., 2016).

1.3.4. Alzheimer Hastalığının Genetik Temelleri

Alzheimer vakalarının çok az bir kısmında 65 yaşından önce semptomlar gelişmektedir. Erken-başlangıçlı (ailevi) denilen bu AH'nın büyük bir kısmında APP, presenilin 1 (PSEN1), veya PSEN2 gen mutasyonlarını sorumlu olduğu düşünülmektedir. PSEN1 ve bununla yakın ilişkili olan PSEN2 genleri APP'yi farklı uzunluklardaki A β peptitlerine parçalayan γ -sekretaz enziminin katalitik bileşenidir. PSEN mutasyonlarının A β peptidinin oluşumunda değişimlere yol açmaktadır. Bununla birlikte, ilginç bir şekilde PSEN proteininden tamamen yoksun farelerin beyinlerinde de nörodejenerasyon görülmüş olup bu durum A β hipotezi hakkında kuşkulara yol açmaktadır (De Strooper, 2007).

Alzheimer hastalarının büyük bir kısmı geç-başlangıçlı (sporadik) olup bu hastalarda ilk semptomlar 65 yaş ve üstünde görülmektedir. Geç başlangıçlı AH'nda en büyük genetik risk faktörü apolipoprotein E (APOE) gen allelidir (Zhao vd., 2018).

1.3.5. Alzheimer Hastalığının Teşhisi

AH teşhisi oldukça zor bir hastalık olup öncelikli olarak hasta hikayesi dinlenmektedir. Sonrasında hafıza, problem çözümü, dikkat ve dil becerisi gibi fonksiyonları içeren testlerin yapılması, beyin taramaları ve genetik testler gelmektedir. Teşhis için standart olarak izlenebilecek bir yönerge "Uluslararası Çalışma Grubu" tarafından yakın bir zaman önce hazırlanmıştır. Bu rapora göre hastalığın teşhisi için temel kriterler kısaca şunlardır: Hastalar en az 6 aydır hafıza fonksiyonunda kademeli ve ilerleyen değişimler göstermelidir ve bunların nöropsikolojik testlerle tespit edilmesi gerekir. Ciddi derecede bozulmuş episodik hafızaya yönelik kanıtlar olmalıdır. Episodik hafıza diğer kognitif değişimlerle birlikte izlenebilir veya tek başına bir kriter de olabilir. Bu sayılan temel kriterler dışında destekleyici kriterler de listelenmiştir. Bunlar, medial temporal lob atrofisi, anormal beyin-omurilik sıvı biyomarkörü (artan *tau* düzeyleri ya da anormal amiloit görüntüleme), ve otozomal-dominant AH mutasyonlarıdır.

Uluslararası çalışma grubu kriterlerine göre AH'nın 4 teşhis grubu tanımlanmıştır. Bunlar: risk grubu, klinik öncesi, prodromal Alzheimer ve Alzheimer tipi demanstır. Hiçbir semptom göstermeyip hastalığın belirteçlerini taşıyan kişiler risk grubunda görülmektedir. 70 yaş üstü insanların yaklaşık %20-30 kadarının beyin A β fibrilleri görüntülenebilmektedir,

fakat bu insanların hepsinde AH gelişmez. Bu bireylerin bazılarının yaşam ömürleri tamamlandığından hastalığın gelişip gelişmediği anlaşılamamaktadır. Bundan dolayı hastalığın semptomlarını göstermeyen kişilere mörkör taşısalar da Alzheimer hastası teşhisi konulmaktan kaçınılmaktadır. Bununla birlikte PSEN 1 veya APP mutasyonları taşıyan kişilerin, presenilin 2 mutasyonu taşıyanların da birçoğunun erken-başlangıçlı Alzheimer geliştirdikleri bilindiğinden bir istisna taşımaktadır. Bu bireyler klinik öncesi Alzheimer hastası olarak anılmaktadırlar.

Hastalığın biyomarkörlerini taşıyıp episodik hafıza geriliği görülen veya hastalığa yönelik diğer semptomları taşıyan, fakat günlük yaşamı etkileyecek problemleri olmayan bireyler prodromal AH ile teşhis edilmektedir. Bu hastalarda günlük yaşam aktivitelerinde henüz bir kesinti gözlenmediğinden Alzheimer hastası teşhisi konulmaz. Bu durumda 3 olasılık vardır: Birincisi hastalarda ileride Alzheimer gelişmesi, ikincisi ise hastalığın aslında “hafif kognitif bozukluk” olmasıdır. Üçüncü bir ihtimalle de hastalar iyileşebilirler.

Alzheimer tipi demans teşhisi ise prodromal fazdan hastanın günlük yaşam aktivitelerinin bozulmuş olduğu faza geçildiğinde konulur. Çoğunlukla prodromal Alzheimer’a göre kognitif bozukluklar daha ciddi ve daha geniş kapsamlıdır (Cummings vd., 2013).

1.3.6. Alzheimer Hastalığında Terapötik Yaklaşımlar

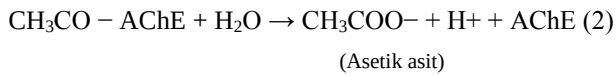
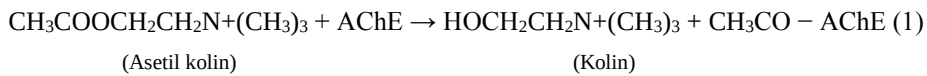
AH şu an itibariyle tam tedavisi olmayan nörodejeneratif bir hastalıktır. AH için terapötik yaklaşımlar semptomları azaltmaya ve hastalığın seyrini düşürmeye yönelik olmaktadır. Bununla birlikte, hastalığın tedavisi veya ilerleyişinin durdurulması mümkün olmamaktadır. Bundan dolayı kesin bir tedavi bulunana dek en iyi çözüm mümkünse hastalıktan korunmaktır.

Hastalığa karşı tedavi kolinesteraz inhibitörlerine ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistine dayanmakta olup sadece semptomatik bir rahatlama sağlamaktadırlar. Bunların dışında fiziksel aktivite, uygun beslenme, geleneksel tıp gibi tamamlayıcı-koruyucu tedaviler de araştırılmaktadır.

1.3.6.1. Semptomatik Tedavi

a. Asetilkolinesteraz inhibitörleri: Tanımlanan ilk nörotransmitter olan asetilkolinin (ACh) öğrenme ve hafızada büyük rol oynadığı bilinmektedir. ACh üreten ve salan hücreler için kolinerjik, ACh ile ilişkili bütün sisteme ise kolinerjik sistem denilir. AH’nda ACh seviyeleri kolinesterazlarla hidroliz edilip düşüşe geçer. Bu durum, yaklaşık 30 yıl önce ortaya konan “kolinerjik hipotez” dir ve AH için ilk mantıklı tedaviyi sunmuştur. ACh, AChE ve bütirilkolinesteraz (BuChE) olmak üzere 2 tip kolinesteraz enzim ile degrade edilir, fakat ACh daha yaygındır ve AH için özellikle AChE’lara başvurulmaktadır. Bu hipotez Alzheimer hastalarının beyinlerinde kolinerjik aktivite kaybının farkedilmesiyle ve insan ve primatlarda ACh’in öğrenme ve hafıza ile ilgili rolüne yönelik deneysel çalışmalar neticesinde ortaya konmuştur (Craig vd., 2011). Merkezi kolinerjik sistemin fonksiyonundaki bir azalma, hafıza kaybı ve AH’nda görülen oryantasyon bozukluğu gibi semptomları ortaya çıkarabilir. Kolinerjik aktivitedeki bir azalmanın kognitif eksikliklerle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Alzheimer hastaları kortikal kolinerjik nöronlarda önemli oranda düşüş ve merkezi kolinerjik fonksiyonlarda bozukluklar göstermektedir. Merkezi kolinerjik fonksiyonun bloke edilmesinin hafıza kaybına yol açtığı ispatlanmıştır.

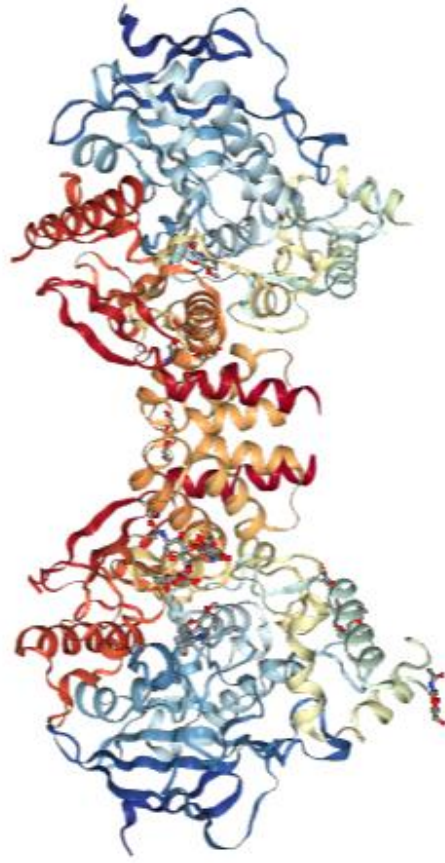
AChE, çok hızlı aktivite gösteren bir enzimdir. Bir serin-hidrolaz olan enzim şaşırtıcı bir şekilde difüzyon hızına yaklaştırmıştır. AChE, aşağıda verilen birinci reaksiyonda asetillenir ve kolin açığa çıkar. İkinci reaksiyonda ise asetillenen enzim su ile tepkimeye girer ve asetik asit açığa çıkar.



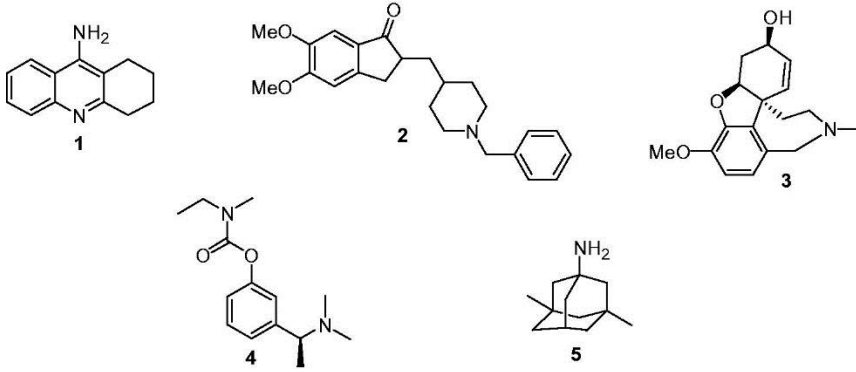
Enzim ilk kez 1991’de torpil balığı olarak bilinen *Torpedo californica* türünden kristalize edilmiştir. Enzimde aktif bölgeyi içeren 20Å derinliğinde uzun ve dar bir oluk enzimin yüzeyinden katalitik bölgeye kadar uzanır (Sussman vd., 1991). Katalitik bölge, oluğun tabanında bulunmakta ve katalitik üçlü (insan AChE’da H447, E334 ve S203) içermektedir. İkinci veya periferik bölge, oluğun girişinde katalitik / periferik bölge arayüzünde Y337’nin (insan AChE) ötesine uzanır. Enzimde iki belirgin ligant bağlanma

bölgesi bulunur: katalitik anyonik bölge ve periferik anyonik bölge. Ayrıca, oluk kısmın duvarlarının ve tabanının yüksek oranda aromatik içeriği ve katalitik bölgedeki yüklü amino asitlerin sıralanışının güçlü bir elektrostatik dipol oluşturmuş olması enzimin önemli karakteristik özellikleridir. Dolayısıyla enzimin aktif bölgesi pozitif yüklü ligantları kendisine çekmektedir (Xu vd., 2017). Kinetik ve termodinamik çalışmalar, inhibitörlerin AChE'daki iki bağlanma bölgesinden biriyle veya her ikisiyle etkileşebileceğini göstermiştir (Rosenberry vd., 2008). Enzimin, APP gibi diğer bazı membran proteinleri gibi nöron hücre yüzeyinden salındığı gösterilmiştir. Trans-membran domaini bulunmaz ve bir trans-membran proteini vasıtasıyla membrana tutunur (Hicks vd., 2012). AChE sinir sistemindeki önemli rolünden dolayı birçok doğal ve sentetik bileşenin de hedefi durumundadır. Bunlar arasında organofosforlu sinir gazları ve insektisitler de bulunmaktadır. Tersinmez AChE inhibitörlerinin ciddi letal etkileri vardır. Şekil 1.2'de AChE enziminin galantaminle kompleks halinde (PDB:4EY6) kristalize edilmiş yapısı verilmiştir (Cheung vd., 2012).

Şekil 1.3'de molekül yapıları verilen takrin (1), donepezil (2), rivastigmin (3), ve galantamin (4) AH ilaçlarıdır. Bu ilaçlar asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek ACh seviyesini artırmaya ve beynin kolinerjik fonksiyonlarını geliştirmeye yöneliktir. Takrin ise yan etkilerinden dolayı artık kullanılmamaktadır.



Şekil 1.2. AChE enziminin 3-boyutlu yapısı



Şekil 1.3. Alzheimer hastalığı için onaylanan ilaçlar: Takrin (1), donepezil (2), rivastigmin (3), galantamine(4) ve memantin (5)

b. N-Metil-D-Aspartat Reseptör (NMDA) Antagonistleri: NMDA reseptörü uzun yıllar öğrenme, hafıza ve ayrıca nörotoksisite çalışmalarında rol oynamıştır. NMDA reseptörünün AH ile ilişkisine dair bazı teoriler vardır. NMDA reseptörünün bir $A\beta$ reseptörü olabileceği veya doğrudan $A\beta$ ile olmasa bile $A\beta$ 'ye bağlanan moleküllerle interaksiyon kurabileceği bu teorilerden bir tanesidir. $A\beta$ proteinlerinin NMDA

reseptörlerinin fonksiyonlarına aracılık ettiği veya NMDA reseptörlerinin A β plak oluşumunu kontrol ettiği de teoriler arasındadır. Özetle, NMDA ile A β arasında birçok potansiyel bağlantının olduğu düşünülmektedir (Malinow, 2012).

NMDA bilindiği gibi glutamat reseptörüdür. Glutamat, temel bir uyarıcı nörotransmitter olup nöronal plastisite, sinirsel iletim, hafıza ve öğrenme süreçleri için gereklidir, fakat çok yüksek seviyelerde glutamat nöronlar için toksiktir. AH neticesinde hasar görmüş dokularda glutamaterjik nöron yoğunluğunun fazla olduğu görülmüştür. NMDA reseptörlerinin uzun süreli aktivasyonu nörodejenerasyonu tetikler. Glutamat eksitotoksitesisi kalsiyum yüklenmesine, mitokondrial fonksiyon bozukluğuna ve aşırı nitrik asit oluşumuna yol açarak yüksek seviyelerde oksidan etki oluşturur ve nöronal apoptosize yol açar. NMDA antagonisti olan memantin (5) (Şekil 1.3) bu durumun bloke edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. 2003 yılında onaylanarak orta ve ileri seviyedeki Alzheimer hastalarının tedavisinde kullanılmaya başlanan memantin kognisyon üzerinde etkili olmaktadır. Memantin'in ayrıca *tau* fosforilasyonunu azaltarak nöronları koruduğu düşünülmektedir. (Wang vd., 2015).

c. Diğer Nörotransmitter Sistemleri: Farklı nörotransmitter ağları da AH tedavisi için hedef alınmaktadır. Bunların bir tanesi olan serotonin reseptörleri MSS'nin öğrenme ve hafıza ile ilgili bölgelerinde ifade edilmekte ve AH'nın tedavisinde üzerinde durulmaktadır (Ramírez, 2013). Histamin reseptörleri ise, beyinde hafıza ve kognisyonla ilgili yapılarda yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Histamin reseptör antagonistlerinin klinik çalışmaları devam etmektedir.

1.3.6.2. Tedaviye Yönelik Diğer Çalışmalar

Hastalığın tedavisine yönelik çalışmalarda amiloit yolağı hipotezine dayananlar sekretaz inhibitörleri, amiloit bağlanıcıları ve anti-A β agregasyon bileşikleri üzerinde çalışmaktadırlar. Ayrıca *tau* proteini hiperfosforilasyonuna karışan kinazlar hedef alınarak çalışmalar yapılmaktadır.

Yaşa-bağımlı bir hastalık olan AH diğer kronik-dejeneratif hastalıklarla da ilişkilendirilir. Geliştirilen tip 3 diyabet hipotezine dayanarak hastalara intranazal insülin uygulanması kan-beyin bariyerini geçeceğinden dolayı bir tedavi sağlayabileceği düşünülmektedir.

Düşük-yoğunluklu lipoprotein (LDL) konsantrasyonu artışı AH riskini artırmaktadır. Bundan dolayı tedavi olarak statinlerin kullanılması yönünde yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Bununla birlikte ileri yaşlarda statinlerin vasküler hastalıklara yol açabileceğine yönelik kanıtlar bu tedavinin iyi bir fikir olmadığını düşündürmektedir (Mendiola-Precoma vd., 2016).

Anlaşıldığı üzere bütün çabalara rağmen AH'nı tamamen durduracak bir tedavi yoktur. Bununla birlikte, başta asetilkolinesteraz inhibitörleri ile olmak üzere hastalığın semptomatik tedavisi yapılabilmektedir. Yeni ve etkili kolinesteraz inhibitörlerinin keşfinde bitkisel ürünler büyük öneme sahiptir.

1.4. Deneysel Alzheimer Hastalığı Modelleri

Hayvan modeli tanım olarak hedef insan grubuna özellikle fizyolojik ve davranışsal olarak yeteri kadar benzeyen ve elde edilen bilginin insanlara uyarlanması amacıyla kullanılan doğal veya yetiştirilmiş hayvana denir (Sjoberg, 2017). Deneysel çalışmalarda model hayvanın seçilmesi ve bu hayvanda istenen hastalık, tıbbi durum veya karakterin oluşturulması önemli bir basamaktır. Birçok demans, AH ve kognitif gerileme hayvan modeli geliştirilmiştir. Burada sayılanlar dışında AH için çok daha çeşitli hayvan modelleri bulunmaktadır.

1.4.1. Kimyasallarla İndüklenen Modeller

Bu modeller kimyasal yollarla merkezi nöronal ve nörotransmitter yolları manipüle etmeye dayanır. En sık kullanılanı skopolamin hayvan modelidir.

1.4.1.1. Skopolamin Hayvan Modeli

Eski çağlarda bazı bitkilerin insanların mental durumunu etkilediği bilinmekteydi. *Mandragora* ve *Datura* gibi bitkiler kullanıldığında delüzyona yol açarak bireylerin gerçeklik algısını ortadan kaldırmasına ve intoksikasyon süresince olup bitenleri tamamen unutmalarına neden olmasıyla “sihirli iksirler” olarak tanımlanmışlardı. Daha sonra bu bitkilerin yüksek konsantrasyonda tropan alkaloid (skopolamin, atropin gibi) içerdiği ve bu maddelerin halüsinasyonlara yol açtığı anlaşılmıştır.

Tropan alkaloidler içerisinde, skopolamin, parasempatik aktivasyonu engellemek için klinikte kullanılmaktadır. Skopolamin, otobüs ve gemi seyahatlerinde bazı insanlarda yaşanan “yol tutması”na karşı da kullanılır. Bununla birlikte skopolaminin amnezik özellikleri 1900’lerin başında anlaşılmıştır. İlerleyen zamanlarda ise kolinerjik hipotez ortaya atıldığında skopolamin modeli popüler olmuştur. 1970’lerin ilk yıllarında skopolamin ilk kez gönüllü insanlar üzerinde denenmiş ve demans hastalarında görülen kognitif fonksiyon bozukluklarının skopolaminle sağlıklı insanlarda geliştiği kayda geçmiştir. Günümüzde skopolamin sağlıklı insanlarda ve hayvanlarda yaş ve demans bağlantılı kognitif bozukluk oluşturmak için standart/referans ilaç olarak kullanılmaktadır. Klinik öncesi çalışmalarda ilaçların kognisyon üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla skopolamin modeli sıkça kullanılmaktadır. Bir ilaç eğer skopolaminle oluşturulan kognitif hasarı geri çevirebiliyorsa, sağlıklı insanlarda veya demans hastalarında kognitif fonksiyonları geliştirebilir düşüncesi hakimdir. Özellikle de bir dizi ilacın kolay ve hızlıca taranması skopolamin modelinin avantajlarından (Klinkenberg ve Blokland, 2010).

Skopolamin non-selektif muskarinik reseptör antagonisti olup, düşük dozlarda muskarinik reseptörlere bağlanırken, yüksek dozlarda hem muskarinik hem de nikotinik reseptörlere bağlanır. Skopolaminin serebral kortekste ACh muskarinik reseptörlerinin bağlanma bölgelerini bloke ettiği bildirilmiştir. Bunun neticesinde çok fazla miktarda ACh salınmasının hipokampus nöronlarına zarar verdiği ve öğrenme ve hafıza süreçlerini bozduğu düşünülür. Skopolamin intraperitoneal yolla uygulanır. Kompleks ameliyat prosedürleri gerekmediğinden dolayı hafıza bozukluğu için sıkça skopolamin modeli kullanılır (Neha vd., 2014).

1.4.1.2. Amiloid-beta Peptidi Modeli

Amiloid beta plakları bilindiği gibi AH için karakteristik bir özellik olup $A\beta$ uygulamasının hafıza kaybına neden olduğu görülmektedir. $A\beta$ peptidinin akut enjeksiyonu ya da devamlı uygulanmasının AH’nda görülen beyin fonksiyonlarında bozulma, nörodejenerasyon ve öğrenme ve hafızada gerilik gibi durumları oluşturduğu kanıtlanmıştır. Bu model AH için oldukça spesifik bir model olup, ilaç geliştirmede kullanılmaktadır.

1.4.1.3. Ağır Metal Modeli

Birçok çalışma demir, bakır, krom, kobalt, alüminyum ve çinko gibi metallerin reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumlarını artırarak Alzheimer tipi demansa yol açtığını göstermektedir. Kadmiyum, arsenik ve kurşun, proteinlerin sülfidril gruplarına bağlanarak ve glutasyonu tüketerek toksik etki gösterirler. Çinko A β dimerizasyonuna yol açarak AH'nın gelişiminde rol oynayabilir. Bakırın ROS oluşumuna yol açtığı kanıtlanmıştır ki ROS AH ile ilişkili görülmektedir. İçme suyundaki fazla miktarda alüminyumun A β metabolizmasını bozarak AH'na yol açtığı gözlenmiştir. Alüminyum uygulamasının *tau* birikimi ve apoptozise yol açtığı bildirilmiştir. Alüminyum gastrointestinal ve kan-beyin bariyerini aştığında, AH için önemli beyin bölgesi olan hipokampüsteki nöronlarda birikmektedir. Bundan dolayı alüminyum modeli AH hayvan modeli olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Neha vd., 2014).

1.4.2. Spontan Modeller

Hafıza kaybı ileri yaşın karakteristik bir özelliği olduğundan yaşlı hayvanlar hafıza geriliği ve AH için doğal bir model olarak kullanılabilir. Spontan modeller bundan dolayı yaş-bağımlı demans ve senesens hızlandırılmış fare modelleridir.

Yaşlı hayvanlar rutin olarak kognitif gerileme ve davranışsal değişimlerle ilişkili ilaç geliştirmede kullanılmaktadırlar. Bu hayvanlar yalnızca nörokimyasal ve morfolojik değişiklikleri taklit etmekle kalmaz, aynı zamanda AH'nın patofizyolojisine benzer şekilde kolinerjik fonksiyonlarda azalma da gösterir. Bu modelin avantajı invaziv olmaması ve doğal olmasıdır. Kognitif araştırmalarda genelde yaşlı kemirgenler kullanılır. Köpekler, kediler, ayılar ve insan-dışı primatlar da uygun hayvan modelleri olsa da, bunların sık kullanılmalarında etik problemler doğabilmektedir.

1.4.3. Transgenik Hayvan Modeli

AH, transgenik hayvan modeli için uygun bir hastalıktır. Transgenik modeller var olan genetik yapıda bazı modifikasyonlar yaparak veya hedef geni değiştirerek oluşturulmaktadır. AH'nın iyi tanımlanmış davranışsal fenotipi farelerde modellenenebilir. Fareler transgenik modelleme için yaygın olarak kullanılır. Pahalı olmamaları, kısa yaşam sürelerine sahip

olmaları ve genetik modifikasyonlar geliştirmek için iyi çalışılmış hayvanlar olmaları bunda etkili olmuştur. Transgenik modelleme ratlar üzerinde de yapılabilir, fakat bu çok da yaygın değildir. Çok sayıda transgenik fare modeli geliştirilmiştir. Bu modellerin en sık kullanılanları, $A\beta$ ile ilişkili modeller (APP mutasyonları taşıyan fareler), *tau* ilişkili modeller (nörofibriller yumaklar oluşur), ApoE modelleri, sekretaz modelleri, presenilin modelleri, aksonal transport modelleri şeklindedir. Transgenik modeller dışında knock-out modelleri de Alzheimer hayvan modeli oluşturmak için kullanılmaktadır.

AH için yüksek risk ve hafıza bozukluğu oluşturacak modeller de oluşturulmaktadır. Bunlar içerisinde en yaygın olanı yüksek- yağlı beslenme ile oluşturulan demans modelidir. Yüksek-kolesterollü diyet uygulanan hayvanlarda hafıza geriliği görülmekle birlikte bu hayvanların AH için büyük risk taşıdıkları bildirilmiştir. Transgenik hayvanlarda yüksek-kolesterollü diyet uygulandığı zaman $A\beta$ birikimlerinin arttığı gözlenmiştir. Çalışmalar 90 gün boyunca yüksek-kolesterolle birlikte diğer bazı maddelerle beslenen hayvanlarda demans geliştiğini göstermiştir. Kandaki kolesterol seviyesinin beyin kolesterol seviyesini etkilediği bilinmektedir. Aşırı kolesterol tüketiminin $A\beta$ birikimini artırarak inflamatuvar cevabı tetiklediği ve oksidatif stres oluşturduğu rapor edilmiştir. Yüksek-kolesterollü diyetle demans oluşturma uzun süre gerektiren fakat AH'nın önemli özelliklerinin oluşturulabilmesi gibi avantajları olan bir modeldir.

1.5. Moleküler Doklama Metodu ile İlaç Geliştirme Çalışmaları

İlaç dizaynı ve geliştirme sürecinde bilgisayar tekniklerini kullanmak popülerite kazanmıştır. Bu tekniklerden biri olan moleküler doklama, kullanım kolaylığı sağlaması nedeniyle daha çok tercih edilmekte ve gün geçtikçe geliştirilmektedir. Birçok başarı hikayesi bulunan moleküler doklama tekniği şu ana kadar çeşitli ilaçların keşfinde kullanılmış, bundan dolayı da gösterilen ilgiyi hak etmiştir. 1995 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ilk kez bilgisayar destekli metotlarla dizayn edilen ve glokom tedavisinde kullanılan dorzolamide (Trusopt®) ilacını onaylamıştır (Pandey ve Bhatnagar, 2013). *In-silico* metotlarla dizayn edilen diğer bir ilaç da yüksek tansiyon ve diyabetten kaynaklanan kalp yetmezliği ve böbrek yetmezliğine karşı kullanılan captopril'dir (Capoten®). AIDS'e karşı kullanılan HIV1 proteaz inhibitörü nelfinavir mesilat (Viracept®) ve antibiyotik norfloksasin (Noroxin®) de moleküler doklama tekniği kullanılarak geliştirilmişlerdir (Pandey ve Bhatnagar, 2013). AH tedavisinde kullanılan ilaçlardan donepezil (Aricept®) de

yine bilgisayar destekli tekniklerle geliştirilmiştir (Eisai Firması, Japonya). Bu ilacın dizaynında hedef olarak ilk kristalize edilen torpil balığı AChE enzimi (TcAChE) esas alınmıştır (Kryger vd., 1999).

Moleküler doklama, bir ligantın reseptörle kararlı bir kompleks oluşturması için tercih edilen oryantasyonu öngörme metodudur. Doklama genelde ilaç adaylarının ilacın afinitesini ve aktivitesini tahmin etmek amacıyla hedef proteinlere karşı bağlanma oryantasyonlarını öngörmek için uygulanır. Bundan dolayı doklama ilaç dizaynı sürecinde kilit rol oynamaktadır. Moleküler doklama metoduyla bütün sistemin serbest enerjisi en aza indirilerek en iyi konformasyon elde edilmeye çalışılır (Chaudhary ve Mishra, 2016).

Küçük moleküllerin proteine bağlanma başarılarının bağlanma affinitesinden ziyade kurduğu interaksiyonların kalitesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Protein-ligant interaksiyonlarının kalitesi öncelikli olarak serbest bağlanma enerjisi ile anlaşılır. Serbest bağlanma enerjisi molekülün proteine ne kadar kolay bağlandığını ifade eder. Düşük değerler molekülün daha kolay bağlandığı anlamına gelir. Doklama çalışmalarında ikinci önemli parametre ise inhibisyon sabitidir (K_i). K_i , enzim aktivitesini yarıya düşürmek için gereken madde konsantrasyonudur. Dolayısıyla K_i 'nin düşük olması daha düşük doz ilacın gerektiği anlamına gelir. Eğer K_i , hastaya uygulanan dozun maksimum plazma konsantrasyonundan daha yüksek olursa, bu ilaç enzimin aktivitesini inhibe edemez. Bu iki parametre dışında ligant-protein interaksiyonu için önemli olan diğer parametreler şunlardır: total moleküllerarası enerji (kcal/mol), van der Waals + Hidrojen bağı + desolvasyon enerjisi, elektrostatik enerji, iç enerji, torsiyonel enerji ve bağısız sistemin enerjisi (kcal/mol) (Śledź ve Caflisch, 2018).

Ligant ve reseptörün bağlanma mekanizması ilk zamanlar Fischer tarafından ortaya atılan “anahtar-kilit teorisi”’ne dayanmaktaydı. Teoriye göre, ligant ve reseptör katı madde gibi görülüyor ve birbirlerine anahtarın kilitle uyumu gibi bağlandıkları esas alınıyordu. Daha sonra Koshland tarafından anahtar-kilit teorisi bir adım öteye götürülerek “indüklenmiş uyum modeli” ortaya atıldı. Bu modele göre ise reseptörün aktif bölgesi liganta bağlanma durumunda şekil değiştirmektedir. Bu durumda ligant ve reseptörün değişken oldukları göz önünde bulundurularak doklama yapılmaktadır. Sonuç olarak, bu teoriyle bağlanma olaylarının daha doğru gerçekleştiği düşünülmektedir (Meng vd., 2011).

AH için yeni ve daha etkili ajanların bulunması zorunlu hale gelmiştir. Bu amaçla moleküler doklama tekniğinin kullanılması etkili olabilecek binlerce ajanın sayısını onlara kadar indirebileceğinden son derece önemlidir.

1.6. Amaç

Çalışma kapsamındaki bitkiler seçilirken bitki türünün veya cinse ait diğer türlerin halk tıbbındaki yeri ve daha önce yapılan bilimsel çalışmalar esas alınmıştır. Tezin “çalışma kapsamındaki bitkiler” kısmında referanslarıyla belirtildiği üzere bitki taksonlarının seçilmesi özetle aşağıda belirtilen kıstaslara dayanmaktadır.

- ❖ *Hypericum* cinsine ait bazı türlerin halk tıbbında sedatif ve antidepresan etkileriyle bilinmesi, çeşitli bilimsel çalışmalarda antioksidan ve antikolinestrez inhibitör aktivitelerinin tespit edilmiş olması ve hayvan modelinde *H. perforatum* ekstresinin kognitif fonksiyonları geliştirdiğinin tespit edilmesi,
- ❖ Bilimsel çalışmalarda *Achillea* cinsine ait bazı türlerin antioksidan ve antinöroenflamatuvar aktivitelerinin ve *A. millefolium* ekstresinin anksiyolitik etki gösterdiğinin tespit edilmesi,
- ❖ *Nepeta* türlerinin halk tıbbında sinir sistemi hastalıklarına karşı kullanılması ve çeşitli bilimsel çalışmalarda anksiyolitik ve antioksidan etki gösterdiklerinin tespit edilmesi.

