

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALZHEİMER HASTALIĞININ İN VİTRO
MODELLERİNDE HERPES SİMPEKS
PROTEİNLERİNİN KOMPLEMAN SİSTEM,
SİTOKİNLER VE EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLER
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Ecz. Anıl YİRÜN

**Farmasötik Toksikoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2023

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALZHEİMER HASTALIĞININ İN VİTRO
MODELLERİNDE HERPES SİMPEKS
PROTEİNLERİNİN KOMPLEMAN SİSTEM,
SİTOKİNLER VE EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLER
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Ecz. Anıl YİRÜN

**Farmasötik Toksikoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU**

ANKARA

2023

ONAY SAYFASI**ALZHEİMER HASTALIĞININ İN VİTRO MODELLERİNDE HERPES
SİMPEKS PROTEİNLERİNİN KOMPLEMAN SİSTEM, SİTOKİNLER VE
EPIGENETİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ****Uzm. Ecz. Anıl YİRÜN****Danışman: Prof.Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU**

Bu tez çalışması 15/11/2023 tarihinde jürimiz tarafından “Farmasötik Toksikoloji Doktora Programı”nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Terken Baydar
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Doç. Dr. Merve BACANLI
(Sağlık Bilimleri Üniversitesi)

Üye:

Dr. Öğr. Üyesi Aylin BALCI ÖZYURT
(Bahçeşehir Üniversitesi)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

...../...../.....

Anıl YİRÜN

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Uzm. Ecz. Anıl YİRÜN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca çok kıymetli bilgi ve tecrübelerini sabırla aktaran, desteğini hiç esirgemeyen ve her zaman yol gösteren, öğrencisi olmaktan büyük bir onur ve mutluluk duyduğum çok değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Ü. Pınar ERKEKOĞLU'na,

Eğitimime katkıda bulunan Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine,

Deneylerim sırasında bilimsel birikimleri ve emekleri ile yanımda olan, her zaman desteklerini ve sevgilerini hissettiğim, varlıkları hayatımı güzelleştiren, çok kıymetli arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Aylin BALCI ÖZYURT, Dr. Selinay Başak ERDEMLİ KÖSE ve Uzm. Bio. Deniz Arca ÇAKIR'a,

Hayatımın her aşamasında sevgi ve destekleriyle yanımda oldukları ve bana güç verdikleri için Annem, Babam ve Ağabeyime,

Çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Hacettepe Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmektedir. Proje no: THD-2021-19660

ÖZET

Anıl, Y. Alzheimer Hastalığının in vitro Modellerinde *Herpes Simpleks* Proteinlerinin Kompleman Sistem, Sitokinler ve Epigenetik Değişiklikler Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2023. Alzheimer hastalığı (AH), bilişsel işlevlerde düşüş ve demansla karakterize bir hastalıktır. Vakaların çoğu sporadiktir. Ancak, bir kısmı ise genetik veya epigenetik kökenli gelişebilir. Ayrıca, beyinde de eksprese edilen kompleman proteinlerin veya sitokinlerin düzensizliğinin de AH gelişiminde bir faktör olabileceği ifade edilmiştir. Diğer taraftan, *Herpes simpleks 1* (HSV-1) gibi patojenlerin de AH gelişimine katkıda bulunabileceğine dair veriler bulunmaktadır. Bu tez kapsamında, bir nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y hücre hattında 2 farklı AH modeli oluşturularak HSV-1 glikoprotein B'nin (HSV-gB) etkisinin hücrelerdeki kompleman proteinleri, sitokinlerin düzeyleri ve epigenetik değişikliklerin değerlendirilmesiyle belirlenmesi amaçlanmıştır. Sitotoksikite deneylerinden elde edilen sonuçlara göre HSV-gB için inhibitör konsantrasyon 20 (IC₂₀) dozu 190,5 pg/ml olarak bulunmuştur. Çalışma grupları (n=3): 1. kontrol; 2. HSV grubu; 3. retinoik asit (RA) ve beyin türevi nörotrofik faktör (BDNF) ile oluşturulan Alzheimer modeli (AD), 4. RA ve BDNF ile oluşturulan Alzheimer modeli + HSV-gB (ADH), 5. amiloid beta 1-42 peptid ile oluşturulan Alzheimer modeli (A β) ve 6. amiloid beta 1-42 peptidi ile oluşturulan Alzheimer modeli + HSV-gB (A β H) olarak tasarlanmıştır. Tüm gruplarda spesifik AH belirteçleri (hiperfosforile Tau proteinleri, A β 1-42 peptidi ve amiloid öncü proteini) ölçülmüştür. HSV-gB uygulamasının AD modellerine benzer şekilde A β ve hiperfosforile Tau düzeylerini arttırdığı bulunmuştur. Tüm gruplarda kompleman proteinleri ve sitokinlerin düzeyleri karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir. Ek olarak çalışma gruplarında epigenetik parametreler (DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve histon deasetilaz düzeyleri) değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi sonucunda bağışıklık sistemi ve kronik inflamasyonun hastalığın gelişiminde çok önemli rollere sahip olabileceği ve HSV-1 enfeksiyonunun da AH'nin altında yatan bir faktör olabileceği gösterilmiştir. Aynı zamanda, epigenetik düzensizliklerin AH gelişiminde etkili olabileceği ve HSV-1 enfeksiyonunun da bu mekanizma ile hastalığın patogenezeine katkıda bulunabileceği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Alzheimer hastalığı, kompleman sistem, *Herpes simpleks* virüsü, epigenetik mekanizmalar, sitokinler

ABSTRACT

Anıl, Y. Evaluation of the Effects of *Herpes Simplex* Proteins on the Complement System, Cytokines and Epigenetic Changes in in vitro Models of Alzheimer's Disease. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Pharmaceutical Toxicology Program, PhD Thesis, Ankara, 2023. Alzheimer's disease (AD) is characterized by decline in cognitive functions and dementia. Most cases are sporadic. However, some of these cases may develop from genetic or epigenetic origins. Additionally, it has been stated that dysregulation of complement proteins or cytokines expressed in the brain may also be a factor in the development of AD. On the other hand, there is data that pathogens such as *Herpes simplex* 1 (HSV-1) may also contribute to the development of AD. Within the scope of this thesis, we aimed to determine the effect of HSV-1 glycoprotein B (HSV-gB) by evaluating the complement proteins, cytokine levels and epigenetic changes in the cells by creating two different AD models in the SH-SY5Y cell line, a neuroblastoma cell line. According to the results obtained from cytotoxicity experiments, the inhibitory concentration 20 (IC₂₀) dose for HSV-gB was found to be 190.5 pg/ml. Study groups (n=3) were designed as: 1. control; 2. HSV group; 3. retinoic acid (RA) and brain derived neurotrophic factor induced (BDNF) Alzheimer's model (AD), 4. RA and BDNF induced alzheimer's model + HSV-gB (ADH), 5. amyloid beta 1-42 peptide induced Alzheimer's model (A β) and 6. amyloid beta 1-42 peptide induced Alzheimer's model + HSV-gB (A β H). Specific AD markers (hyperphosphorylated Tau proteins, A β 1-42 peptide and amyloid precursor protein) were measured in all groups. HSV-gB administration was found to increase A β and hyperphosphorylated Tau levels, similar to AD models. Levels of complement proteins and cytokines were determined comparatively in all groups. In addition, epigenetic parameters (DNA methylation, histone modifications and histone deacetylase levels) were evaluated in the study groups. As a result of the evaluation of the results obtained, it has been shown that the immune system and chronic inflammation may have very important roles in the development of the disease and that HSV-1 infection may be an underlying factor of AD. It was also determined that epigenetic dysregulation may be effective in the development of AD and that HSV-1 infection may contribute to the pathogenesis of the disease by this mechanism.

Keywords: Alzheimer's disease, complement system, *Herpes simplex* virus, epigenetic mechanisms, cytokines

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	Vi
ÖZET	Vii
ABSTRACT	Viii
İÇİNDEKİLER	İx
SİMGELER VE KISALTMALAR	Xii
ŞEKİLLER	Xiv
TABLOLAR	Xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Alzheimer Hastalığı	4
2.1.1. Alzheimer Hastalığının Genetiği	6
2.1.2. Hastalığın Patofizyolojisi	7
2.1.3. Alzheimer Hastalığının Tedavisi	11
2.2. Herpes Simpleks Virüsü	11
2.2.1. Herpes Simpleks Enfeksiyonuna Karşı Bağışıklık Tepkisi	13
2.2.2. Herpes Simpleks Virüsünün Alzheimer Hastalığı ile İlişkisi	14
2.3. Bağışıklık Sistemi	16
2.3.1. Sitokinler	17
2.3.2. Kompleman Sistem	19
2.3.3. Nöroimmün Sistem	21
2.3.4. Alzheimer Hastalığı Patofizyolojisinde İmmün Sistem Değişiklikleri	22
2.4. Epigenetik	28
2.4.1. Epigenetik Mekanizmalar	28
2.4.2. Epigenetik Mekanizmaların Alzheimer Hastalığında Etkileri	32
2.5. SH-SY5Y Hücre Hattı	36
2.5.1. Alzheimer Hastalığı ve SH-SY5Y Hücre Hattı	36

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	38
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	38
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	39
3.3. Kullanılan Hücre Hattı	41
3.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	41
3.4.1. Dozlama ve Modellerin Oluşturulmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	41
3.4.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması	42
3.4.3. Farklılaştırma Besiyerinin Hazırlanması	42
3.4.4. Sitotoksosite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	43
3.4.5. Hücre İçi ROS Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	43
3.4.6. Amiloid Beta 1-42 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	43
3.4.7. Tau Proteini Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	44
3.4.8. Amiloid Öncü Proteini Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	45
3.4.9. Kompleman Protein C1q Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	46
3.4.10. Kompleman Protein C3 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	46
3.4.11. Kompleman Protein C6 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	47
3.4.12. Kompleman Protein C9 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	47
3.4.13. İnterlökin-1 α Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	48
3.4.14. İnterlökin-6 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	48
3.4.15. İnterlökin-10 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	49
3.4.16. Tümör Nekroz Faktörü-Alfa Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	50
3.4.17. Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta 1 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	50
3.4.18. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	51
3.4.19. Global DNA Metilasyonu Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	51
3.4.20. Histon İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	52
3.4.21. Histon H3 Asetilasyonu Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	52
3.4.22. Histon H4 Asetilasyonu Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	53
3.4.23. Histon H3 Çoklu Modifikasyonlarının Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	54
3.4.24. Histon H4 Çoklu Modifikasyonlarının Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	54

3.4.25. Histon Deasetilaz 3 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	55
3.4.26. Histon Deasetilaz 8 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	56
3.4.27. Protein Miktar Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	56
3.5. Deneysel İşlemler ve Yöntemler	56
3.5.1. Hücre Kültürü	56
3.5.2. Hücre Dondurma, Çözme ve Pasaj İşlemleri	57
3.5.3. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum Bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi	58
3.5.4. Alzheimer Modellerinin Oluşturulması	59
3.5.5. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	61
3.5.6. Hücre İç ROS Miktarının Belirlenmesi	61
3.5.7. Amiloid Beta 1-42 Düzeylerinin Ölçümü	62
3.5.8. Tau Proteini Düzeylerinin Ölçümü	64
3.5.9. Amiloid Öncü Proteini (APP) Düzeylerinin Ölçümü	65
3.5.10. Kompleman Protein C1q Düzeylerinin Ölçümü	67
3.5.11. Kompleman Protein C3 Düzeylerinin Ölçümü	69
3.5.12. Kompleman Protein C6 Düzeylerinin Ölçümü	71
3.5.13. Kompleman Protein C9 Düzeylerinin Ölçümü	72
3.5.14. İnterlökin 1-Alfa Düzeylerinin Ölçümü	74
3.5.15. İnterlökin-6 Düzeylerinin Ölçümü	76
3.5.16. İnterlökin-10 Düzeylerinin Ölçümü	77
3.5.17. Tümör Nekroz Faktörü- α (TNF- α) Düzeylerinin Ölçümü	79
3.5.18. Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta 1 (TGF- β 1) Düzeylerinin Ölçümü	81
3.5.19. DNA İzolasyonu	83
3.5.20. Global DNA Metilasyonu Düzeyinin Ölçülmesi	84
3.5.21. Histon İzolasyonu	85
3.5.22. Histon H3 Asetilasyon Düzeylerinin Ölçülmesi	86
3.5.23. Histon H4 Asetilasyon Düzeylerinin Ölçülmesi	87
3.5.24. Çoklu Histon H3 Modifikasyon Düzeylerinin Ölçülmesi	89
3.5.25. Çoklu Histon H4 Modifikasyon Düzeylerinin Ölçülmesi	90
3.5.26. Histon Deasetilaz 3 Düzeylerinin Ölçülmesi	92

3.5.27. Histon Deasetilaz 8 Düzeylerinin Ölçülmesi	93
3.5.28. Total Protein Düzeylerinin Ölçülmesi	95
4. BULGULAR	97
4.1. Hücre Canlılığı	97
4.2. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri	99
4.3. Sitopatoloji	101
4.4. Amiloid Beta 1-42 Düzeyleri	103
4.5. Amiloid Prekürsör Protein Düzeyleri	104
4.6. Tau Proteini Düzeyleri	105
4.7. Kompleman Protein C1q Düzeyleri	107
4.8. Kompleman Protein C3 Düzeyleri Düzeyleri	108
4.9. Kompleman Protein C6 Düzeyleri Düzeyleri	109
4.10. Kompleman Protein C9 Düzeyleri Düzeyleri	111
4.11. İnterlökin-1 α Düzeyleri	113
4.12. İnterlökin-6 Düzeyleri	114
4.13. İnterlökin-10 Düzeyleri	116
4.14. Tümör Nekroz Faktörü- α Düzeyleri	117
4.15. Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta-1 Düzeyleri	118
4.16. DNA Metilasyonu Düzeyleri	120
4.17. Histon H3 Asetilasyon Düzeyleri	121
4.18. Histon H4 Asetilasyon Düzeyleri	123
4.19. Çoklu Histon H3 Modifikasyon Düzeyleri	124
4.20. Çoklu Histon H4 Modifikasyon Düzeyleri	126
4.21. Histon Deasetilaz 3 Düzeyleri	127
4.22. Histon Deasetilaz 8 Düzeyleri	128
5. TARTIŞMA	130
5.1. Hücre İçi ROS Düzeyleri	132
5.2. Alzheimer Hastalığı ile İlgili Parametrelerdeki Değişiklikler	134
5.3. Sitopatolojik Değişiklikler	136
5.4. Kompleman Sistem Proteini Düzeyleri	137
5.5. Sitokin Düzeyleri	138
5.6. DNA Metilasyonu	140
5.7. Histon Modifikasyonları	141