Bu bilgiler ışığında cinse ait türlerin merkezi sinir sisteminde olumlu etki gösterebilecekleri düşünülmüştür. Ayrıca, *Hypericum*, *Achillea* ve *Nepeta* cinslerine ait bazı türlerin Türkiye’de ve dünyada gıda maddesi olarak kullanılmaları dolayısıyla bu cinslerin biyolojik etkilerinin ortaya konması büyük önem taşımaktadır.

Çalışmanın amacı ülkemizde doğal yayılış gösteren *Nepeta nuda* subsp. *nuda*, *Hypericum uniglandulosum* ve *Achillea pseudoaleppica* uçucu yağlarının merkezi sinir sistemindeki etkilerinin deneysel Alzheimer modeli kullanılarak incelenmesi ve etki mekanizmaları üzerinde araştırma yapmak ve olası yeni anti-Alzheimer ajanlarını tespit etmektir. Çalışmanın özel amaçları şunlardır:

- ❖ *Nepeta nuda* subsp. *nuda*, *Hypericum uniglandulosum*, ve *Achillea pseudoaleppica* uçucu yağlarının skopolaminle oluşturulan Alzheimer hastalığı hayvan modelinde hafıza üzerindeki etkilerini tespit etmek
- ❖ *Nepeta nuda* subsp. *nuda*, *Hypericum uniglandulosum*, ve *Achillea pseudoaleppica* uçucu yağlarının skopolaminle oluşturulan Alzheimer hastalığı hayvan modelinde anksiyete ve depresyon-benzeri davranışlar üzerindeki etkilerini tespit etmek,

- ❖ *Nepeta nuda* subsp. *nuda*, *Hypericum uniglandulosum*, ve *Achillea pseudoaleppica* uçucu yağlarının deney hayvanlarında skopolamin'in yol açtığı oksidatif stres hasarı üzerindeki etkilerini tespit etmek,
- ❖ *Nepeta nuda* subsp. *nuda*, *Hypericum uniglandulosum*, ve *Achillea pseudoaleppica* uçucu yağ bileşenlerinin asetilkolinesteraz enzimi ile interaksiyonlarını teorik olarak moleküler modelleme metoduyla incelemek ve olası yeni antikolinesteraz ajanları tespit etmek.



2. MATERYAL VE METOT

2.1. Bitkilerin Toplanması

Bitki türleri Türkiye sınırları içerisinde doğal yetiştirme habitatlarından çiçeklenme döneminde toplanmıştır. Çiçeklenme dönemi farklılık göstermekte olup bu süre Mayıs-Ağustos arasındadır. Çalışmada kullanılan bitkilerin lokalite adresleri şu şekildedir:

Nuda nuda subsp. *nuda*: Bingöl-Merkez, Dikme Köyü Kuzeyi, *Quercus* orman açıklıkları, taşlık-kayalık alanlar, 1700-1800 m. (Şekil 2.1),

Hypericum uniglandulosum: Elazığ-Merkez, Cip Baraj Gölü piknik alanı, 1050 m, *Pinus* sp. altı (Şekil 2.2),

Achillea pseudoaleppica: Elazığ-Merkez, Cip Baraj Gölü piknik alanı, yamaçlar, 1050 m, (Şekil 2.3).

Çalışmada bitkilerin toprak üstü kısımları (gövde, yaprak ve çiçekler) kullanılmıştır. Bitkiler Fırat Üniversitesi Herbaryumu'nda (FÜH) teşhisleri yapıldıktan sonra gölgede kurutulmuşlardır.



Şekil 2.1. *Nepeta nuda* subsp. *nuda* 'nın genel görünüşü



Şekil 2.2. *Hypericum uniglandulosum*'un genel görünüşü



Şekil 2.3. *Achillea pseudoaleppica*'nın genel görünüşü

2.1.1. Uçucu Yağların Elde Edilmesi

Kimyasal analizler için kurutulmuş bitki örneklerinden su distilasyonu (hidrodistilasyon) yöntemiyle Clevenger aparatı kullanılarak (3 saat) uçucu yağlar elde edilmiştir (**Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**) (Kilic ve Bağcı, 2016). Uçucu yağlar kullanim zamanına kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 2.4. Clevenger apareyi ile uçucu yağ eldesi

2.1.2. Kimyasal Analizler

Uçucu yağ bileşenlerinin kimyasal teşhisi ve karakterizasyonu HP-5MS kolonu (30 m x 0.25 mm i.d., film kalınlık, 0.25 μ m) ve dedektörlü GC-MS (Agilent 5973 N) ve GC-FID (Agilent 6890 GC) ile Fırat Üniversitesi Bitki Ürünleri ve Biyoteknoloji araştırma laboratuvarı'nda yapılmıştır. Örnek bölerek enjekte edilmiş ve oranı 1:100'dür. GC fırın sıcaklığı 2 dakika boyunca 70°C'de tutulmuş ve 10°C/dak oranında 150°C'ye programlanmış ve sonra 15 dakika boyunca 150°C'de tutulmuş ve 5°C/dak oranıyla 240°C'ye çıkarılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak helyum 1 ml/dak akış hızında kullanılmıştır. MS 70 eV'de ve kütle aralığı 35-425 olarak alınmıştır. Retensiyon indeksi (RI) hesaplanmasında alkanlar referans olarak kullanılmıştır. Bileşenlerin tanımlanması kütle spektrumlarının elektronik Wiley ve Nist laboratuvarları ile kıyaslanmasına dayanmaktadır (Yüce vd., 2016). Bulgular tablolar halinde (Tablo 3.1, Tablo 3.2, Tablo 3.3) verilmiştir.

2.2. Deney Hayvanları ve Hayvan Modeli Oluşturulması

2.2.1. Deney Grupları

Deneyin başlangıcında 70 adet 250+/- 50 g ağırlığında olan 3 aylık dişi Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır (Şekil 2.5). Hayvan sayısı 7 rat/ grup olarak belirlenmiştir. Hayvanlar oda sıcaklığında (22°C) ve 12-saat döngülü aydınlatmalı odada tutulup yiyecek ve içeceğe serbestçe ulaşmaları sağlanmıştır (*ad libitum*) (Hancianu vd., 2013). Sıçanlar 10 gruba ayrılmıştır. Bu gruplar aşağıdaki şekildedir:

Kontrol grubu: Yalnızca salin ve çözücü olan tween 20 (%1) uygulandı;

Skopolamin grubu (Sko): Yalnızca skopolamin ve çözücü olan tween 20 (%1) uygulandı;

Pozitif kontrol 1: Antidepresan ilaç olan Tramadol (TRM) uygulandı (yalnızca zorunlu yüzme testinde);

Pozitif kontrol 2: Anksiyolitik ilaç olan Diazepam (DIA) uygulandı (yalnızca yükseltilmiş artı labirentinde);

Sko+ HYP %1: Skopolamin uygulamasına ilaveten *Hypericum uniglandulosum* (HYP %1) uçucu yağı uygulandı;

Sko+ HYP %3: Skopolamin uygulamasına ilaveten *Hypericum uniglandulosum* (HYP %3) uçucu yağı uygulandı;

Sko+ ACH %1: Skopolamin uygulamasına ilaveten *Achillea pseudoaleppica* (ACH %1) uçucu yağı uygulandı;

Sko+ ACH %3: Skopolamin uygulamasına ilaveten *Achillea pseudoaleppica* (ACH %3) uçucu yağı uygulandı;

Sko+ NPT %1: Skopolamin uygulamasına ilaveten *Nepeta nuda* subsp. *nuda* (NPT %1) uçucu yağı uygulandı;

Sko+NPT %3: Skopolamin uygulamasına ilaveten *Nepeta nuda* subsp. *nuda* (NPT %3) uçucu yağı uygulandı.

Kontrol, skopolamin, pozitif kontrol 1 ve pozitif kontrol 2 grupları aynı şartlarda kafeslendi fakat uçucu yağ uygulanmadı. Çalışma için Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (FÜHADYEK) izni alınmıştır (04.11.2015 tarih ve 180 nolu karar) ve hayvanlar Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (FÜDAM) temin

edilmiştir. Davranış deneyleri toplam 35 gün sürmüştür. En son testin (zorunlu yüzme testi) ardından hayvanlar dekapite edilmiştir.



Şekil 2.5. Deney gruplarının bazıları (kontrol, sko, sko+NPT%1 ve sko+NPT%3)

2.2.2. İlaç Uygulaması

Sıçanlara intraperitonel (*i.p*) 1.5 mg/kg skopolamin hidrobromür (Sigma-Aldrich) uygulanmıştır. Skopolamin hidrobromür izotonik bir çözelti (% 0.9 NaCl) içerisinde çözüldü. Bu uygulama günde 1 kez olmak üzere skopolamin grubuna ve uçucu yağ uygulanan gruplara yapılmıştır (Şekil 2.6). Skopolamin uygulaması uçucu yağ uygulamasından yaklaşık 30 dakika önce ve yalnızca test günlerinde uygulanmıştır (toplam 7 gün). Davranış testlerine ise skopolamin uygulamasından 45 dakika sonra başlanmıştır (Cioanca vd., 2015).



Şekil 2.6. Enjeksiyon işlemi

Nefes alma aparatı plexiglas hazneden oluşur (50 cm ×40 cm×18 cm). Kullanılan iki hazneden bir tanesi kontrol ve yalnız- skopolamin uygulanan hayvanlara, diğeri ise deneysel hayvanlara ayrılmıştır. Uçucu yağ %1 Tween 20 (v/v) ile seyreltildi. Deney grubu hayvanları ardışık 21 gün boyunca ve 15'er dakikalık periyotlarla yağ buharına maruz bırakıldı (200 µL, %1 ya da %3). Hazneler uygulama öncesinde %10'luk etanol çözeltisi ile temizlendi (Aydın vd., 2015).

2.2.3. Davranış Testleri

2.2.3.1. Y-labirenti Testi

Y-labirenti üç koldan (35 cm uzunluğunda, 25 cm yüksekliğinde ve 10 cm genişliğinde) ve eşkenar üçgen merkezi alanından oluşmaktadır (Şekil 2.7). Sırasıyla sıçanlar labirentin merkez kısmına konulmuş ve labirenti 8 dakika boyunca serbestçe dolaşmaları sağlanmıştır. Sıçanın arka patileri tamamen labirent kolunun içinde olduğu zaman o kola girdiği kabul edilmiştir. Spontan değişim davranışı, sıçanların labirent kollarının üçüne peşpeşe girmesi olarak (ABC, ACB, BCA gibi) tanımlanmıştır. Maksimum spontan değişim davranışı ise giriş yapılan toplam kol sayısı eksi (-) 2 olarak ve yüzde

spontan değişim ise (mevcut değişim / maksimum değişim) X 100 olarak hesaplanmıştır. Labirent bir sonraki hayvan test edilmeden önce %10 etanol çözeltisi ile temizlenmiş ve kağıt havlu ile kurulanmıştır. Spontan değişim davranışı, bir çeşit kısa-sürelili hafıza olan spasyal işleyen hafızayı (spatial working memory) yansıtmaktadır (Postu vd., 2017).

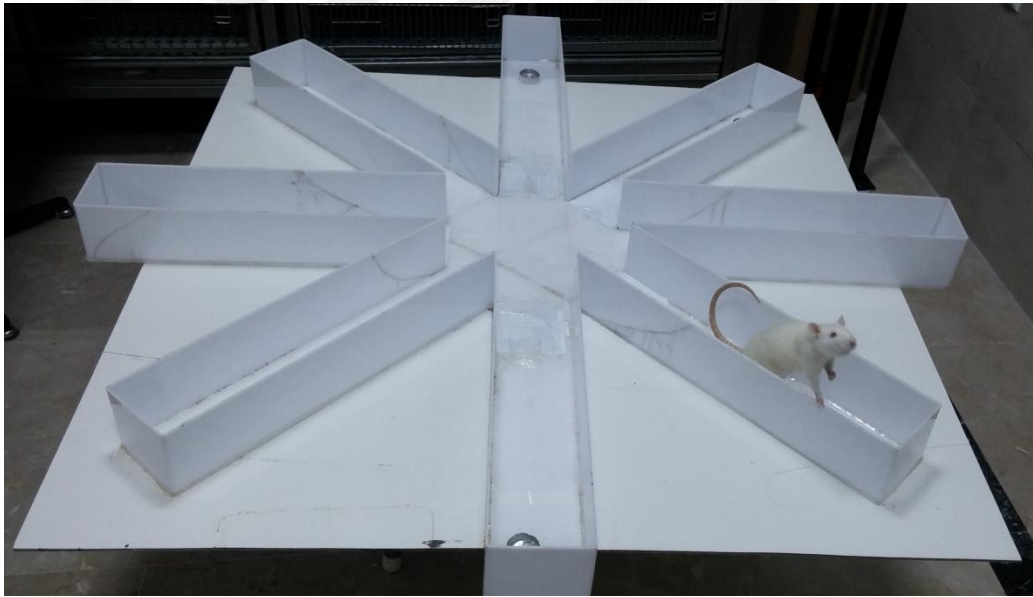


Şekil 2.7. Y-labirenti testi

2.2.3.2. Radyal-Kol Labirenti Testi

Radyal 8 kol labirenti merkezi alandan (32 cm çapında) radyal olarak uzanan 1’den 8’e kadar numaralandırılmış (48 x 12 cm) 8 adet koldan oluşmaktadır (Şekil 2.8). Aparat yerden 50 cm yüksek bir alana konulmuştur. Her kolun uç kısmına içinde 50 mg’lık yiyecek olan kap konulmuştur. Labirent testine başlamadan önce, hayvanlar sınırlı diyetle beslenmişler ve ağırlıklarının yaklaşık % 15’ini kaybetmişlerdir. Su, *ad libitum* olarak verilmiştir. Gerçek teste başlamadan önce, ratlar grup olarak labirente konulmuş ve 5 dakika boyunca labirenti keşfetmeleri ve yiyecekleri yemeleri için izin verilmiştir. Başlangıçta yiyecek kabı dolu olurken, zamanla azaltılmıştır. Bu işlem 4 gün boyunca devam etmiştir. Hayvanların serbestçe labirent kollarında gezmeleri ve yiyecekleri yemeleri için beklenmişlerdir. Eğitim bütün yiyecekler bitene kadar veya 5 dakika geçene kadar

sürmüştür. Test günlerinde ise, her hayvan tek başına labirentin merkezine konmuş ve her zaman aynı 5 kola yiyecek konulmuş (nolar. 1, 2, 4, 5 ve 7), diğer kollara yiyecek konulmamıştır. Yiyecekler her hayvan için tazelenmiştir. Sıçanın 4 uzvu labirent kolunun içinde olduğu zaman o kola girdiği kabul edilmiştir. Hesaplamalar, işleyen hafıza hataları sayısı (yiyecek içeren fakat daha önce girilmiş kola girmek) ve referans hafıza hataları sayısı (yiyecek olmayan kola girmek) şeklinde olmuştur. Labirent bir sonraki hayvan test edilmeden önce %10 etanol çözeltisi ile temizlenmiş ve kağıt havlu ile kurulanmıştır. Referans hafıza, her tekrarda sabit kalan bilgiye dair uzun-süreli hafıza olarak değerlendirilirken (yiyecekli kolların pozisyonunun hafızada kalması), işleyen hafıza kısa - süreli hafıza olarak ele alınmıştır, çünkü her denemede hatırlanacak olan bilgi değişmektedir (her denemede girilmiş olan kolların pozisyonuna dair hafıza) (Bagci vd., 2015).



Şekil 2.8. Radyal kol labirenti testi

2.2.3.3. Yükseltilmiş Artı-labirenti Testi

Yükseltilmiş artı-labirentindeki davranış anksiyete, keşfetme ve motor davranışını değerlendirmek için kullanılmaktadır. Artı-labirenti dört koldan oluşmaktadır. Kollar, 49 cm uzunluğunda ve 10 cm genişliğinde olup, labirent yerden 50 cm yüksekte olacak şekilde metal ayaklara sahiptir (Şekil 2.9). İki kol 30 cm yüksekliğinde duvarlar ile kapatılmış, diğer iki kol ise üstü açık durmaktadır. Her sıçan labirentin merkezinde ve açık olan kola bakacak şekilde yerleştirilmiştir. 5 dakika boyunca davranışları gözlemlenmiş ve açık ve kapalı olan kolları geçirdiği zaman ve bu kolları giriş sayısı kaydedilmiştir. Açık kolları geçirdikleri zaman yüzdesi (açık kolları geçirdiği zaman / bütün kolları geçirdiği zaman x 100) hesaplanmıştır. Hayvanların bütün uzuvları bir kolun içerisinde olduğu zaman o kola girmiş kabul edilmiştir ve hayvanın merkezi alanda bulunduğu zaman dikkate alınmamıştır. Her test sonrası zemin % 10'luk etanolle temizlenmiştir (Cioanca vd., 2014).



Şekil 2.9. Yükseltilmiş artı labirenti testi

2.2.3.4. Zorunlu Yüzme Testi

Bitki ekstraktının potansiyel antidepresan etkileri zorunlu yüzme testi ile değerlendirilmiştir. Deneylerin ilk gününde (ön test seansı) sıçanlar bireysel olarak $26\pm1^{\circ}\text{C}$ su dolu havuza (30 cm çapında, 59 cm yüksekliğinde) bırakılmıştır (Şekil 2.10). Hayvanlar 15 dakika yüzmeye bırakılmış, daha sonra kurulanıp kafeslerine götürülmüşlerdir. Bu prosedür 24 saat sonra 6 dakikalık yüzme seansında (test seansı) tekrarlanmıştır. Test seansı boyunca, şu davranışlar kaydedilmiştir: (1) hareketsizlik (başı suyun dışında tutmak için yapılan hareketlerle geçirilen süre); (2) yüzme (aktif yüzme hareketleri ile geçirilen süre) (Beppe vd., 2015).



Şekil 2.10. Zorunlu yüzme testi

2.2.4. Biyokimyasal Analizler

Davranış deneylerini takiben sıçanlar gece boyunca aç bırakılmış ve her sıçan eter anestezisi altında dekapite edilerek bütün beyinleri çıkarılmıştır. Hipokampus ve amigdala örnekleri ayrıldıktan ve soğuk ($+4^{\circ}\text{C}$) potasyum fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra kurutma kağıdı ile kurutulmuş ve derhal sıvı azot tankına aktararak hızla donmaları sağlanmıştır. Dokular analiz zamanına kadar -80°C 'de saklanmıştır. Analiz öncesinde

dokuların kuru ağırlıkları tartılarak kaydedilmiş ve dokular küçük parçalara ayrılarak homojenizatör ile (Kema Keur, model pro 200, Pro Sci. Inc., ABD) soğuk 0.1 M potasyum fosfat tamponu (pH 7.4) içerisinde (1:9,w:v), 16000 rpm’de 2 dakika homojenize edilmiştir. Hazırlanan bu homojenatlar +4°C’de 30 dakika süreyle 16000 rpm’de santrifüj edilerek süpernatantları ayrılmıştır.

Dokularda asetilkolinesteraz (AChE) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri ve indirgenmiş glutatyon (GSH) seviyeleri Eliza kitleriyle (Rel Assay, MEGA Tıp Grup) kit içeriklerine uygun olarak ve malondialdehit (MDA) seviyeleri ise manuel metotla çalışılmıştır.

2.2.4.1. AChE, SOD Aktivitesi ve GSH Miktarı Ölçümü

Eliza kiti reaktifleri uygulamadan yaklaşık 30 dakika önce çıkarılarak oda sıcaklığına getirilmiştir. Yıkama tamponu kit manuelinde belirtildiği gibi seyreltilmiştir. Kitle birlikte verilen standart stok çözelti seyreltilerek standart çözeltiler hazırlanmıştır. Numuneler ve standart çözeltiler kuyucuklara 50 µl olarak sırayla yüklenmiştir. Ardından 50 µl antijen yüklenmiş ve 37°C’de 60 dakika inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda yıkama tamponu ile 3 kez yıkama yapılmıştır. Standart ve numune kuyucuklarına 50 µl avidin-HRP yüklenmiş ve tekrar 37°C’de 60 dakika inkübasyon yapılmıştır. Ardından ikinci kez yıkama işlemleri yapılmış ve renkli A ve B çözeltileri yüklenip 10 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. 50 µl sonlandırma çözeltisinin yüklenmesinin ardından 450 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Ölçüm sonunda değerler u/gram doku cinsinden yazılmıştır.

2.2.4.2. MDA Seviyesi Ölçümü

Öncelikle tampon çözelti hazırlamak için 0,42 g Tris bazı, 1,43 g Tris-HCl, 3 g KCl, 0,5 ml Tween 20, 250 ml distile suda çözülmüştür. 1 g. doku üzerine 5 ml tampon çözelti olacak şekilde homojenize edilmiştir. Homojenat 5000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmından 1 ml başka bir tüpe alınmıştır. Üzerine 1 ml %10’luk tiyobarbitürik asit (TBA), 1 ml distile su ve 0.5 ml %4’lük HCl ilave edildikten sonra bu karışım 90°C’de 120 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında oda sıcaklığına kadar soğutulan tüplere 3 ml bütanol eklenmiştir. Daha sonra, tüpler 5000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiş ve oluşan bütanol faz spektrofotometrede 532 nm’de okutulmuştur.

Absorbans değeri ise okunan absorbans + 0,0344/ 0,0492 formülüne göre hesaplandıktan sonra 5 ile çarpılmıştır (Cetin vd., 2015).

2.2.5. İstatistiksel Analizler

Bütün bulgular ortalama $\pm$ standart hata (S.E.M.) olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler tek-yönlü ANOVA kullanılarak yürütülmüştür. Buna ek olarak gruplar arasındaki farklılıklar Tukey's *post hoc* testi ile GraphPad 6 programı kullanılarak elde edilmiştir. Radyal kol labirenti testinde gruplar arasındaki farklılığın belirtilmesi için tekrarlı ölçümler (repeated measures) XLSTAT 2015 programı kullanılarak hesaplanmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

2.2.6. Moleküler Doklama Metodu ile Biyoinformatik Analizler

Moleküler doklama çalışmaları için, Protein Data Bank (PDB) 'den alınan PDB ID: 4M0F dosyası (Cheung vd., 2013) kullanılmıştır. Moleküler doklama işlemi, NAMD (Phillips vd., 2005) ve AutoDock4 (Huey vd., 2007) ile birlikte bir moleküler modelleme paketi olan VEGA ZZ (Pedretti vd., 2004) kullanılarak gerçekleştirildi.

Enerji minimizasyonu ve ligant-protein doklama gibi makromoleküler yapıların simülasyonlarını yapmak için bütün-atom moleküler mekaniği, doklama ve elektrostatik hesaplamalar için açık hidrojen atomları gereklidir. Protonlanma durumu problemi sadece düşük çözünürlüklü X-ışını yapılarıyla değil, aynı zamanda yüksek çözünürlüklü yapılarla da ortaya çıkmaktadır (Labute, 2009). Bu durum, proteinin PDB yapısının düzenlenmesini gerektirmektedir. Bu amaçla, proteinin koordinatları normalize edilmiş ve hidrojen atomları eklenmiştir. Ardından kalan birkaç protonasyon problemi manuel yöntemlerle tespit edilmiş ve düzeltilmiştir. Kompleksin kristal yapısını optimize etmek için öncelikle PDB-REDO sunucusu kullanılmıştır. PDB-REDO, yeniden yapılandırma ve doğrulama için otomatik bir karar verme sistemi oluşturan algoritmalar sağlayan kristalografik yapı modellerini optimize etmek için kullanılan bir prosedürdür (Joosten vd., 2014). Sonunda, düzenlenmiş yapı, NAMD ile gerçekleştirilen bir enerji minimizasyon prosedürüne tabi tutulmuştur.

Kristalize edilmiş yapılar içerisinde enzim-territrem-B kompleksinin seçilmesi uygun bulunmuştur, çünkü territrem B'nin bağlanması hem katalitik, hem de periferik bölgeleri kapsamaktadır. Territrem-B ligantı, yeni molekülleri yerleştirmek amacıyla yeterli alan

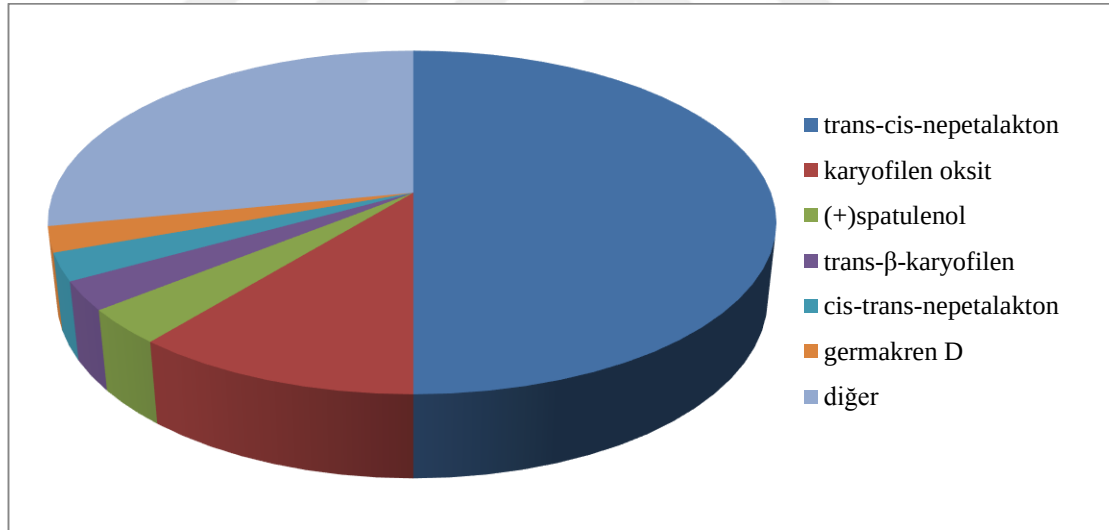
oluşturmak için uzaklaştırılmıştır. Bileşiklerin yapıları PubChem Bileşik Veritabanından alınmıştır. Moleküler doklama prosedürü için GriDock / AutoDock ile birlikte VEGA ZZ modelleme yazılımı kullanılmıştır ve AChE yapısı, su moleküllerini ortadan kaldırmak, AMBER atom tiplerini saptamak, atom yüklerini sabitlemek, apolar hidrojenleri çıkarmak ve molekülü PDBQT formatında saklamak suretiyle ön işleme tabi tutulmuştur. Moleküler doklama bulguları için görüntüler PyMOL ile işlenmiş ve protein ile ligant etkileşimleri arasındaki non-kovalent etkileşimler PLIP (Protein-Ligand Etkileşim Profilcisi) ile analiz edilmiştir (Salentin vd., 2015).



3. BULGULAR

3.1. Uçucu Yağların Kimyasal Kompozisyonu

Nepeta nuda subsp. *nuda* çiçekli örneklerinden su distilasyonu yöntemi ile elde edilen uçucu yağ kompozisyonu Tablo 3.1’de ve bu sonuçlar kromatogramlar şeklinde Şekil 3.2’de verilmektedir. Bitki örneğine ait uçucu yağ verimi 0.7 ml’ dir. Bitki örneğinden elde edilen uçucu yağda toplam 44 bileşen saptandı. Bu bileşenler toplam yağın %90.1’ini oluşturmaktadır. Bu analizde, major bileşen 4 α ,7 α ,7 β -nepetalakton (*trans-cis*-nepetalakton) (%50.0)’ dir. Diğer major bileşenler karyofilen oksit (%10.9), (+)spatulenol (%3.3), *trans*- β karyofilen (%2.7), 4 α ,7 α ,7 α -nepetalakton (*cis-trans*-nepetalakton) (%2.6) ve germakren D (%2.4) dir. Major bileşenlerin uçucu yağdaki dağılımı Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Bu ana bileşenler toplam yağın %71.9’unu oluşturmaktadır.