5.8. Histon Deasetilaz Seviyeleri	145
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	147
7. KAYNAKLAR	153
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması Orijinallik Raporu Ekran Görüntüsü	
EK-2: Turnitin Dijital Makbuz	
EK-3: Tez Çalışması ile İlgili Yayın ve Bildiriler	
9. ÖZGEÇMİŞ	



SİMGELER VE KISALTMALAR

5-mc	5-Metil Sitozin
AH	Alzheimer Hastalığı
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid Öncü Proteini
Aβ	Amiloid Beta
BDNF	Beyin Derive Nörotrofik Faktör
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
BRCA1	Meme Kanseri Tip 1 Duyarlılık Proteini
CRP	C-Reaktif Protein
CTF-α	C-Terminal Fragman Alfa
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNMT	DNA Metil Transferaz
FBS	Fötal Sığır Serum
GSK3β	Glikojen Sentaz Kinaz 3 Beta
H3	Histon 3
H4	Histon 4
HAT	Histon Asetil Transferaz
HDAC	Histon Deasetilaz
HIV	İnsan İmmünoyetmezlik Virüsü
HKB	Hafif Kognitif Bozukluk
HMT	Histon Metil Transferaz
HSE	Herpes Simpleks Ensefaliti
HSV-1	Herpes Simpleks Virüs Tip-1
HSV-gB	HSV-1 Glikoprotein B
IFN	İnterferon
IL-10	İnterlökin 10
IL-1β	İnterlökin 1 Beta
IL-2	İnterlökin 2
IL-4	İnterlökin 4

IL-6	İnterlökin 6
IL-8	İnterlökin 8
IVIg	İntravenöz İmmünoglobulin
JCV	John Cunningham Virüsü
KBB	Kan-Beyin Bariyeri
MAK	Membran Atak Kompleksi
MAPT	Mikrotübülle İlişkili Protein Tau
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
mRNA	Mikro RNA
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NFY	Nörofibriler Yumaklar
NO	Nitrik Oksit
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PSEN1	Presenilin-1
PSEN2	Presenilin-2
RA	Retinoik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
TGF-β1	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta-1
TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü- α
US FDA	Amerikan gıda ve İlaç Dairesi

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Amiloid öncü proteininin metabolizması	9
2.2. Tau hiperfosforilasyonu ve nörofibriler yumak oluşumu	10
2.3. Membran atak kompleksinin oluşumu	21
2.4. Histon proteinlerinin kromatin yapısı ile olan ilişkisi	30
2.5. Asetilasyon-deasetilasyona bağlı değişen kromatin yapısı	32
3.1. Amiloid Beta 1-42 standart eğrisi	63
3.2. Tau proteini standart eğrisi	65
3.3. Amiloid öncü proteini standart eğrisi	67
3.4. Kompleman protein C1q standart eğrisi	69
3.5. Kompleman protein C3 standart eğrisi	70
3.6. Kompleman protein C6 standart eğrisi	72
3.7. Kompleman protein C9 standart eğrisi	74
3.8. İnterlökin-1 α standart eğrisi	75
3.9. İnterlökin-6 standart eğrisi	77
3.10. İnterlökin-10 standart eğrisi	79
3.11. Tümör Nekroz Faktörü- α standart eğrisi	81
3.12. TGF- β 1 standart eğrisi	83
3.13. Global DNA metilasyonu standart eğrisi	85
3.14. Asetile histon H3 standart eğrisi	87
3.15. Asetile histon H4 standart eğrisi	89
3.16. Histon deasetilaz 3 standart eğrisi	93
3.17. Histon deasetilaz 8 standart eğrisi	95
3.18. Protein standart eğrisi	96
4.1. SH-SY5Y hücre hattında HSV glikoprotein B (HSV-gB)'nin (0-1000 pg/ml) hücre canlılığı üzerine etkisi	97
4.2. SH-SY5Y hücre hattında HSV glikoprotein B (HSV-gB)'nin (0-1000 pg/ml) hücre canlılığı üzerine etkisi	98
4.3. Çalışma gruplarında hücre içi ROS düzeyleri	100
4.4. Çalışma gruplarının sitopatolojisi	102
4.5. Amiloid beta 1-42 düzeyleri	104
4.6. APP düzeyleri.	105

4.7.	Tau proteini düzeyleri	106
4.8.	Kompleman Protein C1q düzeyleri	108
4.9.	Kompleman protein C3 düzeyleri	109
4.10.	Kompleman protein C6 düzeyleri	111
4.11.	Kompleman protein C9 düzeyleri	112
4.12.	İnterlökin 1- α düzeyleri	114
4.13.	İnterlökin-6 düzeyleri	116
4.14.	İnterlökin-10 düzeyleri	117
4.15.	Tümör nekroz faktörü- α düzeyleri	118
4.16.	Dönüştürücü büyüme faktörü beta-1 düzeyleri	119
4.17.	DNA metilasyonu düzeyleri	121
4.18.	Histon H3 asetilasyon düzeyleri	122
4.19.	Histon H4 asetilasyon düzeyleri	124
4.20.	HDAC 3 düzeyleri	128
4.21.	HDAC 8 düzeyleri	129

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
3.1. Çalışma gruplarına yapılan uygulamalar.	60
4.1. HSV-gB için kullanılan konsantrasyon ve hücre canlılıkları.	99
4.2. Çalışma gruplarında hücre içi ROS düzeyleri.	100
4.3. Amiloid beta 1-42 düzeyleri.	103
4.4. Amiloid prekürsör protein düzeyleri.	105
4.5. Tau proteini düzeyleri.	106
4.6. Kompleman Protein C1q düzeyleri.	107
4.7. Kompleman protein C3 düzeyleri.	109
4.8. Kompleman protein C6 düzeyleri.	110
4.9. Kompleman protein C9 düzeyleri.	112
4.10. İnterlökin 1- α düzeyleri.	113
4.11. İnterlökin-6 düzeyleri.	115
4.12. İnterlökin-10 düzeyleri.	116
4.13. Tümör nekroz faktörü- α düzeyleri.	118
4.14. Dönüştürücü büyüme faktörü beta-1 düzeyleri.	119
4.15. DNA metilasyonu düzeyleri.	120
4.16. Histon H3 asetilasyon düzeyleri.	122
4.17. Histon H4 asetilasyon düzeyleri.	123
4.18. Histon H3 modifikasyon düzeyleri.	125
4.19. Histon H4 modifikasyon düzeyleri.	127
4.20. Histon deasetilaz 3 düzeyleri.	128
4.21. Histon deasetilaz 8 düzeyleri.	129

1. GİRİŞ

Nörodejeneratif hastalıklar, dünya çapında engellilik ve ölümün önde gelen nedenleri arasındadır. Nörodejenerasyon süreci, nöronların ilerleyici atrofisini içerir; bu da nöronal bağlantı ve fonksiyon kaybına yol açar (1). Alzheimer hastalığı (AH), genellikle ilerleyen yaşla birlikte görülen, bilişsel işlevlerde düşüş ve demansla karakterize kronik nörodejeneratif bir hastalıktır (2). Patolojik sürecin bir yansıması olarak beynin limbik sistem bölgeleri ile frontal ve temporal loblar arasındaki sinirsel bağlantılarda kopmalar meydana gelir (3). AH vakalarının çoğu (>%90) sporadiktir. Ancak, bir kısmı genetik veya epigenetik kökenli gelişebilir ve “ailesel AH” olarak adlandırılır. AH için ana risk faktörü yaşlanmadır. Hastalık 65 yaşın üzerindeki nüfusun %10'unu ve 85 yaşın üzerindeki nüfusun %50'sini etkiler. Hastalığa ilişkin iki önemli patolojik bulgu tanımlanmıştır. Bunlar amiloid beta (A β) plakları ve hiperfosforile Tau proteinlerinden oluşan nörofibriler yumaklar (NFY'ler)'dir (4).

Çeşitli faktörler AH gelişme riskini artırabilir (5). Çevresel risk faktörleri arasında ise özellikle *Herpes simplex* virüs tip-1 (HSV-1) tarafından indüklenenler başta olmak üzere kalıcı beyin enfeksiyonlarının anahtar bir rol oynadığı düşünülmektedir (6). HSV-1 insanlarda viral enfeksiyonlara neden olan *Herpesviridae* ailesinin üyesidir. HSV-1, esas olarak oral ve nazal mukozanın epitel hücrelerini enfekte eden nörotropik çift sarmallı bir DNA virüsüdür. Oral ve nazal mukozada virüs litik replikasyona uğrar; yeni üretilen viral partiküller, duyu nöronlarına girebilir ve aksonal taşıma yoluyla, genellikle gizli bir enfeksiyon oluşturan trigeminal gangliona ulaşabilir. Virüs, yeni oluşan viral partiküllerin duyu nöronlar yoluyla birincil enfeksiyon bölgesine geri taşındığı ve iyi bilinen klinik lezyonlara neden olduğu periyodik reaktivasyon döngülerinden geçer. Bununla birlikte, bipolar trigeminal ganglion nöronları, beyin sapında bulunan trigeminal çekirdeklere de yansır. Nöronlar buradan talamusa, sonunda duyu korteksine ulaşır. Bu yolak, yeniden aktive olmuş virüsün, ensefalit (*Herpes simplex* ensefaliti, HSE) gibi akut nörolojik bozukluklara veya hafif, klinik olarak asemptomatik veya ömür boyu latent kalan enfeksiyonlara neden olabileceği merkezi sinir sistemine (MSS) ulaşabileceği yoldur (7, 8). HSV-1'in AH'nin gelişiminde rol oynayabileceği hipotezi, 1980'lerin başında Melvyn Ball (1982) tarafından çeşitli gözlemlere dayandırılarak öne sürülmüştür. Bu hipotezin kaynağı olarak HSV kaynaklı ensefalit vakalarında, AH ile benzer beyin

bölgelerinin dejenere olması ve bazı HSV kaynaklı ensefalit vakalarında gözlenen hafıza bozuklukları gösterilmiştir (9). Daha sonra yapılan moleküler çalışmalar sonucunda HSV-1 enfeksiyonunun nöronal ve glial hücrelerde amiloid öncü protein (APP) taşınmasında artışa, Tau proteininin hiperfosforilasyonuna ve hücre içi A β düzeylerinde artışa neden olduğu belirlenmiştir (10-12).

Oksidatif stres ve inflamasyon dahil birçok durum bir araya gelerek, AH olan beyinde tipik olarak bulunan yapısal ve fonksiyonel değişiklikleri üretebilir (13). Kronik inflamasyonun bazı nörodejeneratif hastalıkların altında yatan bir mekanizma olduğu giderek daha fazla kabul edilmektedir (14). Beyinde mikrogliya ve astrositlerin inflamatuvar aktivasyonu artık AH'nin önemli bir belirtici olarak kabul edilmektedir (15). Sinir sistemi kompleman aktivasyonunun ürünlerinden yeterince korunmadığından, kompleman düzensizliğinden kaynaklanan hasara karşı özellikle hassastır ve diğer dokulardaki tolere edilebilir derecedeki bozukluklar beyinde ve sinir sisteminin diğer kısımlarında hasara neden olabilir (16). Alzheimer hastalarının beyinlerindeki inflamasyon, büyük olasılıkla aşırı A β üretiminin sonucudur. Ancak, nörodejenerasyonun ek bir nedeni olabileceğine ve nörodejenerasyona neden olan kimyasal, fiziksel veya biyolojik faktörlerin hastalığın ilk tetikleyicileri olabileceğine dair çok sayıda kanıt vardır (17). Son yıllarda kompleman proteinleri ve bağışıklık sisteminin AH'de rol oynadığı ileri sürülmektedir. Ayrıca, interlökin-1 beta (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6), tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve C-reaktif protein (CRP), AH popülasyonunda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Yeni kanıtlar, kompleman sistemi proteinlerinin aynı zamanda hem nöroprotektif (özellikle AH'nin klinik öncesi aşamalarında) hem de nöroinflamatuvar etkiler gösterdiğine işaret etmektedir (18,19).

Alzheimer hastalığı birçok yolda bozulmalar içeren kompleks bir hastalıktır ve epigenetik değişiklikler bu yolların düzenlenmesini kontrol eden temel mekanizmalardandır. Epigenetik mekanizmaların AH'nin etiyolojisine bir katkısı olduğu öne sürülmüştür (20,21). Fenotipik değişikliklere sebep olan DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi değişikliklerin organizmaların yaşlanma sürecinde etkili olduğu gösterilmiştir. Yaşlanma ve AH'de benzer değişikliklerin gözlenmesi ile birlikte hastalığın patofizyolojisinde epigenetik mekanizmaların rol aldığı düşünülmüştür (22). AH'de görülen epigenetik değişiklikler arasında DNA metilasyonunda değişiklikler olabileceği belirtilmiştir. Özellikle yaşla birlikte bazı

proteinlerdeki sitozin bölgelerinde görülebilecek demetilasyonun beyinde A β birikimine yol açabileceği ifade edilmiştir (23). Histon 4 (H4) asetilasyonundaki eksikliklerin giderilmesinin de farelerde hafızayı güçlendirdiği belirlenmiştir (24).

Bu tez kapsamında, nöroblastoma hücre hattında, Tau patolojisi ve A β ₁₋₄₂ peptidiyle indüklenen olmak üzere oluşturulan iki AH modelinde HSV-1 glikoprotein B'nin (HSV-gB) etkisi hücrelerdeki kompleman proteinleri, sitokinlerin düzeyleri ve epigenetik değişikliklerin saptanmasıyla belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışmasından elde edilen verilerin değerlendirilmesi ile;

- İki farklı AH modelinde ölçülen kompleman protein ve sitokin düzeylerinin karşılaştırılması ile AH'nin olası immünolojik kökeninin daha iyi anlaşılması sağlanacaktır.
- HSV-gB'nin kompleman protein ve sitokin düzeylerini nöroblastoma hücrelerinde değiştirip değiştirmediği belirlenecek ve bu sayede HSV-1'in AH patofizyolojisinde olası etkileri değerlendirilecektir.
- İki farklı AH modelinde epigenetik değişikliklerin (DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları) karşılaştırılması ile hastalığın gelişiminde epigenetik düzensizliklerin rolü değerlendirilecektir.
- İki farklı AH modelinde HSV-gB'nin olası epigenetik değişiklikleri nasıl modüle ettiği belirlenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Demans, kişinin günlük aktivitelerini yerine getirme yeteneğini etkileyen bilişsel yeteneklerdeki azalmanın genel adıdır. Bu durum genellikle hafıza, düşünme ve davranışla ilişkili sorunları içerir. Hafıza ve düşünce kalıplarında bozulmanın yanı sıra en sık görülen semptomlar arasında duygusal sorunlar, dil ile ilgili zorluklar ve motivasyon azalması yer alır. Demansın AH, vasküler demans, Lewy cisimcikli demans, Parkinson demansı gibi çok çeşitli nörodejeneratif hastalıkları kapsayan birçok nedeni bulunmaktadır (25).

Adını hastalığı ilk tanımlayan kişi olan Alman psikiyatrist Alois Alzheimer'dan alan AH en sık görülen demans türüdür ve yavaş ilerleyen nörodejeneratif bir hastalık olarak tanımlanabilir. Alois Alzheimer, ölmeden önce hafıza kaybı ve kişilik değişikliği yaşayan ilk hastasının beynini incelerken amiloid plaklarının varlığını ve büyük miktarda nöron kaybını fark etmiş ve durumu ciddi bir serebral korteks hastalığı olarak tanımlamıştır (26). AH, beyinde özellikle hipokampus, temporal lob, frontal lob ve frontal korteks bölgelerinde ilerleyici ve sürekli nörodejenerasyon ile karakterizedir. Bu bölgelerdeki nörodejenerasyon, bunama, öğrenme bozukluğu ve ilerleyici bilişsel işlev bozukluğunu içeren AH'nın klinik belirtilerine neden olur (27).

Zamanla AH, hastalığın başlangıcına bağlı olarak erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı olmak üzere iki klinik duruma ayrılmıştır. Erken başlangıçlı AH'de klinik tanı 65 yaşından önce (genellikle 30-60) konur. AH'nin nadir görülen bir şeklidir ve tüm vakaların yalnızca %5-10'unu oluşturur. Bu hastaların yaklaşık %60'ında pozitif bir aile öyküsü vardır ve bunların %13'ü otozomal dominant şekilde kalıtsaldır (28).

Alzheimer hastalığı küresel bir sorundur. Dünya çapında 47 milyon insanın demansla yaşadığı düşünülmektedir ve bu sayının her 20 yılda bir neredeyse ikiye katlanarak artacağı tahmin edilmektedir. AH'nin nedenleri hala tam olarak bilinmemektedir. Ancak, yaş en büyük risk faktörü olarak kabul edilmektedir ve 65 yaşından sonra her 5 yılda bir hastalığın görülme sıklığı ikiye katlanmaktadır (29).

AH'nin yaşam tarzı, genetik ve çevresel etmenler gibi çoklu risk faktörlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu faktörler, 60-65 yaş üstü bireylerde vakaların çoğunu oluşturan sporadik geç başlangıçlı AH'nin başlamasına ve ilerlemesine neden olmak için birbiriyle etkileşime girer (30). Yapılan bir araştırma hipertansiyon, obezite, diyabet, sigara kullanımı, sosyal izolasyon, depresyon, aşırı alkol tüketimi, hava kirliliği, zihinsel atalet ve travmatik beyin hasarı olmak üzere 11 adet değiştirilebilir risk faktörü tanımlamıştır. Diyabet ve metabolik sendrom gibi değiştirilebilir risk faktörlerinin neden olduğu hasarlar, ateroskleroz ve beyin enfarktüsü ile sonuçlanabilirken, obezite ve insülin direnci olan hastalarda adipoz dokuda kronik, düşük seviyeli inflamasyon ile ilişkili bağışıklık sisteminde düzensizlik görülür (31). Kardiyovasküler hastalıklar, potansiyel olarak değiştirilebilir yaşam tarzıyla ilgili risk faktörleriyle birleşebilir ve AH patogenezi etkileyebilir. Kardiyovasküler hastalık beyinde vasküler hasara yol açabilir; bu da makro ve mikrovasküler hasarları takiben beyin atrofi riskini artırır (32).

Hastalığın en yaygın belirtisi kısa süreli hafızada bozulmadır. Ancak konuşma, görsel-uzaysal işleme ve zihinsel çeviklik gibi yürütücü işlevlerde de bozulmalar meydana gelir. Hastalarda kognitif bozukluğun şiddeti değişir. En erken belirtiler olarak nesnel bilişsel testlerde bozulmuş performans olmaksızın zihinsel yeteneklerde öznel bir düşüş olabilir. Hafif kognitif bozukluk (HKB) normal yaşlanma ve demans arasındaki bir durumu temsil eder. Tek bir bilişsel alanın veya muhtemelen birden fazla bilişsel alanın hafif bir ölçüde bozulduğu ve işlevsel kapasitenin nispeten korunduğu bilişsel bozukluğun en erken semptomatik aşamasını ifade eder. Buna karşılık, bunama kişinin bağımsız yaşamını bozmaya ve günlük yaşamını ekilemeye yetecek büyüklükte bir bilişsel bozulmadır (3,33).

Belirgin amnestik belirti ve bulgularla birlikte kademeli başlangıçlı ve devam eden ilerlemeli demans, AH'nin prototipik klinik fenotipidir. İlk zamanlarda AH klinikopatolojik kabul edilmiştir; yani hasta amnestik demansın klinik semptomlarını gösterirse ve diğer koşullar dışlanırsa hastada AH patolojisi olduğu varsayılmıştır (34). AH'nin epidemiyolojisi, tüm nedenlere bağlı demans epidemiyolojisi ile iç içe geçmiştir. AH demansın en yaygın nedeni olmasına rağmen, bunama, özellikle yaşlı hastalarda çok sayıda nörodejeneratif veya serebrovasküler patolojiden kaynaklanabilir. Bilişsel bozukluğun prevalansı ilerleyen yaşla birlikte katlanarak

artar. Genel olarak demans insidansı 65 yaşından sonra hızla artar ve yaş ilerledikçe artmaya devam eder (35).

2.1.1. Alzheimer Hastalığının Genetiği

Alzheimer vakalarının %95'i sporadik olmasına rağmen, genel olarak ailesel AH olarak bilinen ve toplam vakaların %5'ini temsil eden genetik bir risk faktörü bulunmaktadır. AH ile ilişkili olarak belirlenen başlıca genler amiloid öncü protein (APP) geni, presenilin-1 (PSEN1), presenilin-2 (PSEN2) ve apolipoprotein E (ApoE) genleridir. Bunlardan APP'yi kodlayan gendeki ve APP'yi işleyen γ -sekretaz kompleksinin katalitik bileşenleri olan PSEN1 ve PSEN2'yi kodlayan genlerdeki otozomal dominant mutasyonlar erken başlangıçlı AH'den, ApoE geninin ise geç başlangıçlı AH'den sorumlu olduğu bulunmuştur (36,37).

İnsanlarda APP geni 21. kromozom üzerinde yer alır ve 290 kilobaz (kB) uzunluğunda 18 ekzon içerir. APP geninde 30'un üzerinde kodlama mutasyonu tanımlanmıştır. Bunların çoğu patojeniktir ve erken başlangıçlı AH ile sonuçlanır. Söz konusu mutasyonların birçoğu APP'nin β - veya γ -proteolitik bölgelerinde veya bu bölgelerin yakınında kümelenerek A β 'nin aşırı üretimini veya A β ₁₋₄₀ peptidine göre pro-agregasyon yapan A β ₁₋₄₂ peptidinin oranındaki artışı destekler (38). Yapılan bir çalışmada ise APP genindeki 673. amino asitte alaninden treonin değişimini kodlayan yeni, nadir bir mutasyon (A673T mutasyonu) tanımlanmış ve bu mutasyonun AH gelişimine ve bilişsel gerilemeye karşı koruma sağladığı görülmüştür. Bu mutasyon, APP'yi β -sekretaz tarafından bölünmesi için daha az uygun bir substrat haline getirir ve *in vitro* amiloidojenik peptitlerin oluşumunda %40'luk bir azalmaya neden olur (39). PSEN-1 ve 2 ise insanlarda PSEN1 ve PSEN2 genleri tarafından kodlanır ve APP'den A β oluşumunda önemli bir rol oynayan γ -sekretaz kompleksindeki çekirdek proteinlerdendir. Bu nedenle, APP metabolizmasını düzenlediği varsayılmaktadır ve bu genlerdeki mutasyonlar APP metabolizmasında düzensizlikle sonuçlanır (40).

Apolipoprotein E geni, kan dolaşımında kolesterol ve diğer yağ türlerinin taşınmasına yardımcı olan ApoE'nin yapımında rol oynar. ApoE proteini 299 amino asit uzunluğundadır. ApoE geni, kromozom 19'da bulunur ve üç ekzon ve üç introndan oluşan 3597 nükleotit uzunluğunda bir RNA molekülü kodlar. Bu genin ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4 olarak adlandırılmış üç ana aleli vardır. Bu aleller, ApoE proteininin yalnızca 112. ve

158. amino asitlerinde birbirinden farklı olan üç protein türünün sentezlenmesine yol açar, ancak bu ufak farklılıklar çok önemli fizyolojik sonuçlar doğurur. ApoE $\epsilon 2$ aleli hastalığa karşı bir miktar koruma sağlayabilir. Bu alele sahip bir kişide AH daha sonraki yaşlarda gelişir. Popülasyonun yaklaşık %5-10'u bu alele sahiptir. ApoE $\epsilon 3$ aleli ise popülasyonda en yaygın bulunan aleldir ve hastalık üzerinde nötr etkiye sahiptir. ApoE $\epsilon 4$ aleli AH riskini artırmaktadır ve geç başlangıçlı AH vakalarının %50-80'inde etkili olduğu düşünülmektedir. İnsanların yaklaşık olarak %15-25'i bu alele sahiptir ve %2-5'i alelin her iki kopyasını da taşır. ApoE $\epsilon 4$ 'ün iki kopyasına sahip olmak, tek kopyaya sahip olmaktan daha yüksek AH riskiyle ilişkilidir (41,42).

2.1.2. Hastalığın Patofizyolojisi

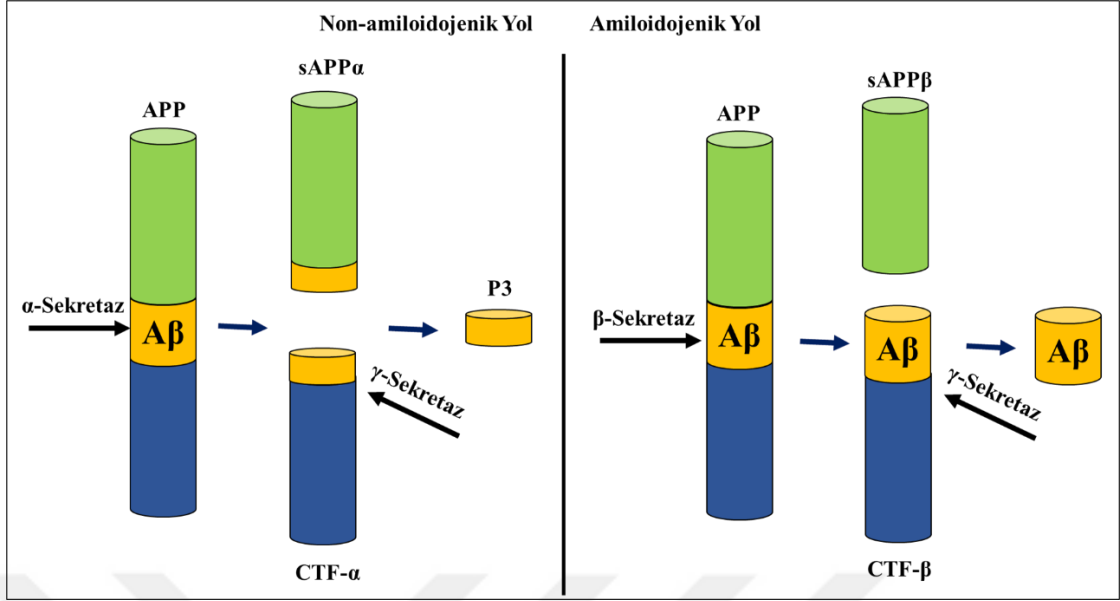
Alzheimer hastalığının patogenezi anormal A β metabolizması, Tau hiperfosforilasyonu, oksidatif stres, reaktif glial ve mikrogial değişiklikler ve diğer patolojik süreçleri içeren karmaşık bir süreçtir. Serebral korteks ve bazı subkortikal bölgelerdeki nöronların ve sinapsların kaybıyla karakterizedir. Bu kayıp, temporal lob, parietal lob, frontal korteks ve *singular gyrus*un bazı kısımlarında dejenerasyon ve atrofiye neden olur. Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) kullanılarak yapılan çalışmalar, sağlıklı yaşlı yetişkinlerle karşılaştırıldığında AH'li bireylerde hafif bilişsel bozukluktan AH'ye doğru ilerledikçe belirli beyin bölgelerinin boyutlarında azalma olduğu belgelenmiştir. Hastalığa ilişkin iki önemli patolojik bulgu tanımlanmıştır. Bunlar, A β içeren ekstraselüler plaklar ve hiperfosforile edilmiş Tau proteinlerinden oluşan intraselüler NFY'lerdir (4).