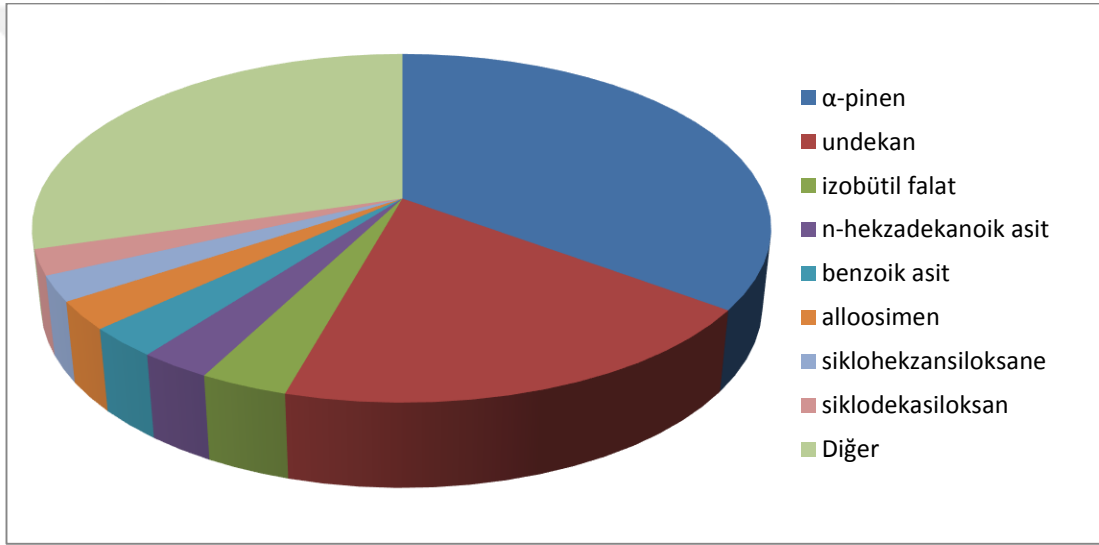


Şekil 3.1. *Nepeta nuda* subsp. *nuda* uçucu yağının majör bileşenlerinin dağılımı

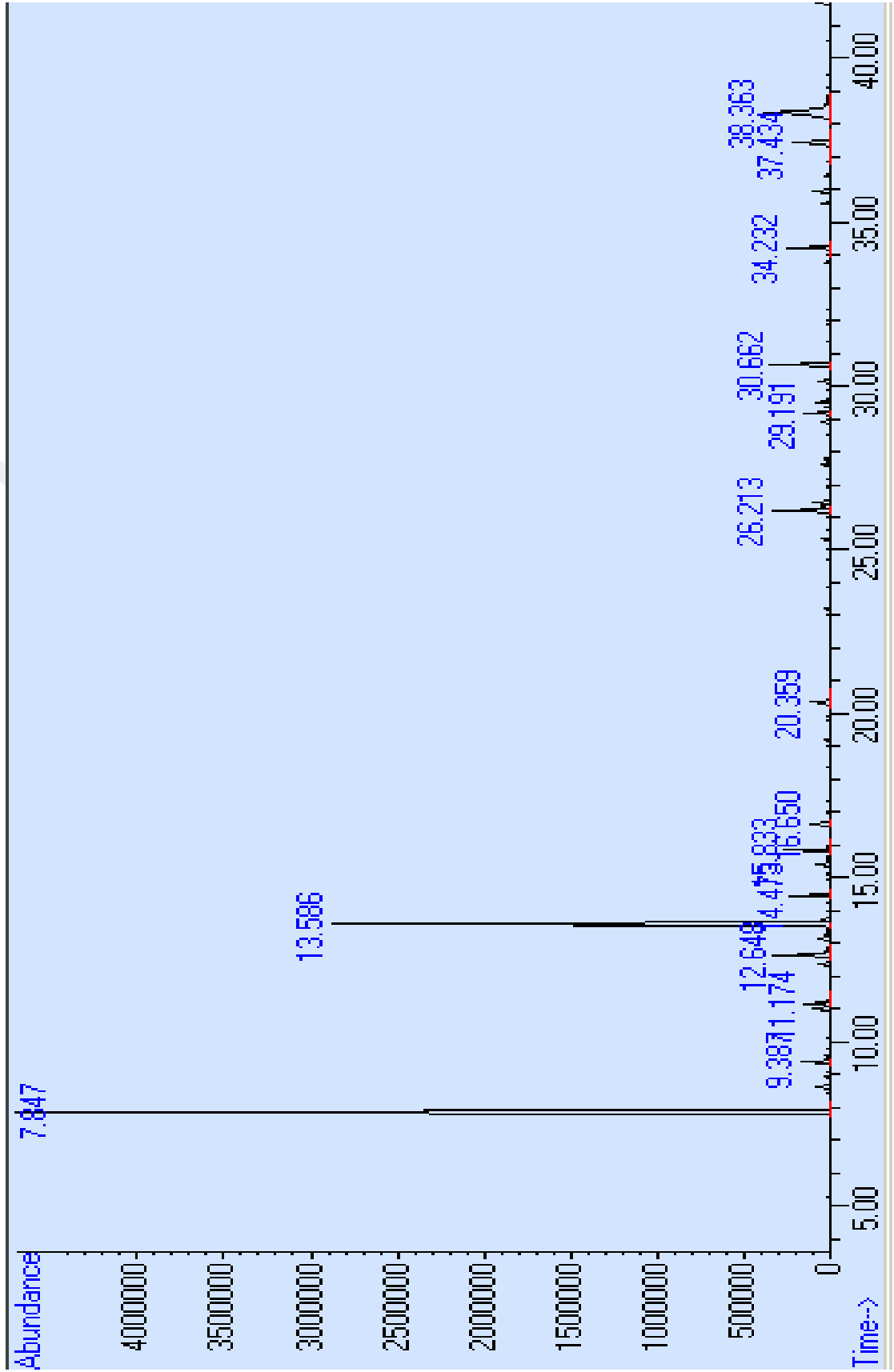
Tablo 3.1. *Nepeta nuda* subsp. *nuda* uçucu yağının GC-MS analizi, yüzde oranı ve PubChem numaraları

NO	Bileşenler	RI	<i>Nepeta nuda</i> ssp <i>nuda</i> % oran	PubChem CID
1	1-Okten-3-ol	1056	0.3	18827
2	1-Asetilsiklohekzen	1092	0.1	13612
3	Ökaliptol	1097	1.8	2758
4	Linalol	1147	0.1	6549
5	Norinon	1175	0.2	10313167
6	<i>Trans</i> -Pinocarveol	1177	0.1	88302
7	4-Terpineol	1204	0.2	11230
8	Metil salisilat	1212	0.1	4133
9	<i>m</i> -Mentha 1,8 dien	1215	0.3	91746479
10	Cis-3-hekzenil izovalerat	1241	0.1	5367681
11	4α,7α,7α-Nepetalakton	1348	2.6	161367
12	α -Kubeben	1358	0.4	42608159
13	β -Bourbonen	1365	1.9	62566
14	4α,7α,7β-Nepetalakton	1380	50.0	442430
15	α -Gurjunen	1384	0.4	15560276
16	<i>Trans</i>-β-Karyofilen	1393	2.7	5281515
17	β -Kubeben	1399	0.2	93081
18	(<i>Z</i>) β -Farnesen	1414	0.2	5317319
19	α -Humulen	1417	0.8	5281520
20	Aromadendren	1420	0.3	91354
21	(+) <i>Epibisikloseskifellandren</i>	1426	0.1	91747125
22	γ -Kadinen	1430	0.1	6432404
23	Germakren D	1434	2.4	5373727
24	Germakren B	1444	0.2	5281519
25	β -Bisabolen	1451	0.8	10104370
26	α -Amorfen	1455	0.2	101708
27	1-Endobourbonalol	1457	0.5	6430727
28	α -Kalamenen	1459	0.2	10224
29	β -Seskifellandren	1461	0.3	12315492
30	Elemol	1477	0.3	92138
31	α -Bergomoten	1479	0.9	86608
32	1,5 Epoksisalvial 4(14) en	1489	0.5	85669481
33	Palustrol	1490	0.8	110745
34	(+)<i>Spatulenol</i>	1496	3.3	92231
35	Karyofilen oksit	1499	10.9	1742210
36	γ -Gurjunen	1504	0.5	15560285
37	Ledol	1511	1.9	11074994
38	Nor-kopaanon	1520	0.5	-
39	Karyofilladienol II	1528	0.3	527418
40	α -Kadinol	1538	1.5	10398656
41	İzoaromadendren epoksit	1573	0.4	534398
42	Perhidrofarnesil aseton	1630	0.3	10408
43	<i>n</i> -Hekzadekanoik asit	1691	0.2	985
44	Fitol	1791	0.2	5366244
	TOPLAM		90.1	

H. uniglandulosum çiçekli örneklerinden su distilasyonu yöntemi ile elde edilen uçucu yağ kompozisyonu Tablo 3.2’de ve bu sonuçlar kromatogram şeklinde Şekil 3.4’te verilmektedir. Bitki örneğine ait uçucu yağ verimi 0.5ml’ dir. Bitki örneğinden elde edilen uçucu yağda toplam 29 bileşen saptanmıştır. Bu bileşenler toplam yağın %90.3’ ünü oluşturmaktadır. Bu analizde, ana bileşen α -pinen (%35.6)’dir. Diğer ana bileşenler undekan (%19.4), izobütil ftalat (%3.6), *n*-hekzadekanoik asit (%2.8), benzoik asit (%2.9), allosimen (%2.7), sikloheksasiloksan (%2.7) ve β -pinen (%2.4)’dir. Ana bileşenlerin uçucu yağdaki dağılımı Şekil 3.3’te gösterilmiştir. Bu ana bileşenler toplam yağın %72.1’ini oluşturmaktadır.



Şekil 3.3. *Hypericum uniglandulosum* uçucu yağının majör bileşenlerinin dağılımı

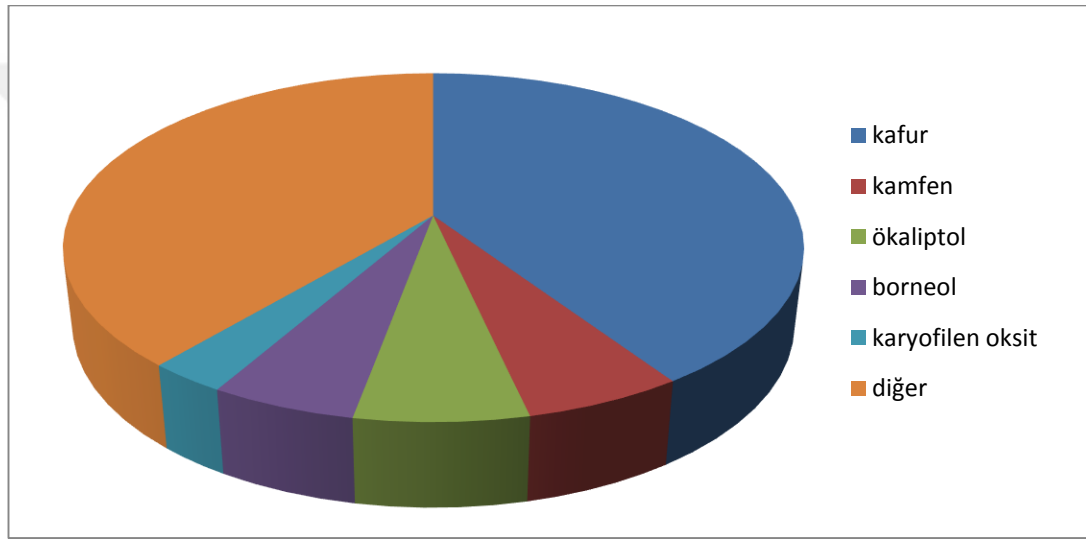


Şekil 3.4. *Hypericum uniglandulosum* uçucu yağının GC kromatogramı

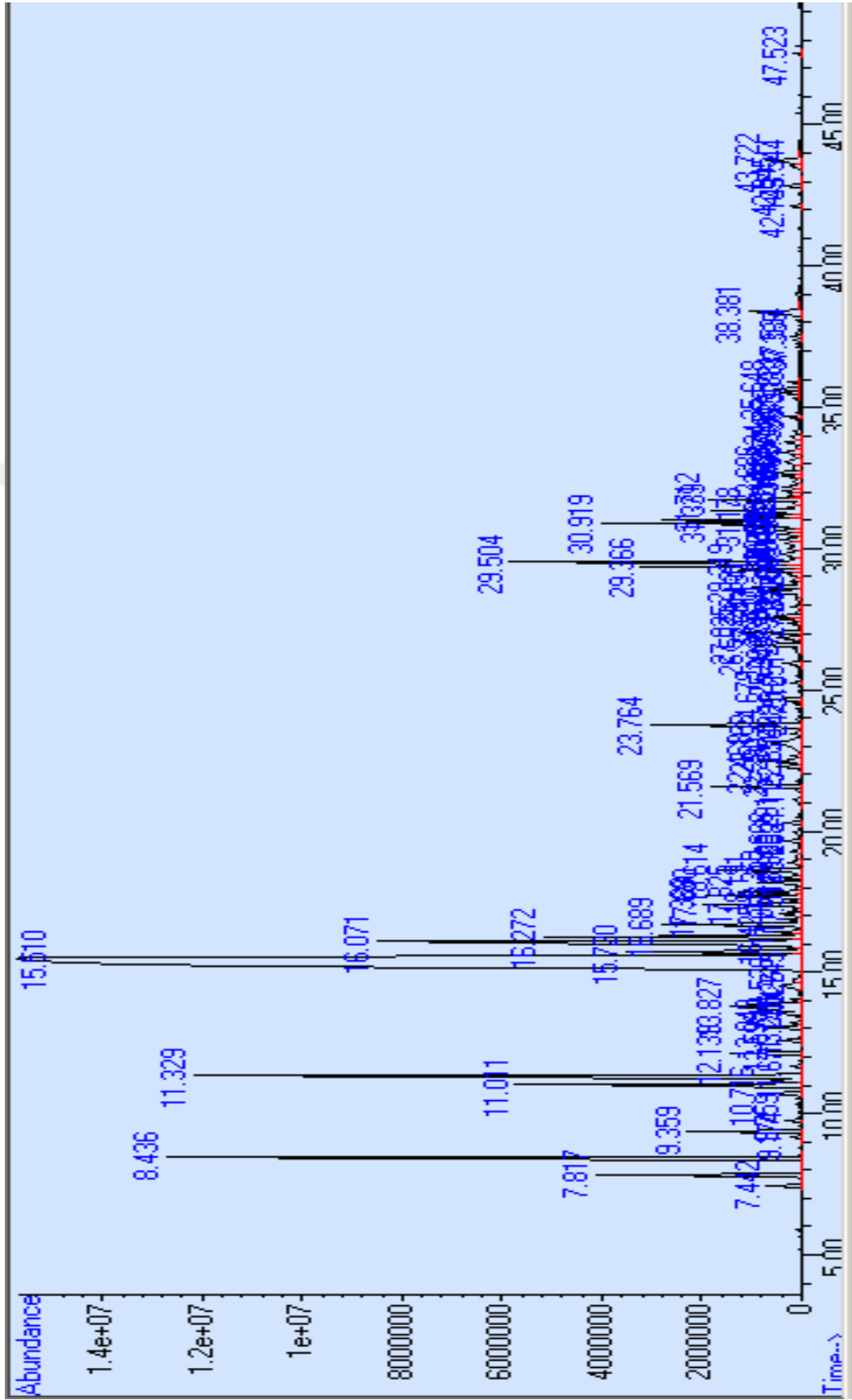
Tablo 3.2. *Hypericum uniglandulosum* uçucu yağının GC-MS analizi, yüzde oranı ve PubChem numaraları

NO	Bileşenler	RI	<i>H. uniglandulosum</i> % oran	PubChem CID
1	α-Pinen	1021	35.6	6654
2	β-Pinen	1055	2.4	14896
3	Sülkaton	1060	1.3	9862
4	<i>p</i> -Simen	1091	1.3	7463
5	Limonen	1095	1.9	22311
6	α -Terpinolen	1137	0.5	11463
7	Undekan	1148	19.4	14257
8	Allosimen	1167	2.7	5368821
9	α -Terpineol	1215	0.9	17100
10	α -Kopaen	1360	0.4	19725
11	Aromadendren	1406	1.6	91354
12	Sikloheksasiloksan	1425	2.7	10911
13	γ -Kadinen	1430	2.1	6432404
14	α -Amorfen	1456	0.4	101708
15	Cis-Kalamenen	1460	0.4	10224
16	Dodekanoik asit	1486	0.3	3893
17	3-Hekzen-1-ol	1491	1.9	5281167
18	Spatulenol	1495	1.5	92231
19	Karyofilen oksit	1498	0.7	1742210
20	Siklododekan	1512	0,6	9268
21	İzobütil ftalat	1637	3.6	6782
22	Benzoik asit	1523	2.9	243
23	Tetradekanoik asit	1592	0.3	11005
24	Benzilbenzoat	1596	0.3	2345
25	2- Pentadekanon	1631	0.5	61303
26	Siklotetradekan	1650	0.9	67524
28	<i>n</i>-Hekzadekanoik asit	1689	2.8	985
29	Trikosan	1903	0.4	12534 veya chemspider ID 12017
TOPLAM			90.3	

A. pseudoaleppica çiçekli örneklerinden su distilasyonu yöntemi ile elde edilen uçucu yağ kompozisyonu Tablo 3.3'te ve bu sonuçlar kromatogram şeklinde Şekil 3.6'da verilmektedir. Bitki örneğine ait uçucu yağ verimi 0.7 ml'dir. Bitki örneğinden elde edilen uçucu yağda toplam 67 bileşen saptandı. Bu bileşenler toplam yağın %92.5'ini oluşturmaktadır. Bu analizde, major bileşen kafur (%40.6)'dır. Diğer ana bileşenler kamfen (%5.9), ökaliptol (%6.4), borneol (%5.4) ve (-) karyofilen oksit (%2.9)'tir. Ana bileşenlerin uçucu yağdaki dağılımı Şekil 3.5'te gösterilmiştir. Bu ana bileşenler toplam yağın % 61.2'sini oluşturmaktadır.



Şekil 3.5. *Achillea pseudoaleppica* uçucu yağının majör bileşenlerinin dağılımı



Tablo 3.3. *Achillea pseudoaleppica* uçucu yağının GC-MS analizi, yüzde oranı ve PubChem numaraları

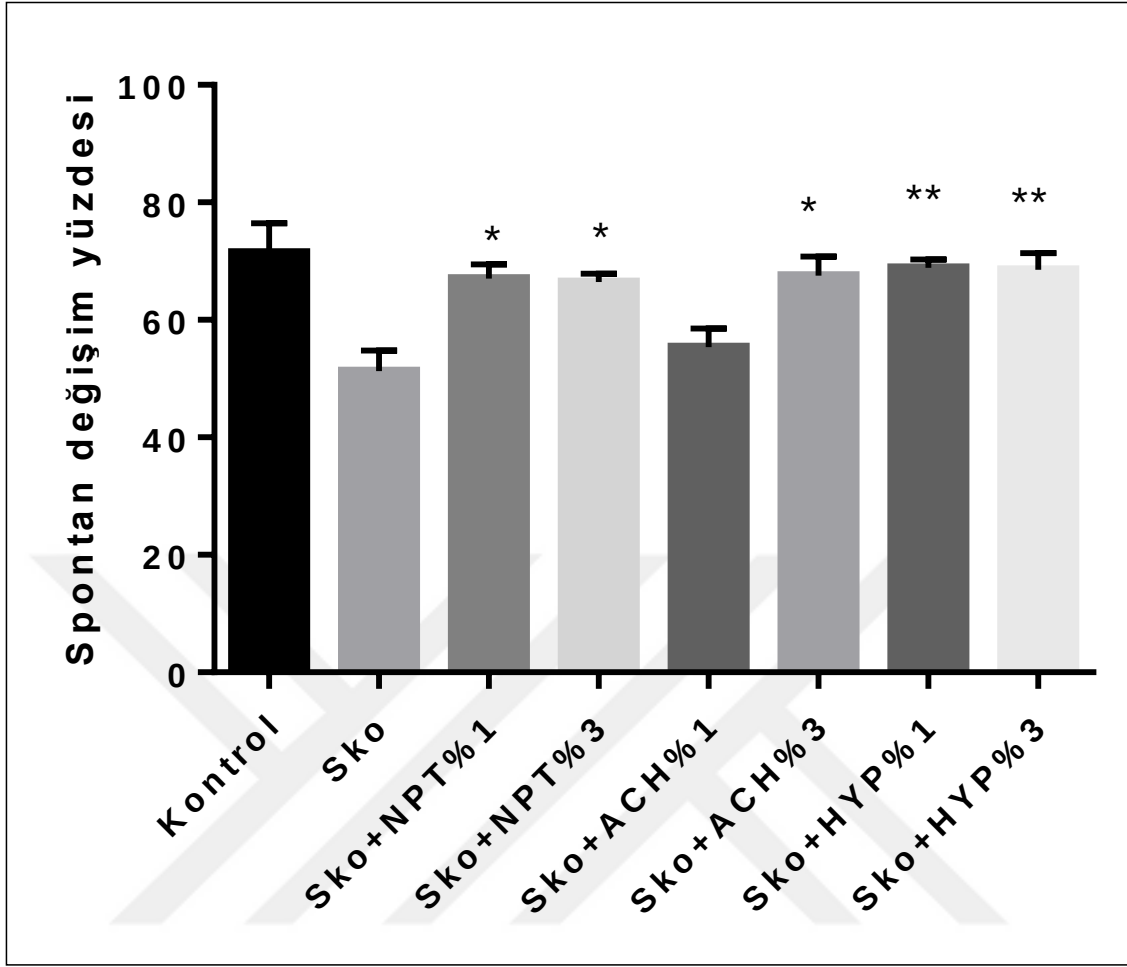
NO	Bileşenler	RI	<i>A. pseudoaleppica</i> % oran	PubChem CID
1	2-Hekzanal	964	0.1	12297 (hekzanol) veya 5281168 (hekzanal)
2	İzopentil asetat	978	0.3	31276
3	2-Metil bütül asetat	980	0.1	12209
4	Trisiklen	1013	0.2	79035
5	α - Tujen	1015	0.2	12444322
6	α - Pinen	1021	1.4	6654
7	Kamfen	1035	5.9	6616
8	Verbenen	1037	0.1	6427476
9	Benzaldehit	1043	0.2	240
10	Sabinen	1051	0.1	18818
11	β -Pinen	1055	0.9	14896
12	Amil vinil karbinol	1057	0.1	18827
13	2-Amilfuran	1064	0.1	19602
14	α - Terpinen	1085	0.3	7462
15	<i>p</i> -Simen	1091	2.2	7463
16	Limonen	1095	0.3	22311
17	Ökalyptol	1099	6.4	2758
18	Salisilal	1106	0.1	6998
19	γ -Terpinen	1116	0.6	7461
20	Epoksilinalol	1126	0.2	22310
21	α - Terpinolen	1136	0.3	11463
22	2- Dehidrokamfor	1145	0.1	193498
23	Linalol	1153	0.9	6549
24	α - Kamfenal	1169	0.4	98497
25	Kafur	1190	40.6	2537
26	Pinokarvon	1195	1.5	121719
27	4-Metillbensensülfonat	1197	0.1	85570
28	Borneol	1203	5.4	64685
29	İzopinokamfon	1204	0.1	84532
30	4-Terpineol	1207	1.9	11230
31	Metil asetofenon	1209	0.1	11340
32	<i>m</i> -Menta-1,8 dien	1216	1.3	10354
33	Karveol-1	1232	0.8	330573
34	<i>Cis</i> -Karveol	1241	0.6	330573
35	<i>L</i> -Karvon	1249	0.4	439570
36	(-) Bornil Asetat	1282	0.2	6448
37	Kuminol	1288	0.3	325
38	Timol	1295	0.1	6989
39	<i>Cis</i> -Karveol asetat	1324	0.9	7335
40	<i>m</i> -Öjenol	1339	0.2	596375
41	Nepetalakton	1347	0.3	92770
42	<i>Trans</i> -Geraniol	1360	0.2	637566
43	β -Bourbonen	1365	0.1	62566
44	<i>Cis</i> -Jasmon	1372	1.8	1549018
45	β -Karyofilen	1392	0.9	5281515
46	Geranil aseton	1411	0.1	1549778
47	α -Humulen	1417	0.3	5281520
48	Aromadendren	1420	0.2	91354
49	β -İyonon	1432	0.1	638014
50	Germakren- D	1434	0.4	5373727

Tablo 3.3'ün devamı

51	Bisiklogermakren	1443	0.6	13894537
52	γ - Muurolen	1455	0.2	12313020
53	Bornil izovalerat	1457	0.3	60968
54	Nerolidol	1484	0.1	5284507 (<i>trans</i>) veya 5320128 (<i>cis</i>)
55	1,5-Epoksisalvial 4(14) en	1488	0.2	85669481
56	Spatulenol	1495	1.5	92231
57	(-) Karyofilen oksit	1498	2.9	1742210
58	α -Guaien	1505	0.2	5317844
59	Karyofilladienol II	1529	1.6	527418
60	(+)Epibisiklosesquifellandren	1531	1.1	91747125
61	13-Tetradekanolit	1535	0.7	543405
62	α -Kadinol	1538	0.9	10398656
63	Perhidrofarnesil aseton	1630	0.1	10408
64	15-Hekzadekanolid	1633	0.3	543385
65	İzobütil ftalat	1638	0.1	6782
66	<i>n</i> -Hekzadekanoik asit	1693	0.7	985
67	9,12,15 Oktadekatrienal	1810	0.6	5283384
TOPLAM			92.5	

3.2. Uçucu Yağların Hafıza Üzerindeki Etkilerinin Y-labirentinde Değerlendirilmeleri

Uçucu yağların spasyal hafıza üzerindeki etkileri öncelikli olarak Y-labirentinde değerlendirilmiştir. İstatistiki analizler tek-yönlü ANOVA kullanılarak yapılmıştır. Tek-yönlü ANOVA spontan değişim yüzdesinde (Şekil 3.7) genel olarak bütün gruplar arasında ($F(7,48) = 5.42$, $p=0.0004$) anlamlı farklılıklar ortaya koymuştur. Gruplar arasındaki farklılıklar Tukey's *post hoc* analizi ile değerlendirilmiştir. Tukey's *post hoc* analizi kontrol ve sko arasında ($p < 0.001$), sko ve sko+NPT %1 arasında ($p=0.0204$), sko ve sko+NPT %3 arasında ($p= 0.0283$), sko ve sko+ACH %3 arasında ($p= 0.0154$), sko ve sko+HYP %1 arasında ($p= 0.0070$), sko ve sko+HYP %3 arasında ($p= 0.0085$) istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar ortaya koymuştur. Uygulanan uçucu yağlar arasında spontan değişim yüzdesinde istatistiki olarak en büyük farklılık yalnız skopolamin uygulanan gruba (sko) nazaran sko+HYP %1 ve sko+HYP %3 gruplarında gözlenmiştir.



Şekil 3.7. Uçucu yağların Y-labirentinde spontan değişim yüzdesi üzerindeki etkileri. Değerler ortalama $\pm$ SEM (n = 7 hayvan/ grup). Yalnız-skopolamin uygulanan gruba (Sko) kıyasla, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

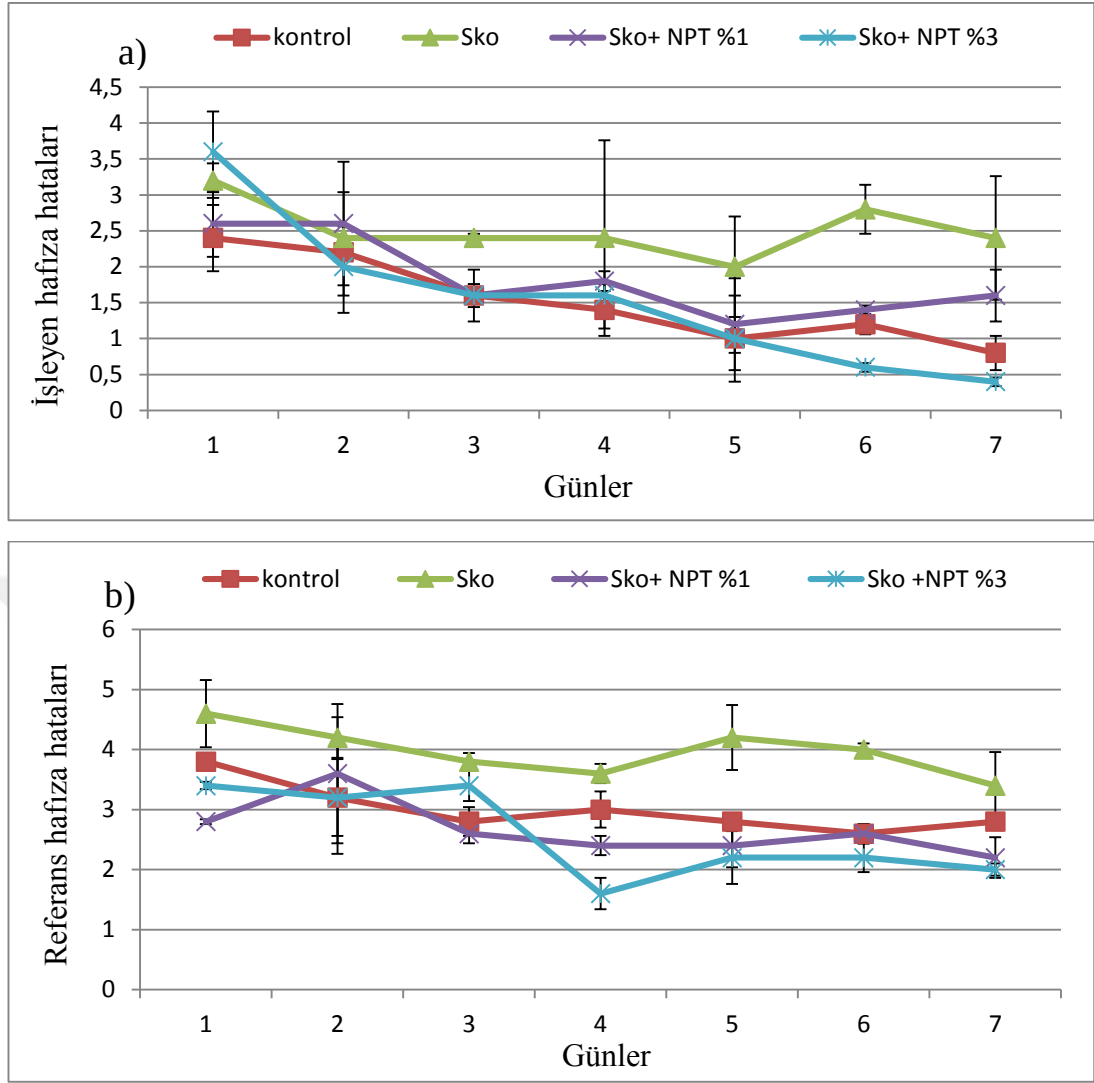
Görüldüğü gibi, *N. nuda* subsp. *nuda*, *A. pseudoaleppica* ve *H. uniglandulosum* uçucu yağları uygulanmış sıçanlarda, yalnızca skopolamin uygulanan sıçanlara kıyasla istatistiki olarak anlamlı fark elde edilmiştir. *A. pseudoaleppica* uçucu yağı %1 uygulanan ratlarda ise spontan değişim davranışında yalnız-skopolamin uygulanan gruba göre istatistiki olarak anlamlı fark görülmemiştir.

H. uniglandulosum uçucu yağı uygulanan deney hayvanlarında diğer uçucu yağların uygulandığı hayvanlara göre spontan değişim davranışı daha yüksek görülmektedir. *H. uniglandulosum* uçucu yağının %1 ve %3 dozları arasında ise spontan değişim yüzdesinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Spontan değişim davranışındaki bu etki, söz konusu uçucu yağların spasyal hafıza üzerinde anlamlı etkileri hakkında bilgi vermektedir.

3.3. Uçucu Yağların Hafıza Üzerindeki Etkilerinin Radyal Kol Labirentinde Değerlendirilmeleri

Uçucu yağların spasyal hafıza üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla uygulanan diğer bir test ise radyal kol labirenti testidir. Uçucu yağ uygulanan deney hayvanı gruplarına ait bulgular kolaylık olması açısından ayrı ayrı grafikler üzerinde gösterilmiştir. Kontrol ve yalnız-skopolamin uygulanan gruplar ise bütün grafiklerde gösterilmiştir. *Nepeta nuda* subsp. *nuda* uçucu yağı uygulanan gruplar Şekil 3.8’de gösterilmiştir. Tek-yönlü ANOVA işleyen hafıza hatalarında genel olarak bütün gruplar arasında anlamlı farklılıklar [$F(3,24)= 3.07, p=0,0456$] göstermiştir. Tukey’s *post doc* analizi ise kontrol ve Sko arasında ($p=0,0271$) ve Sko ve Sko+NPT%3 arasında ($p=0,0341$) anlamlı farklılıklar göstermiştir. Referans hafıza hataları için tek-yönlü ANOVA bütün gruplar arasında genel anlamlı farklılıklar gösterirken [$F(3,24)= 12.14, p<0,0001$], Tukey’s *post hoc* analizinde kontrol ve Sko arasında ($p=0,0009$), Sko ve Sko+NPT%1 arasında ($p<0,0001$), Sko ve Sko+NPT%3 arasında ($p<0,0001$) anlamlı farklılıklar elde edilmiştir.

Tekrarlı ölçümlü-ANOVA radyal kol labirentinde işleyen hafıza hataları için anlamlı zaman ve grup farklılığı [$F(18,112)= 3.55, p<0.0001$] ortaya koymuştur. Referans hafıza hataları için ise anlamlı zaman farklılığı [$F(6,112)= 2.10, p=0.0590$] ve anlamlı grup farklılığı ($F(3,112)= 14.94, p<0.0001$) elde edilmiştir.

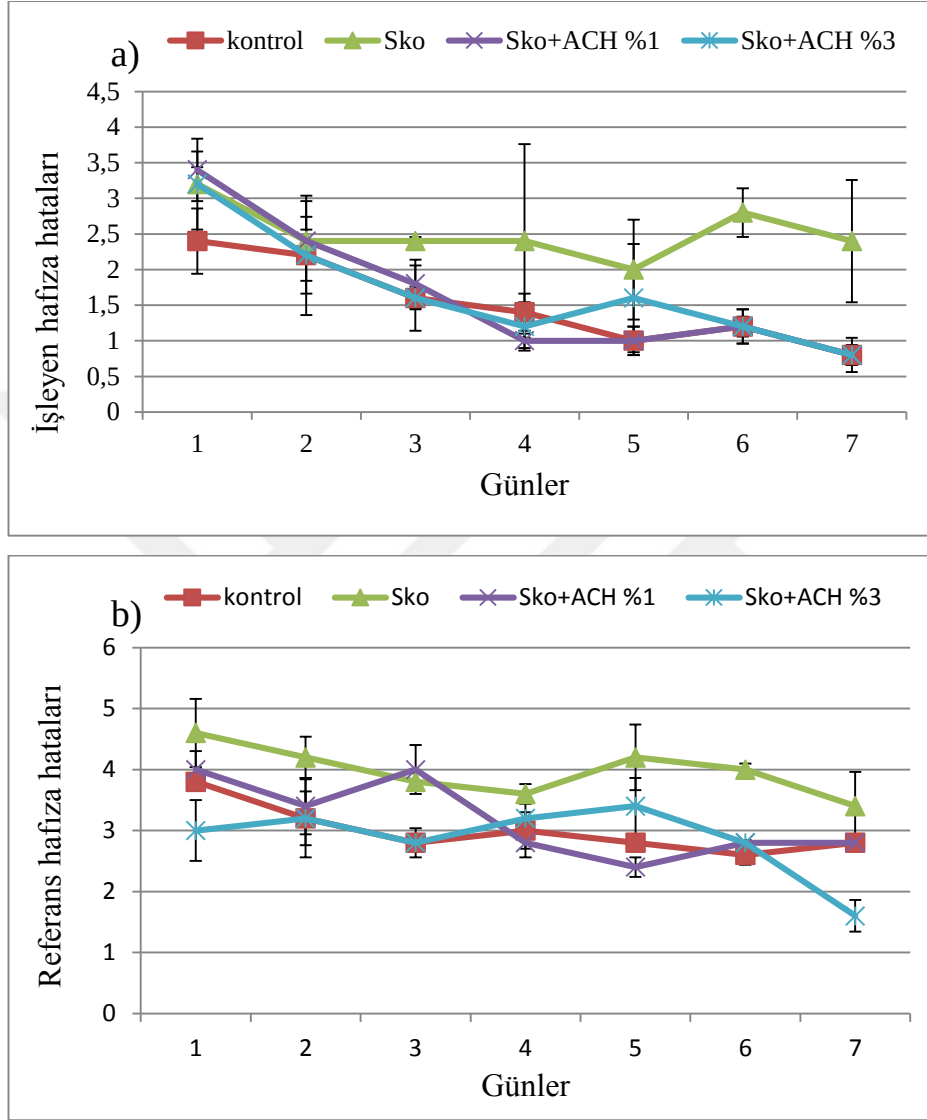


Şekil 3.8. *Nepeta nuda* subsp. *nuda* uçucu yağının radyal-kol labirentinde hafıza üzerindeki etkisi. Değerler ortalama $\pm$ SEM (n = 7 hayvan/ grup). Yalnız-skopolamin uygulanan gruba (Sko) kıyasla, a) işleyen hafıza hataları; sko ve sko+NPT%3 arasında ($p < 0,05$) b) referans hafıza hataları; sko ve sko+NPT%1 arasında ($p < 0,0001$), sko ve sko+NPT%3 arasında ($p < 0,0001$)

Achillea pseudoaleppica uçucu yağı uygulanan gruplar Şekil 3.9’da gösterilmiştir. Tek-yönlü ANOVA işleyen hafıza hataları için anlamlı grup farklılığı göstermezken, referans hafıza hataları için genel bir grup farklılığı [$F(3,24) = 6.38$, $p = 0.0035$] elde edilmiştir. Tukey’s post hoc analizinde ise kontrol ve Sko arasında ($p = 0.0050$), Sko ve Sko+ACH%1 arasında ($p = 0.0440$), Sko ve Sko+ACH%3 arasında ($p = 0.0025$) anlamlı farklılıklar elde edilmiştir.