Amiloid Hipotezi

Alzheimer hastalığının gelişiminde amiloid kaskadı hipotezi, son 20 yıldır araştırmaların ana odağı olmuştur ve AH'de gözlenen nörodejenerasyonun, beyin parankiminde A β plaklarının anormal birikmesinden kaynaklandığını ve nörotoksiteye neden olduğunu öne sürmektedir. Bu hipotez, ayrıca AH'nin A β peptitlerinin üretilmesinde önemli olan PSEN1, PSEN2 ve APP genlerindeki otozomal dominant mutasyonlardan da kaynaklanabileceğinin keşfedilmesiyle desteklenmiştir (43).

Amiloid prekürsör proteini, birçok dokuda eksprese edilen ve nöronların sinapslarında yoğunlaşan 695 amino asit uzunluğunda integral bir membran glikoproteinidir. Bir hücre yüzeyi reseptörü olarak işlev görür ve sinaps oluşumunun, nöral plastisitenin, antimikrobiyal aktivitenin ve demirin hücre dışına taşınmasının düzenlenmesinde rol oynar. Embriyoda APP, sinir sistemi gelişiminin erken aşamalarında eksprese edilir ve bu proteinin nöral büyüme ve olgunlaşmada önemli bir rol oynadığını gösterir. Yetişkin beyinde ise APP'nin, yaralanma sonrası nöral hücre proliferasyonu ve aksonal büyümenin düzenlenmesinde görev yaptığı gösterilmiştir (44).

APP'nin metabolizması üç farklı şekilde gerçekleşebilir: Birinci yolda APP α -sekretaz ve ardından γ -sekretaz ile parçalanabilir; bu da çözünür, amiloidojenik olmayan amiloid peptitlerinin üretimi ile sonuçlanır. Amiloidojenik olmayan yol sonucunda C-terminal fragman alfa (CTF- α) ve çözünür bir dış alana sahip APP- α ürün olarak üretilir. Hem CTF- α hem de APP- α 'nın nörotrofik ve nöroprotektif bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Bunu takiben, CTF- α γ -sekretaz tarafından parçalanarak P3 olarak bilinen bir peptidin salınmasına izin verir. P3, A β 'den farklı olarak toplanma eğilimi göstermeyen çözünür bir peptittir. APP'nin β -sekretaz ve γ -sekretaz tarafından ardışık bölünmesi ise çözünmeyen A β plakları oluşturmak için hücre dışı boşlukta biriken amiloidojenik A β peptitlerini üretir. Amiloidojenik yolda APP, β -sekretazlar tarafından hidrolize edilir ve sonuçta CTF- β üretilir. CTF- β daha sonra hücre dışına salınan A β ₁₋₄₀ veya A β ₁₋₄₂ peptitlerini oluşturan γ -sekretazlar tarafından bölünür. Peptitlerin uzunluğundaki varyasyon, γ -sekretazın hangi bölgesinin CTF- β 'yi parçaladığına bağlıdır. A β ₁₋₄₂ peptidi agregasyon oluşturmaya en yatkın türdür ve en nörotoksik peptittir. Üçüncü yolda ise, APP n-sekretaz tarafından hidrolize edilir ve bunun fizyolojik koşullar altında alternatif bir işleme yolu olduğu düşünülür (45). APP'nin amiloidojenik ve non-amiloidojenik yollarla metabolizması Şekil 2.1'de özetlenmiştir.



Şekil 2.1. Amiloid öncü proteininin metabolizması (45).

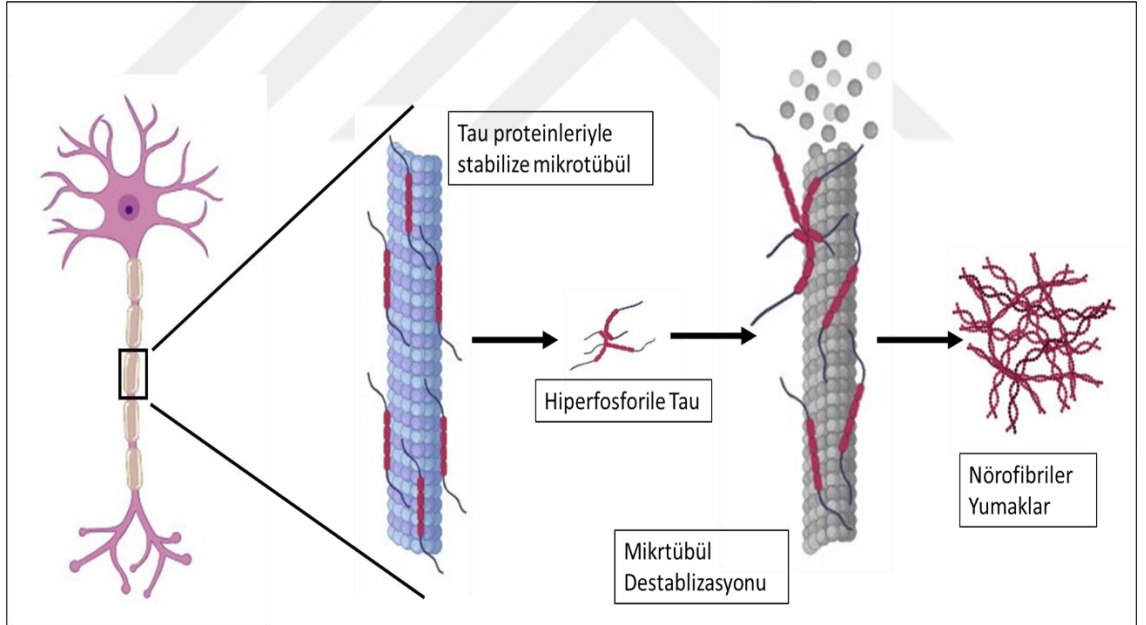
Tau Hiperfosforilasyonu

Tau proteinleri, mikrotübülle ilişkili protein Tau (MAPT) geninden alternatif uç birleştirme (*splicing*) yoluyla üretilen, yüksek düzeyde çözünürlüğe sahip altı protein izoformundan oluşan bir gruptur. Kromozom üzerinde bulunan insan Tau geninin en az 16 ekzonu vardır (46). Beyindeki Tau proteinleri yapısal olarak iki büyük alana bölünmüştür: projeksiyon alanı, molekülün amino terminalinin üçte ikisini kapsar ve mikrotübül bağlanma alanı, molekülün karboksil terminalinin üçte birini kapsar. Esas olarak serebral korteks nöronlarında bol miktarda bulunurlar ve MSS'nin diğer bölgelerinde daha az yaygındırlar. Astrosit ve oligodendrositlerde de çok düşük seviyelerde eksprese edilirler (47).

Tau proteinlerinin ana biyolojik işlevi, mikrotübüllerin toplanmasını teşvik etmek ve nöronların aksonal taşınması için gerekli olan mikrotübüllerin stabilitesini korumaktır. Ek olarak, Tau'nun çeşitli yapısal ve fonksiyonel proteinlerle etkileşimi aynı zamanda nöronların sinyal iletiminde de önemli roller oynayabileceğini düşündürmektedir (48). Ayrıca Tau'nun fizyolojik düzeyde fosforilasyonu yoluyla hücre canlılığının düzenlenmesine de katıldığı bulunmuştur (49).

Alzheimer hastalığı patofizyolojisinde rol oynayan ikinci ana özellik, nöronların somatodendritik bölümlerinde ve aksonlarda NFY'lerin varlığıdır. Hastalık, nöronal hücre iskeletinin giderek bozulduğu ve hiperfosforile Tau proteininin filament

demetleri halinde toplandığı nörofibriler dejenerasyon ile karakterizedir. NFY'ler, tau proteininin hiperfosforile formunun agregatlarından oluşur. Tau, normalde Tau proteininin molü başına 1-3 mol fosfat içeren bir fosfoproteindir. Tau'nun mikrotübül birleşimi aktivitesi, fosforilasyon derecesi ile düzenlenmektedir. AH'li beyin dokularında, Tau'nun fosforilasyon seviyesinin, aynı yaştaki kontrol beyinlerinden izole edilen Tau'dan üç ila dört kat daha yüksek olduğu bulunmuştur (50). Tau'nun fosforilasyonu, mikrotübüllere olan afinitesini azaltabilir ve bu nedenle bu bağlanmamış proteinler kendi kendine birleşebilir ve düğümler oluşturabilir. NFY'lerin beyinde bulundukları yerler hastalığın derecesiyle ilişkilidir. Hastalığın başında entorinal kortekste daha sonra hipokampusta ve son aşamalarında izokortekste görülebilir (51,52). Tau proteini, beyinde esas olarak glikojen sentaz kinaz 3 beta (GSK3 β) tarafından fosforile edilir ve protein fosfataz 2A (PP2A) tarafından defosforile edilir. AH'de aktif GSK3 β enzim seviyesi artarken PP2A aktivitesi azalır (53,54). Tau patalojisi ve NFY'lerin oluşumu Şekil 2.2'de özetlenmiştir.



Şekil 2.2. Tau hiperfosforilasyonu ve nörofibriler yumak oluşumu (50).

2.1.3. Alzheimer Hastalığının Tedavisi

Şu anda AH'nin etkili bir tedavisi yoktur. Bunun temel nedeni hastalığın patojenik mekanizmalarının hala tam olarak anlaşılamamasıdır. Devam eden klinik çalışmalar dejenerasyonun ilerlemesini önleyerek ve semptomatik rahatlama sağlayarak AH'nin ilerlemesini durdurmaya yöneliktir. Ancak bu stratejiler, nöral sinapslarda geniş hasarlar ve nöron kaybı bırakan dejeneratif sürecin neden olduğu hasarı onaramaz (5).

Amiloid plakları hedef alan birçok ilaç, randomize kontrollü çalışmalarda başarısız olmuştur ve şu anda doğrudan amiloidojenik işlemeye etki eden kanıtlanmış etkinliği olan bir ilaç yoktur (55). GSK3 β inhibitörleri de tedavi hedefi olarak denenmiştir. İyi bilinen bir GSK3 β inhibitörü olan lityumun, AH'nin hayvan modellerinde Tau patolojisini azaltmada bazı potansiyel faydalar sağladığı gösterilmiştir. Tau patolojisini azaltmaya yönelik başka bir yaklaşım, Tau toplanmasını doğrudan engellemeye çalışmak olmuştur ve ön kanıtlar, metiltiyoninyum klorürün bu süreç üzerinde önemli bir yararlı etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir (56).

Dört asetilkolinesteraz inhibitörü, donepezil rivastigmin, galantamin ve takrin ile birlikte NMDA reseptör antagonisti memantin, AH için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (US FDA) onaylı tek ilaçlardır; bununla birlikte, sadece hastalığın semptomlarını hedef alırlar ve hastalardaki ilerleyici hafıza, bilişsel ve yürütücü işlev kaybını engellemezler. Yaşam beklentisinin artması ve hastalığın altında yatan nedenleri tedavi edecek ajanların yokluğu ile önümüzdeki 40 yıl içinde AH'na sahip insan sayısının üç katına çıkması beklenmektedir (57).

2.2. Herpes Simpleks Virüsü

Herpesviridae ailesi üç alt aile grubu içerir: alfa alt ailesi (HSV-1, HSV-2 ve varicella-zoster virüsü), beta alt ailesi (insan sitomegalovirüsü, *Roseola* virüsü) ve gama alt ailesi (Epstein-Barr virüsü ve kaposi sarkomu ile ilişkili *Herpes* virüsü) (58). HSV-1 ve HSV-2 insanlarda viral enfeksiyonlara neden olan *Herpesviridae* ailesinin alfa alt grubunun iki üyesidir. İki virüsün de protein kodlayan bölgeleri büyük ölçüde (%83) aynıdır ve bu nedenle biyolojik açıdan benzerlik sergilerler. İnsan herpes virüsleri dünya çapında oldukça yaygındır ve yetişkinlerin %90'ından fazlası bir veya daha fazla HSV ile enfektir. HSV-1 esas olarak oral ve nazal mukozanın epitel

hücrelerini enfekte eden nörotropik çift sarmallı bir DNA virüsüdür. HSV-2 ise, aksine çoğunlukla genital lezyonlardan sorumludur. Bununla birlikte, her iki virüs de aynı vücut bölgelerinde lezyonlara neden olma kapasitesine sahiptir ve yeni doğanlar, HIV'li hastalar veya bağışıklık sistemini baskılayıcı tedavi gören hastalar dahil olmak üzere bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde yaşamı tehdit eden hastalıklara neden olabilir (59,60).

Virüs çift sarmallı DNA'sı ikozahedral kapsid ile çevrelenmiştir. Kapsidin kendisi proteinli bir katmanla (tegument) ve yüzeyde çift katmanlı lipit zarfla çevrilidir. Viral zarf üzerinde 12 veya daha fazla sayıda HSV glikoproteini içerir ve virüsün enfeksiyon oluşturabilmesi için en az dört tip glikoprotein (gD, gB ve heterodimer gH/gL) koordineli hareketi gereklidir. Virüsün temel bileşenlerinden biri bu glikoproteinlerdir ve HSV-1'in hücreleri enfekte etme ve bağışıklık sisteminden kaçma yeteneğinde çok önemli bir rol oynar (61).

Herpes simplex virüsünün konakçı bir hücreye girişi, virüs zarfının yüzeyindeki birkaç glikoproteinin hücre yüzeyindeki transmembran reseptörlerine bağlanmasını içerir. gC ve gB, ilk bağlanmayı desteklemek için hücre membranındaki heperan sülfat proteoglikanlarıyla etkileşime girer. Daha sonra, reseptör bağlayıcı protein olan glikoprotein D (gD), bilinen üç giriş reseptöründen [*Herpes* virüsü giriş aracısı (HVEM), nektin-1 veya 3-O-sülfatlanmış heperan sülfat (3-OS HS)] en az birine spesifik olarak bağlanır. Bu etkileşimler, membran yüzeylerini birbirine yakınlştırır ve viral zarfın içine gömülü olan diğer glikoproteinlerin diğer hücre yüzeyi molekülleri ile etkileşime girmesine izin verir (62). Bu membran proteinlerinin etkileşimi hemifüzyon durumuna neden olabilir. gB'nin gH/gL kompleksi ile etkileşimi viral kapsid için bir giriş gözeneği oluşturur (63).