Tekrarlı ölçümlü-ANOVA radyal kol labirentinde işleyen hafıza hataları için anlamlı farklılıklar göstermemektedir. Referans hafıza hataları için ise tekrarlı ölçümlü-ANOVA

anlamli zaman farkliligi [$F(6,112)= 1.96, p=0.0780$] ve anlamli grup farkliligi ($F(3,112)= 7.99, p<0.0001$) ortaya koymaktadır.

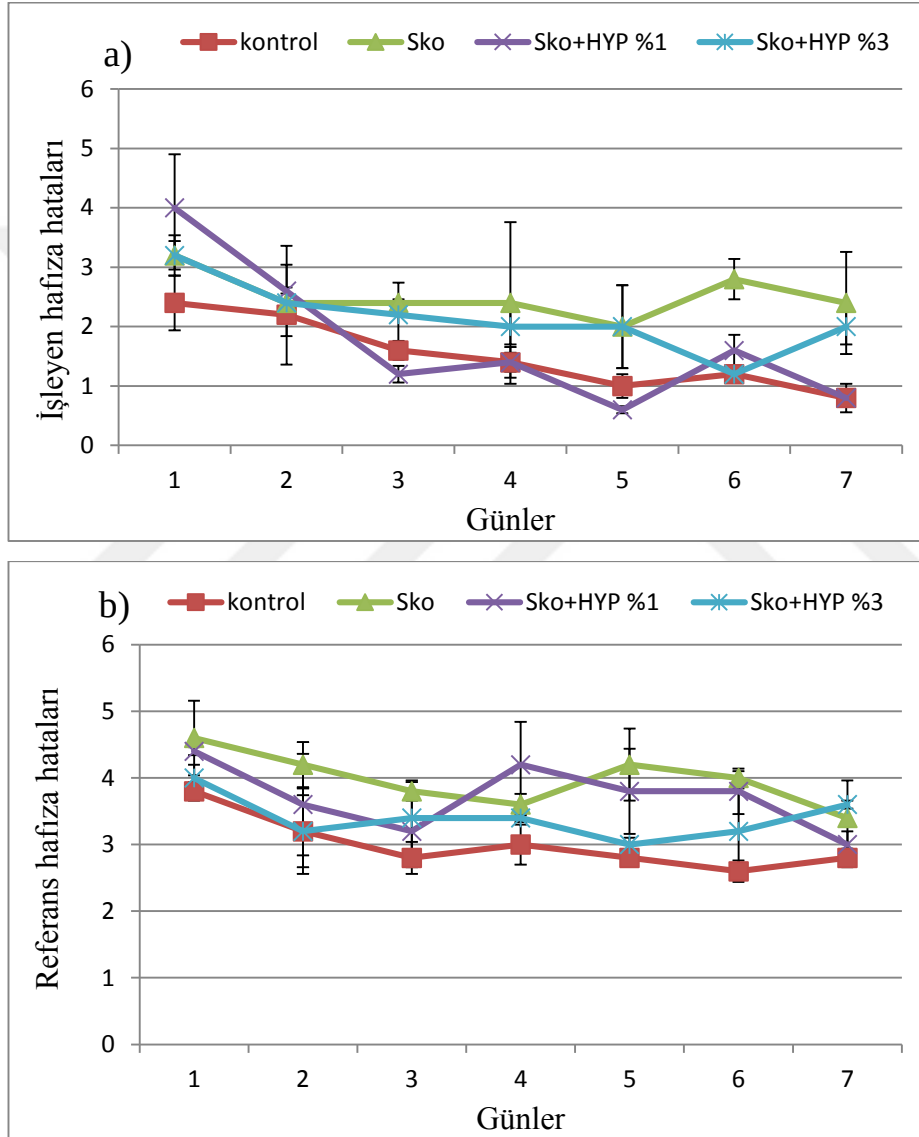


Şekil 3.9. *Achillea pseudoaleppica* uçucu yağının radyal-kol labirentinde hafıza üzerindeki etkisi. Değerler ortalama $\pm$ SEM (n = 7 hayvan/ grup). Yalnız-skopolamin uygulanan gruba (Sko) kıyasla, a) işleyen hafıza hataları, b) referans hafıza hataları; sko ve sko+ACH%1 arasında ($p<0.05$), sko ve sko+ACH%3 arasında ($p<0.005$)

Hypericum uniglandulosum uçucu yağı uygulanan gruplar Şekil 3.10’da gösterilmiştir. Tek-yönlü ANOVA işleyen hafıza hatalarında anlamli farklılık göstermezken, referans hafıza hatalarında genel anlamli farklılıklar [$F(3,24)=7.18, p=0.0007$] elde edilmiştir. Tukey’s *post hoc* analizi ise kontrol ve sko arasında ($p=0.0006$), kontrol ve sko+HYP%1

arasında ($p=0.0009$), sko ve sko+HYP%3 arasında ($p=0.0236$) anlamlı farklılıklar göstermiştir.

Tekrarlı ölçümlü-ANOVA radyal kol labirentinde işleyen hafıza hataları için anlamlı farklılıklar göstermemektedir. Referans hafıza hataları için ise anlamlı zaman ve grup farklılığı [$F(18,112)= 1.69$, $p=0.0510$] ortaya koymuştur.



Şekil 3.10. *Hypericum uniglandulosum* uçucu yağının radyal-kol labirentinde hafıza üzerindeki etkisi. Değerler ortalama $\pm$ SEM ($n = 7$ hayvan/ grup). Yalnız-skopolamin uygulanan gruba (Sko) kıyasla, a) işleyen hafıza hataları, b) referans hafıza hataları; kontrol ve sko+HYP%1 arasında ($p<0.001$), sko ve sko+HYP%3 arasında ($p<0.05$)

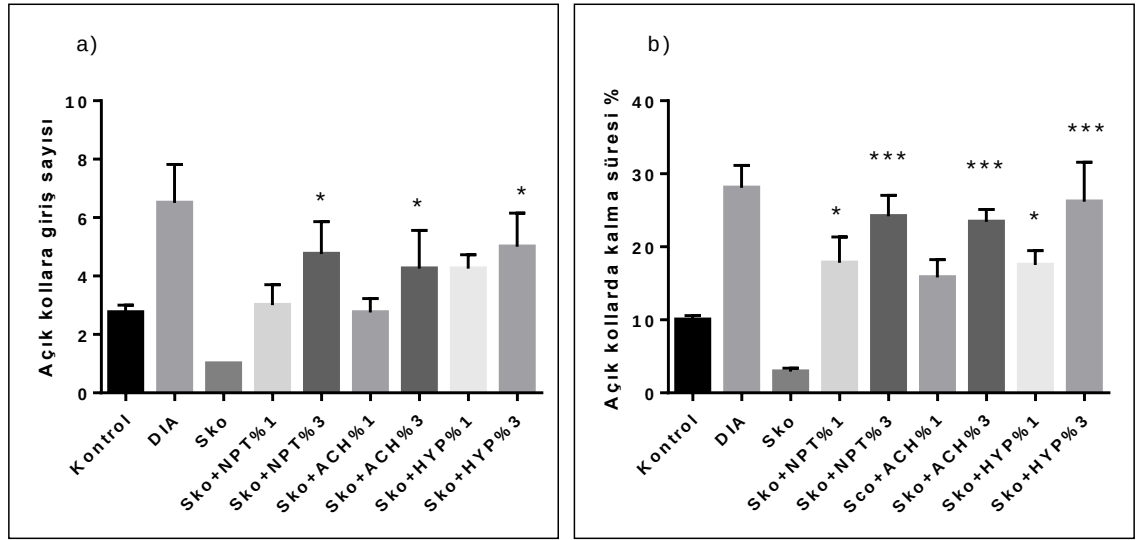
Görüldüğü gibi referans hafıza hatalarında bütün gruplar arasında anlamlı farklılıklar görülürken işleyen hafıza hatalarında anlamlı farklılıklar görülmemiştir. Uçucu yağların uzun süreli hafızada daha etkili olduğu, kısa süreli hafızada test grupları arasında yalnızca *N. nuda* subsp. *nuda* uçucu yağının etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

3.4. Uçucu Yağların Anksiyete Üzerindeki Etkileri

Nepeta nuda subsp. *nuda*, *Achillea pseudoaleppica*, *Hypericum uniglandulosum* uçucu yağlarının anksiyete üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla yükseltilmiş artı labirenti testi uygulanmıştır. Şekil 3.11a'da görüldüğü üzere, yükseltilmiş artı labirentinde ANOVA, açık kollara giriş sayısında genel olarak anlamlı etki [$F(8,54)=3.30$, $p=0.0093$] ortaya koymuştur. Ayrıca Tukey's *post hoc* analizi DIA ve sko arasında ($p=0.0042$), sko ve sko+NPT %3 arasında ($p=0.0460$), sko ve sko+ACH %3 arasında ($p=0.0438$), sko ve sko+HYP %3 arasında ($p=0.0346$) anlamlı farklılıklar ortaya koymuştur.

Şekil 3.11b'de görüldüğü üzere, yükseltilmiş artı labirentinde ANOVA, açık kollarda kalma süresi yüzdesinde genel olarak anlamlı etki [$F(8,54)=8.22$, $p<0.0001$] ortaya koymuştur. Ayrıca, Tukey's *post hoc* analizi kontrol ve DIA arasında ($p=0.0032$), kontrol ve Sko+NPT %3 arasında ($p=0.0346$), kontrol ve sko+HYP %3 arasında ($p=0.0105$), DIA ve sko arasında ($p<0.0001$), Sko ve Sko+ NPT%1 arasında ($p=0.0224$), Sko ve Sko+ NPT%3 arasında ($p=0.0004$), Sko ve Sko+ ACH%3 arasında ($p=0.0007$), Sko ve Sko+ HYP %1 arasında ($p=0.0273$), Sko ve Sko+ HYP %3 arasında ($p<0.0001$) anlamlı farklılıklar ortaya koymuştur.

Uçucu yağların anksiyete üzerindeki anlamlı etkileri yükseltilmiş artı labirentiyle ortaya konmuştur. Uçucu yağlar, özellikle de %3'lük konsantrasyonları, skopolamin'in yol açtığı anksiyete davranışını azaltmıştır. Bununla birlikte pozitif kontrol olan diazepam grubunda her iki parametrede de daha yüksek değerler gözlenmiş olup, diazepam'ın daha güçlü bir anksiyolitik ajan olduğu görülmektedir.

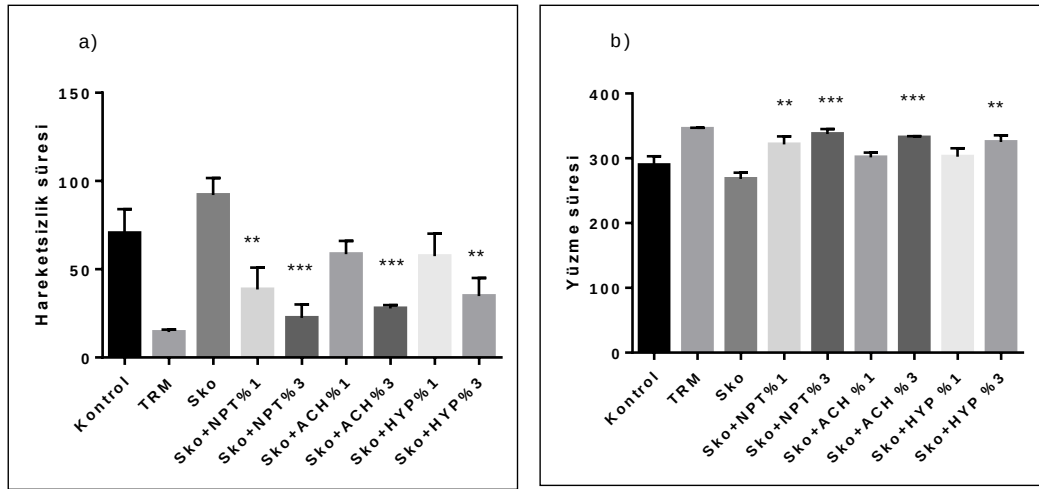


Şekil 3.11. Uçucu yağların yükseltilmiş artı labirentinde anksiyete üzerindeki etkileri. Değerler ortalama ± SEM (n=7 hayvan/ grup). Yalnız-skopolamin uygulanan gruba (Sko) kıyasla, a) açık kollara giriş sayısı; * $p<0.05$, b) açık kollarda kalma süresi yüzdesi; * $p<0.05$, *** $p<0.0005$

3.5. Uçucu Yağların Depresyon Üzerindeki Etkileri

Uçucu yağların depresyon üzerindeki etkileri zorunlu yüzme testiyle değerlendirilmiştir. Zorunlu yüzme testinde hareketsizlik süresi ve yüzme süresi olmak üzere 2 parametre kullanılmıştır. Hareketsizlik süresinde (Şekil 3.12) ANOVA gruplar arasında genel olarak anlamlı farklılıklar [$F(8,54)= 6.94$, $p<0.0001$] ortaya koymuştur. Ayrıca Tukey's *post hoc* analizi kontrol ve TRM arasında ($p=0.0055$), kontrol ve Sko+NPT%3 arasında ($p=0.0266$), TRM ve Sko arasında ($p<0.0001$), Sko ve Sko+NPT%1 arasında ($p=0.0093$), Sko ve Sko+NPT%3 arasında ($p=0.0003$), Sko ve Sko+ACH%3 arasında ($p=0.0010$), Sko ve Sko+HYP%3 arasında ($p=0.0043$) anlamlı farklar tespit etmiştir.

Zorunlu yüzme testinde yüzme süresinde (Şekil 3.12b) de ANOVA genel olarak anlamlı etki [$F(8,54)= 6.94$, $p<0.0001$] ortaya koymuştur. Ayrıca Tukey's *post hoc* analizi kontrol ve TRM arasında ($p=0.0055$), kontrol ve Sko+NPT%3 arasında ($p=0.0266$), TRM ve Sko arasında ($p<0.0001$), Sko ve Sko+NPT%1 arasında ($p=0.0093$), Sko ve Sko+NPT%3 arasında ($p=0.0003$), Sko ve Sko+ACH %3 arasında ($p=0.0010$), Sko ve Sko+HYP %3 arasında ($p=0.0043$) anlamlı farklılıklar tespit etmiştir.



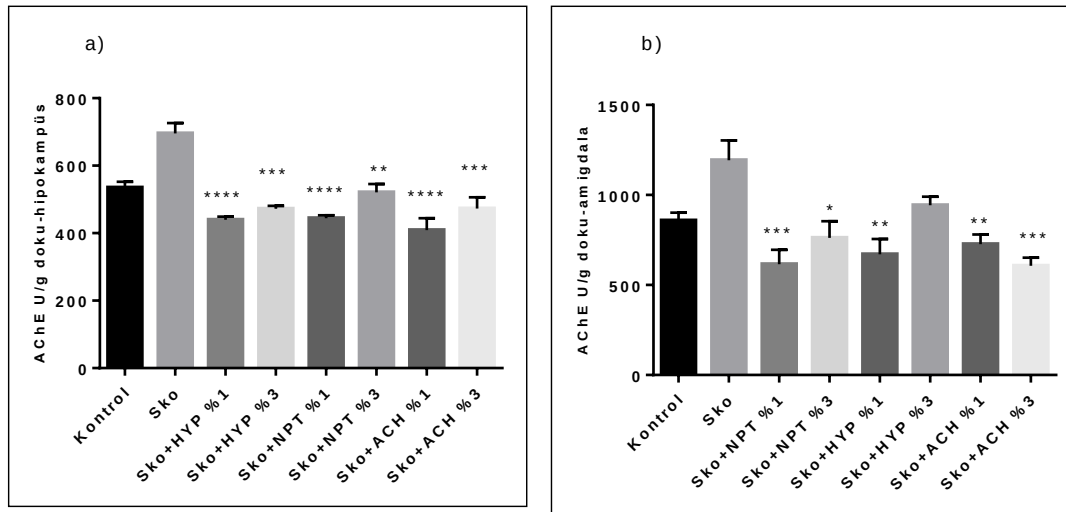
Şekil 3.12. Uçucu yağların zorunlu yüzme testinde depresyon üzerindeki etkileri. Değerler ortalama $\pm$ SEM (n=7 hayvan/grup). Yalnız-skopolamin uygulanan gruba (Sko) kıyasla, a) hareketsizlik süresi; ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, b) yüzme süresi; ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

Uçucu yağların (özellikle de %3'lük konsantrasyondaki) antidepresan etkileri gösterilmiştir. Antidepresan ajan olan diazepam'ın etkisi daha fazla olmakla birlikte, uçucu yağ uygulanan gruplar kontrol grubuna nazaran daha güçlü etkiler göstermişlerdir.

3.6. Uçucu Yağların AChE Aktivitesi Üzerine Etkileri

Biyokimyasal testler sıçanların hipokampus ve amigdala homojenatlarında ayrı ayrı incelenmiştir. Tek-yönlü ANOVA hipokampus homojenatlarında AChE aktiviteleri için gruplar arasında genel anlamlı farklılıklar [$F(7, 48) = 14.55, p<0.0001$] ortaya çıkarmıştır (Şekil 3.13). Ayrıca, Tukey's *post hoc* analizi her bir grup arasındaki istatistiki farkları belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Buna göre kontrol ve Sko arasında ($p=0.0036$), kontrol ve Sko+ACH%1 arasında ($p=0.0273$), Sko ve Sko+HYP%1 arasında ($p<0.0001$), Sko ve Sko+HYP%3 arasında ($p=0.0001$), Sko ve Sko+NPT%1 arasında ($p<0.0001$), Sko ve Sko+NPT%3 arasında ($p=0.0016$), Sko ve Sko+ACH%1 arasında ($p<0.0001$), Sko ve Sko+ACH%3 arasında ($p=0.0001$) anlamlı farklılıklar bulunmuştur.

Sıçan amigdala homojenatlarında ise tek-yönlü ANOVA gruplar arasında genel anlamlı farklılıklar [$F(7, 48) = 7.23, p=0.0005$] tespit etmiştir. Tukey's *post hoc* analizine göre ise Sko ve Sko+NPT%1 arasında ($p=0.0009$), Sko ve Sko+NPT%3 arasında ($p=0.0135$), Sko ve Sko+HYP%1 arasında ($p=0.0024$), Sko ve Sko+ACH%1 arasında ($p=0.0070$), Sko ve Sko+ACH%3 arasında ($p=0.0008$) anlamlı farklar bulunmuştur.



Şekil 3.13. Uçucu yağların beyin dokularında AChE aktivitesi üzerine etkileri. Değerler ortalama $\pm$ SEM (n=7 hayvan/grup). Yalnız-skopolamin uygulanan gruba (Sko) kıyasla, a) hipokampus, ** $p=0.0016$, *** $p<0.0005$, **** $p<0.0001$, b) amigdala homojenatı, * $p=0.0135$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

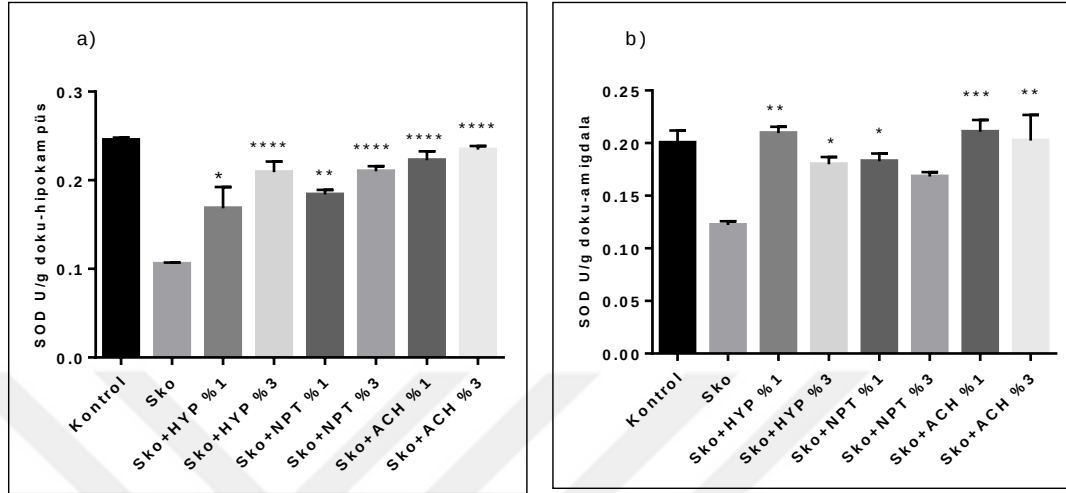
Uçucu yağların sıçan hipokampus ve amigdala bölgelerinde AChE inhibitör aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir. AChE aktiviteyi skopolamin uygulaması ile artarken, solunumla alınan uçucu yağlar sıçanda AChE aktivitesinin azaldığı görülmüş, kontrol grubuna yakın değerler elde edilmiştir.

3.7. Uçucu Yağların SOD Aktivitesi Üzerine Etkileri

SOD aktivitesi için hipokampus homojenatlarında tek-yönlü ANOVA genel bir grup farklılığı [$F(7, 48) = 17.73, p<0.0001$] tespit etmiştir (Şekil 3.14). Tukey's *post hoc* analizi verilerine göre her bir grup arasında şu anlamlı farklılıklar elde edilmiştir: kontrol ve Sko arasında ($p<0.0001$), kontrol ve Sko+HYP%1 arasında ($p=0.0021$), kontrol ve Sko+NPT%1 arasında ($p=0.0155$), Sko ve Sko+HYP%1 arasında ($p=0.0128$), Sko ve Sko+HYP%3 arasında ($p<0.0001$), Sko ve Sko+NPT%1 arasında ($p=0.0017$), Sko ve Sko+NPT%3 arasında ($p<0.0001$), Sko ve Sko+ACH%1 arasında ($p<0.0001$) ve Sko ve Sko+ACH%3 arasında ($p<0.0001$).

SOD aktivitesi için amigdala homojenatlarında tek-yönlü ANOVA genel bir grup farklılığı [$F(7, 48) = 6.72, p=0.0008$] elde etmiştir. Tukey's *post hoc* analizine göre kontrol ve Sko arasında ($p=0.0033$), Sko ve Sko+HYP%1 arasında ($p=0.0011$), Sko ve Sko+HYP%3 arasında ($p=0.0389$), Sko ve Sko+NPT%1 arasında ($p=0.0271$), Sko ve Sko+ACH%1

arasında ($p=0.0009$), Sko ve Sko+ACH %3 arasında ($p=0.0026$) anlamlı farklar elde edilmiştir.

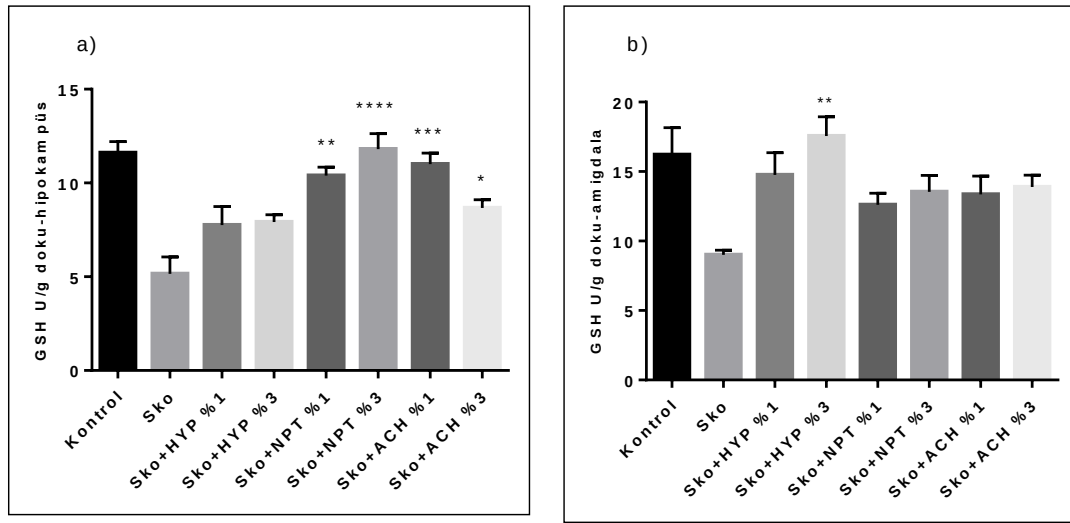


Şekil 3.14. Uçucu yağların beyin dokularında SOD aktivitesi üzerine etkileri. Değerler ortalama $\pm$ SEM (n=7 hayvan/grup). Yalnız-skopolamin uygulanan gruba (Sko) kıyasla, a) hipokampus, * $p=0.0128$, ** $p=0.0017$, **** $p<0.0001$, b) amigdala homojenatı * $p<0.05$, ** $p<0.005$, *** $p=0.0009$

3.8. Uçucu Yağların Toplam GSH Miktarı Üzerine Etkileri

Deney hayvanlarının hipokampus dokularındaki toplam GSH miktarları (Şekil 3.15) için tek-yönlü ANOVA genel bir grup farklılığı [$F(7, 48) = 11.61, p<0.0001$] elde etmiştir. Tukey's *post hoc* analizine göre ise, kontrol ve Sko arasında ($p=0.0001$), kontrol ve Sko+HYP %1 arasında ($p=0.0175$), kontrol ve Sko+HYP %3 arasında ($p=0.0246$), Sko ve Sko+NPT %1 arasında ($p=0.0011$), Sko ve Sko+NPT %3 arasında ($p<0.0001$), Sko ve Sko+ACH %1 arasında ($p=0.003$), Sko ve Sko+ACH %3 arasında ($p=0.0356$) anlamlı farklar bulunmuştur.

Amigdala örneklerindeki toplam GSH miktarları için tek-yönlü ANOVA ile genel bir grup farklılığı [$F(7, 48) = 4.028, p=0.0100$] elde edilmiştir. Tukey's *post hoc* analizi ile kontrol ve Sko arasında ($p=0.0174$) ve Sko ve Sko+HYP%3 arasında ($p=0.0041$) anlamlı farklar elde edilirken diğer gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı farklar bulunmamıştır.

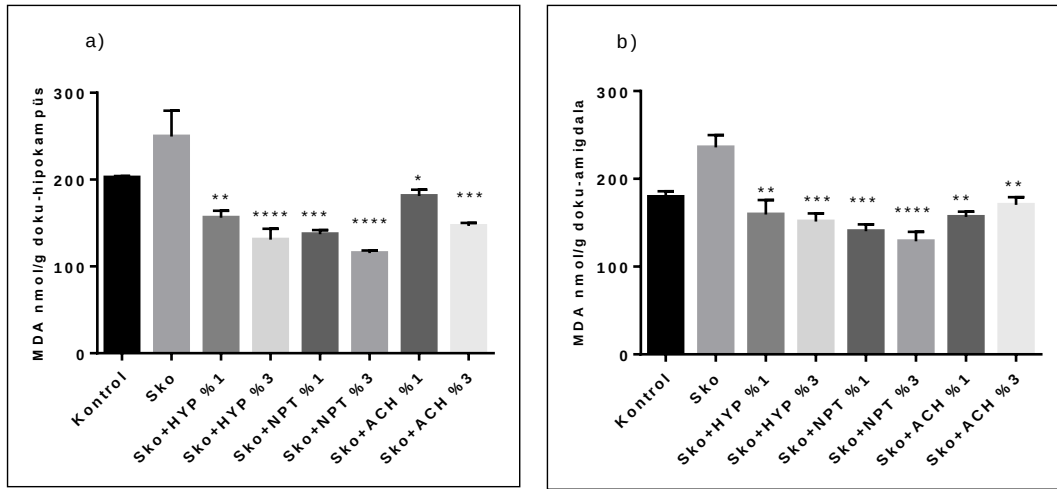


Şekil 3.15. Uçucu yağların beyin dokularında toplam GSH miktarı üzerine etkileri. Değerler ortalama $\pm$ SEM (n=7 hayvan/grup). Yalnız-skopolamin uygulanan gruba (Sko) kıyasla, a) hipokampus, Tukey's *post hoc* analizleri için, * $p=0.0356$, ** $p=0.0011$, *** $p=0.003$, **** $p<0.0001$, b) amigdala homojenati, ** $p=0.0041$

3.9. Uçucu Yağların MDA Seviyesi Üzerine Etkileri

MDA seviyesi için deney hayvanlarının hipokampus dokularında (Şekil 3.16) tek-yönlü ANOVA gruplar arasında genel bir anlamlı farklılık [$F(7, 48) = 12.85$, ($p<0.0001$)] göstermektedir. Tukey's *post hoc* testi kullanılarak elde edilen herbir grup arasındaki anlamlı farklılıklar şu şekildedir: kontrol ve Sko+HYP%3 arasında ($p=0.0148$), kontrol ve Sko+NPT%1 arasında ($p=0.0291$), kontrol ve Sko+NPT%3 arasında ($p=0.0026$), Sko ve Sko+HYP%1 arasında ($p=0.0012$), Sko ve Sko+HYP%3 arasında ($p<0.0001$), Sko ve Sko+NPT%1 arasında ($p=0.0002$), Sko ve Sko+NPT%3 arasında ($p<0.0001$), Sko ve Sko+ACH%1 arasında ($p=0.0204$), Sko ve Sko+ACH%3 arasında ($p=0.0004$).

MDA seviyesi için amigdala örneklerinde tek-yönlü ANOVA ile gruplar arasında genel bir anlamlı farklılık [$F(7, 48) = 9.72$, $p<0.0001$] bulunmuştur. Tukey's *post hoc* verilerine göre ise kontrol ve Sko arasında ($p=0.0254$), Sko ve Sko+HYP%1 arasında ($p=0.0019$), Sko ve Sko+HYP%3 arasında ($p=0.0007$), Sko ve Sko+NPT%1 arasında ($p=0.0002$), Sko ve Sko+NPT%3 arasında ($p<0.0001$), Sko ve Sko+ACH%1 arasında ($p=0.0013$), Sko ve Sko+ACH%3 arasında ($p=0.0076$) anlamlı farklar elde edilmiştir.



Şekil 3.16. Uçucu yağların beyin dokularında MDA seviyesi üzerine etkileri. Değerler ortalama ± SEM (n=7 hayvan/grup). Yalnız-skopolamin uygulanan gruba (Sko) kıyasla, a) hipokampus, * $p=0.0204$, ** $p=0.0012$, *** $p<0.0005$, **** $p<0.0001$, b) amigdala homojenatı, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$

Uçucu yağ uygulamasının sıçanlarda hipokampus ve amigdala beyin homojenatlarında antioksidan etki gösterdikleri, SOD aktivitesi, toplam GSH miktarı ve MDA seviyeleri ile gösterilmiştir. Skopolamin bu değerlerde artışa neden olurken, uçucu yağ uygulamalarının beyin dokularında skopolamin'in oksidan etkilerini azalttıkları görülmüştür.

3.10. Biyoinformatik Analizler

3.10.1. AChE Enzimi Moleküler Doklama Çalışmaları

Uçucu yağ bileşenlerinin AChE enzimi ile olası interaksiyonlarının belirlenmesi için öncelikli olarak X-ışını kristalografisi ile kristalize edilmiş olan ligantların verileri incelenmiştir. Bu ligantlar gerçeğe en yakın modelleri vereceğinden ligantların doklama verileri standart olarak kullanılmıştır. İkinci önemli nokta ise doklama algoritmasının doğrulanması olmuştur. Bu kez aynı ligantların bağlanma enerjilerini hesaplamak için doklama algoritması kullanılmış ve yazılımla elde edilen değerlerin kristalleşme ile elde edilenlerle çok yakın oldukları görülmüştür. Kristalize edilen 4 ligant territrem-B (4m0f), dihidrotaşinon-I (4m0e), galantamin (4ey6) ve donepezil (4ey7) 'dir. Bu ligantların bağlanma serbest enerjileri ve inhibisyon sabitleri bizim algoritmamızla elde ettiğimiz verilerle kıyaslanmıştır. Kristalize edilen ligantların bağlanma enerjileri -13,15 (territrem-b), -9,66 (dihidrotaşinon-I), -8,72 (galantamin) ve -11,23 (donepezil) şeklinde iken, bizim

verilerimize göre -13,11(territrem-b), -9,73 (dihidrotanşinon-I), -8,37 (galantamin) ve -10,71 (donepezil) şeklinde elde edilmiştir. Görüldüğü gibi veriler birbirine çok yakın görülmektedir. İnhibisyon sabitleri ise kristalize edilen ligantlar için 0,000231 μM (territrem-B), 0,0831 μM (dihidrotanşinon-I), 0,404 μM (galantamin) ve 0,0059 μM (donepezil) şeklinde iken, bizim verilerimize göre 0,000246 μM (territrem-b), 0,0742 μM (dihidrotanşinon-I), 0,727 μM (galantamin) ve 0,0142 μM (donepezil) şeklinde elde edilmiştir. İnhibisyon sabitleri de her iki veri arasında oldukça yakınlık göstermektedir. Bu açıdan bakıldığında, bu algoritmanın bu enzim modelinde diğer bileşikleri değerlendirmek için uygun olduğu sonucu çıkmıştır. Yani bilinmeyen bileşiklerin AChE enzimi ile interaksyonunun teorik olarak değerlendirilmesi için elimizde doğruladığımız bir doklama algoritması ve önemli referans değerleri mevcut olmuştur. Ayrıca AChE enzimi için tersinir ve tersinmez inhibitörlerin doklama çalışmaları yine karşılaştırma amacıyla yapılmıştır. Seçilen bu inhibitörlerin isimleri ve PubChem numaraları Tablo 3.4'te ve doklama verileri ise Tablo 3.5'te verilmiştir. Birçok uçucu yağın majör bileşeni olarak elde edilmekte olan α -pinen bileşeni daha önce araştırmacılar tarafından çalışılmıştır. α -pinen'in doklama verileri Tablo 3.6'da verilmiş olup inhibisyon sabiti 35,8 μM iken, bağlanma enerjisi -6,07 şeklinde elde edilmiştir. Daha sonra uçucu yağ bileşenlerinin doklama çalışmalarına geçilmiştir. Territrem-B'nin AChE enzimine bağlanma pozisyonu Şekil 3.17a'da, molekül yapısı ise Şekil 3.18a'da gösterilmiştir. Doklama verilerine göre, teorik olarak AChE enzimi ile territrem B'nin kurduğu bağlar Tablo 3.10'da verilmiştir. Buna göre territrem B ile AChE arasında hidrofobik interaksyonlar ve hidrojen bağları kurulduğu ve π -istiflenmeleri görülmektedir.

Tablo 3.4. AChE inhibitörleri ve PubChem numaraları

No	Bileşikler	PubChem CID
Tersinir inhibitörler		
1	Fizostigmin	5983
2	Neostigmin	5824
3	Piridostigmin	7550
4	Donepezil (4EY7)	3152
5	Galantamin (4EY6)	9651
6	Kafein	2519
7	α -Pinen	6654
8	Takrin	1935
9	Huperzin A	5912039
10	Territrem-B (doğal)(4M0F)	114734
11	Dihidrotanşinon-I (doğal)(4M0E)	5316743
Yarı-tersinir inhibitörler		
1	Karbosülfan	41384
2	Sarin	7871
3	Ekotiofat	10547
4	Paration	991
5	Metrifonat	5853

Tablo 3.5. Kristalize edilmiş AChE ligantları

Molekül Adı	MolID	Poz	İnhibisyon sabiti (Ki) (µM)	Bağlanma serbest enerjisi	Toplam intermoleküler enerji (kcal/mol)	VdW + H bağı+ Desolvasyon enerjisi	Elektrostatik enerji	İç enerji	Torsiyonel enerji	Bağsız sistemin enerjisi (kcal / mol)
Donepezil (4EY7)	1	1	0,0059	-11,23	-12,44	-12,29	-0,15	-0,58	1,79	0
Galantamin (4EY6)	1	1	0,404	-8,72	-9,22	-8,93	-0,29	-0,1	0,6	0
Dihidrotanşininon-I (4M0E)	1	1	0,0831	-9,66	-9,66	-9,57	-0,09	0	0	0
Territrem-B (4M0F)	1	1	0,000231	-13,15	-13,24	-13,1	-0,14	-1,69	1,79	0

Tablo 3.6. AChE inhibitörlerinin doklama verileri

Molekül Adı	MolID	Poz	inhibisyon sabiti (Ki) (µM)	Bağlanma serbest enerjisi	Toplam intermoleküler enerji (kcal/mol)	VdW + H bağı+ Desolvasyon enerjisi	Elektrostatik enerji	iç enerji	Torsiyonel enerji	Bağısız sistemin enerjisi (kcal / mol)
Territrem-B	2	44	0,000246	-13,11	-13,97	-13,81	-0,17	-1,7	1,79	-0,77
Donepezil	5	3	0,0142	-10,71	-12,45	-12,33	-0,12	-0,89	1,79	-0,84
Karbosülfan	6	28	0,0654	-9,8	-11,5	-11,36	-0,15	-1,66	2,98	-0,38
Dihidrotanşinon-I	7	10	0,0742	-9,73	-9,73	-9,58	-0,15	0	0	0
Huperzin A	10	57	0,408	-8,72	-9,06	-9,04	-0,02	0,09	0,3	0,05
Fizostigmin	11	83	0,41	-8,71	-9,45	-9,34	-0,11	-0,09	0,6	-0,23
Galantamin	15	30	0,727	-8,37	-8,67	-8,69	0,02	-0,4	0,6	-0,1
Paration	16	70	1,28	-8,04	-9,27	-9,27	-0,01	-0,43	1,19	-0,47
Takrin	3	13	2,28	-7,7	-8	-7,97	-0,02	0,04	0,3	0,04
Neostigmin	8	69	4,61	-7,28	-7,93	-7,29	-0,64	-0,41	0,89	-0,17
Ekotiofat	1	86	11,8	-6,72	-8,14	-7,49	-0,65	-0,39	1,49	-0,32
Piridostigmin	13	44	17,8	-6,48	-7,03	-6,95	-0,08	-0,28	0,6	-0,23
α -Pinen	12	5	35,8	-6,07	-6,07	-6,06	0	0	0	0
Kafein	4	25	40,3	-6	-6	-5,98	-0,02	0	0	0
Metrifonat	9	29	59,2	-5,77	-5,77	-5,75	-0,02	-0,41	0,3	-0,11
Sarin	14	29	860	-4,18	-4,8	-4,71	-0,09	-0,09	0,6	-0,11

3.10.1.1. *Nepeta nuda* subsp. *nuda* Uçucu Yağ Bileşenlerinin Moleküler Doklama Çalışmaları

N. nuda subsp. *nuda* uçucu yağ bileşenleri ve bu bileşenlerin PubChem numaraları Tablo 3.1’de verilmiştir. Bu bileşenlerin moleküler doklama analizleri Tablo 3.7’de verilmiştir. Tabloda bileşenler bağlanma serbest enerjileri en düşük olandan en yükseğe doğru sıralanmıştır. Analize göre *N. nuda* subsp. *nuda* uçucu yağının kimyasal bileşenlerinden bağlanma serbest enerjisi en düşük çıkan perhidrofarnesil aseton olmuştur (-8,60). Bileşenin inhibisyon sabiti ise 0,495 μ M olarak elde edilmiştir. Ardından, α -kalamenen, β -seskifellandren, α -kadinol, γ -kadinen, β -burbonen, β -bisabolen, (+) epibisikloseskifellandren, β -kubeben, 1,5 epoksisalvial-4(14)-en, elemol, aromadendren, germakren B ve α -amorfen bileşenleri bağlanma serbest enerjileri açısından en düşükten yükseğe doğru sıralanmışlardır. Bu bileşenlerin inhibisyon sabitleri de düşük görülmektedir. Uçucu yağın ana bileşenleri ise tabloda ilk sıralarda olmamalarına rağmen bağlanma serbest enerjileri oldukça düşük görülmektedirler. Uçucu yağın %50.0’ına tekabül eden *trans-cis*-nepetalakton -6,55 bağlanma serbest enerjisine ve 15,8 μ M inhibisyon sabitine sahiptir. Buna karşılık uçucu yağın %2,6’sını oluşturan *cis-trans*-nepetalakton izomerinin ise bağlanma serbest enerjisi -6,96 iken, inhibisyon sabiti 7,88 μ M olarak elde edilmiştir. Diğer ana bileşenlerin bağlanma serbest enerjileri *trans*- β -karyofilen için -7,97, spatulenol için -7,96, germakren D için -7,91 ve karyofilen oksit için ise -7,63 olarak tespit edilmiştir. Perhidrofarnesil aseton’un molekül yapısı Şekil 3.18b’de, AChE enzimine bağlanma pozisyonu Şekil 3.17b’de gösterilmiştir. Uçucu yağın ana bileşeni olan *trans-cis* nepetalakton’un molekül yapısı Şekil 3.18f’de, enzime bağlanma pozisyonu ise Şekil 3.17f’de gösterilmiştir. Doklama verileri eas alınarak, perhidrofarnesil aseton-AChE ve *trans-cis* nepetalakton-AChE arasındaki bağlar sırasıyla Tablo 3.11 ve Tablo 3.15’te verilmiştir. Buna göre teorik olarak, enzim ve ligantlar arasında hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları kurulduğu görülmektedir.

Tablo 3.7. *Nepeta nuda* subsp. *nuda* uçucu yağ bileşenlerinin doklama verileri

Molekül Adı	MolID	Poz	İnhibisyon sabiti (Ki) (µM)	Bağlanma serbest enerjisi	Toplam intermoleküler enerji (kcal/mol)	VdW + H bağı+ Desolvasyon enerjisi	Elektrostatik enerji	İç enerji	Torsiyonel enerji	Bağız sistemin enerjisi (kcal / mol)
Perhidrofarnesil aseton	3	24	0,495	-8,60	-11,11	-11,04	-0,07	-0,33	2,39	-0,46
α-Kalamenen	3	18	0,64	-8,45	-8,45	-8,45	0,00	0,00	0,00	0,00
β-Sesquifellandren	6	2	0,702	-8,40	-8,82	-8,82	0,00	-0,37	0,60	-0,20
α- Kadinol	2	9	0,756	-8,35	-8,65	-8,61	-0,04	0,04	0,30	0,03
γ-Kadinen	23	33	0,781	-8,33	-8,33	-8,33	0,00	0,00	0,00	0,00
β-Burbonen	21	10	0,79	-8,33	-8,33	-8,32	0,00	0,00	0,00	0,00
β-Bisabolen	1	59	0,826	-8,30	-8,89	-8,89	0,00	-0,23	0,60	-0,22
(+)Epibisiklosekifelandren	29	9	0,852	-8,28	-8,28	-8,28	0,00	0,00	0,00	0,00
β-Kubeben	31	20	0,901	-8,25	-8,25	-8,24	0,00	0,00	0,00	0,00
1,5-Epoksisalvial-4(14)-en	62	4	1,11	-8,13	-8,13	-8,11	-0,02	0,00	0,00	0,00
Elemol	30	20	1,22	-8,07	-8,36	-8,23	-0,14	-0,13	0,30	-0,13
Aromadendren	27	6	1,26	-8,05	-8,05	-8,04	0,00	0,00	0,00	0,00
Germakren B	16	53	1,35	-8,01	-8,01	-8,01	0,00	0,00	0,00	0,00
α-Amorfen	2	5	1,37	-8,00	-8,00	-8,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Trans-β-Karyofilen	15	46	1,44	-7,97	-7,97	-7,97	0,00	0,00	0,00	0,00
Spatulenol	65	5	1,47	-7,96	-8,26	-8,24	-0,01	0,03	0,30	0,03
α-Kubeben	13	28	1,48	-7,95	-7,95	-7,95	0,00	0,00	0,00	0,00
Germakren D	20	10	1,6	-7,91	-7,91	-7,91	0,00	0,00	0,00	0,00

Tablo 3.7'nin devamı

Karyofilladienol II	30	31	1,74	-7,86	-8,16	-8,09	-0,06	0,03	0,30	0,03
α-Bergomoten	25	93	1,99	-7,78	-8,66	-8,66	0,00	-0,40	0,89	-0,39
(Z) β-Farnesen	18	84	2,12	-7,74	-8,91	-8,91	0,00	-0,45	1,19	-0,43
1-Endo-burbonanol	22	29	2,35	-7,68	-7,98	-7,93	-0,05	0,04	0,30	0,04
α-Gurjunen	8	6	2,37	-7,68	-7,68	-7,67	0,00	0,00	0,00	0,00
Karyofilen oksit	11	34	2,56	-7,63	-7,63	-7,66	0,03	0,00	0,00	0,00
α-Humulen	17	18	2,79	-7,58	-7,58	-7,57	0,00	0,00	0,00	0,00
4α,7α,7α-Nepetalakton	9	9	7,88	-6,96	-7,26	-7,11	-0,14	0,05	0,30	0,06
4α,7α,7β-Nepetalakton	14	41	15,8	-6,55	-6,86	-6,70	-0,16	0,06	0,30	0,05
n-Hekzadekanoik asit	29	47	20,5	-6,40	-10,84	-10,82	-0,02	-0,53	4,77	-0,20
Linalol	24	79	22,7	-6,34	-7,04	-6,92	-0,12	-0,07	0,60	-0,18
4-Terpineol	5	1	24,9	-6,28	-6,60	-6,52	-0,08	0,04	0,30	0,02
M-Mentha-1,8-dien	28	22	26,4	-6,25	-6,25	-6,25	0,00	0,00	0,00	0,00
Metilsalisilat	12	85	30,9	-6,15	-7,35	-7,13	-0,22	0,07	1,19	0,07
Trans-Pinokarveol	26	13	32,5	-6,12	-6,42	-6,35	-0,07	0,02	0,30	0,02
1-Asetilsikloheksen	7	26	33,3	-6,11	-6,70	-6,60	-0,10	-0,06	0,60	-0,06
Norinon	4	11	58,4	-5,78	-6,07	-6,03	-0,04	0,02	0,30	0,02
Ökaliptol	11	22	60,9	-5,75	-5,75	-5,79	0,04	0,00	0,00	0,00
cis-3-Hekzenil izovalerat	19	21	65,9	-5,70	-8,01	-7,93	-0,09	-0,25	2,39	-0,17
1-Okten-3-ol	10	85	242	-4,93	-6,66	-6,55	-0,11	-0,15	1,79	-0,09

3.10.1.2. *Hypericum uniglandulosum* Uçucu Yağ Bileşenlerinin Moleküler Doklama Çalışmaları

H. uniglandulosum uçucu yağ bileşenleri ve bu bileşenlerin PubChem numaraları Tablo 3.22’de verilmiştir. Bu bileşenlerin moleküler doklama analizleri Tablo 3.8’de verilmiştir. Tablonun ilk sırasında bulunan *cis*-kalamenen, 0,643 μM inhibisyon sabitine ve -8,45 bağlanma serbest enerjisine sahip olup *H. uniglandulosum* uçucu yağ bileşenleri arasında en düşük değerleri vermiştir. Ardından, bağlanma enerjilerine göre en düşükten yükseğe doğru sıralama yaptığımızda γ -kadinen, benzil benzoat, α -kopaen, aromadendren, izobütil ftalat ve α -amorfen bileşikleri karşımıza çıkmaktadır. Ana bileşenlerden ise uçucu yağın % 35,6’sını oluşturan α -pinen’in inhibisyon sabiti 27,8 μM olarak elde edilirken, bağlanma serbest enerjisi -6,22 olarak bulunmuştur. α -Pinen’in molekül yapısı Şekil 3.18c’de, bağlanma pozisyonu ise Şekil 3.17c’de gösterilmiştir. Tablo 3.12’de verildiği üzere, α -pinen ve enzim arasında hidrofobik etkileşimler görülmektedir. Yağın %19,4’üne tekabül eden undekan, 186 μM inhibisyon sabitine ve -5,09 bağlanma serbest enerjisine sahiptir. *Cis*-kalamenen molekülünün molekül yapısı Şekil 3.18e’de, AChE enzimine bağlanma pozisyonu ise Şekil 3.17e’de gösterilmiştir. Tablo 3.14’te görüldüğü üzere enzim ve *cis*-kalamenen arasında hidrofobik etkileşimler kurulmaktadır.

Tablo 3.8. *Hypericum uniglandulosum* uçucu yağ bileşenlerinin doklama verileri

Molekül Adı	MoID	Poz	inhibisyon sabiti (Ki) (μ M)	Bağlanma serbest enerjisi	Toplam intermoleküler enerji (kcal/mol)	VdW + H bağı+ Desolvasyon enerjisi	Elektrostatik enerji	iç enerji	Torsiyonel enerji	Bağısız sistemin enerjisi (kcal / mol)
Cis-Kalamenen	2	6	0,643	-8,45	-8,45	-8,45	0,00	0,00	0,00	0,00
γ -Kadinen	21	30	0,783	-8,33	-8,33	-8,33	0,00	0,00	0,00	0,00
Benzil benzoat	14	99	0,777	-8,33	-9,79	-9,68	-0,10	-0,37	1,49	-0,33
α -Kopaen	12	30	1,2	-8,08	-8,08	-8,08	0,00	0,00	0,00	0,00
Aromadendren	26	20	1,26	-8,05	-8,05	-8,04	0,00	0,00	0,00	0,00
İzobütil ftalat	24	59	1,34	-8,01	-9,50	-9,41	-0,09	-1,39	2,39	-0,49
α -Amorfen	1	10	1,37	-8,00	-8,00	-8,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Spatulenol	27	5	1,47	-7,96	-8,25	-8,24	-0,01	0,03	0,30	0,04
Karyofilen oksit	11	34	2,56	-7,63	-7,63	-7,66	0,03	0,00	0,00	0,00
Trikosan	7	16	3,45	-7,45	-12,54	-12,54	0,00	-1,30	5,97	-0,43
Siklotetradekan	23	19	3,79	-7,40	-7,40	-7,40	0,00	0,00	0,00	0,00
Siklododekan	28	86	11	-6,77	-6,77	-6,77	0,00	0,00	0,00	0,00
2-Pentadekanon	20	9	14,3	-6,61	-10,20	-10,09	-0,11	-0,54	3,88	-0,25
α -Terpineol	10	3	15,6	-6,56	-6,56	-6,51	-0,05	0,00	0,00	0,00
<i>n</i> -Hekzadekanoik asit	29	47	20,5	-6,40	-10,84	-10,82	-0,02	-0,53	4,77	-0,20
DL-Limonen	13	3	21,6	-6,37	-6,37	-6,36	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>p</i> -Simen	25	4	23,5	-6,32	-6,32	-6,31	0,00	0,00	0,00	0,00
α -Pinen	22	9	27,8	-6,22	-6,22	-6,21	0,00	0,00	0,00	0,00

Tablo 3.8'in devamı

α-Terpinolen	5	3	28,2	-6,21	-6,21	-6,21	0,00	0,00	0,00	0,00
Tetradekanoik asit	4	25	36,5	-6,05	-9,73	-9,64	-0,10	-0,65	4,18	-0,15
Alloosimen	19	9	37,7	-6,04	-6,63	-6,63	0,00	-0,17	0,60	-0,17
β-Pinen	9	13	46,1	-5,92	-5,92	-5,91	0,00	0,00	0,00	0,00
Benzoik asit	15	73	65,5	-5,71	-6,60	-6,51	-0,10	0,01	0,89	0,01
Dodekanoik asit	16	86	83,6	-5,56	-8,85	-8,72	-0,13	-0,40	3,58	-0,11
Sülkaton	2	70	130,0	-5,30	-6,49	-6,40	-0,09	-0,12	1,19	-0,11
Undekan	8	12	186,0	-5,09	-7,25	-7,24	0,00	-0,38	2,39	-0,15
3-Hekzen-1-ol	18	59	1240,0	-3,97	-5,44	-5,33	-0,11	-0,05	1,49	-0,03

3.10.1.3. *Achillea pseudoaleppica* Uçucu Yağ Bileşenlerinin Moleküler Doklama Çalışmaları

A. pseudoaleppica uçucu yağ bileşenleri ve bu bileşenlerin PubChem numaraları Tablo 3.3’de verilmiştir. Bu bileşenlerin moleküler doklama analizleri Tablo 3.9’da verilmiştir. Tablonun ilk sırasını 0,495 μM inhibisyon sabiti ve -8,60 bağlanma serbest enerjisi ile perhidrofarnesil aseton almıştır. Ardından en düşük bağlanma enerjilerine sahip olan bileşikler 15-hekzadekanolit, γ -murolen, α -guaïen, α -kadinol, β -burbonen, (+) epibisikloseskifellandren, 1,5 epoksisalvial-4(14)-en, *trans*-nerolidol, aromadendren ve izobütil ftalat şeklinde sıralanmışlardır. *A. pseudoaleppica* uçucu yağında ana bileşen olarak tespit ettiğimiz kafur’un (% 40,6) inhibisyon sabiti 48,2 μM olarak, bağlanma serbest enerjisi ise -5,89 olarak tespit edilmiştir. Kafur’un molekül yapısı Şekil 3.18d’da, AChE enzimine bağlanma pozisyonu ise Şekil 3.17d’de gösterilmiştir. Teorik olarak kafur ve AChE arasında hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları kurulduğu görülmektedir (Tablo 3.13).

İkinci ana bileşen olan ökaliptol (%6,4) ise 60,8 μM inhibisyon sabiti ve -5,75 bağlanma serbest enerjisine sahiptir. Uçucu yağın %5,9’una tekabül eden kamfen’in inhibisyon sabiti 46,8 μM , bağlanma serbest enerjisi ise -5,91 olarak bulunmuştur. *A. pseudoaleppica* uçucu yağının %5,4’ünü oluşturan borneol ise 41,9 μM inhibisyon sabitine ve -5,89 bağlanma serbest enerjisine sahiptir.

Tablo 3.9. *Achillea pseudoaleppica* uçucu yağ bileşenlerinin doklama verileri

Molekül Adı	MoID	Poz	İnhibisyon sabiti (Ki) (μ M)	Bağlanma serbest enerjisi	Toplam intermoleküler enerji (kcal/mol)	VdW + H bağı+ Desolvasyon enerjisi	Elektrostatik enerji	İç enerji	Torsiyonel enerji	Bağısız sistemin enerjisi (kcal / mol)
Perhidrofarnesil aseton	3	24	0,495	-8,60	-11,11	-11,04	-0,07	-0,33	2,39	-0,46
15-Hekzadekanolit	39	26	0,583	-8,51	-8,81	-8,77	-0,04	0,06	0,30	0,06
γ -Murolen	10	2	0,623	-8,47	-8,47	-8,47	0,00	0,00	0,00	0,00
α -Guaïen	36	1	0,76	-8,35	-8,35	-8,35	0,00	0,00	0,00	0,00
α - Kadinol	2	9	0,756	-8,35	-8,65	-8,61	-0,04	0,04	0,30	0,03
β -Burbonen	43	28	0,79	-8,33	-8,33	-8,32	0,00	0,00	0,00	0,00
(+)Epibisikloseskifelandren	64	71	0,845	-8,29	-8,29	-8,29	0,00	0,00	0,00	0,00
1,5-Epoksisalvial-4(14)-en	62	4	1,11	-8,13	-8,13	-8,11	-0,02	0,00	0,00	0,00
Trans-Nerolidol	35	45	1,14	-8,11	-9,25	-9,12	-0,13	-0,41	1,19	-0,37
Cis-Nerolidol	37	71	1,16	-8,10	-9,17	-9,04	-0,12	-0,56	1,19	-0,43
Aromadendren	63	3	1,26	-8,05	-8,05	-8,04	0,00	0,00	0,00	0,00
İzobütil ftalat	52	30	1,28	-8,04	-9,49	-9,33	-0,15	-1,43	2,39	-0,49
β -Karyofilen	32	4	1,45	-7,97	-7,97	-7,97	0,00	0,00	0,00	0,00
Spatulenol	65	5	1,47	-7,96	-8,26	-8,24	-0,01	0,03	0,30	0,03
Germakren D	38	69	1,58	-7,92	-7,92	-7,92	0,00	0,00	0,00	0,00
Bornil izovalerat	42	52	1,72	-7,86	-8,75	-8,70	-0,04	-0,50	1,19	-0,19
Karyofiladienol II	30	31	1,74	-7,86	-8,16	-8,09	-0,06	0,03	0,30	0,03
(-)Karyofilen oksit	16	22	2,57	-7,63	-7,63	-7,65	0,02	0,00	0,00	0,00

Tablo 3.9'un devamı

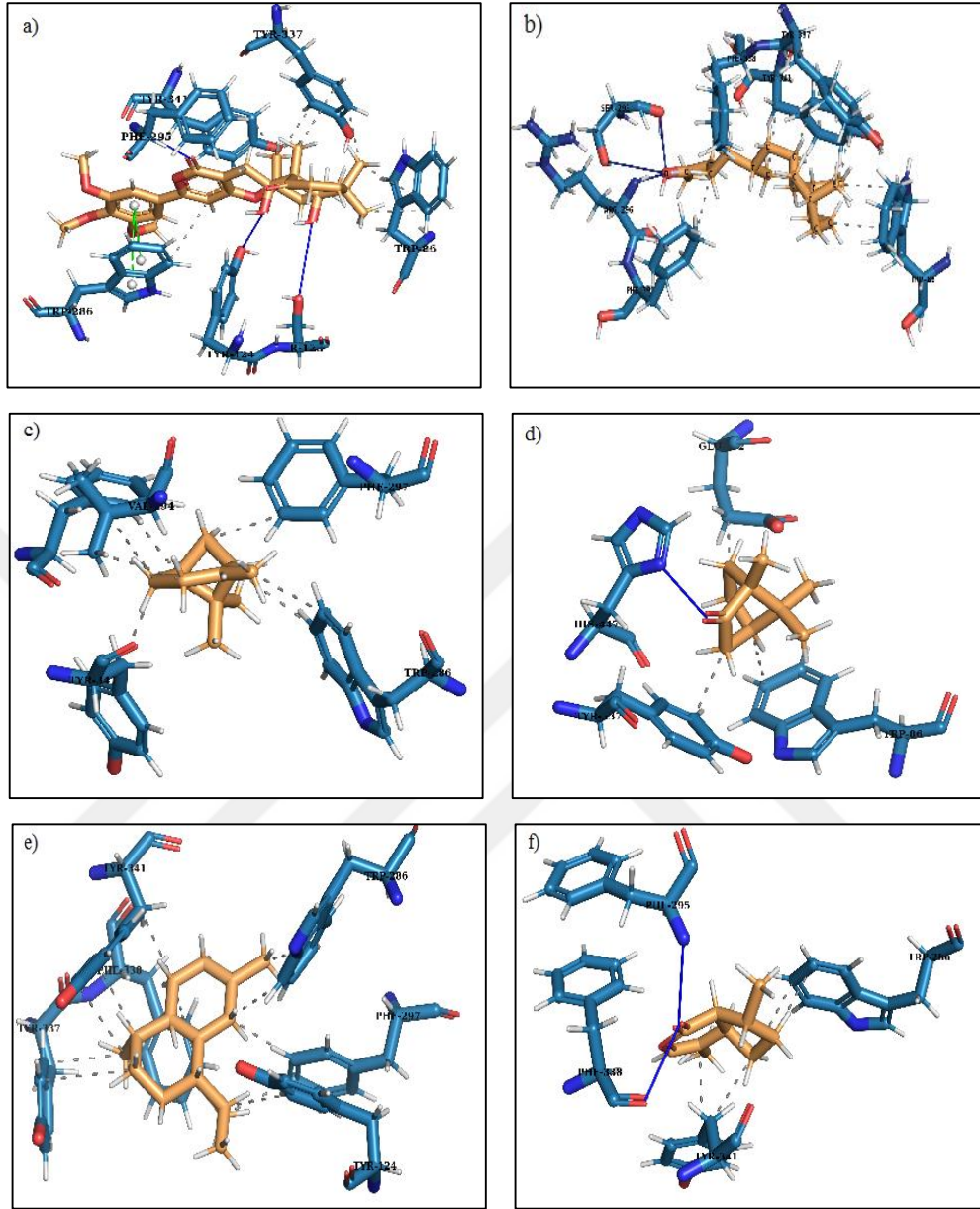
α-Humulen	33	9	2,79	-7,58	-7,58	-7,58	0,00	0,00	0,00	0,00
β-Ionon	45	26	3,8	-7,39	-8,37	-8,28	-0,09	-0,28	1,19	-0,06
Geranil aseton	15	49	4,1	-7,35	-9,06	-8,95	-0,11	-0,36	1,79	-0,28
13-Tetradekanolit	40	70	4,84	-7,25	-7,55	-7,46	-0,09	0,07	0,30	0,06
Timol	53	6	8,53	-6,92	-7,21	-7,10	-0,11	0,02	0,30	0,03
L-Karvon	29	3	8,88	-6,89	-7,19	-7,11	-0,08	0,02	0,30	0,02
Cis-Karveol asetat	55	100	9,25	-6,87	-7,67	-7,60	-0,07	-0,21	0,89	-0,12
9,12,15 Oktadekatrienal	34	43	9,58	-6,85	-11,02	-10,88	-0,15	-1,21	5,07	-0,31
Kuminol	27	64	10,1	-6,82	-7,42	-7,31	-0,10	-0,01	0,60	-0,01
m-Öjenol	41	14	10,9	-6,77	-7,92	-7,75	-0,18	-0,30	1,19	-0,26
Nepetalakton	66	31	11,2	-6,75	-7,06	-6,93	-0,12	0,05	0,30	0,05
Cis-Karveol	28	3	13,4	-6,65	-6,94	-6,89	-0,05	0,02	0,30	0,02
α-Kamfenal	67	33	14,7	-6,59	-7,47	-7,38	-0,09	-0,10	0,89	-0,09
Trans-Geraniol	44	83	16,3	-6,53	-7,63	-7,54	-0,09	-0,26	1,19	-0,16
Pinokarvon	7	59	16,8	-6,52	-6,81	-6,72	-0,10	0,03	0,30	0,03
İzopinokamfon	60	96	17,2	-6,50	-6,80	-6,70	-0,09	0,03	0,30	0,03
α-Tujen	11	33	17,6	-6,49	-6,49	-6,48	0,00	0,00	0,00	0,00
n-Hekzadekanoik asit	68	75	19,2	-6,44	-10,93	-10,80	-0,13	-0,47	4,77	-0,20
m-Mentha 1,8 dien	1	23	20,1	-6,41	-6,41	-6,41	0,00	0,00	0,00	0,00
cis-Jasmon	14	90	20,5	-6,39	-7,89	-7,80	-0,09	-0,27	1,49	-0,27
DL- Limonen	22	1	21,3	-6,37	-6,37	-6,37	0,00	0,00	0,00	0,00
Sabinen	17	56	22	-6,36	-6,36	-6,35	0,00	0,00	0,00	0,00

Tablo 3.9'un devamı

Metil asetofenon	5	66	21,9	-6,36	-6,94	-6,84	-0,10	-0,09	0,60	-0,07
Linalol	49	10	22,4	-6,34	-7,01	-6,89	-0,12	-0,11	0,60	-0,18
α-Terpinen	57	44	23,1	-6,33	-6,33	-6,33	0,00	0,00	0,00	0,00
p-Simen	58	1	23,4	-6,32	-6,32	-6,32	0,00	0,00	0,00	0,00
4-Terpineol	4	12	24,8	-6,28	-6,59	-6,50	-0,08	0,02	0,30	0,02
Epoksilinalool	21	14	25,3	-6,27	-6,57	-6,54	-0,03	-0,05	0,30	-0,05
γ-Terpinen	56	7	25,9	-6,26	-6,26	-6,26	0,00	0,00	0,00	0,00
α- Pinen	51	10	27,8	-6,22	-6,22	-6,21	0,00	0,00	0,00	0,00
α-Terpinolen	6	5	28,2	-6,21	-6,21	-6,21	0,00	0,00	0,00	0,00
(-) Bornil asetat	47	17	30,5	-6,16	-7,08	-7,02	-0,06	-0,25	0,89	-0,28
Borneol	48	27	41,9	-5,97	-6,26	-6,19	-0,07	0,02	0,30	0,03
Verbenen	46	2	43,8	-5,95	-5,95	-5,95	0,00	0,00	0,00	0,00
Trisiklen	59	1	45,3	-5,93	-5,93	-5,92	0,00	0,00	0,00	0,00
2-Dehidrokafur	19	2	45,8	-5,92	-6,22	-6,14	-0,07	0,03	0,30	0,03
Kamfen	50	3	46,8	-5,91	-5,91	-5,91	0,00	0,00	0,00	0,00
β-Pinen	13	4	46,7	-5,91	-5,91	-5,91	0,00	0,00	0,00	0,00
Kafur	24	23	48,2	-5,89	-6,19	-6,11	-0,07	0,03	0,30	0,03
Ökaliptol	25	35	60,8	-5,75	-5,75	-5,79	0,04	0,00	0,00	0,00
2-Amilfuran	20	99	78,9	-5,60	-6,78	-6,67	-0,11	-0,15	1,19	-0,14
Salisilal	54	60	85,9	-5,55	-6,83	-6,65	-0,18	0,08	0,89	-0,30
Benzaldehit	23	45	100	-5,45	-6,05	-5,96	-0,09	-0,01	0,60	-0,01
İzopentil asetat	26	86	183	-5,10	-6,25	-6,09	-0,17	-0,15	1,19	-0,11

Tablo 3.9'un devamı

2-Metilbütıl asetat	8	97	229	-4,96	-5,88	-5,85	-0,03	-0,10	0,89	-0,13
Amil vinil karbinol	18	17	243	-4,93	-6,63	-6,52	-0,11	-0,18	1,79	-0,09
2-Hekzanol	9	82	711	-4,29	-5,47	-5,35	-0,12	-0,06	1,19	-0,04
2-Hekzanal	31	23	1190	-3,99	-5,46	-5,35	-0,10	-0,06	1,49	-0,03
4-Metilbenzensülfonat	61	91	7640	-2,89	-2,89	-2,95	0,07	0,00	0,00	0,00



Şekil 3.17. Moleküllerin AChE’ya bağlanma pozisyonları: a) territrein-B, b) perhidrofarnesil aseton c) α -pinen, d) kafur, e) *cis*-kalamenen, f) *trans-cis* nepetalakton. Ligant-protein interaksiyonlarından, hidrojen bağları (—) şeklinde hidrofofik interaksiyonlar (- - -) şeklinde, ve π -bağları ise (- - -) şeklinde gösterilmiştir.