HSV-1 glikoproteinleri viral girişteki rollerinin yanı sıra bağışıklıktan kaçınmada da önemli bir rol oynar. Glikoprotein E (gE), bağışıklık sisteminin enfekte hücreleri tanıma ve yok etme yeteneğini engelleyerek antiviral tepkinin bloke edilmesinde rol oynar. Ek olarak, gD konağın bağışıklık sistemini ele geçirerek viral yayılmada kritik bir rol oynar (64).

HSV-1 enfeksiyonu, enfekte olmuş hücrelerde yeni virüs parçacıklarının üretimiyle sonuçlanan karmaşık biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler tetikler. En erken morfolojik değişiklikler çekirdekte meydana gelir ve konakçı kromatininin

marjinasyonunu, nükleolusun parçalanmasını ve yoğun intranükleer cisimlerin oluşumunu içerir (65). HSV-1 esas olarak boşaltılan kesecikler veya tükürük gibi enfekte vücut sıvıları ile doğrudan temas yoluyla kişiden kişiye bulaşır (66). HSV-1 birincil enfeksiyonu genellikle çocukluk döneminde ortaya çıkar ve başlangıçta yüz mukoza zarlarındaki epitel hücrelerini ve ikincil olarak duyu sinir terminallerini içerir. İlk enfeksiyondan kısa bir süre sonra virüs, başta trigeminal gangliyonlar olmak üzere nöral dokuları enfekte eder ve burada latent olarak kalır (67). HSV-1 enfeksiyonu, uzun süreli latent dönemler ve epizodik nüksetmelerle karakterizedir. Virüs yeni oluşan viral partiküllerin duyu nöronları yoluyla birincil enfeksiyon bölgesine geri taşındığı ve klinik lezyonlara (uçuklar ve kabarcıklar) neden olduğu periyodik yeniden etkinleşme dönemlerinden geçer (4,68). İkincil HSV-1 reaktivasyonu nispeten sık olup, enfekte bireylerin yaklaşık %25'inde zararsız bir rahatsızlık olan uçuklara ve çok daha nadiren ise ensefalit dahil ciddi nörolojik komplikasyonlara neden olur (69).

Herpes simplex ensefaliti, HSV-1 veya HSV-2 virüslerinin neden olduğu fokal veya global serebral fonksiyon bozukluğu ile ilişkili akut veya subakut bir hastalıktır. Ateş, halsizlik, baş ağrısı ve mide bulantısından oluşan ilk evre sıklıkla daha şiddetli nörolojik semptomlardan önce gelir. HSE'nin tipik klinik özellikleri arasında 24 saatten uzun süren bilinç değişikliği ve ateş, baş ağrısı, nöbetler ve fokal nörolojik bozukluklar gibi beyin inflamasyon semptomları yer alır. Bilişsel, davranışsal ve kişilik değişiklikleri de tanımlanmıştır (70).

2.2.1. Herpes Simpleks Enfeksiyonuna Karşı Bağışıklık Tepkisi

HSV-1 enfeksiyonu, konakçının doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin hızlı bir şekilde uyarılmasını aktive eder. Konakçı bağışıklık sistemi, viral replikasyona müdahale ederek HSV-1 enfeksiyonunu sınırlamada iyi rol oynasa da, HSV-1 proteinlerinin antiviral bağışıklık tepkilerini atlatacak kadar etkili olması ve virüsün latent olarak kalıp sürekli reaktivasyona uğrama yeteneği nedeniyle virüsü tamamen ortadan kaldıramazlar (71). HSV-1 enfeksiyonu durumunda hem doğal hem de edinilmiş bağışıklık tepkileri ortaya çıkar. Virüse karşı ilk doğuştan gelen immün yanıt olan tip 1 interferon (IFN) sinyal yolu virion tarafından aktive edilir. Bu IFN yolu, spesifik nükleik asit ve DNA ve RNA sensörlerine sahip reseptöre bağlıdır ve virüsün

tanınmasının ardından, interferonla uyarılan genler, viral replikasyonu inhibe etmek ve sınırlamak için HSV-1 enfeksiyonu oranına bağlı olarak etkinleştirilir (72).

Adaptif bağışıklık tepkileri de viral çoğalmanın kontrolünde rol oynamak açısından önemlidir. Nötrofiller apoptotik ve nekrotik epitel hücrelerinin fagositozuna yardımcı olur. Ek olarak etkilenen nötrofiller, viral enfeksiyonlu epitel hücrelerinin lizisi ve apoptozunda rol oynayan kaspaz 8'e bağımlı yolu aktive eden TNF- α 'yı salgılar. Makrofajlar da periferik dokularda ve trigeminal gangliyonlarda enfeksiyonun sınırlandırılmasında önemli bir rol oynar (73). Virüs enfeksiyonu başta klasik yol olmak üzere kompleman kaskadın üç yolunu da aktive edebilir. Klasik yol, kompleman bileşeni C1q'nun antikor-antijen komplekslerine bağlanmasıyla aktive edilir. Bu aktivasyon ayrıca spesifik antikorların yokluğunda C1q'nun bazı virüslerin glikoproteinlerine doğrudan bağlanmasıyla da sağlanabilir (74).

2.2.2. Herpes Simpleks Virüsünün Alzheimer Hastalığı ile İlişkisi

Uzun süredir enfeksiyöz ajanların kronik ve ilerleyici MSS hastalıklarına ve sendromlarına neden olduğu düşünülmektedir. Yalnızca *Herpes* virüslerin değil, diğer birçok DNA ve RNA virüsünün [örn. kızamık, insan immünoyetmezlik virüsü (HIV), varicella zoster virüsü, John Cunningham virüsü (JCV)] sinir sisteminin ciddi patolojileriyle (örn. subakut sklerozan panensafalit, HIV ile ilişkili demans, multifokal lökoensefalopati) ilişkili olduğu görülmüştür. Tüm bu hastalıklar birincil enfeksiyondan onlarca yıl sonra gelişebilir (69). *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi* ve herpes virüsleri gibi pek çok enfeksiyöz ajanın da insanlarda ve deneysel hayvan modellerinde nörobilişsel bozulmalarla ilişkili olduğu görülmüş ve AH'nin olası nedenleri olarak düşünülmüştür (75-77).

Herpes simpleks virüsü-1'in AH ile ilişkili olabileceğini gösteren ilk kanıt 1982'ye kadar uzanır ve HSV ensefaliti geçiren kişilerin AH'yi anımsatan klinik bulgular (hafıza kaybı, bilişsel bozukluklar, vb.) gösterdiği ve hastalıktan etkilenen beyin bölgelerinin (limbik sistem, frontal ve temporal korteksler) AH'de ilk olarak etkilenen beyin bölgeleriyle benzer olması gözlemlerine dayanır (9). Daha sonra yapılan moleküler çalışmalar da nöronal ve glial hücrelerin HSV-1 ile enfeksiyonunun, hücre içi A β seviyelerinde artışa, APP miktarında azalmaya ve NFY'lerin ana bileşeni

olan Tau proteinlerinin fosforilasyonuna yol açtığını göstererek bu hipotezi desteklemiştir (10,11,78,79).

Itzhaki ve ark. (1997) 46 AH hastası ve 44 kontrolden alınan post-mortem beyin örneklerinde PCR kullanarak HSV-1 timidin kinaz geninin varlığı ve konakçıdaki ApoE genotipi arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Çalışmada ApoE-ε4 alel frekansı, beyinde HSV-1 geni pozitif olan hastalarda, HSV-1 negatif çıkan hastalara ve kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu bulgular HSV-1'in diğer risk faktörleri ile birleştiğinde AH riskini artırabileceğini düşündürmüştür (80). Mancuso ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada da AH'li hastaların sağ orbitofrontal korteks, sol teemporal lob ve sağ alt frontal girus bölgeleri manyetik rezonans görüntüleme ile incelenmiş ve hastalarda HSV-1 spesifik antikor ölçülmüştür. Çalışmada ölçülen HSV-1 spesifik antikor titreleri ile kortikal hacimler arasında anlamlı pozitif korelasyon olduğu görülmüştür. HSV-1 spesifik antikorların AH'nin erken evrelerinde koruyucu olabileceği düşünülmüştür. Bu durum HSV-1'e özgü daha zayıf humoral yanıtın viral reaktivasyonun kontrolünün kaybıyla sonuçlanabileceği ve virüsün zamanla beyin hasarına neden olma riskini artırabileceği hipoteziyle açıklanmıştır (81). Ancak, yaşamın ilerleyen dönemlerinde bağışıklık sisteminin nispeten olumlu etkisi azalmaktadır. İki bağımsız boylamsal araştırmanın sonuçları bu fikri doğrulamaktadır. Bu kohortlarda HSV'ye özgü IgM varlığının, AH gelişme riskinin önemli ölçüde artmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (82,83). HSV-1 enfeksiyonunun popülasyonda oldukça yaygın olması sonucunda HSV-1 DNA'sı ve HSV'ye özgü antikorlar hem AH'li bireylerde hem de yaşlı kontrollerin çoğunda gözlenebilir. Bu nedenle yapılan epidemiyolojik çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilebilmektedir (84). Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalardan elde edilen mekanistik veriler incelendiğinde enfeksiyonun hastalık patofizyolojisinde oynadığı rol daha iyi anlaşılmaktadır.

Alzheimer hastalığının histopatolojik özelliklerinden olmasına rağmen, Aβ plakları ve NFY'ler AH'ye özgü değildir. Kronik enfeksiyonlar da dahil olmak üzere çeşitli MSS koşullarında bu patolojik durumlar meydana gelebilir. Örneğin, kızamık virüsünün neden olduğu subakut sklerozan panensefalit vakalarında ve sfilizde NFY'ler görülebilirken, Creutzfeldt-Jakob hastalığı gibi bazı prion proteini hastalıklarında amiloid plaklar mevcuttur (85,86). Buna ek olarak, amiloidopati

(yüksek serum amiloid seviyeleri ve dokularda amiloid birikimi ve agregasyonu ile karakterize edilen bir durum) çeşitli akut ve kronik sistemik inflamatuvar durumlarda, özellikle de tüberküloz ve lepra gibi kronik enfeksiyonlarda sık görülen bir durumdur (77,87). Bakteriyel olarak türetilmiş bir endotoksin olan lipopolisakkaritin fare hipokampusüne enjeksiyonunun, mikroglia aktivasyonu, makrofajlar ve T hücreleri tarafından infiltrasyon ve hiperfosforilasyon ve agregasyon ile karakterize edilen bir nöroinflamatuvar yanıtı tetiklediği ve Tau hiperfosforilasyonuna neden olduğu bulunmuştur (88). Ayrıca farelerde lipopolisakkaritin intraperitoneal enjeksiyonu fare hipokampusunda proinflamatuvar sitokinlerin ve $A\beta_{1-42}$ düzeylerinin önemli ölçüde yükselmesine yol açmıştır (89). Son zamanlarda $A\beta$ 'nin enfeksiyonlarda antimikrobiyal rolüne ilişkin alternatif bir görüş ortaya çıkmıştır (90). Bourgade ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada $A\beta_{1-40}$ ve $A\beta_{1-42}$ peptitlerinin, *in vitro* ortamda HSV-1 ile enfekte edilmiş insan fibroblast, epitelyal ve nöron hücrelerinde antiviral aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (91). Bu bulgular latent *Herpes* virüslerine ve sonuçta diğer enfeksiyonlara karşı korunmak için $A\beta$ peptitlerinin aşırı üretiminin, amiloid plak oluşumuna katkıda bulunabileceğini göstermektedir (92).

Herpes simplex virüsünün bu etkileri göz önüne alındığında antiviral ajanlar yoluyla viral replikasyonun inhibisyonu önemli bir terapötik hedef olabilir. Yapılan bir çalışmada, HSV-1 ensefalitli farelere intravenöz immünoglobulin (IVIg) infüzyonunun ölümü önlediği ve HSV-1 ile latent olarak enfekte olmuş trigeminal ganglionların sayısını azalttığı gösterilmiştir (93). Fillit ve ark. (2009) yaptıkları retrospektif vaka kontrol çalışmasında ise IVIg kullanımı daha düşük AH riski ile ilişkili bulunmuştur (94).

2.3. Bağışıklık Sistemi

Bağışıklık, bireyin yabancı maddeleri ayırt etmesini ve bu yabancı maddeyi nötralize ve/veya elimine etmesini sağlayan; hassas şekilde dengelenmiş karmaşık, çok hücreli ve fizyolojik mekanizmalar serisinden oluşan, homeostatik bir süreçtir. Bağışıklık sistemi de organizmayı hastalıklardan koruyan bir biyolojik süreçler ağıdır. Sistem, çok sayıda lenfoid organı ve çeşitli işlevlere sahip farklı hücre topluluklarını içerir. Bağışıklık sistemi, vücutta virüslerden parazitlere, tümör hücrelerinden vücuda

giren her yabancı maddeye kadar saptar ve canlının kendi sağlıklı hücrelerinden ayırt eder (95).

Birçok türün bağışıklık sisteminin doğuştan gelen ve edinilmiş bağışıklık olmak üzere iki ana alt sistemi vardır. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, geniş durum ve uyarıcı gruplarına önceden yapılandırılmış bir yanıt sağlar (96). Edinilmiş bağışıklık sistemi ise, daha önce karşılaştığı molekülleri tanımayı öğrenerek her uyarıcıya uyarlanmış bir yanıt sağlar. Her ikisi de işlevlerini yerine getirmek için molekülleri ve hücreleri kullanır (97). Birçok immün hücre için yaygın etki mekanizması, sitokin, kemokin veya interferon üretimi şeklindedir. Sitokin, kemokin ve interferonların birincil fonksiyonları hücre aktivasyonu, hücre içi sinyalin başlatılması veya sonlandırılması, çoğalma, farklılaşma, göç, alışveriş ya da etkinlik işlevleridir (98).

Doğuştan gelen bağışıklığın önemli bir işlevi, sitokinlerin ve kemokinlerin (hücre-hücre iletişimi ve alımında yer alan küçük proteinler) üretimi yoluyla bağışıklık hücrelerinin enfeksiyon ve inflamasyon bölgelerine hızlı bir şekilde alınmasıdır. Doğuştan gelen bağışıklık aktivasyonu sırasında sitokin üretimi, vücuttaki birçok savunma mekanizmasını harekete geçirirken, aynı zamanda enfeksiyon veya yaralanmaya karşı yerel hücresel tepkileri de aktive eder. Bakteriyel enfeksiyona erken yanıt sırasında salınan anahtar inflamatuvar sitokinler şunlardır: tümör nekroz faktör (TNF), interlekin 1 (IL-1) ve interlekin 6 (IL-6). Bu sitokinler, hücre alımını ve birçok patojenin temizlenmesi için gerekli olan lokal inflamasyonu başlatmak için kritik öneme sahiptir. Ayrıca, ateş gelişimine katkıda bulunurlar. Bu tür inflamatuvar sitokinlerin düzensiz üretimi, sıklıkla inflamatuvar veya otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilir ve bu da onları önemli terapötik hedefler haline getirir (99,100).

2.3.1. Sitokinler

Sitokinler, immün hücreler tarafından salgılanan küçük molekül ağırlıklı proteinlerdir. Bir enfeksiyona veya yaralanmaya yanıt olarak T hücreleri, B hücreleri ve makrofajlar dahil olmak üzere bağışıklık sisteminin çeşitli hücreleri tarafından salgılanır. İmmün yanıtın bütün evreleri boyunca üretilebilirler ve hücreler arasındaki etkileşimler üzerinde düzenleyici bir etkiye sahiptir. Ayrıca inflamasyon ve bağışıklık

tepkisinin düzenlenmesinden hücre büyümesi ve farklılaşmasına kadar çok sayıda fizyolojik sürecin kontrolünden sorumludurlar (101).

Sitokin terimi genel bir isimdir; içerdiği gruplar arasında lenfokinler (lenfositler tarafından yapılan sitokinler), monokinler (monositler tarafından yapılan sitokinler), kemokinler (kemotaktik aktiviteye sahip sitokinler) ve interlökinler (lökositler tarafından yapılan sitokinler) bulunur (102). Her grubun bağışıklık düzenlemesine katkıda bulunan farklı işlevleri vardır. Örneğin, interlökin 2 (IL-2) ve interlökin 4 (IL-4) gibi interlökinler, bağışıklık hücreleri arasındaki sinyali düzenler ve bağışıklık aktivasyonunu uyarır. Öte yandan interferonlar, viral replikasyonu inhibe ederek ve hücrel savunmayı güçlendirerek viral enfeksiyonlarla mücadeleye yardımcı olur. Kemokinler ise bağışıklık hücrelerini belirli enfeksiyon veya yaralanma bölgelerine yönlendirmekten sorumludur; böylece bağışıklık tepkisinin lokalizasyonunu sağlar. Farklı hücre tiplerinin aynı sitokini salgılaması veya tek bir sitokinin birkaç farklı hücre tipi üzerinde etki etmesi (pleiotropi) yaygındır (103). Bir sitokin, hedef hücreleri ilave sitokinler yapmaya teşvik ettiğinden, genellikle kademeli olarak üretilirler. Sitokinler ayrıca sinerjistik veya antagonistik olarak hareket edebilir ve farklı sitokin türleri, bağışıklık reaksiyonlarını artırabilir veya baskılayabilir. Belirli sitokinlerin üretimindeki veya düzenlenmesindeki dengesizlikler, otoimmün hastalıklar da dahil olmak üzere bir dizi inflamatuvar durumla ilişkilendirilmiştir (104).

İnterlökinler

İnterlökinler, çeşitli bağışıklık hücreleri arasında haberci görevi görerek sağlıklı bir bağışıklık tepkisinin sürdürülmesinde çok önemli bir rol oynar. Bu küçük proteinler, beyaz kan hücreleri de dahil olmak üzere çok çeşitli hücreler tarafından üretilir ve işlevlerine göre farklı türlere ayrılır. Bu proteinler öncelikle belirli bir sırayla düzenlenmiş amino asitlerden oluşan glikoproteinlerdir. Her bir interlökinin spesifik yapısı biraz farklılık gösterse de genellikle disülfid bağlarıyla bir arada tutulan dört alfa sarmaldan oluşur. Bu karakteristik yapı, interlökinlerin bağışıklık hücreleri üzerindeki spesifik reseptörlerle etkileşime girmesini sağlar (105). İnterlökinler bağışıklık sistemi içinde çeşitli roller oynar ve çeşitli bağışıklık tepkilerine yardımcı olur. Temel işlevlerden bazıları şunlardır:

- Bağışıklık hücrelerinin farklılaşması ve olgunlaşması: İnterlökinler, bağışıklık hücrelerinin farklılaşmasını ve olgunlaşmasını destekler. Örneğin IL-2, enfekte veya kanserli hücrelerin yok edilmesi için gerekli olan T hücrelerinin ve doğal öldürücü hücrelerin gelişimini destekler.
- Bağışıklık tepkisinin aktivasyonu: İnterlökinler, bağışıklık hücrelerinin çoğalmasını ve aktivasyonunu uyaran aktivatörler olarak görev yapar. İnterlökin-1 (IL-1), ateşi, inflamasyonu ve akut faz proteinlerinin üretimini tetikleyerek enfeksiyon veya yaralanmaya ilk tepkide önemli bir rol oynar.
- İnflamatuar yanıt: IL-6 ve interlökin 8 (IL-8) gibi bazı interlökinler, patojenlere, yaralanmaya veya doku hasarına yanıt olarak inflamasyonu teşvik eder. Bağışıklık hücrelerini enfeksiyon veya yaralanma bölgesine çekerek bağışıklık tepkisini ve doku onarımını kolaylaştırırlar.
- Bağışıklık hücreleri arası iletişim: İnterlökinler, bağışıklık hücreleri arasındaki iletişimi kolaylaştırarak bağışıklık yanıtlarının koordinasyonunu artırır. Komşu hücrelere belirli molekülleri serbest bırakmaları veya belirli bağışıklık yollarını etkinleştirmeleri için sinyal verebilirler. Örneğin interlökin-10 (IL-10), aşırı inflamasyonu engelleyerek ve anti-inflamatuar süreçleri teşvik ederek bağışıklık tepkilerini düzenler.
- Hematopoezin düzenlenmesi: İnterlökinler, hematopoez olarak bilinen karmaşık bir süreç yoluyla kan hücrelerinin gelişimini ve farklılaşmasını düzenler. İnterlökin-3 (IL-3), diğer büyüme faktörleriyle birlikte kırmızı kan hücreleri, beyaz kan hücreleri ve trombositler dahil olmak üzere çeşitli kan hücrelerinin oluşumunu ve olgunlaşmasını destekler (106,107).

2.3.2. Kompleman Sistem

Kompleman sistem, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin temel bir bileşenidir ve doğuştan gelen ve edinilmiş bağışıklık arasında bir köprü görevi görür. Kompleman sistem, kanda bulunan ve patojenik hedeflerin tanımlanması, opsonizasyonu ve parçalanması yoluyla vücut savunmasında rol oynayan bir dizi çözünür ve membran ilişkili proteinler ve hücre yüzeyi reseptörleri dahil olmak üzere 40'tan fazla proteinden oluşur. Bu da onun patojenleri hızla tanımasına, temizlenmesine ve apoptotik nekrotik hücreleri ve kalıntıları temizleyerek homestazı sürdürmesine

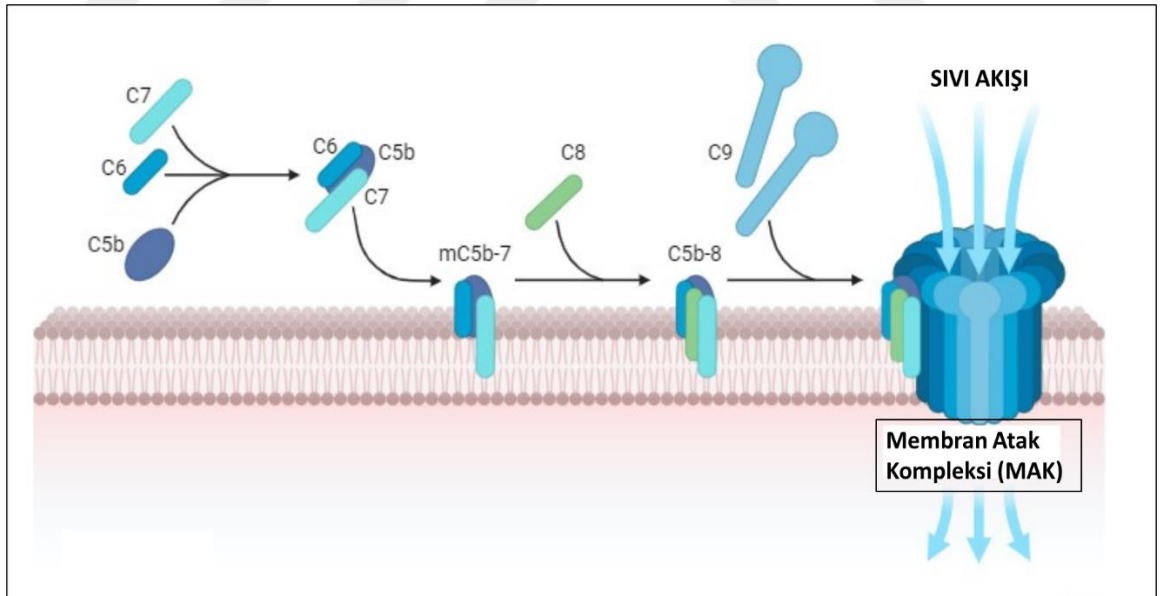
olanak tanır (108,109). Kompleman sisteminin temel işlevlerinden biri, antikorların ve fagositik hücrelerin patojenlerle savaşıma yeteneğini arttırmaktır. Bir enfeksiyon meydana geldiğinde, bazı kompleman proteinleri aktive olur ve bir dizi reaksiyonu başlatır. Bu basamak patojenlerin opsonizasyonuna yol açarak onları fagositik hücreler tarafından yok edilmek üzere işaretler. Bu süreç, bu hücrelerin istilacıları daha etkili bir şekilde tanımlamasına ve ortadan kaldırmasına yardımcı olur (110).

Ek olarak kompleman sistemi, bağışıklık komplekslerinin ve ölü hücrelerin temizlenmesinde hayati bir rol oynar. Bu atık ürünlerin tanınmasına ve uzaklaştırılmasına yardımcı olarak vücutta zararlı kalıntıların birikmesini önler. Bu işlev özellikle bağışıklık sisteminin yanlışlıkla vücut dokularına saldırdığı otoimmün hastalıklarda çok önemlidir. Kompleman sistemi hasarlı hücrelerin uzaklaştırılmasına ve doku bütünlüğünün korunmasına yardımcı olur. Ayrıca kompleman sistemi, bağışıklık hücrelerini enfeksiyon veya iltihaplanma bölgesine çeken kemotaksis adı verilen bir sürece katılır. Bazı aktive edilmiş kompleman proteinleri, bağışıklık hücrelerini etkilenen bölgeye yönlendiren, bağışıklık tepkisini artıran ve patojenlerin temizlenmesini kolaylaştıran kimyasal sinyal görevi görür (111).

Kompleman sistem, tümü sıralı enzim aktivasyonuna, protein bölünmesine ve efektör fonksiyonlara aracılık etmek için konformasyonel değişikliklere yol açan üç farklı yol (klasik, lektin ve alternatif) tarafından aktive edilir. Kompleman aktivasyonu, bir anlamda kan pıhtılaşması döngüsüne benzer şekilde, her bir bileşenin sıralı olarak diğeri üzerindeki etkisiyle gerçekleşir. Bu yollar, başlamaları için farklı bağlayıcı moleküllere bağlı olsalar da, hepsi nihai olarak kompleman hareketlerinden sorumlu olan kompleman protein 3 (C3) dönüştürücü enzim (konvertaz) üretimine yol açar (112).

Klasik kompleman yolu, kompleman protein 1 (C1) kompleksinin bir bileşeni olan kompleman protein 1q (C1q)'nın immün komplekslerdeki antikorun Fc alanına veya fibriller A β gibi immünoglobulin olmayan aktivatörlere bağlanmasıyla aktive edilir. Etkileşimin neden olduğu konformasyonel değişiklik, C1 kompleksi içindeki kompleman protein 1r (C1r) ve kompleman protein 1s (C1s) proenzimlerinin aktivasyonunu indükler. C1s daha sonra tamamlayıcı bileşen C4'ü parçalayarak C4a ve C4b'yi oluşturur, bunlardan ikincisi bir tioester bağı ile aktivatör yüzeyinde kovalent olarak biriktirilir. Kompleman protein 4b (C4b), kompleman protein 2 (C2)'yi

ve C1s proteazı bağlar; daha sonra C2'yi kompleman protein 2a (C2a) ve kompleman protein 2b (C2b)'ye böler. C4b ve C2b birleşerek C3 konvertazı oluşturur ve bu C3'ü bağlayarak kompleman protein 3a (C3a) ve kompleman protein 3b (C3b)'yi oluşturur. Oluşan C3b'nin bir kısmı C3 konvertaz (C4b2b) ile birleşir ve C4b2b3b yani kompleman protein 5 (C5) konvertazı oluşturur. Daha sonra C5 konvertaz C5 i kompleman protein 5a (C5a) ve kompleman protein 5b (C5b) olarak böler. C5a, miyeloid, mast hücreleri ve diğer hücre tiplerinde eksprese edilen reseptörlere bağlanarak kemotaksiyi indükleyebilir; vasküler geçirgenliği artırabilir ve proinflatuvar yolları uyarabilir. C5b, patojenleri parçalayabilen membranolitik gözenek oluşturucu C5b-9 kompleksinin oluşumunu başlatır (113). Kompleman membran atak kompleksi (MAK), klasik olarak patojenlerin veya hedeflenen hücrelerin plazma membranında gözenekler oluşturarak ozmolize yol açan, doğuştan gelen ve edinsel bağışıklığın sitolitik efektörü olarak bilinir. Antikor aracılı kompleman aktivasyonu, enfekte olmuş hücrelerin yüzeyinde MAK birikmesine yol açar. MAK'ın birleşmesi, hedef hücrelerin hücre zarını bozan gözeneklere yol açarak hücre lizisine ve ölümüne yol açar (114). MAK oluşumu Şekil 2.3.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Membran atak kompleksinin oluşumu (114).