Tablo 3.10. Territrem B'nin AChE enzimi ile yaptığı bağlar

Hidrofobik İnteraksiyonlar							
Amino asit	Mesafe	Ligant atomu	Protein atomu				
86 TRP	3.48	8447	665				
86 TRP	3.82	8448	662				
286 TRP	3.89	8423	2161				
337 TYR	3.38	8413	2563				
337 TYR	3.92	8449	2560				
337 TYR	3.77	8448	2562				
341 TYR	3.49	8413	2601				
Hidrojen bağları							
Amino asit	Mesafe H-A	Mesafe D-A	Donör açısı	Protein donör?	Yan zincir	Donör atomu	Akseptör atomu
124 TYR	1.93	2.74	142.74	Evet	Evet	981 [O3]	8441 [O3]
125 SER	3.44	3.98	117.59	Evet	Evet	987 [O3]	8450 [O3]
285 PHE	3.00	3.82	140.93	Evet	Hayır	2227 [Nam]	8427 [O2]
π-İstiflenmesi							
Amino asit	Mesafe	Açı	Ofset	Tipi	Ligant atomları		
286 TRP	4.03	7.70	1.52	P	8428, 8429, 8430, 8431, 8432, 8433		
286 TRP	3.63	8.37	0.38	P	8428, 8429, 8430, 8431, 8432, 8433		

Tablo 3.11. Perhidrofarnesil aseton'un AChE enzimi ile yaptığı bağlar

Hidrofobik İnteraksiyonlar							
Amino asit	Mesafe	Ligant atomu	Protein atomu				
86 TRP	3.87	14	1584				
86 TRP	3.26	16	1590				
297 PHE	3.72	6	5355				
337 TYR	3.63	11	6065				
338 PHE	3.25	3	6093				
341 TYR	3.36	5	6157				
341 TYR	3.47	1	6159				
Hidrojen bağları							
Amino asit	Mesafe H-A	Mesafe D-A	Donör açısı	Protein donör?	Yan zincir	Donör atomu	Akseptör atomu
293 SER	2.84	3.44	121.45	EVET	HAYIR	5264 [O3]	19 [O3]
293 SER	3.31	3.89	121.82	HAYIR	EVET	19 [O3]	5266 [O3]
296 ARG	1.88	2.85	158.79	EVET	HAYIR	5320 [N3]	19 [O3]

Tablo 3.12. α -Pinen'in AChE enzimi ile yaptığı bağlar

Hidrofobik interaksyonlar			
Amino asit	Mesafe	Ligant atomu	Protein atomu
286 TRP	3.32	5049	2572
286 TRP	3.55	5047	2573
294 VAL	3.76	5050	2647
294 VAL	3.85	5051	2646
297 PHE	3.30	5052	2687
338 PHE	3.31	5053	3046
341 TYR	3.19	5051	3072

Tablo 3.13. Kafur'un AChE enzimi ile yaptığı bağlar

Hidrofobik İnteraksiyonlar							
Amino asit	Mesafe	Ligant atomu	Protein atomu				
86 TRP	3.67	5047	776				
202 GLU	3.84	5048	1857				
337 TYR	3.17	5054	3034				
Hidrojen bağları							
Amino asit	Mesafe H-A	Mesafe D-A	Donör açısı	Protein donör?	Yan zincir	Donör atomu	Akseptör atomu
447 HIS	1.83	2.63	140.61	HAYIR	EVET	5045 [O3]	4054 [N2]

Tablo 3.14. *cis*-Kalamenen'in AChE enzimi ile yaptığı bağlar

Hidrofobik interaksionlar			
Amino asit	Mesafe	Ligant atomu	Protein atomu
124 TYR	3.49	5056	1145
286 TRP	3.51	5048	2572
286 TRP	3.91	5046	2573
297 PHE	3.18	5046	2687
297 PHE	3.28	5057	2689
337 TYR	3.90	5054	3033
337 TYR	3.41	5053	3031
338 PHE	3.25	5050	3046
341 TYR	3.10	5050	3072
341 TYR	3.23	5052	3074
341 TYR	3.84	5054	3076

Tablo 3.15. *trans-cis*-Nepetalakton'un AChE enzimi ile yaptığı bağlar

Hidrofobik İnteraksiyonlar							
Amino asit	Mesafe	Ligant atomu	Protein atomu				
286 TRP	3.45	5053	2572				
286 TRP	3.64	5051	2573				
341 TYR	3.27	5051	3072				
341 TYR	3.59	5050	3073				
Hidrojen bağları							
Amino asit	Mesafe H-A	Mesafe D-A	Donör açısı	Protein donör?	Yan zincir	Donör atomu	Akseptör atomu
295 PHE	2.07	3.04	156.93	EVET	HAYIR	2650 [Nam]	5055 [O3]
338 PHE	2.08	2.93	149.29	HAYIR	HAYIR	5055 [O3]	3042 [O2]

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada skopolamin uygulanan deney hayvanlarında *Nepeta nuda* subsp. *nuda* (NPT %1 ve NPT %3), *Achillea pseudoaleppica* (ACH %1 ve ACH %3) ve *Hypericum uniglandulosum* (HYP %1 ve HYP %3) bitkilerinden elde edilen uçucu yağların hafıza fonksiyonu, anksiyete ve depresyon-benzeri davranışlar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Uçucu yağların 3 aylık yetişkin wistar albino sıçanlara uygulanmasının ardından sıçanlarda davranış testleri yapılmış ve son testi takiben sıçanlar dekapite edilerek beyin dokuları alınmıştır. Hipokampus ve amigdala numunelerinde oksidatif stres parametreleri ölçülmüş ve uçucu yağların serbest radikal hasarı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ayrıca, uçucu yağların GC/MS analiziyle tespit edilen kimyasal bileşenleri *in silico* analizler kullanılarak AChE enzimi ile interaksiyonları yönünden değerlendirilmiştir.

Bilindiği gibi, skopolamin muskarinik asetilkolin reseptörlerinin bağlanma bölgelerini bloke etmektedir. Skopolamin çok hızlı bir şekilde kan-beyin bariyerini geçer ve merkezi sinir sisteminde muskarinik reseptörlerin inhibisyonu hafızada gerilemeye yol açar (More vd., 2016). Skopolamin modeli, deneysel Alzheimer tipi demans oluşturmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu modelin tercih edilmesinin en önemli nedeni kısa sürede etki göstermesi ve Alzheimer hastalığının en önemli semptomu olan hafıza geriliğini istenen şekilde oluşturmasıdır (Klinkenberg ve Blokland, 2010). Zaten skopolamin hayvanlarda Alzheimer hastalığına yol açmaz, sadece hastalığın semptomlarını modelleyebilir ve bundan dolayı Alzheimer hastalığı veya genel olarak demans için ilaç geliştirme çalışmalarında bu model kullanılır. Skopolamin deney hayvanlarına intra-peritoneal olarak ve günlük uygulanmış, sonra davranış testleri yapılmıştır. Bunlar kısa ve uzun süreli hafıza fonksiyonu, anksiyete ve depresyon davranışlarını değerlendirmek için kullanılan standart testlerdir (Y-labirenti, radyal kol labirenti, yükseltilmiş artı labirenti ve zorunlu yüzme testi).

Çalışma için seçilen bitkilerin uçucu yağ analizleri araştırmanın ilk basamağını teşkil etmiştir. *Nepeta nuda* subsp. *nuda* uçucu yağının kromatografik analiziyle 44 bileşen tespit edilmiş olup bu bileşenler toplam yağın % 90.1'ine tekabül etmektedir. Ana bileşenleri *trans-cis-nepetalakton* (%50.0), karyofilen oksit (% 10.9), (+) spatulenol (%3.3), *trans-β* karyofilen (%2.7), *cis-trans-nepetalakton* (%2.6) ve germakren D (%2.4) olarak bulunmuştur. Buna göre *Nepeta nuda* subsp. *nuda* uçucu yağının tam olarak yarısı nepetalakton izomeridir. Nepetalaktonlar *Nepeta* uçucu yağlarında genellikle tespit

edilmektedirler. Nepetalakton izomerleri tek bir kimyasal bağın oryantasyonunda farklılık gösterirken biyolojik aktivitelerinde farklılık görüldüğü belirtilmektedir. 4 α ,7 α ,7 β -Nepetalakton *trans-cis* stereoizomeri, 4 α ,7 α ,7 α -nepetalakton ise *cis-trans* stereoizomeridir (Nestorović vd., 2010).

Aynı tür ile Yunanistan'da yapılan çalışmada *trans-cis*-nepetalakton, yaprak yağında %24.7 olarak ve çiçek yağında %75.7 olarak bildirilmiştir (Gkinis vd., 2010). Bununla birlikte aynı türün uçucu yağında hiç nepetalaktonlara rastlanmadığı da literatür taramalarında görülmektedir. Bir çalışmada, *Nepeta nuda* subsp. *nuda* uçucu yağının majör bileşenleri karyofilen oksit (%21.8), spatulenol (%13.8), allo-aromadendren (%9.0) ve β -karyofilen (%5.4) şeklinde tespit edilmiştir (Kokdil vd., 1998). 2011 yılında aynı laboratuvarında farklı lokasyondan elde edilen *Nepeta nuda* subsp. *nuda* örneklerinde ise majör bileşenler kafur (%23.5), borneol (%18.7), ökaliptol (%21.0) ve kamfen (%6.5) şeklinde bulunmuş ve nepetalaktonlara rastlanmamıştır. Söz konusu çalışmada, *Nepeta* cinsinin uçucu yağları için farklı kemotipler söz konusu olup bunlardan bir tanesinin nepetalakton kemotipi olduğu sonucuna varılmıştır (Kilic vd., 2011). Bu bulgular Tablo 4.1'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Tabloda görüldüğü üzere uçucu yağ bileşenleri oldukça farklılık göstermektedir.

Achillea pseudoaleppica uçucu yağı analizinde toplam yağın %92,5 'ine tekabül eden 67 bileşen bulunmuştur. Ana bileşenler kafur (%40.6), ökaliptol (%6.4), kamfen (%5.9), borneol (%5.4) ve (-) karyofilen oksit (%2.9)'tir. Özen vd. (2003)'nin çalışmasında ise *Achillea pseudoaleppica* uçucu yağının ana bileşenleri kafur (%29.1), ökaliptol (%17.7) artemisia keton (%10.3), artemisia alkol (%3.6), terpinen-4-ol (%3.5), borneol (%2.4) ve kamfen (%2.0) olarak bildirilmiştir. Bu iki çalışmada uçucu yağın ana bileşenleri benzerlik göstermektedir. Bu bulgular Tablo 4.2'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Bisiklik monoterpenoit olan kafur, ilk olarak Doğu Asya'da yetişmekte olan *Cinnamomum camphora* L. bitkisinden elde edilmiştir. Bitki analjezik, antiseptik, kaşıntı önleyici ve uyarıcı gibi aktiviteleri ile bilinmektedir. Kafur günümüzde özellikle kas ağrılarına karşı kullanılan birçok merhemin aktif bileşenidir. Bununla birlikte birçok çalışmada kafur'un yanlış uygulanmasının toksik etkileri bildirilmiştir. Yanlışlıkla ağızdan alınan kafur gastrointestinal sistemde hızla emilip ölüme varabilecek ciddi semptomlar meydana getirmektedir (Vatanparast and Andalib-Lari, 2017). Bundan dolayı, kafur'un dikkatli kullanılması gerekmektedir.

Tablo 4.1. *Nepeta nuda* subsp. *nuda* uçucu yağ bileşenlerinin karşılaştırması

Bileşenler/ yüzdeleri	Bu çalışma	Gkinis vd. 2010 (çiçek yağı)	Gkinis vd. 2010 (yaprak yağı)	Kökçil vd. 1998	Kilic vd. 2011
<i>trans-cis</i> - Nepetalakton	50.0	75.7	24.7	-	-
Karyofilen oksit	10.9	2.0	16.3	21.8	-
Spatulenol	3.3	-	-	13.8	-
Trans- β -karyofilen	2.7	-	-	5.4	-
<i>cis-trans</i> - Nepetalakton	2.6	2.3	3.5	-	-
Germakren D	2.4	-	-	-	-
Allo-aromadendren	-	-	-	9.0	-
Kafur	-	-	-	-	23.5
Borneol	-	-	-	-	18.7
Ökalyptol	-	3.3	16.7	-	21.0
Kamfen	-	-	-	-	6.5
β -Burbonen	-	3.1	4.7		
α -Kopaen	-	2.6	4.4		

Tablo 4.2. *Achillea pseudoaleppica* uçucu yağ bileşenlerinin karşılaştırması

Bileşenler/ yüzdeleri	Bu çalışma	Özen vd. 2003
Kafur	40.6	29.1
Ökalyptol	6.4	17.7
Kamfen	5.9	2.0
Borneol	5.4	2.4
Karyofilen oksit	2.9	-
Artemisia keton	-	10.3
Artemisia alkol	-	3.6
Terpinen-4-ol	-	3.5

Hypericum uniglandulosum uçucu yağının toplam yağın %90.3'üne tekabül eden 29 bileşeni tespit edilmiş olup, majör bileşenleri α -pinen (%35.6), undekan (% 19.4), izobütil ftalat (%3.6), *n*-hekzadekanoik asit (%2.8), benzoik asit (% 2.9), allosimen (%2.7), sikloheksasiloksan (%2.7) ve β -pinen (%2.4) olarak bulunmuştur. Türün uçucu yağı önceki yıllarda laboratuvarımızda elde edilen ve yeni yayınlanan makaledeki verilerle paralellik göstermektedir. Bu çalışmada major bileşenler olarak α -pinen (%35.1), undekan (%19.2), benzoik asit (%2.7) ve sikloheksasiloksan (%2.3) şeklinde elde edilmiştir (Yuce-Babacan ve Bagci, 2017). *H. uniglandulosum* uçucu yağının majör bileşenleri Özkan vd. (2013) tarafından 2,6 dimetil-3,5 heptadien-2-on (%40.7), nonakosan (%3.2), α -pinen (%2.7) ve hekzadekanoik asit (%2.7) şeklinde tespit edilmiştir. Bizim numunemizdeki yüksek konsantrasyonlu α -pinen, bu çalışmada çok daha düşük oranda görülürken, majör bileşen olarak bulunan 2,6 dimethyl-3,5 heptadien-2-one bizim analizimizde tespit edilmemiştir. Tablo 4.3'te karşılaştırmalı olarak bu bulgular verilmiştir. Görüldüğü üzere aynı türün farklı lokasyonlara ait numunelerden elde edilen uçucu yağ kompozisyonu oldukça farklılık gösterebilmektedir. Bu durumda, uçucu yağların biyolojik etkilerine bakılırken yağ bileşenleri daha çok göz önünde tutulmalıdır. Örneğin Özkan vd.'nin çalışmasına göre *H. uniglandulosum* uçucu yağının ana bileşeni 2,6 dimethyl-3,5 heptadien-2-one iken, bizim bulgularımıza göre ana bileşenin α -pinen olması sebebiyle biyolojik etkinin daha çok α -pinen kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz.

Tablo 4.3. *Hypericum uniglandulosum* uçucu yağ bileşenlerinin karşılaştırması

Bileşenler/ yüzdeleri	Bu çalışma	Yuce-Babacan ve Bagci, 2017	Özkan vd. 2013
α -pinen	35.6	35.1	2.7
undekan	19.4	19.2	-
izobütil ftalat	3.6	-	-
benzoik asit	2.9	2.7	-
<i>n</i> -hekzadekanoik asit	2.8	-	2.7
allosimen	2.7	2.6	-
sikloheksasiloksan	2.7	2.3	-
β -pinen	2.4	2.2	-
2,6 dimetil-3,5 heptadien-2-on	-	-	40.7
nonakosan	-	-	3.2

Bir monoterpen olan α -pinen birçok uçucu yağda bulunan ve biyolojik etkileriyle dikkati çeken doğal bir bileşendir. α -Pinen, antioksidan, antiinflamatuvar, analjezik (Xiao-Jun vd., 2016), antinosiseptif, antibakteriyel, antifungal, apoptotik, antialerjik, antimetastatik (Nam vd., 2014) ve antiülserojenik aktiviteleri bildirilmiş bir bileşen olup tat ve aroma endüstrisinde de kullanım alanı bulmaktadır (Bouzenna vd., 2017). α -Pinen'in ayrıca AChE inhibitör aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Kim vd., 2006). Porres-Martinez vd. (2016)'nin çalışmasında α -pinen'in sıçan hücre hattında H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif stres hasarına karşı koruyucu olduğu ve hücreleri apoptozis'ten koruduğu bildirilmiştir. *H. uniglandulosum* uçucu yağında ana bileşen olarak tespit ettiğimiz α -pinen'in, uçucu yağ uygulanan sıçanların beyin dokularında antioksidan etki gösterdiğini düşünmekteyiz.

Son olarak monoterpenlerin toksik etkileri konusunda yapılan araştırmalarda düşük dozlarının koruyucu olduğu, fakat yüksek dozlarda kafur, ökaliptol ve tuyon uygulamasının memeli hücre hattında sitotoksik ve genotoksik olduğu bildirilmektedir (Nikolić vd., 2015). Bizim çalışmamızda solunumla alınan uçucu yağların %1 ve %3'lük dozları kullanılmış olup beyin dokularında oksidatif stresi azalttıkları görülmüştür, fakat toksik etkileri konusunda bir çalışma yapılmamıştır.

Deney hayvanlarında kısa süreli hafıza sıklıkla Y-labirenti testi ile değerlendirilir. Y-labirenti kemirgenlerin yeni bir çevreyi keşfetme içgüdülerine dayanmaktadır. Kemirgenler, 3 kolu olan Y-labirentinde girmiş oldukları kola nazaran yeni kolu keşfetme eğiliminde olurlar (Nazir vd., 2018). Bu testte spontan davranış fare ve sıçanlarda keşif davranışının bir ölçüsüdür. Kısa süreli hafızasında bozulma olan hayvanlar labirentte hangi kola girdiğini hatırlayamaz ve spontan değişimde bir düşüş sergiler (Nazir vd., 2018). Diğer bir ifadeyle sıçanlar tekrar tekrar aynı kola girme eğiliminde olurlar. Hiçbir dış uyaran içermeyen test, hipokampus bağımlı spasyal hafızanın değerlendirilmesinde kullanılır (Hritcu vd., 2014).

N. nuda subsp. *nuda*, *A. pseudoaleppica* ve özellikle de *H. uniglandulosum* uçucu yağları skopolamin uygulanan sıçanlarda Y-labirentinde spontan değişim yüzdesini arttırmıştır. Dolayısıyla uçucu yağların spasyal hafıza üzerinde olumlu etki gösterdiği, en büyük etkinin ise *H. uniglandulosum* uçucu yağının meydana getirdiği görülmektedir.

Spasyal hafıza için standart olarak kullanılan ikinci bir test ise radyal kol labirentidir. Bu labirent sıçanlar için çok daha karmaşık bir test olup kısa ve uzun süreli hafızanın ölçülmesinde kullanılmaktadır. Radyal kol labirentinin literatürde farklı versiyonları bulunmakta olup, bizim laboratuvarında kullandığımız versiyon 4 gün test- öncesi ve 7 gün test olmak üzere toplam 11 günlük bir uygulamadır. Bu test süresince hayvanlar aldıkları

günlük kalori miktarları düşürülerek labirentteki yemlere ulaşmaları beklenmiştir. Test-öncesi uygulamada deney hayvanlarının labirente uyum sağlamaları sağlanmış ve her gün labirent kollarındaki yem miktarı azaltılmıştır. Test sürecinde ise ardışık 7 gün boyunca sıçanların yem bulmada gösterdikleri başarılar not alınmıştır.

Spasyal hafızanın, her iki bileşeni (işleyen hafıza ve referans hafıza) de beyin objeleri ve yollar hakkındaki bilginin hatırlanması, kodlanması ve depolanmasından oluşmaktadır. Spasyal hafıza her zaman keşif davranışı ve merakla ilişkili olmuştur. Bu çeşit bir davranış hayvanların yeni çevrelerle karşılaştıklarında bilgi edinme gereksinimlerini gösterebilmektedir. İşleyen hafıza “kısa süreli hafızaya”, referans hafıza ise “uzun süreli hafızaya” atfedilir. Unutulmaması gereken önemli bir nokta ise stresin hafıza oluşumunu etkilediğidir (Sahak vd., 2013).

Skopolamin uygulaması ile hata sayıları kontrol grubuna nazaran daha yüksek çıkmıştır. *N. nuda* subsp. *nuda* uçucu yağı uygulanan gruplarda işleyen hafıza hataları ve referans hafıza hatalarında yalnızca skopolamin uygulanan gruba göre düşüş görülmesi uçucu yağın kısa ve uzun süreli hafızayı geliştirmede başarılı olduğunu göstermiştir. *A. pseudoaleppica* uçucu yağı ve *H. uniglandulosum* uçucu yağı işleyen hafıza hatalarında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Bununla birlikte, referans hafızada bu uçucu yağların olumlu etki gösterdiği görülmektedir. Sonuç olarak solunumla alınan her bir uçucu yağın spasyal hafızanın gelişmesinde, özellikle de referans hafıza oluşumunda rol oynadığı, *N. nuda* subsp. *nuda* uçucu yağının ise hem işleyen hafıza hem de referans hafızada olumlu etki gösterdiği görülmektedir. *N. nuda* subsp. *nuda* uçucu yağında %50.0 oranında elde ettiğimiz *trans-cis-nepetakton*’un bu etkiden sorumlu olabileceğini düşünmekteyiz.

Uçucu yağların hafıza üzerindeki etkilerine yönelik birçok çalışma vardır. Önceki çalışmalarımızda Apiaceae familyasına ait *Ferulago angulata* (Hritcu vd., 2015), *Pimpinella peregrina* (Aydın vd., 2016) ve *Anthriscus nemorosa* (Bagci vd., 2016) uçucu yağlarının yine skopolamin uygulanan sıçanlar üzerinde spasyal hafızanın gelişmesinde rol oynadığını göstermiştik. Bu çalışmalarda *Ferulago angulata* uçucu yağının yüksek oranda α -pinen, β -pinen, α -felandren ve β -felandren içerdiğini, *Pimpinella peregrina* uçucu yağının *trans*-pinocarveol ve *Anthriscus nemorosa* uçucu yağının ise karyofilen’ce zengin olduğunu rapor etmiştik. Bu bileşenler içerisinde karyofilen, seskiterpenler sınıfında olup diğerleri monoterpenler sınıfındadır. Bu çalışmalar monoterpenlerin hafıza güçlendirici etkileri konusunda birçok ipuçları sunmuştur.

Uçucu yağların nöroprotektif etkilerine dair yakın tarihli çalışmalarda çeşitli uçucu yağların koruyucu etkileri dikkati çekmektedir. *Salvia lavandulifolia* uçucu yağının sinir hücre hattında antioksidan etki göstererek hasarlı hücrelerin viabilitesi ve morfolojisini geri kazandırdığı bildirilmiştir (Porres-Martínez vd., 2015). Öğrenciler üzerinde yapılan bir çalışmada ise biberiye ve lavanta uçucu yağlarının kısa süreli hafızayı anlamlı ölçüde geliştirdiği bildirilmiştir (Filipstova vd., 2017). Uçucu yağların bu etkileri, küçük moleküller ihtiva etmeleri ve kan-beyin bariyerini geçip beyne ulaşmaları neticesinde gerçekleşmektedir. Yüzyılları aşan bir süredir geleneksel tıpta aromaterapi kullanılmaktadır. Günümüzde de aromaterapinin etkilerinin bilimsel metotlarla gösterilmesi geleneksel veya halk tıbbının önemini bir kez daha ortaya koymaktadır.

Uçucu yağların temel bileşenlerinden olan monoterpenlerin birçok biyolojik aktivitesi bildirilmiştir. Ayrıca bir monoterpen olan mentol'ün reçetesiz güvenli bir şekilde kullanılabileceği FDA tarafından onaylanmıştır (Kamatou vd., 2013). Monoterpenlerin hafıza-güçlendirici etkileri birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (Orhan and Aslan, 2009). Monoterpenlerden linalol'ün, antidepresan, antiinflamatuvar, antioksidan ve anti-tümör aktiviteleri bildirilmiştir. Ayrıca nöroprotektif etkileri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Mehri vd., 2015) (P. Xu vd., 2017). Birbirinin izomeri olan timol ve karvakrol ise hem skopolamin hem de amiloit- β hayvan modelinde nöroprotektif etki göstermiştir (Azizi et al., 2012). Perilil alkol ve limonen bileşenleri skopolamin hayvan modelinde hafıza güçlendirici etki göstermiştir (Zhou et al., 2009). Bir terpenoit olan 6-gingerol ise zencefilin aktif bileşeni olup amiloit- β birikimini azalttığı ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiş ve dolayısıyla Alzheimer hastalığına karşı etkili görülmektedir (Lee vd., 2011). Bizim monoterpen ağırlıklı uçucu yağlarımızın deney hayvanlarındaki biyolojik etkileri, monoterpenlerle yapılan çalışmaları destekler niteliktedir.

Bilindiği gibi Alzheimer hastalığında en önemli semptom hafıza geriliğidir. Kolinerjik hipoteze göre ise Alzheimer hastalarında görülen beyindeki ACh azlığı hafıza geriliğinin başlıca nedenidir. ACh, hem muskarinik hem de nikotinik reseptörlere bağlanan, periferik ve merkezi sinir sisteminde önemli role sahip olan bir nörotransmitterdir. Sinaptik açıklıkta derhal AChE enzimi tarafından hidrolize olur. ACh, bütün kolinerjik nöronlar tarafından kullanılmaktadır. MSS'de kolinerjik nöronlar geniş bir dağılım gösterir. Kolinerjik sistem ise hafıza, öğrenme, dikkat, stres cevabı ve uyku gibi kritik fizyolojik süreçlerde görev almaktadır. Kolinesteraz inhibitörleri sinaptik açıklıktaki ACh miktarını artırarak kognitif bozuklukları azaltmakta ve hastaların yaşam kalitesini arttırmaktadırlar. Rivastigmin,

galantamin ve donepezil adlı AChE inhibitörleri AH'nın tedavisinde halen kullanılmakta olan ilaçlardır (Ferreira-Vieira vd., 2016). Bu ilaçlar toksik potansiyeller ve istenmeyen yan etkiler taşımaktadır. Bundan dolayı, daha etkili, daha güvenilir ve daha düşük maliyetli ilaçlara ihtiyaç vardır (Bahadori vd., 2016). Uçucu yağların eldesinin kolay olması ve ihtiva ettikleri doğal bileşenler açısından ihtiyaca cevap verebilir niteliktedir.