2.3.3. Nöroimmün Sistem

Nöroimmün sistem, nöronları patojenlerden koruyan sinir sistemi ile bağışıklık sistemi arasındaki biyokimyasal ve elektrofizyolojik etkileşimleri içeren bir yapılar ve süreçler sistemidir. Seçici geçirgen bariyerleri [örneğin kan-beyin bariyeri (KBB) ve beyin omurilik sıvısı (BOS) bariyeri] koruyarak, hasarlı nöronlarda nöroinflamasyona ve yara iyileşmesine aracılık ederek ve patojenlere karşı konak savunmasını harekete geçirerek nöronları hastalığa karşı korumaya hizmet eder. Nöronlar, glial hücreler gibi sinir bileşenlerini ve mikrogliya, astrositler ve bağışıklık hücreleri dahil olmak üzere bağışıklık sisteminin hücresel bileşenlerini içeren karmaşık bir ağı temsil eder (115).

Nöroimmün sistem ve periferik immün sistem yapısal olarak farklıdır. Periferik sistemin aksine, nöroimmün sistem esas olarak glial hücrelerden oluşur; bağışıklık sisteminin tüm hematopoietik hücreleri arasında, nöroimmün sistemde normalde sadece mast hücreleri bulunur. Bununla birlikte bir nöroimmün yanıt sırasında, belirli çevresel bağışıklık hücreleri, beyne giren patojenlere yanıt vermek için çeşitli kan veya sıvı-beyin bariyerlerini geçebilir. Nöroimmün sistemin temel hücresel bileşenleri, astrositler, mikrogliya ve oligodendrositler dahil olmak üzere glial hücrelerdir (116).

Nöroimmün sistem, bağışıklık fonksiyonlarının hassas bir şekilde düzenlenmesini mümkün kılan çift yönlü iletişim mekanizmalarını içerir. Bu çift yönlü iletişimde MSS tarafından salınan nörotransmitterler, nöropeptitler ve nörohormonlar bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu, kemotaksisini ve polarizasyonunu etkilerken, bağışıklık hücreleri de nöronal fonksiyonları ve sinaptik plastisiteyi modüle etmek için nöronlar ve glial hücrelerle etkileşime girer (117).

Enfeksiyon, travma veya kronik hastalıkların varlığında nöroimmün sistem, nöroinflamatuvar yanıtları başlatır. Bu tür tepkiler, mikrogliya ve astrositlerin aktivasyonunun yanı sıra periferik bağışıklık hücrelerinin toplanmasını içerir ve bu da proinflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve reaktif oksijen türleri (ROS)'un salınmasına yol açar. Ancak, kontrolsüz nöroinflamatuvar yanıtlar nörotoksisteye, nörodejenerasyona ve bazı nörolojik bozuklukların ilerlemesine yol açabilir. Nöroimmün sistemin düzensizliği, multipl skleroz, AH, Parkinson hastalığı ve majör depresif bozukluk dahil olmak üzere çeşitli nörolojik ve psikiyatrik bozuklukların patogeneze katkıda bulunur (118,119).

2.3.4. Alzheimer Hastalığı Patofizyolojisinde İmmün Sistem Değişiklikleri

Nöroinflamasyon genellikle enfeksiyon, travma, iskemi ve toksinler dahil olmak üzere çeşitli patolojik durumların neden olabileceği MSS içindeki inflamatuvar yanıtı ifade eder. Süreç MSS'deki bağışıklık hücreleri tarafından IL-1 β , IL-6, IL-18 ve TNF dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin, prostaglandinler ve nitrik oksit (NO) dahil olmak üzere küçük moleküllü habercilerin ve ROS'un üretimi ile birlikte ilerler (120). Normalde doğal bağışıklık sisteminin aşırı uyarılması, mikrogliya ve astrositlerin inflamatuvar tepkisini baskılayan, glutamat gibi nörotransmitterleri salgılayan nöronlar tarafından baskılanır. Ancak AH'de, sürekli A β ile tehdit edilen nöronlar bu baskılayıcı kapasiteyi kaybeder. Sonuç olarak, başlangıçtaki yararlı etkisini kaybeden, doku yıkımına ve nöronal ölüme katkıda bulunan kronik bir inflamatuvar yanıt hakim olabilir (121).

Nöroinflamasyonun ve bağışıklık sistemi bileşenlerinin AH patogenezi ile ilişkili olduğu düşünülse de özellikle bazı proinflamatuvar sitokinlerin özellikle AH'nin erken evrelerinde koruyucu özellikleri olduğuna dair kanıtlar vardır. TNF- α , AH'nin erken evrelerinde geçici olarak koruma sağlayan bir sitokindir. Bir *in vitro* çalışmada, düşük konsantrasyonlarda ve hastalığın klinik öncesi evrelerinde üretilen TNF- α 'nın kalbindin-manganez süperoksit dismutaz ve B hücre lenfoma 2 (Bcl-2) gibi nöronal hayatta kalma faktörlerinin salgılanmasını uyarıp A β kaynaklı toksisiteyi önleyebileceği gösterilmiştir (122). Tümör büyüme faktörü beta 1 (TGF- β 1) ise *in vitro* ortamda antiapoptotik faktörleri düzenleyerek nöronal hücreleri A β ve glutamat kaynaklı nörotoksisiteden korur (123). IL-6'nın aşırı ekspresyonu, MSS'deki birçok patolojiye katkıda bulunur; ancak, IL-6'nın ekspresyonunun, en azından AH'nin erken evrelerinde inflamatuvar hasarın gelişimine karşı koruma sağlayabileceği öne sürülmüştür (124). Önemli olan bağışıklık sisteminin uzun süreli uyarılmasının dezavantajlarının, AH'nin erken evrelerindeki avantajlarından fazla olup olmadığıdır (125). TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi sitokinlerin, kronik olarak yüksek konsantrasyonlarda üretildiklerinde doğrudan sitotoksik olabildikleri ve APP sentezini artırdıkları bulunmuştur (126,127). İlerleyen yaşla birlikte mikroglialar aktif bir fenotip kazanır ve IL-1, TNF- α , ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımı artar bu durum inflamasyonun alevlenmesine ve nörodejeneratif hastalıklarda hastalığın ilerlemesinin hızlanmasına yol açar (128).

Goldgaber ve ark. (1989) yaptıkları çalışmada AH hastalarının beyinlerinde IL-1 ekspresyonunun arttığını rapor etmiştir. Ayrıca, *in vitro* ortamda hücelere rekombinant IL-1 verilmesinin APP ekspresyonunu protein kinaz C'nin aracılık ettiği bir yolak ile artırdığını göstermişlerdir (127). Daha sonra yapılan bir çalışma da aşırı eksprese edilen IL-1 β 'nın kolinerjik sistemin fonksiyonunu kısıtladığını göstermiştir. Sprague-Dawley sıçanların serebral korteks, hipokampus ve beyinciklerinden elde edilen primer nöronal kültürlerde, rekombinant IL-1 β ile muamele edilmesi sonucu serebral korteks ve hipokampusta AChE aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (129). IL-1'in NFY'lerin birikmesini de desteklediği ileri sürülmektedir. Postmortem doku analizlerinde AH'li bireylerde parahipokampal kortekste fosforile p38-mitojenle aktive edilen protein kinaz (fosfo-MAPK-p38) ve hiperfosforile Tau'ya eşlik eden aktif mikrogliya ve IL-1 ekspresyonu artışı gözlenmiştir (130). Combarros ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada IL-1 α [-889] alel 2 polimorfizminin AH ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Polimorfizmin inflamasyon kaskadını yukarı yönlü regüle ederek AH riskini artırdığı düşünülmüştür (131). Griffin ve ark (1994) yaptıkları çalışmada ise, yaşları 23-65 yaş arası değişen ve kafa travmasını takiben 12 saat ila 10 gün arasında ölen yedi hastadan aldıkları mezial temporal lob örneklerini kontrol grubu ile karşılaştırmışlardır. Kafa travması geçiren hastaların beyinlerinde temporal korteks boyunca IL-1 α pozitif hücrelerin sayısının ve APP sentezinin kontrol örneklerine göre 3 kat arttığı gözlenmiştir. Yaralı nöronlar APP üretimini artırmak üzere indüklendiğinden artmış APP sentezi, işlenmesi ve plak oluşumuna katkıda bulunan bir A β birikme döngüsü meydana gelebileceği düşünülebilir. Bu bulgular, IL-1 α ve β -APP'nin erken dönemde aşırı ekspresyonunun, AH'nin son evrelerinde ortaya çıkan nöropatolojik değişiklikler için bir öncü olay olabileceğini göstermektedir (132).

Alzheimer hastaları hem periferde hem de MSS'de artan IL-6 ekspresyonu göstermişlerdir. Yapılan bir çalışmada AH'li bireylerde, yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş kontrollere göre dolaşımdaki IL-6 düzeylerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (133). Bir *in vitro* çalışmada da hipokampal hücre kültüründe aşırı eksprese edilen IL-6'nın siklin bağımlı kinaz 5/p53 (cdk5/p53) yolağını etkileyerek Tau fosforilasyonunu indüklediğini ve böylece AH riskini artırdığı ileri sürülmüştür (134). Licastro ve ark. (2003) tarafından yapılan bir araştırma, IL-6 geninde 174C polimorfizminin IL-6 düzeylerini artırdığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada C alelinin AH

riskini de artırdığı bulunmuştur. Bu bulgular sonucunda IL-6 düzeylerindeki düzensiz artış ve AH arasında korelasyon olabileceği düşünülmüştür (135).

Akut ve kronik inflamasyon, immün sistem-beyin iletişiminde rol oynayan proinflamatuvar sitokin TNF- α 'nın sistemik üretimi ile karakterizedir. AH'li bireylerde yapılan prospektif bir kohort çalışmasında, artan TNF- α seviyeleri ve akut sistemik inflamasyonun uzun vadeli bilişsel gerileme ile ilişkili olup olamayacağını belirlemek için 2., 4. ve 6. aylarda alınan serum örneklerinde TNF- α seviyeleri ölçülmüştür. Sonuçta serumda ölçülen TNF- α 'daki artışın, bilişsel gerileme oranında 2 kat artışla, başlangıçta ölçülen yüksek seviyeler ise 4 kat artışla ilişkilendirilmiştir (136). Janelins ve ark. (2008) yaptıkları AH'nin hayvan modeli çalışmasında TNF- α 'nın inflamatuvar kaskatta anahtar bir rol oynadığını ve 3xTg transgenik farelerde TNF- α üretiminin uyarılmasının A β ve Tau patolojisini arttırdığı gösterilmiştir (137). Ayrıca Sk-n-sh nöroblastoma hücre hattında TNF- α ve IL-1 β , interferon gama (IFN- γ) ile birleştiğinde, A β sentezini artırdığı ve nöroprotektif etkiye sahip olan APP- α sekretaz enzimini azalttığı gözlenmiştir (138). TNF- α 'nın bu etkileri düşünüldüğünde AH tedavisinde de terapörük bir hedef olarak da düşünülebilir. Yapılan bir çalışmada, hafif ve orta şiddetli AH'li bireylere TNF reseptör 2 antagonisti olan "etanersept" prespinal olarak uygulandığında, hastalarda iyileşme sağlandığı bildirilmiştir (137,139). TNF- α 'nın nöroinflamasyon üzerindeki bu etkileri ile birlikte, TNF- α sinyalinin uzun süreli ve non-spesifik inhibisyonu, AH transgenik farelerin beyinlerinde patolojiyi kötüleştirdiği rapor edilmiştir. Bu durum TNF- α 'nın nöroprotektif rolleri de olduğunu göstermektedir (140). Ayrıca, sitokinlerin kompleman sistemin işleyişini de değiştirerek kronik inflamasyonu geliştirebileceği gösterilmiştir. Veerhuis ve ark. (1999) primer insan astrosit hücrelerinde yaptıkları çalışmada, hücrelerin IL-1 α , IL-1 β , TNF- α ve bunlardan daha az ölçüde olsa da IL-6'ya maruz bırakılması kompleman kaskadın başlatılmasını sağlayan C1r, C1s ve C3 proteinlerinin üretimini belirgin bir şekilde artırmıştır (141).

Alzheimer hastalığında plaklarda biriken TGF- β 1 tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada AH'li hastalarda BOS'ta ve serumda, kontrol grubuna göre daha yüksek oranda TGF- β 1 seviyeleri olduğu bulunmuştur ve TGF- β 1'in ekstraselüler matriks ve/veya büyüme faktörleriyle etkileşimler yoluyla plak oluşumunda rol oynayabileceği düşünülmüştür (142). Ancak, TGF- β 'nın AH gelişiminde koruyucu

etkileri olduğu ve TGF- β sinyalinin düzensiz bir şekilde azalmasının da patofizyolojide rol oynayabileceği düşünülmüştür. Tesseur ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada TGF- β tip II reseptörünün (T β RII) esas olarak nöronlar tarafından eksprese edildiği, insan AH beyinde T β RII ekspresyonunun azaldığı ve azalmanın hastalığın patolojik özellikleriyle korele olduğu rapor edilmiştir (143).

Önceleri MSS'nin KBB nedeniyle bağıışıklık ayrıcalıklı bir sistem olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte, kompleman sistem bileşenlerinin MSS içinde astrositler, mikroglia ve nöronlar tarafından üretilebileceği artık bilinmektedir (144). Kompleman faktörler beyne KBB yoluyla da girebilir. Artan kanıtlar KBB disfonksiyonunun AH'de erken bir olay olduğunu göstermektedir (145). Ayrıca, beyindeki astrositler gibi glial hücrelerin de kompleman sistem bileşenlerini ürettikleri gösterilmiştir (146). C1q, C3 ve C4 beyinde yüksek düzeyde eksprese edilir ve AH'de birkaç kat yüksek düzeyde eksprese edildikleri gösterilmiştir. Fare modellerinde de artan C1q seviyelerinin atan Tau seviyelerine karşılık geldiği gösterilmiştir. (16).