2012 yılında X-ışını difraksiyonu ile galantamin ve donepezil ligandlarıyla (Cheung vd., 2012) bağlı halde kristalize edilen AChE enzimi, 2013 yılında territrem-B ve dihidrotanşinon-I ligandları (Cheung vd., 2013) ile bağlı halde kristalize edilmiştir. Bu referanslar ışığında diğer moleküllerin AChE enzimine bağlanma affinitesi üzerinde çalışmak kolaylaşmıştır. Çalışmamızda *N. nuda* subsp. *nuda*, *H. uniglandulosum* ve *A. pseudoaleppica* uçucu yağlarının GC/MS sistemi kullanılarak elde edilen kimyasal bileşenleri moleküler doklama metodu ile AChE enzimine bağlanma olasılıkları yönünden değerlendirilmişlerdir. Bilindiği gibi moleküler doklama yöntemi teorik bir metod olup ilaç dizaynı çalışmalarında ilk basamakta kullanılmaktadır. Verilerimize göre uçucu yağ bileşenlerinden birçoğunun AChE enzimine bağlanma serbest enerjilerinin oldukça uygun oldukları görülmektedir. Bu durum uçucu yağların bütün olarak gösterdikleri etkileri doğrular niteliktedir. Bununla birlikte hangi bileşenin gerçekte en etkili olduğunu söylemek şu haliyle mümkün değildir. Ayrıca, yüksek konsantrasyonda olup zayıf bağlanma enerjisine sahip herhangi bir bileşenin, daha düşük konsantrasyonda olup, daha elverişli bir bağlanma enerjisine sahip bileşene göre mutlaka elenmesi gerekir. Buna iyi bir örnek olarak küçük konsantrasyonlarda bile son derece etkili olan, nörotoksik bileşenler verilebilir. Yani uçucu yağda bulunan kimyasal bileşenlerin konsantrasyonlarından ziyade AChE enzimine karşı serbest bağlanma enerjileri daha önemlidir. *N. nuda* subsp. *nuda* ve *A. pseudoaleppica* uçucu yağlarının bileşenlerinden olan perhidrofarnesil aseton -8,60 bağlanma serbest enerjisi ile bu yağlardaki en düşük değeri vermiş olup AChE enzimiyle interaksyonu açısından en elverişli durumdadır. *H. uniglandulosum* uçucu yağında ise -8,45 bağlanma serbest enerjisi ile *cis*-kalamenen en elverişli bileşen konumundadır.

Moleküler modelleme çalışmalarında, enzim-ligant arasındaki kimyasal bağlar (teorik olarak), interaksyonun bağlanma serbest enerjisi ve inhibisyon sabiti gibi verileri kadar önem arz etmektedir. Territrem B ile AChE enzimi arasında hidrofobik interaksyonlar, hidrojen bağları ve π -istiflenmeleri kurulduğu görülmektedir. Territrem B'nin güçlü bir ligant oluşu muhtemelen bu bağ ve interaksyonlardan kaynaklanmaktadır. *N. nuda* subsp. *nuda* ve *A. pseudoaleppica* uçucu yağlarında, AChE enzimi için en uygun ligant konumunda

olan perhidrofarnesil aseton'un ise enzimle hidrofobik interaksionlar ve hidrojen bağları kurduğu görülmektedir. Ayrıca, *A. pseudoaleppica* ve *N. nuda* subsp. *nuda* uçucu yağlarının ana bileşenleri olan, sırasıyla kafur ve *trans-cis*-nepetalakton AChE enzimi ile teorik olarak hidrofobik interaksionlar ve hidrojen bağları kurmaktadır. *N. nuda* subsp. *nuda* uçucu yağının %50.0'nın *trans-cis* nepetalakton olması, uçucu yağının biyolojik etkilerinin daha çok bu bileşenden kaynaklandığını düşündürmektedir. *A. pseudoaleppica* uçucu yağında ise %35.6 oranında bulunduğunu tespit ettiğimiz kafur'un da, bu uçucu yağın uygulandığı hayvanların beyin bölgelerinde AChE enzim aktivitesini baskılamış olduğunu düşünmekteyiz. *H. uniglandulosum* uçucu yağının bağlanma serbest enerjisi yönünden en uygun olan bileşeni, *cis*-kalamenen ve ana bileşeni olan α -pinen ise AChE enzimi ile çeşitli hidrofobik interaksionlar kurmaktadır. Bunun neticesinde, özellikle de yüksek konsantrasyonda elde edilen α -pinen'in *H. uniglandulosum* uçucu yağı uygulanan hayvanlarda, AChE enzimiyle güçlü interaksionlar kurup enzim aktivitesini inhibe ettiğini düşünmekteyiz. Kimyasal bağlar yönünden sınırlı sayıda bileşen ele alınmıştır. Bununla birlikte, diğer birçok bileşenin de enzimle interaksion kurup, enzim aktivitesini inhibe ettiği düşünülmektedir. Sonuç olarak, perhidrofarnesil aseton ve *cis*-kalamenen'in AChE enzimi ile interaksion kurduklarını ve bu uçucu yağların ana bileşenleri olan *trans-cis* nepetalakton, α -pinen ve kafur ile birlikte *H. uniglandulosum*, *N. nuda* subsp. *nuda* ve *A. pseudoaleppica* uçucu yağlarının güçlü AChE inhibitörleri durumunda olmalarına neden olduklarını düşünmekteyiz.

Terpenlerin AChE inhibitör aktiviteleri birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Monoterpenler üzerinde yapılan çalışmalar neticesinde, keton grubu olan monoterpenlerin genelde daha güçlü AChE inhibitörü oldukları kanısına varılmıştır (L pez vd., 2015). Çalışmamızda, ana bileşenler olarak elde ettiğimiz *trans-cis*-nepetalakton, α -pinen ve kafur'un monoterpenlerden olması, bu bulguları destekler niteliktedir.

Uçucu yağların insektisit veya böcek kovucu etkileri bilinmektedir. Limon ve  kalept sten elde edilen uçucu yağlar sivsineklerden korunmak için tavsiye edilmektedirler. Öjenol, geraniol ve timol bileşenlerinin bazı böcek türlerine ve hamamböceğine karşı nörotoksik oldukları bildirilmiştir. Bu etkinin uçucu yağların AChE inhibitörleri olmalarından kaynaklandığını bilinmektedir. *In vitro*  alışmalarla böcek AChE enzimini etkili şekilde enhibe eden bileşenler arasında α -pinen, β -pinen, β -fellandren, karvakrol, limonen, mentol, *cis*-osimen ve  kaleptol gösterilmiştir (Jankowska vd., 2018). Bununla birlikte uçucu yağ bileşenlerinin farklı inhibitör aktivitetlerine sahip oldukları, bazılarının kompetitif,

bazılarının ise non-kompetitif oldukları bilinmektedir (López vd., 2015). Çalışmamızda, *H. uniglandulosum* uçucu yağında yüksek konsantrasyonlu α -pinen'in AChE inhibitörü olarak rol aldığını ve bundan dolayı hafıza süreçlerini etkilediğini düşünmekteyiz.

Uçucu yağların anksiyete üzerindeki etkileri için yükseltilmiş artı labirenti testi kullanılmıştır. Bu testte diazepam pozitif kontrol olarak seçilmiştir. Diazepam benzodiazepin ailesinden sedatif-hipnotik bir ilaç olup GABA_A reseptörü ile interaksiyon kurar ve anksiyolitik, kas gevşetici ve hipnotik etkiler gösterir (Razavi vd., 2017). Diazepam uygulanan sıçanlarda beklendiği şekilde açık kollara giriş sayısı ve açık kollarda kalma süresi yüzdesinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Uçucu yağ uygulanan sıçanlarda yalnız-skopolamin uygulanan gruba nazaran açık kollara giriş sayısı ve açık kollarda kalma süresi yüzdesinde artış görülürken özellikle bu etkinin doz bağımlı olarak arttığı görülmüştür. Bütün uçucu yağ gruplarında bu parametrelerde artış görülmüş, fakat diazepam grubunda daha yüksek değerler elde edilmiştir.

Skopolamin'in anksiyete üzerindeki etkilerine dair paralellik göstermeyen bulgular bulunmaktadır. Anksiyeteyi ölçmek için kullanılan testler aynı zamanda lokomotor davranışını ölçmekte de kullanılır (açık alan testi gibi). Locomotor davranışının altında yatan nedenin iyi yorumlanması gerekir. Testlerde yapılan küçük değişikliklerin ve skopolamin dozunun sonuçları değiştirdiği düşünülmektedir. Örneğin, 2 mg/kg *i.p.* skopolamin uygulaması aydınlık/karanlık testinde aydınlık bölüme geçiş sayısını azaltmıştır (Hughes vd., 2004). Skopolamin uygulaması genel anlamda anksiojenik etki göstermektedir. Bununla birlikte, farklı uygulamalarda tam tersi etki göstererek anksiyolitik etkiler de bildirilmiştir (Klinkenberg ve Blokland, 2010).

Anksiyete bozuklukları mental hastalıklar içerisinde en yaygın olanıdır. Popülasyon-temelli araştırmalara göre, hayatı boyunca en az 1 kez anksiyete bozukluğu yaşamış olan hasta sayısı %33,7'ye kadar çıkabilmektedir. Anksiyete ve benzeri hastalıklara karşı bitkisel tıbbın etkinliği bilinmektedir. Doğal bitkisel bileşenlerin uzun süreli kullanımının insanlarda ciddi yan etkilere yol açmaması, sentetik anksiyolitik ilaçların ise önemli yan etkiler ile ilişkilendirilmesi tıbbi bitkiler üzerinde daha fazla araştırma yapmayı gerekli kılmıştır. Bu bağlamda hem bitki ekstraktları hem de doğal bitkisel bileşikler değerlendirilmekte gerekmektedir. Birçok fitokimyasal sınıfının anksiyolitik benzeri etki gösterdiği, bu kimyasalların GABA_A reseptörü bağımlı olarak azalttığı bildirilmiştir. Klinik öncesi araştırmalar birçok anksiyete modelinde alkaloidler, terpenler, flavonoidler, fenolik asitler, lignanlar, sinamatlar, ve saponinlerin anksiyolitik etki gösterdiklerini kanıtlamaktadır.

Uçucu yağ bileşenlerinden olan terpenlerin MSS'ni etkilediği bildirilmiştir. En iyi bilinen uçucu yağ bileşenlerinden biri olan α -pinen'in anksiyolitik etkisi kanıtlanmıştır (Yang vd., 2016). Bir çalışmada *in silico* analizlerle α -pinen'in GABA_A reseptörü modülatörü olabileceği gösterilmiştir (Yang vd., 2016). *Hypericum uniglandulosum* uçucu yağında oldukça yüksek konsantrasyonda ve ana bileşen olarak tespit ettiğimiz α -pinen'in bu uçucu yağda anksiyolitik etkilerden sorumlu olduğunu düşünmekteyiz.

Anksiyolitik etkiye sahip olan diğer bir monoterpen ise mirtenol'dür. *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) uçucu yağında bulunan ve bir monoterpenoit alkol olan mirtenol'ün, yükseltilmiş artı labirenti başta olmak üzere anksiyete değerlendirilmesinde kullanılan testlerde anksiyolitik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Kekik uçucu yağında bulunan bir monoterpenik fenol olan karvakrol de anksiyolitik etkileri bildirilmiş bileşenlerdendir (Fedotova vd., 2017). Linalol'ce zengin uçucu yağların sıçanlarda güçlü antidepresan-benzeri etki gösterdiği bildirilmiştir (Santos vd., 2018). *Cananga odorata* (ylang-ylang) uçucu yağı ve major bileşenlerinin (linalol, benzil alkol ve benzil benzoat) güçlü anksiyolitik etkileri gösterilmiştir (Zhang vd., 2016). Çalışmada, uçucu yağların ana bileşenleri olarak elde ettiğimiz *trans-cis*-nepetalakton, α -pinen ve kafur monoterpenlerdendir. Uçucu yağların deney hayvanlarında skopolamin'in yol açtığı anksiyeteyi azaltmasının, özellikle bu bileşenlere bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Davranış testlerinin sonuncusu olan zorunlu yüzme testi depresyon-benzeri davranışı test etmekte kullanılan standart bir testtir. Bununla birlikte, son zamanlarda depresyonu ölçmek için kullanılan klinik-öncesi testlerin aslında depresyonu değil, stresle baş etme becerisini ölçtüğünü iddia eden araştırmacıların sayısı artmıştır. Zorunlu yüzme testi de bu testlerden biridir. Bundan dolayı, depresyon değil, depresyon-benzeri davranış ifadesi daha uygun olacaktır. Yine de depresyon için daha geçerli bir test bulunana kadar zorunlu yüzme testi uzun bir süre kullanılacak gibi gözükmektedir.

Tramadol zorunlu yüzme testinde pozitif kontrol olarak seçilmiştir ve tramadolün etkisi uçucu yağ gruplarına göre daha fazla görülmüştür. Tramadol analjezik ve antidepresan etkileri olan bir ilaçtır. Tramadolün depresyon hayvan modelinde antidepresan-benzeri etki gösterdiği bildirilmiştir (Ostadhadi vd., 2017). Çalışmamızda skopolamin uygulanan sıçanlarda doz bağımlı olarak *N. nuda* subsp. *nuda*, *H. uniglandulosum* ve *A. pseudoaleppica* uçucu yağ uygulamasının depresyon-benzeri davranışı azalttığı sonucu çıkmıştır.

Klinik bir çalışmada *Nepeta menthoides* ekstresinin hastalarda anksiyete ve majör depresyon (Kolouri vd., 2016) seviyesini düşürdüğü ve seçici serotonin geri-alım inhibitörü

olan sertralin uygulanan gruba nazaran daha az yan etki gösterdiği bildirilmiştir (Firoozabadi vd., 2017).

Hypericum perforatum antidepresan aktivitesi bilinen bir bitki türü olup, birçok ülkede reçetesiz olarak satılmaktadır. Kontrollü klinik çalışmalarda standardize edilmiş *Hypericum perforatum* ekstresinin majör depresyona karşı oldukça etkili olduğu görülmüştür (Kasper, 2015) (Apaydin vd., 2016) (Seifritz vd., 2016).

Achillea millefolium türünün ise anksiyolitik ve antidepresan aktiviteye sahip birçok bileşeni (seskiterpenler, laktonlar, tannin, achillion, organik asitler vd) bildirilmiştir (Saki vd., 2014). *A. millefolium* hidroetanolik ekstraktının farelerde anksiyolitik ve antidepresan etkileri gösterilmiştir (Baretta vd., 2009). Bu çalışmalar, bizim çalışmamızdaki *N. nuda* subsp. *nuda*, *A. pseudoaleppica* ve *H. uniglandulosum* uçucu yağlarının anksiyete ve depresyon üzerindeki etkilerine paralellik göstermektedir.

Oksidatif stresin Alzheimer hastalığını tetiklediğine dair birçok kanıt bulunmaktadır. Dahası, oksidatif stres hipotezi Alzheimer hastalığının olası faktörleri arasında yerini almıştır. Oksidatif stres bilindiği gibi nükleik asitler, lipitler, ve proteinler gibi önemli hücresel elementlere zarar vermektedir. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin hücresel antioksidan savunma sistemine baskın çıkması olarak ifade edilebilir. Benzer şekilde, oksidatif stres yenilenemeyen veya ortadan kaldırılamayan okside olmuş/hasar görmüş makromoleküllerin birikiminden kaynaklanır. Antioksidan savunma sisteminin başlıca elemanları ise glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz, glutaredoksinler ve tioredoksinlerdir (Tramutola vd., 2017). Alzheimer hastalığında antioksidan enzimlerdeki fonksiyon azlığı veya kaybı ve hidrojen peroksit, süperoksit, hidroksil anyonu ve nitrik oksit gibi oksidanların artışı bildirilmiştir (Swomley and Butterfield, 2015). Alzheimer hastalarında beynin birçok bölgesinde, özellikle hipokampüste lipit peroksidasyon markörü olan malondialdehit (MDA) seviyesinin artış gösterdiği bildirilmiştir (Islam, 2017).

Çalışmada, amigdala ve hipokampus beyin bölgelerinde skopolamin uygulanan sıçanlarda MDA seviyesi artış gösterirken, GSH miktarı ve SOD aktivitesi azalmıştır. Bu sonuçlar daha önce skopolamin uygulanarak yapılmış çalışmalara paralellik göstermektedir. Upadhyay ve ark (2018)'nın çalışmasında, sıçanlara skopolamin uygulanmasıyla hipokampus ve frontal kortekste SOD aktivitesinde düşüş görülürken, AChE aktivitesinde artış ve hafızada zayıflama gözlenmiştir. Başka bir çalışmada, skopolamin uygulaması farelerde amneziye yol açarken, SOD aktivitesini düşürmüş ve MDA seviyesini düşürmüştür

(Lu vd., 2018). Haider vd., (2017), skopolamin uygulanan sıçanlarda frontal korteks ve hipokampüste AChE aktivitesinde anlamlı derecede artış ve ACh miktarında düşüş gözlemiştir. Ayrıca aynı çalışmada MDA seviyesinde kontrol grubuna göre skopolamin uygulaması artarken, antioksidan parametrelerinden SOD ve GPx aktiviteleri artmıştır.

Çalışmamızda, skopolamin ve uçucu yağ uygulanan gruplarda ise kontrol grubuna yakın bir şekilde MDA seviyelerinin azaldığını, ve GSH miktarı ve SOD aktivitelerinde ise artış olduğunu görmekteyiz. Dolayısıyla, uçucu yağların antioksidan etki gösterdiğini göstermiş bulunmaktayız. Uçucu yağların oksidatif stres üzerindeki etkileri sıçanların hem hipokampus hem de amigdala beyin homojenatlarında gösterilmiştir.

Hipokampus beynin hafıza ile ilişkili bölgesi olarak bilinirken, amigdala daha çok korku, korku hafızası ve korku ile ilişkili davranışlarla ilişkilendirilmektedir. Bundan dolayı amigdala, depresyon ve özellikle de anksiyete ile bağlantılı beyin bölgesidir. Amigdalanın rolüne ilişkin çalışmalar daha çok insan dışı primatlarda yapıldığından kısıtlı bir bilgiye ulaşılmıştır. Bununla birlikte, ciddi amigdala hasarına sahip 44 yaşındaki bir hasta bu dokunun görevlerine ilişkin çok çarpıcı veriler elde edilmesini sağlamıştır. Bu hastada, korku ve korku ile ilişkili duyguların aracılık ettiği düşünülen sosyal davranışlarda ciddi ölçüde bozulmalar görülmüştür (Feinstein vd., 2011). Çalışmada, uçucu yağların hipokampus ve amigdala dokularında skopolamin'in yol açtığı oksidatif stresi azalttığı görülmektedir. Bundan dolayı uçucu yağların hafıza üzerindeki etkileriyle birlikte, anksiyolitik ve antidepresan etkilerinin antioksidan aktivitelerine bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak bu çalışmada, *Nepeta nuda* subsp. *nuda*, *Hypericum uniglandulosum* ve *Achillea pseudoaleppica* uçucu yağlarının skopolamin hayvan modelinde hafıza güçlendirici, anksiyolitik ve antidepresan aktiviteleri gösterilmektedir. Uçucu yağlarda ana bileşen olarak tespit ettiğimiz trans-cis-nepetalakton, α -pinen ve kafur'un uçucu yağların etkilerinden sorumlu olduklarını, antioksidan ve AChE inhibitör etkilerinin de bu uçucu yağların biyolojik aktiviteleri için temel mekanizmaları niteliğinde olduklarını ön görmekte ve bu uçucu yağların Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar için tamamlayıcı/integratif tedavi oluşturabileceklerini düşünmekteyiz.

5. ÖNERİLER

Nepeta nuda subsp. *nuda*, *Hypericum uniglandulosum* ve *Achillea pseudoaleppica* uçucu yağlarının solunumla alınmasının skopolamin hayvan modelinde nöroprotektif etkilerini bu çalışma ile gösterdik. Bununla birlikte, ileriki aşamalarda uçucu yağların standardize edilmesinin ve çalışmanın farklı parametreler de eklenerek modifiye edilmesinin faydalı olacağını düşünmekteyiz. Skopolamin modeli dışında başka hayvan modellerinin örneğin amiloit-beta modelinin uygulanması, anksiyete ve depresyon testleri için kullandığımız yükseltmiş artı labirenti ve zorunlu yüzme testlerine ek olarak açık alan testi ve aydınlık/karanlık kutusu testi gibi diğer testlerin de kullanılması önerilebilir.

Uçucu yağlarımızda elde ettiğimiz bileşenler içerisinde perhidrofarnesil aseton diğer bileşenlere kıyasla daha elverişli doklama verilerini vermiştir. Bu durumda, teorik bulgularımızın desteklenmesi için mutlaka bu bileşenin *in-vitro* ve *in-vivo* olarak test edilmesi gerekmektedir.

Uçucu yağlarda ana bileşenler olarak tespit ettiğimiz *trans-cis*-nepetalakton, α -pinen ve kafur bileşenlerinin deney hayvanlarına farklı dozlarda uygulanmasının ve testlerin bu hayvanlarda tekrarlanmasının faydalı olacağını düşünmekteyiz. Bu durumda, uçucu yağların ana bileşenlerinin etkilerini, aromaterapi uygulamaları ile karşılaştırmak mümkün olacaktır. Bazı uçucu yağ bileşenleri sinerjistik etki gösterip, bileşenler tek başlarına etki göstermeyebilir. Örneğin, *Achillea pseudoaleppica* uçucu yağında ana bileşen olarak elde ettiğimiz kafur'un, tek başına daha fazla veya daha az etki gösterdiğinin ancak bireysel uygulamalarla tespit edilebileceğini düşünmekteyiz. Bundan dolayı, uçucu yağ ana bileşenlerinin etkilerinin bireysel olarak değerlendirilmeleri faydalı olacaktır.

Bu çalışmada herhangi bir toksisite çalışması yapılmamıştır. Çalışmada kullanılan deney hayvanları arasında ölen olmamakla birlikte bu durum uçucu yağ uygulamasının potansiyel toksik etkileri hakkında yeterince bilgi vermemektedir ve ilave çalışmalar yapılması faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Akram, M. and Nawaz, A.,** 2017. Effects of medicinal plants on Alzheimer's disease and memory deficits, *Neural Regen. Res.*, **12**, 660–670.
- Alim, A., Goze, I., Cetin, A., Atas, A.D., Akkus Cetinus, S. and Vural, N.,** 2009. Chemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Nepeta nuda* L. subsp. *albiflora* (Boiss.) gams, *African J. Microbiol. Res.*, **3**, 463–467.
- Almadiy, A.A., Nenaah, G.E., Al Assiuty, B.A., Moussa, E.A. and Mira, N.M.,** 2016. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils and major fractions of four *Achillea* species and their nanoemulsions against foodborne bacteria, *LWT - Food Sci. Technol.*, **69**, 529–537.
- Apaydin, E.A., Maher, A.R., Shanman, R., Booth, M.S., Miles, J. N. V., Sorbero, M. E., Hempel, S.,** 2016. A systematic review of S. John's Wort for major depressive disorder, *Syst. Rev.*, **5-1**, 148.
- Apostolova, L.G.,** 2016. Alzheimer Disease. *Contin. Learn. Neurol.*, **22**, 419–434.
- Appendino, G., Jakupovic, J., Özen, H.Ç. and Schuster, N.,** 1993. A seco-bis-norguaianolide from *Achillea pseudoaleppica*, *Phytochemistry*, **34**, 1171–1172.
- Aydin, E., Hritcu, L., Dogan, G., Hayta, S. and Bagci, E.,** 2016. The effects of inhaled *Pimpinella peregrina* essential oil on scopolamine-induced memory impairment, anxiety, and depression in laboratory rats, *Mol. Neurobiol.*, **53**, 6557–6567.
- Azizi, Z., Ebrahimi, S., Saadatfar, E., Kamalinejad, M. and Majlessi, N.,** 2012. Cognitive-enhancing activity of thymol and carvacrol in two rat models of dementia, *Behav. Pharmacol.*, **23**, 241–249.
- Bagci, E., Aydin, E., Mihasan, M., Maniu, C. and Hritcu, L.,** 2015. Anxiolytic and antidepressant-like effects of *Ferulago angulata* essential oil in the scopolamine rat model of Alzheimer's disease, *Flavour Fragr. J.*, **31-1**, 70-80.
- Bagci, E., Aydin, E., Ungureanu, E. and Hritcu, L.,** 2016. *Anthriscus nemorosa* essential oil inhalation prevents memory impairment, anxiety and depression in scopolamine-treated rats, *Biomed. Pharmacother.*, **84**, 1313–1320.

- Bagci, E. ve Yuce, E.,** 2011. Constituents of the essential oils of two *Hypericum capitatum* Choisy varieties (var. *capitatum* and var. *luteum* Robson) from Turkey. *J. Essent. Oil Bear. Plants*, **14**, 106–113.
- Bahadori, M.B., Dinparast, L., Valizadeh, H., Farimani, M.M. and Ebrahimi, S.N.,** 2016. Bioactive constituents from roots of *Salvia syriaca* L.: Acetylcholinesterase inhibitory activity and molecular docking studies. *South African J. Bot.*, **106**, 1–4.
- Baretta, I., Feliazardo, R.A., Bimbota, V., Gasparotto, J.A., Kassuya, C. and Andreatini, R.,** 2009. The putative anxiolytic and antidepressant-like effect of *Achillea millefolium* L. extract in mice, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **19**, S610–S611.
- Baretta, I.P., Felizardo, R.A., Bimbato, V.F., Santos, M.G.J. dos, Kassuya, C.A.L., Gasparotto Junior, A., da Silva, C.R., de Oliveira, S.M., Ferreira, J. and Andreatini, R.,** 2012. Anxiolytic-like effects of acute and chronic treatment with *Achillea millefolium* L. extract, *J. Ethnopharmacol.*, **140**, 46–54.
- Barrera-Ocampo, A. and Lopera, F.,** 2016. Amyloid-beta immunotherapy : the hope for Alzheimer disease, *Colomb. Med.*, **47**.
- Beppe, G.J., Dongmo, A.B., Foyet, H.S., Dimo, T., Mihasan, M. and Hritcu, L.,** 2015. The aqueous extract of *Albizia adianthifolia* leaves attenuates 6-hydroxydopamine-induced anxiety, depression and oxidative stress in rat amygdala, *BMC Complement. Altern. Med.*, **15**, 1–13.
- Bertoli, A., Çirak, C. and Seyis, F.,** 2017. *Hypericum* spp. volatile profiling and the potential significance in the quality control of new valuable raw material, *Microchem. J.*, **136**, 94–100.
- Bessada, S.M.F., Barreira, J.C.M., Oliveira, M.B.P.P.,** 2015. Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review, *Ind. Crops Prod.*, **76**, 604–615.
- Bethesda,** 2017. PDQ Cancer information summaries: aromatherapy and essential oils, Integrative, alternative, and complementary therapies editorial board. National Cancer Institute (US).
- Boga, M., Ertas, A., Eroglu-Ozkan, E., Kizil, M., Ceken, B. and Topcu, G.,** 2016. Phytochemical analysis, antioxidant, antimicrobial, anticholinesterase and DNA protective effects of *Hypericum capitatum* var. *capitatum* extracts, *South African J. Bot.*, **104**, 249–257.

- Boran, R. and Ugur, A.,** 2017. The mutagenic, antimutagenic and antioxidant properties of *Hypericum lydium*, *Pharm. Biol.*, **55**, 402–405.
- Bouzenna, H., Hfaiedh, N., Giroux-Metgesa, M.-A., Elfeki, A. and Talarmin, H.,** 2017. Potential protective effects of alpha-pinene against cytotoxicity caused by aspirin in the IEC-6 cells. *Biomed. Pharmacother.*, **93**, 961–968.
- Burke, S.L., Cadet, T., Alcide, A., O'Driscoll, J. and Maramaldi, P.,** 2017. Psychosocial risk factors and Alzheimer's disease: the associative effect of depression, sleep disturbance, and anxiety. *Aging Ment. Health*, 1–8.
- Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A. and Akpulat, H.A.,** 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae), *J. Ethnopharmacol.*, **87**, 215–220.
- Cao, Z., Wang, F., Xiu, C., Zhang, J. and Li, Y.,** 2017. *Hypericum perforatum* extract attenuates behavioral, biochemical, and neurochemical abnormalities in aluminum chloride-induced Alzheimer's disease rats, *Biomed Pharmacother.*, **91**, 931–937.
- Carvalho, A.A., Andrade, L.N., De Sousa, É.B.V. and De Sousa, D.P.,** 2015. Antitumor phenylpropanoids found in essential oils, *Biomed Res. Int.*, **2015**.
- Cetin, F., Gozel, N., Kaya, N., Onalan, E., Gurel, A., Ulu, R., Kuloglu, T. and Donder, E.,** 2015. Dokсорubisin uygulanmasının sıçan böbrek dokusunda meydana getirdiği değişiklikler üzerine benfotiamin'in koruyucu etkileri, *Firat Med. J.*, **20**, 8–14.
- Chaudhary, K.K. and Mishra, N.,** 2016. A review on molecular docking : Novel tool for drug discovery, *JSM Chem.*, **4**, 1029–1032.
- Cheung, J., Gary, E.N., Shiomi, K. and Rosenberry, T.L.,** 2013. Structures of human acetylcholinesterase bound to dihydrotanshinone I and territrem B show peripheral site flexibility, *ACS Med. Chem. Lett.*, **4**, 1091–1096.
- Cheung, J., Rudolph, M.J., Burshteyn, F., Cassidy, M.S., Gary, E.N., Love, J., Franklin, M.C. and Height, J.J.,** 2012. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *J. Med. Chem.*, **55**, 10282–10286.
- Cioanca, O., Hritcu, L., Mihasan, M., Trifan, A., Hancianu, M.,** 2014. Inhalation of coriander volatile oil increased anxiolytic-antidepressant-like behaviors and decreased oxidative status in beta-amyloid (1-42) rat model of Alzheimer's disease, *Physiol. Behav.*, **131**, 68–74.

- Cioanca, O., Hancianu, M., Mihasan, M., Hritcu, L., 2015.** Anti-acetylcholinesterase and antioxidant activities of inhaled *Juniper* oil on amyloid beta (1-42)-induced oxidative stress in the rat hippocampus, *Neurochem. Res.*, **40-5**, 852-960.
- Cooper, E.L. and Ma, M.J., 2017.** Alzheimer Disease: Clues from traditional and complementary medicine, *J. Tradit. Complement. Med.*, **7**, 380–385.
- Craig, L.A., Hong, N.S. and McDonald, R.J., 2011.** Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **35**, 1397–1409.
- Cummings, J., Aisen, P.S., Dubois, B., Frölich, L., Jr, C.R.J., Jones, R.W., Morris, J.C., Raskin, J., Dowsett, S.A. and Scheltens, P., 2016.** Drug development in Alzheimer's disease : the path to 2025, *Alzheimers. Res. Ther.*, **8**, 1–12.
- Cummings, J.L., Dubois, B., Molinuevo, J.L. and Scheltens, P., 2013.** International work group criteria for the diagnosis of Alzheimer Disease, *Med. Clin. North A.*, **97**, 363–368.
- Dall'Acqua, S., Bolego, C., Cignarella, A., Gaion, R.M. and Innocenti, G., 2011.** Vasoprotective activity of standardized *Achillea millefolium* extract, *Phytomedicine*, **18**, 1031–1036.
- De Strooper, B., 2007.** Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease, *EMBO Rep.*, **8**, 141–146.
- Dias, M.I., Barros, L., Dueñas, M., Pereira, E., Carvalho, A.M., Alves, R.C., Oliveira, M.B.P.P., Santos-Buelga, C. and Ferreira, I.C.F.R., 2013.** Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction, *Food Chem.*, **141**, 4152–4160.
- Elufioye, T.O., Oladele, A.T. and Agbedahunsi, J.M., 2012.** Ethnomedicinal study and screening of plants used for memory enhancement and antiaging in Sagamu, Nigeria, *European J. Med. Plants*, **2**, 262–275.
- Fedotova, J., Kubatka, P., Büsselberg, D., Shleikin, A.G., Caprnda, M., Dragasek, J., Rodrigo, L., Pohanka, M., Gasparova, I., Nosal, V., Opatrilova, R., Qaradakh, T., Zulli, A. and Kruzliak, P., 2017.** Therapeutical strategies for anxiety and anxiety-like disorders using plant-derived natural compounds and plant extracts, *Biomed. Pharmacother.*, **95**, 437–446.

- Feinstein, S. Justin., Adolphs, Ralph., Damasio, R. Antonio., Tranel, Daniel.,** 2011. The human amygdala and the induction and experience of fear, *Curr. Biol.*, **21-1**, 34-38.
- Filiptsova, O.V., Gazzavi-Rogozina, L.V., Timoshyna, I.A., Naboka, O.I., Dyomina, Y.V. and Ochkur, A.V.,** 2017. The effect of the essential oils of lavender and rosemary on the human short-term memory, *Alexandria J. Med*, **54-1**, 41-44.
- Forrester, L., Maayan, N., Orrell, M., Spector, A., Buchan, L. and Soares-Weiser, K.,** 2014. Aromatherapy for dementia, *Cochrane Libr.*, **25-2**.
- Ganji, A., Salehi, I., Nazari, M., Taheri, M. and Komaki, A.,** 2017. Effects of *Hypericum scabrum* extract on learning and memory and oxidant/antioxidant status in rats fed a long-term high-fat diet, *Metab. Brain Dis.*, **32**, 1255–1265.
- Gkinis, G., Bozin, B., Mimica-Dukic, N. and Tzakau, O.,** 2010. Antioxidant activity of *Nepeta nuda* L. ssp. *nuda* essential oil rich in nepetalactones from Greece, *J. Med. Food*, **13**, 1176–1181.
- Gold, C.A. and Budson, A.E.,** 2008. Memory loss in Alzheimer's disease: implications for development of therapeutics, *Expert Rev. Neurother.*, **8**, 1879–1891.
- Guo, T., Noble, W. and Hanger, D.P.,** 2017. Roles of *tau* protein in health and disease. *Acta Neuropathol.*, **133**, 665–704.
- Güneş, S., Savran, A., Paksoy, M.Y., Koşar, M. and Çakılcıoğlu, U.,** 2017. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Karaisalı and its surrounding (Adana-Turkey), *J. Herb. Med.*, **8**, 68–75.
- Gürdal, B. and Kültür, Ş.,** 2013. An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris (Muğla, Turkey), *J. Ethnopharmacol.*, **146**, 113–126.
- Ferreira-Vieira, H. T., Guimaraes, M. I., Silva, R. F. and Ribeiro, M. F.,** 2016. Alzheimer's disease: targeting the cholinergic System, *Curr. Neuropharmacol.*, **14**, 101–115.
- Haider, S., Batool, Z., Ahmad, S., Siddiqui, R.A. and Haleem, D.J.,** 2017. Walnut supplementation reverses the scopolamine-induced memory impairment by restoration of cholinergic function via mitigating oxidative stress in rats: A potential therapeutic intervention for age related neurodegenerative disorders, *Metab. Brain Dis.*, **33-1**, 39-51.
- Haider, S., Batool, Z., Tabassum, S., Perveen, T., Saleem, S., Naqvi, F., Javed, H. and Haleem, D.J.,** 2011. Effects of walnuts (*Juglans regia*) on learning and memory functions, *Plant Foods Hum, Nutr.*, **66**, 335–340.

- Hammami, I., Ali, R., Nahdi, A., Kallech-Ziri, O., Boussada, M., El May, A. and El May, M.,** 2017. Chronic consumption of *Hypericum humifusum* leaf extracts impairs epididymis spermatozoa characters in association with oxidative stress in adult male wistar rats, *Biomed. Pharmacother.*, **93**, 616–625.
- Han, S.D., Nguyen, C.P., Stricker, N.H. and Nation, D.A.,** 2017. Detectable neuropsychological differences in early preclinical Alzheimer's Disease: a meta-analysis, *Neuropsychol. Rev.*, **27-4**, 305-325.
- Hancianu, M., Cioanca, O., Mihasan, M. and Hritcu, L.,** 2013. Neuroprotective effects of inhaled lavender oil on scopolamine-induced dementia via anti-oxidative activities in rats, *Phytomedicine*, **20**, 446–52.
- Hickman, R.A., Faustin, A. and Wisniewski, T.,** 2016. Alzheimer Disease and its growing epidemic: risk factors, biomarkers, and the urgent need for therapeutics, *Neurol. Clin.*, **34**, 941–953.
- Hicks, D., Makava, N., Nalivaeva, N. and J Turner, A.,** 2012. Characterisation of acetylcholinesterase release from neuronal cells, *Chemico-biological interactions*, **203**, 302-308.
- Holger, J.,** 2013. Memory loss in Alzheimer's disease, *Clin. Res.*, **15**, 445–454.
- Hritcu, L., Bagci, E., Aydin, E. and Mihasan, M.,** 2015. Antiamnesic and antioxidants effects of *Ferulago angulata* essential oil against scopolamine-induced memory impairment in laboratory rats, *Neurochem. Res.*, **40**, 1799–1809.
- Hritcu, L., Noumedem, J.A., Cioanca, O., Hancianu, M., Kuete, V. and Mihasan, M.,** 2014. Methanolic extract of *Piper nigrum* fruits improves memory impairment by decreasing brain oxidative stress in amyloid beta (1–42) rat model of Alzheimer's Disease, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **34**, 437–449.
- Huey, R., Morris, G.M., Olson, A.J. and Goodsell, D.S.,** 2007. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation, *J. Comput. Chem.*, **28**, 1145–1152.
- Hughes, R.N., Desmond, C.S. and Fisher, L.C.E.,** 2004. Room novelty, sex, scopolamine and their interactions as determinants of general activity and rearing, and light-dark preferences in rats, *Behav. Processes*, **67**, 173–181.
- Hullinger, R. and Puglielli, L.,** 2017. Molecular and cellular aspects of age-related cognitive decline and Alzheimer's disease, *Behav. Brain Res.*, **322**, 191–205.
- Islam, M.T.,** 2017. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders, *Neurol. Res.*, **39**, 73–82.

- Isman, M.B., Wilson, J.A. and Bradbury, R.,** 2008. Insecticidal activities of commercial rosemary oils (*Rosmarinus officinalis*) against larvae of *Pseudaletia unipuncta* and *Trichoplusia ni* in relation to their chemical compositions, *Pharm. Biol.*, **46**, 82–87.
- Jankowska, M., Rogalska, J., Wyszowska, J. and Stankiewicz, M.,** 2018. Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system—a review, *Molecules*, **23-1**, 34.
- Jazayeri, S.B., Amanlou, A., Ghanadian, N., Pasalar, P. and Amanlou, M.,** 2014. A preliminary investigation of anticholinesterase activity of some Iranian medicinal plants commonly used in traditional medicine, *DARU J. Pharm. Sci.*, **22-17**.
- Jimbo, D., Kimura, Y., Taniguchi, M., Inoue, M. and Urakami, K.,** 2009. Effect of aromatherapy on patients with Alzheimer's disease, *Psychogeriatrics*, **9**, 173–179.
- Joosten, R.P., Long, F., Murshudov, G.N. and Perrakis, A.,** 2014. The PDB_REDO server for macromolecular structure model optimization, *Int. Union Crystallogr.*, **1**, 213–220.
- Kamatou, G.P.P., Vermaak, I., Viljoen, A.M. and Lawrence, B.M.,** 2013. Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties, *Phytochemistry*, **96**, 15–25.
- Kasper, S.,** 2015. Phytopharmaceutical treatment of anxiety, depression, and dementia in the elderly: evidence from randomized, controlled clinical trials, *Wien. Med. Wochenschr.*, **165**, 217–228.
- Kennedy, D.O. and Scholey, A.B.,** 2006. The psychopharmacology of European herbs with cognition-enhancing properties, *Curr. Pharm. Des.*, **12-35**, 4613-4623.
- Kilic, O. and Bagci, E.,** 2016. Chemical composition of two endemic *Centaurea* L. taxa from Turkey, a chemotaxonomic approach, *J. Essent. Oil-Bearing Plants*, **19**, 185–193.
- Kilic, O., Hayta, S. and Bagci, E.,** 2011. Chemical composition of essential oil of *Nepeta nuda* L. subsp. *nuda* (Lamiaceae) from Turkey, *Asian J. Chem.*, **23**, 2788–2790.
- Kim, K., Bu, Y., Jeong, S., Lim, J., Kwon, Y., Cha, D.S., Kim, J., Jeon, S., Eun, J. and Jeon, H.,** 2006. Memory-enhancing effect of a supercritical carbon dioxide fluid extract of the needles of *Abies koreana* on scopolamine-induced amnesia in mice, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1821–6.

- Klinkenberg, I. and Blokland, A.,** 2010. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **34**, 1307–50.
- Kocahan, S. and Doğan, Z.,** 2017. Mechanisms of Alzheimer's disease pathogenesis and prevention: The brain, neural pathology, N-methyl-D-Aspartate receptors, *tau* protein and other risk factors, *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.*, **15**, 1–8.
- Kokdil, G., Kurucu, S. and Yildiz, A.,** 1998. Essential oil composition of *Nepeta nuda* L. ssp. *nuda*, *Flavour Fragr. J.*, **13**, 233–234.
- Koppula, S. and Choi, D.K.,** 2011. *Cuminum cyminum* extract attenuates scopolamine-induced memory loss and stress-induced urinary biochemical changes in rats: A noninvasive biochemical approach, *Pharm. Biol.*, **49**, 702–708.
- Korkina, L., Kostyuk, V., de Luca, C. and Pastore S.,** 2011. Plant phenylpropanoids as emerging anti-inflammatory agents. *Mini Rev. Med. Chem.*, **11-10**, 823-835.
- Kozuharova, E., Benbassat, N. and Getov, I.,** 2014. Ethnobotanical records of not yet documented therapeutic effects of some popular Bulgarian medicinal plants, *Emirates J. Food Agric.*, **26**, 647–651.
- Kryger, G., Silman, I. and Sussman, J.L.,** 1999. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): Implications for the design of new anti-Alzheimer drugs, *Structure*, **7**, 297–307.
- Labute, P.,** 2009. Protonate3D: Assignment of ionization states and hydrogen coordinates to macromolecular structures, *Proteins*, **75**, 187–205.
- Lee, C., Park, G.H., Kim, C.-Y. and Jang, J.-H.,** 2011. [6]-Gingerol attenuates β -amyloid-induced oxidative cell death via fortifying cellular antioxidant defense system, *Food Chem. Toxicol.*, **49**, 1261–9.
- Levy, K., Lanctôt, K.L., Farber, S.B., Li, A. and Herrmann, N.,** 2012. Does pharmacological treatment of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's Disease relieve caregiver burden, *Drugs Aging*, **29**, 167–179.
- López, M.D., Campoy, F.J., Pascual-Villalobos, M.J., Muñoz-Delgado, E. and Vidal, C.J.,** 2015. Acetylcholinesterase activity of electric eel is increased or decreased by selected monoterpenoids and phenylpropanoids in a concentration-dependent manner, *Chem. Biol. Interact.*, **229**, 36–43.

- Lu, C., Dong, L., Lv, J., Wang, Y., Fan, B., Wang, F. and Liu, X.,** 2018. 20(S)-protopanaxadiol (PPD) alleviates scopolamine-induced memory impairment via regulation of cholinergic and antioxidant systems, and expression of Egr-1, c-Fos and c-Jun in mice, *Chem. Biol. Interact.*, **279**, 64–72.
- Lydiard, R.B.,** 2003. The role of GABA in anxiety disorders, *J. Clin. Psychiatry.*, **64**, 21–27.
- Malinow, R.,** 2012. New developments on the role of NMDA receptors in Alzheimer's disease, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **22**, 559–563.
- Mehri, S., Meshki, M.A. and Hosseinzadeh, H.,** 2015. Linalool as a neuroprotective agent against acrylamide-induced neurotoxicity in wistar rats, *Drug Chem. Toxicol.*, **38**, 162–166.
- Mendiola-Precoma, J., Berumen, L.C., Padilla, K., Garcia-Alcocer, G.,** 2016. Therapies for prevention and treatment of Alzheimer's Disease, *Biomed Res. Int.*, **2016**.
- Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M., Cui, M.,** 2011. Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery, *Curr. Comput. Aided Drug Des.*, **7**, 146–157.
- Mohammadhosseini, M., Sarker, S.D. and Akbarzadeh, A.,** 2017. Chemical composition of the essential oils and extracts of *Achillea* species and their biological activities: A review. *J. Ethnopharmacol.*, **199**, 257–315.
- More, S.V., Kumar, H., Cho, D., Yun, Y. and Choi, D.,** 2016. Toxin-induced experimental models of learning and memory impairment, *Mol. Sci.*, **17**, 1447.
- Nagai, K., Niijima, A., Horii, Y., Shen, J. and Tanida, M.,** 2017. Olfactory stimulatory with grapefruit and lavender oils change autonomic nerve activity and physiological function. *Auton. Neurosci.*, **185**, 29–35.
- Nam, S.-Y., Chung, C.-K., Seo, J.-H., Rah, S.-Y., Kim, H.-M. and Jeong, H.-J.,** 2014. The therapeutic efficacy of α -pinene in an experimental mouse model of allergic rhinitis, *Int. Immunopharmacol.*, **23**, 273–282.
- Natarajan, S., Shunmugiah, K.P. and Kasi, P.D.,** 2013. Plants traditionally used in age-related brain disorders (dementia): An ethanopharmacological survey, *Pharm. Biol.*, **51**, 492–523.

- Nazir, N., Karim, N., Abdel-Halim, H., Khan, I., Wadood, S.F., Nisar, M.,** 2018. Phytochemical analysis, molecular docking and antiamnesic effects of methanolic extract of *Silybum marianum* (L.) Gaertn seeds in scopolamine induced memory impairment in mice, *J. Ethnopharmacol.*, **210**, 198–208.
- Neha, Sodhi, R.K., Jaggi, A.S. and Singh, N.,** 2014. Animal models of dementia and cognitive dysfunction, *Life Sci.*, **109**, 73–86.
- Nestorović, J., Misic, D., Sokovic, M., Glamoclija, J., Ciric, A., Maksimovic, V. and Grubisic, D.,** 2010. Nepetalactone content in shoot cultures of three endemic *Nepeta* species and the evaluation of their antimicrobial activity, *Fitoterapia*, **81**, 621–626.
- Nikolić, B., Vasilijevic, B., Mitic-Culafic, D., Vukovic-Gacic, B. and Knezevic-Vulcevic, J.,** 2015. Comparative study of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic activities of monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in bacteria and mammalian cells, *Chem. Biol. Interact.*, **242**, 263–271.
- Olsen, R.W. and DeLorey, T.M.,** 1999. GABA receptor physiology and pharmacology, in basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects, Eds. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW., 6th Edition. Philadelphia.
- Orhan, I. and Aslan, M.,** 2009. Appraisal of scopolamine-induced antiamnesic effect in mice and in vitro antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of some traditionally used Lamiaceae plants, *J. Ethnopharmacol.*, **122**, 327–332.
- Ostadhadi, S., Norouzi-Javidan, A., Chamanara, M., Akbarian, R., Imran-Khan, M., Ghasemi, M. and Dehpour, A.R.,** 2017. Involvement of NMDA receptors in the antidepressant-like effect of tramadol in the mouse forced swimming test, *Brain Res. Bull.*, **134**, 136–141.
- Ozarowski, M., Mikolajczak, P.L., Bogacz, A., Gryszczynska, A., Kujawska, M., Jodynisliefert, J., Piasecka, A., Napieczynska, H., Kujawski, R., Bartkowiak-wieczorek, J., Cichocka, J., Bobkiewicz-kozlowska, T., Czerny, B. and Mrozikiewicz, P.M.,** 2013. *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain, *Fitoterapia*, **91**, 261–271.
- Özen, H.Ç., Toker, Z., Clery, R.A. and Owen, N.E.,** 2003. Composition of the essential oil of *Achillea pseudoaleppica* Hub.-Mor, *J. Essent. Oil Res.*, **15**, 96–97.

- Özkan, E.E., Demirci, B., Gürer, Ç.Ü., Kültür, Ş., Mat, A. and Başer, K.H.C.,** 2013. Essential oil composition of five endemic *Hypericum* species from Turkey, *Med. Aromat. Plants.*, **2**, 2–5.
- Pagadala, N.S., Syed, K. and Tuszynski, J.,** 2017. Software for molecular docking : A review, *Biophys. Rev.*, **9**, 91–102.
- Pandey, A.K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N.N. and Bajpai, V.K.,** 2016. Essential oils: sources of antimicrobials and food preservatives, *Front. Microbiol.*, **7**, 2161.
- Pandey, A.K., Mohan, M., Singh, P. and Tripathi, N.N.,** 2015. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential Oil of *Nepeta hindostana* (Roth) Haines from India, *Rec. Nat. Prod.*, **9**, 224–233.
- Pandey, P. and Bhatnagar, S.,** 2013. Search for novel drug targets using bioinformatics tools in *Plasmodium falciparum*, *World Res. J. Bioinforma.*, **1-1**, 9–11.
- Pedretti, A., Villa, L. and Vistoli, G.,** 2004. VEGA – An open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming, *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, **18**, 167–173.
- Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kalé, L. and Schulten, K.,** 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD, *J. Comput. Chem.*, **26**, 1781–1802.
- Piccininni, M., Carlo, A. Di, Baldereschi, M., Zaccara, G. and Inzitari, D.,** 2005. Behavioral and psychological symptoms in Alzheimer’s disease: Frequency and relationship with duration and severity of the disease, *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, **19**, 276–281.
- Porres-Martínez, M., Gonzales-Burgos, E., Carretero, M.E. and Gomez- Serranillos, M.P.,** 2016. In vitro neuroprotective potential of the monoterpenes α -pinene and 1,8-cineole against H_2O_2 -induced oxidative stress in PC12 cells, *Zeitschrift für Naturforsch. C.*, **71**, 191–199.
- Porres-Martínez, M., González-Burgos, E., Carretero, M.E. and Gómez-Serranillos, M.P.,** 2015. Protective properties of *Salvia lavandulifolia* Vahl. essential oil against oxidative stress-induced neuronal injury, *Food Chem. Toxicol.*, **80**, 154–162.

- Postu, P.A., Noumedem, J.A.K., Cioanca, O., Hancianu, M., Mihasan, M., Ciorpac, M., Gorgan, D.L., Petre, B.A. and Hritcu, L.,** 2017. *Lactuca capensis* reverses memory deficits in A β 1-42-induced an animal model of Alzheimer's disease, *J. Cell. Mol. Med*, **22**, 111–122.
- Properzi, A., Angelini, P., Bertuzzi, G., Venanzoni, R.,** 2013. Some biological activities of essential oils, *Med Aromat Plants*, **2**, 136.
- Puthenkalam, R., Hieckel, M., Simeone, X., Suwattanasophon, C., Feldbauer, R. V, Ecker, G.F. and Ernst, M.,** 2016. Structural studies of GABA(A) receptor binding sites: Which experimental structure tells us what, *Front. Mol. Neurosci.*, **9**, 44.
- Ramírez, M.J.,** 2013. 5-HT(6) receptors and Alzheimer's disease, *Alzheimers. Res. Ther.*, **5-2**, 15.
- Raut, J.S. and Karuppayil, S.M.,** 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils, *Ind. Crops Prod.*, **62**, 250–264.
- Razavi, B.M., Zargarani, N. and Hosseinzadeh, H.,** 2017. Anti-anxiety and hypnotic effects of ethanolic and aqueous extracts of *Lippia citriodora* leaves and verbascoside in mice. *Avicenna J. Phytomedicine*, **7**, 353–365.
- Roodenrys, S., Booth, D., Bulzomi, S., Phipps, A., Micallef, C. and Smoker, J.,** 2002. Chronic effects of Brahmi (*Bacopa monnieri*) on human memory. *Neuropsychopharmacology*, **27**, 279.
- Rosenberry, T.L., Sonoda, L.K., Dekat, S.E., Cusack, B. and Johnson, J.L.,** 2008. Analysis of the reaction of carbachol with acetylcholinesterase with thioflavin T as a coupled fluorescence reporter, *Biochemistry*, **47**, 13056–13063.
- Sahak, M.K.A., Abdul Majid, M., Hashim, N.H. and Adli, D.S.H.,** 2013. *Nigella sativa* oil enhances the spatial working memory performance of rats on a radial arm maze, *Evid-Based Complement. Altern. Med.*, **2013**.
- Saki, K., Bahmani, M. and Rafieian-Kopaei, M.,** 2014. The effect of most important medicinal plants on two important psychiatric disorders (anxiety and depression)-a review, *Asian Pac. J. Trop. Med.*, **7**, 34–42.
- Salentin, S., Schreiber, S., Haupt, V.J., Adasme, M.F. and Schroeder, M.,** 2015. PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler, *Nucleic Acids Res.*, **43**, W443–W447.

- Santos, C.Y., Snyder, P.J., Wu, W.-C., Zhang, M., Echeverria, A. and Alber, J., 2017.** Pathophysiologic relationship between Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and cardiovascular risk: A review and synthesis, *Alzheimer's Dement.*, **9-7**, 69–87.
- Santos, É.R.Q., Maia, C.S.F., Fontes Junior, E.A., Melo, A.S., Pinheiro, B.G. and Maia, J.G.S., 2018.** Linalool-rich essential oils from the Amazon display antidepressant-type effect in rodents, *J. Ethnopharmacol.*, **212**, 43–49.
- Šarić-Kundalić, B., Dobeš, C., Klatte-Asselmeyer, V. and Saukel, J., 2010.** Ethnobotanical study on medicinal use of wild and cultivated plants in middle, south and west Bosnia and Herzegovina, *J. Ethnopharmacol.*, **131**, 33–55.
- Schwob, I., Bessiere, J.M., Dherbomez, M. and Viano, J., 2002.** Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum coris*, *Fitoterapia*, **73**, 511–513.
- Seifritz, E., Hatzinger, M., Holsboer-Trachsler E., 2016.** Efficacy of *Hypericum* extract WS(®) 5570 compared with paroxetine in patients with a moderate major depressive episode-a subgroup analysis, *Int J Psychiatry Clin Pract*, 20-3, 126-132.
- Selkoe, D.J. and Hardy, J., 2016.** The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years, *EMBO Mol. Med.*, **8**, 595–608.
- Souza, P., Gasparotto, A., Crestani, S., Stefanello, M.É.A., Marques, M.C.A., Silva-Santos, J.E. da, and Kassuya, C.A.L., 2011.** Hypotensive mechanism of the extracts and artemetin isolated from *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in rats, *Phytomedicine*, **18**, 819–825.
- Shahat, A.A., Ibrahim, A.Y., Elsaid, M.S., 2014.** Polyphenolic content and antioxidant activity of some wild Saudi Arabian asteraceae plants, *Asian Pac. J. Trop. Med.*, **7**, 545–551.
- Sjoberg, E.A., 2017.** Logical fallacies in animal model research, *Behav. Brain Funct.*, **13-3**.
- Skaper, S.D., 2012.** The neurotrophin family of neurotrophic factors: An overview, *Methods Mol. Biol.*, **846**, 1–12.
- Skoric, M., Gligorijevic, N., Cavic, M., Todorovic, S., Jankovic, R., Ristic, M., Misic, D. and Radulovic, S., 2017.** Cytotoxic activity of *Nepeta rtanjensis* Diklić & Milojević essential oil and its mode of action, *Ind. Crops Prod.*, **100**, 163–170.

- Śledź, P. and Caflisch, A.,** 2018. Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **48**, 93–102.
- Sonboli, A., Saadat, M., Arman, M. and Kanani, M.,** 2017. Antibacterial activity and composition of the essential oil of *Nepeta hormozganica* Jamzad from Iran. *Nat. Prod. Res.*, **31-23**, 2806-2809.
- Sussman, J.L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. and Silman, I.,** 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein, *Science*, **253**, 872–879.
- Sutton, A.L.,** 2010. Complementary and Alternative Medicine: Sourcebook, Fourth edi. ed. Peter E. Ruffner, Omnigraphics, Inc.
- Swomley, A.M. and Butterfield, D.A.,** 2015. Oxidative stress in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: evidence from human data provided by redox proteomics, *Arch. Toxicol.*, **89**, 1669–1680.
- Tan, M., Yu, J., Tan, C., Wang, H., Meng, X., Wang, C.,** 2015. Efficacy and adverse effects of *Ginkgo Biloba* for cognitive impairment and dementia : A systematic review, *J. Alzheimer's Dis.*, **43**, 589–603.
- Tekeli, F.O. and Gokce, A.F.,** 2016. Endemic plants and wild *Allium* species in Turkey, *Acta Horticulturae*, **1143**, 327–332.
- Tekin, M.,** 2017. Pharmacobotanical study of *Hypericum thymopsis*, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **27**, 143–152.
- Thenmozhi, A.J., Dhivyabharathi, M., William, T.R., Manivasagam, T. and Essa, M.M.,** 2016. Tannoid principles of *Embllica officinalis* renovate cognitive deficits and attenuate amyloid pathologies against aluminum chloride induced rat model of Alzheimer's disease, *Nutr. Neurosci.*, **19**, 269–278.
- Tisserand R.,** 1988. Aromatherapy for everyone, Penguin, London.
- Todorov, D., Shishkova, K., Dragolova, D., Hinkov, A., Kapchina-Toteva, V. and Shishkov, S.,** 2015. Antiviral activity of medicinal plant *Nepeta nuda*. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, **29**, 39–43.
- Toker, Z., Kızıl, G., Özen, H.Ç., Kızıl, M. and Ertekin, S.,** 2006. Compositions and antimicrobial activities of the essential oils of two *Hypericum* species from Turkey. *Fitoterapia*, **77**, 57–60.
- Tramutola, A., Lanzillotta, C., Perluigi, M. and Butterfield, D.A.,** 2017. Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease, *Brain Res. Bull.*, **133**, 88–96.

- Tse, K. and Herrup, K.,** 2016. Re-imagining Alzheimer's disease—the diminishing importance of amyloid and a glimpse of what lies ahead, *J. Neurochem.*, **143-4**, 432-444.
- Turkoglu, S., Turkoglu, I., Celik, S., Bahsi, M., Gur, S. and Parlak, A.E.,** 2015. Some biological compounds, antioxidant and antimicrobial activities of endemic *Hypericum uniglandulosum*, *Chem. Nat. Compd.*, **51**, 615–619.
- Uludag, A., Aksoy, N., Yazlık, A., Arslan, Z.F., Yazmış, E., Uremis, İ., Cossu, T.A., Groom, Q., Pergl, J., Pysek, P., Brundu, G.,** 2017. Alien flora of Turkey: checklist, taxonomic composition and ecological attributes, *Neobiota*, **35**, 61-85.
- Upadhyay, P., Sadhu, A., Singh, P.K., Agrawal, A., Ilango, K., Purohit, S., Dubey, G.P.,** 2018. Revalidation of the neuroprotective effects of a United States patented polyherbal formulation on scopolamine induced learning and memory impairment in rats, *Biomed. Pharmacother.*, **97**, 1046–1052.
- URL-1,** www.alzheimerdernegi.org.tr, Türkiye Alzheimer Derneği, 11 Aralık 2017.
- URL-2,** www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=4992, 18 Kasım 2017.
- URL-3,** www.bizimbitkiler.org.tr/v2/hiyerarsi.php?c=Hypericum, Türkçe Bitki Adları, 20 Kasım, 2017.
- URL-4,** <http://www.bizimbitkiler.org.tr/v2/turkce.php>, Türkçe Bitki Adları, 19 Kasım 2017.
- URL-5,** <http://www.bizimbitkiler.org.tr/v2/turkce.php>, Türkçe Bitki Adları, 22 Kasım 2017.
- Uslusoy, F., Nazıroğlu, M., Övey, İ.S. and Sönmez, T.T.,** 2017. *Hypericum perforatum* L. supplementation protects sciatic nerve injury-induced apoptotic, inflammatory and oxidative damage to muscle, blood and brain in rats, *J. Pharm. Pharmacol.*
- Vatanparast, J. and Andalib-Lari, F.,** 2017. Camphor elicits epileptiform discharges in snail neurons: The role of ion channels modulation, *Neurotoxicology*, **60**, 299–307.
- Wang, X., Blanchard, J., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K.,** 2015. Memantine attenuates Alzheimer's Disease-like pathology and cognitive impairment. *PLoS One*, **10-12**.
- Xiao-Jun, L., Yan-Jing, Y., Yu-Sang, L., Kevin Zhang, W. and He-Bin, T.,** 2016. α -Pinene, linalool, and 1-octanol contribute to the topical anti-inflammatory and analgesic activities of frankincense by inhibiting COX-2. *J. Ethnopharmacol.*, **179**, 22–26.
- Xu, P., Wang, K., Lu, C., Dong, L., Gao, L., Yan, M., Aibai, S., Yang, Y. and Liu, X.,** 2017. Protective effects of linalool against amyloid beta-induced cognitive deficits and damages in mice, *Life Sc.*, **174**, 21–27.

- Xu, Y., Cheng, S., Sussman, J.L., Silman, I. and Jiang, H.,** 2017. Computational studies on acetylcholinesterases, *Molecules*, **22-8**, 1324-1334.
- Yang, H., Woo, J., Pae, A.N., Um, M.Y., Cho, N.-C., Park, K.D., Yoon, M., Kim, J., Lee, C.J. and Cho, S.,** 2016. α -Pinene, a major constituent of pine tree oils, enhances non-rapid eye movement sleep in mice through GABA_A-benzodiazepine receptors, *Mol. Pharmacol.*, **90**, 530-539.
- Yang, Q., Song, D. and Qing, H.,** 2017. Neural changes in Alzheimer's disease from circuit to molecule: Perspective of optogenetics, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **79**, 110–118.
- Yuce-Babacan, E. ve Bagci, E.,** 2017. Essential oil composition of *Hypericum uniglandulosum* Hausskn . ex Bornm. and *Hypericum lyidium* Boiss. from Turkey, *Int. J. Nat. Life Sci.*, **1**, 12–16.
- Yuce, E.,** 2009. *Hypericum* L. (Hypericaceae) cinsine ait Drosanthe (Spach) Endl. seksiyonunun biyosistematigi, *Doktora Tezi*, F. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Yuce, E. and Bagci, E.,** 2011. The essential oils of the aerial parts of two *Hypericum* taxa (*Hypericum triquetrifolium* and *Hypericum aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* (Clusiaceae)) from Turkey, *Nat. Prod. Res.*, **26**, 1985–1990.
- Yüce, E., Paksoy, M.Y. and Bagci, E.,** 2016. Essential oil composition of two *Grammosciadium* DC species, *G. platycarpum* (Boiss et Hausskn) Schischk and *G. macrodon* Boiss (Apiaceae), from Turkey, *Trop. J. Pharm. Res.*, **15**, 411–414.
- Zengin, G., Bulut, G., Mollica, A., Haznedaroglu, M.Z., Dogan, A. and Aktumsek, A.,** 2017. Bioactivities of *Achillea phrygia* and *Bupleurum croceum* based on the composition of phenolic compounds: *In vitro* and *in silico* approaches, *Food Chem. Toxicol.*, **107**, 597-608.
- Zhang, N., Zhang, L., Feng, L. and Yao, L.,** 2016. The anxiolytic effect of essential oil of *Cananga odorata* exposure on mice and determination of its major active constituents, *Phytomedicine*, **23**, 1727–1734.
- Zhao, J., Liu, W. and Wang, J.-C.,** 2015. Recent advances regarding constituents and bioactivities of plants from the Genus *Hypericum*, *Chem. Biodivers*, **12**, 309–349.
- Zhao, N., Liu, C.-C., Qiao, W. and Bu, G.,** 2018. Apolipoprotein E, receptors, and modulation of Alzheimer's Disease, *Biol. Psychiatry.*, **15**, 83(4), 347-357.
- Zhou, W., Fukumoto, S. and Yokogoshi, H.,** 2009. Components of lemon essential oil attenuate dementia induced by scopolamine, *Nutr. Neurosci.*, **12**, 57–64.

ÖZGEÇMİŞ

Emel AKBABA

Doğum Yeri : Zonguldak
Doğum Tarihi : 02.11.1985
Görevi : Araştırma Görevlisi
İş Adresi : Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler
Biyoloji Anabilim Dalı
Tel : 0 424 237 00 00/3779
Fax : 0 424 233 00 62
e-posta : eakbaba@firat.edu.tr
2013-2018 : Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji
Anabilim Dalı'nda Doktora Eğitimi
Tez Konusu : *Hypericum uniglandulosum* Hausskn. ex Bornm., *Achillea*
pseudoaleppica Hub.-Mor. ve *Nepeta nuda* subsp. *nuda* L. uçucu
yağlarının merkezi sinir sistemi üzerine etkilerinin *in vivo* ve *in*
silico modellerle incelenmesi
2010-2012 : University of Texas at San Antonio, Graduate School in
Biology'de Tezsiz Yüksek Lisans Eğitimi.
2004-2008 : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Lisans
Eğitimi
1997-2004 : Orta ve Lise Eğitimi
1992-1997 : İlkokul Eğitimi