Kompleman sistem, başlangıç hedeflerine ve aktivasyon seviyesine bağlı olarak nörotoksik olduğu kadar nöroprotektif de olabilir (144). Kompleman sistem bileşenlerinin normal fizyolojik koşullarda nöroprotektif fonksiyon gösterdiğine dair kanıtlar vardır. MSS'de nörogenez, sinaptik budama ve sinaptik plastisite üzerinde rolleri olduğu gösterilmiştir. Wallis ve ark. (2007) hayvan modellerinde serebellar gelişim zamanında kompleman reseptörlerinin aktivasyonunun arttığı bulunmuştur (147). Diğer bir çalışmada ise, farelerde C3aR sinyalinin bozulması nörogenezin bozulmasına neden olmuştur (148). C1q proteini baskılanmış fareler ise, epilepsi ile sonuçlanan, artmış sinaptik bağlantılar sergilemiştir. Ayrıca, bu farelerde zayıf dendritler ve dendritik uçlar olduğu görülmüştür. Bu durum C1q proteininin sinaptik budama ve sinaptik plastisite süreçlerinde önemli bir rol oynadığını düşündürmüştür (141,144).

Kompleman sistemin nöroprotektif rolüne karşın sistemde dengesizlikler nöroinflamasyonla sonuçlanabilmektedir ve bu nöroinflamasyon durumunun nörolojik, nörodejeneratif ve psikiyatrik hastalıkların patogenezinde rol alabileceği düşünülebilir (149). Kompleman sistemin aşırı aktivasyonu ve kompleman reseptörlerinin aşırı ekspresyonu mikrogliaların aşırı aktivasyonuna sebep olarak hem MSS'de mikroglia aracılı fagositozu artırabilir (150-152), hem de proinflamatuvar

sitokinlerin salınımını arttırarak nöronal ölüme yol açabilir (153). Bununla birlikte kompleman sistemin MSS gelişiminde oynadığı roller ile tutarlı olarak aşırı kompleman aktivasyonuna bağlı olarak sinaptik budamanın arttığı ve/veya lokalize dendritik yoğunluk kaybı meydana geldiği gösterilmiştir. Bu durumun davranışsal performansta eksikliklerle ilişkili olduğu düşünülmüştür. Vasek ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada Batı Nil Virüsü ile enfekte olmuş farelerde kompleman sistem bileşenlerinin ekspresyonunun arttığını bulmuş ve bunun aşırı sinaps eliminasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir (154).

Alzheimer hastalarının beyindeki amiloid plaklarla ilişkili tamamlayıcı proteinler ilk olarak 1982’de bulunmuştur (155). Daha sonra, kompleman kaskadının *in vitro* olarak yapılan deneylerde fibriler AB agregatları ve NFY’ler (hiperfosforillenmiş Tau) tarafından doğrudan aktive edilebileceği gösterilmiştir (156-159). A β plakları ve Tau proteininden oluşan NFY’ler direkt olarak klasik yolun uyarılması ile kompleman kaskadını aktive edebilirler (160-164). Alzheimer β -amiloid peptitleri, kompleman klasik yolunun erken bileşenlerini C1q’den bağımsız bir şekilde aktive edebilir. İnsan plazması A β ₁₋₄₂ ile inkübe edildiğinde, C1s ve C4 doza bağlı artmıştır (165). A β , ayrıca NF- κ B aktivasyonuna neden olur. NF- κ B aktivasyonu C3 salınımını artırır ve bu da mikroglia aktivasyonu ile sitokin salınımını artırır (166,167). A β ’nın astrositlerde NF- κ B yolunu aktive ettiği, bunun sonucunda C3 salınımının artmasına neden olduğu; bunun da nöronlar ve mikroglia üzerindeki C3a reseptörleri üzerinde etki ederek nöronal fonksiyon bozukluğuna ve mikroglial aktivasyona neden olduğu gösterilmiştir (168).

Diğer dokulardaki makrofajların beyindeki karşılığı olarak kabul edilen mikroglialar, C3a ve C5a proteinleri için yüzey reseptörleri eksprese eder. Bu nedenle A β peptitleri tarafından kompleman sistemin aktivasyonu sonucu üretilen C5a, glial hücreleri amiloid plakların toplanma bölgelerine ve böylece bu bölgelerde bir inflamatuvar çekirdek oluşturabilir (169). Yapılan bir *in vitro* çalışmada mikroglia için bir model olarak monosit hücre dizisi kullanan O’Barr ve Cooper (2000), ortamda C5a varlığında A β peptitlerinin belirgin şekilde IL-1 β ve IL-6 indüksiyonunu tetiklediğini göstermiştir. Aynı çalışmada, A β ’nin tek başına proinflamatuvar sitokinlerin sentezini düşük düzeyde indüklediği, C5a’nın ise tek başına proinflamatuvar sitokin salınımını indüklediği gözlenmiştir. Bu nedenle kompleman sistemin aktivasyon ürünü olan

C5a proteininin mikrogiaları plak alanına çekmek için kemotaktik bir uyarı sağlamanın yanı sıra, A β ile sinerji oluşturarak inflamatuvar yanıtı daha da artırabileceği ve nöroinflamasyonu şiddetlendirebileceği düşünülmüştür (170). Litvinchuk ve ark. (2018), AH farelerde C3a reseptör inaktivasyonunun Tau patolojisini azalttığı gösterilmiştir (171). Elde edilen kanıtlar, kompleman sistem kaynaklı inflamasyonun aktivasyon kaynaklı bölünme ürünü C5a tarafından tetiklendiğini göstermektedir. C5a, hücre içi kalsiyum seviyelerinin artmasına, hücre içi sinyalleşme basamaklarının aktivasyonuna, histamin ve sitokinlerin üretimine yol açar(172). Bir AD fare modelinde, C5aR1'in genetik ablasyonu, amiloid yükündeki değişikliklerden bağımsız olarak uzamsal spesifik bellek eksikliklerini önlemiştir (173).

2.4. Epigenetik

Epigenetik, DNA nükleotit dizisini etkilemeden genlerin ekspresyonunu ve fonksiyonlarını düzenleyen kalıtsal modifikasyonlarla ilgilenir. Epigenetik modifikasyon yoluyla, vücudun ihtiyaç duyduğu çeşitli hücreler ve işlevler, tüm hücreler için tek bir genetik kod kullanılarak elde edilebilir (174). Hücreler arasındaki farklılıklar DNA'nın yapısı ve nükleotitlerin dizilişlerindeki farklılıklarından değil gen ekspresyonundaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Bir genin eksprese edilip edilmemesi kromozomal DNA-protein kompleksinin konformasyonel durumuyla belirlenen kromatin yapısına göre transkripsiyon faktörlerinin gene bağlanmasına bağlıdır (175).

Kimyasal maddelere maruziyet gibi çevresel etkenler fenotipi sadece promotör bölge mutasyonu ile değil, epigenomu modifiye ederek de etkileyebilir. Epigenetik gen ekspresyonuna olan etkisini transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya ulaşmasını engelleyerek veya artırarak gösterir. Epigenetik sürecin hatalı çalışması genomik kararsızlığa yol açabilir. Ayrıca epigenetik modifikasyonlarla iletilen bilgi DNA onarımı, replikasyon ve transkripsiyon gibi DNA bazlı süreçlerin düzenlenmesinde kritik role sahiptir. Bu nedenle, ekspresyon bölgelerinde meydana gelen anormal değişiklikler çeşitli hastalıklara sebep olabilir. Son araştırmalar, epigenetik faktörlerin kanser ve AH dahil olmak üzere kronik hastalıklar üzerinde sıklıkla bir etkisi olduğunu göstermektedir (176,177).

2.4.1. Epigenetik Mekanizmalar

Gen ekspresyonu kromatin yapısı tarafından sıkıca kontrol edilmektedir ve bu kromatin yapısı çeşitli kromatin modifikasyonlarıyla dinamik olarak düzenlenir. Başlıca epigenetik mekanizmalar DNA ve histon modifikasyonlarıdır (178). Bu mekanizmalar bağımsız olarak hareket edebileceği gibi gen ekspresyonunu değiştirmek için birlikte de çalışabilir. Meydana gelen modifikasyonlar nükleozomların içindeki veya nükleozomlar arasındaki kovalan olmayan etkileşimleri değiştirerek kromatin yapısını değiştirebilir (179).

DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu en çok çalışılan epigenetik modifikasyondur. DNA'nın metile olması DNA dizisini değiştirmez; ancak, DNA'nın aktivitesini, gen ekspresyonunu ve genlerin işlevini değiştirir. Genomik DNA metilasyonu memelilerde erken embriyonik gelişme sırasında programlanmaya başlanır. Ökaryot hücrelerde *de novo* metilasyonu ve sürdürme metilasyonu olmak üzere iki tip metilasyon görülür (180).

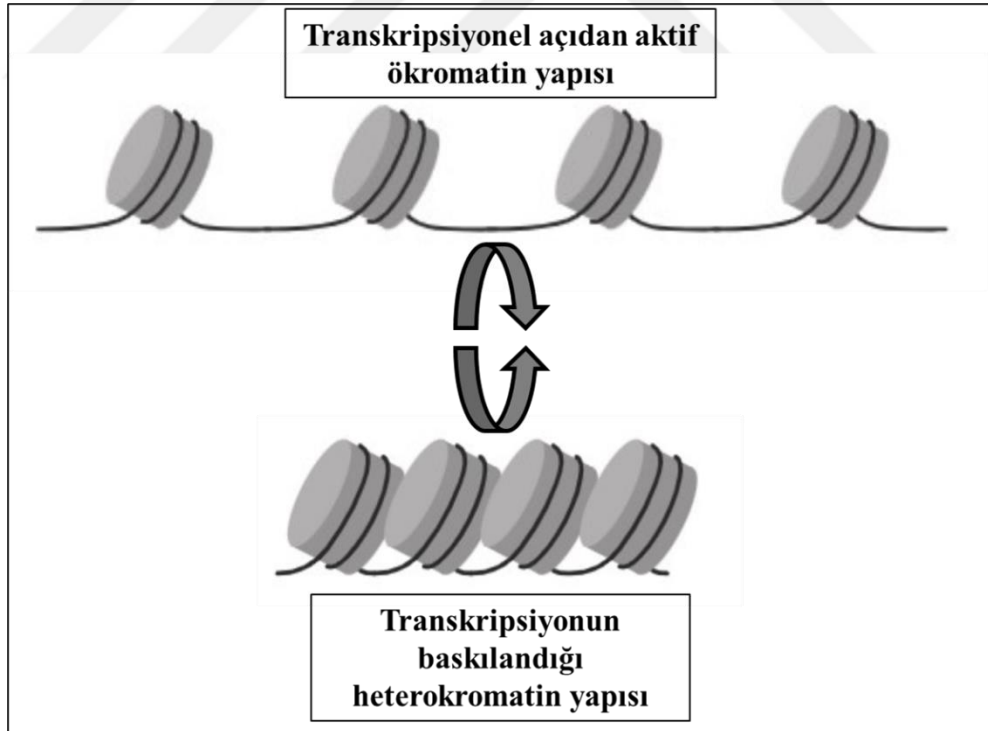
DNA metilasyonu memelilerde DNA dizisinin sitozin-fosfat-guanin (CpG) adacıklarında meydana gelir. CpG dinükleotit dizisinde sitozin halkasının 5 numaralı karbon atomuna metil grubunun kovalan olarak bağlanması ile oluşur. Ortaya çıkan 5-metil sitozin (5-mc) birçok hücresel fonksiyonda önemli rol oynar. Memeli genomunda CpG dizilerinin bulunduğu bölgeler rastgele değildir. CpG adacıklarının %50'den fazlası genlerin promotör bölgelerinde bulunur ve buraya bağlanacak moleküller için tanıma bölgeleri oluşturur (181).

DNA metilasyonu DNA metiltransferaz (DNMT) enzim grubu tarafından katalizlenir. Bugüne kadar tanımlanmış beş sınıf DNMT (DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT 3b ve DNMT3L) vardır (182). Bunlardan DNMT1 somatik hücrelerde yoğun olarak bulunur ve mevcut metilasyon kalıbının sürdürülmesinde rol alır. DNMT1 ekspresyonu, embriyonik sinir sisteminde oldukça yüksektir ve bu durum nöral progenitor hücrelerin bölünmesinde DNA metilasyonunun rolü ile tutarlıdır (183). DNMT'ler S-adenozil-L-metiyonin (SAM)'den aldıkları metil grubunu hedef sitozin molekülünün beşinci karbon atomuna aktarırlar (184).

DNA metilasyonu transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını inhibe ederek direkt olarak gen ekspresyonunun durdurulmasına yol açabilir veya metil bağlayıcı proteinlerin bağlanması yoluyla kromatin yapısını değiştirerek transkripsiyonu durdurabilir. Gen ekspresyonunu baskılaması nedeniyle DNA metilasyonu, X kromozomu inaktivasyonu veya tekrarlayan ve parazitik DNA dizilerinin susturulması gibi önemli işlevlere sahiptir. Metilasyon tekrar dizilerinin ve transpozonların bulunduğu CpG adacıklarında sıklıkla görülür ve bu sayede genomun kararlılığı sağlanır (185)

Histon Modifikasyonları

DNA, kromatin adı verilen DNA-protein kompleksi içinde paketlenmiştir (186). Histon proteinleri, DNA'nın kromatin halinde paketlenmesinde etkili ve bu nedenle DNA ile yakın ilişkide olan, bazık yapıda proteinlerdir. Histon modifikasyonları kromatin yapısını sıkıştırarak veya gevşeterek transkripsiyonu etkiler (Şekil 2.4) (187).



Şekil 2.4. Histon proteinlerinin kromatin yapısı ile olan ilişkisi (187)

Oktamer histon yapısında, dört çift histon proteini (H2A, H2B, H3 ve H4) yanında histonlar ile DNA arasındaki bağlantıyı sağlayan bağlayıcı H1 histon proteini bulunur. Her bir histon çifti kromatin yapısı içerisinde yuvarlak bir saha oluşturur ve 20-30 aminoasitten oluşan, amino ve karbonil bölgelerine sahip histon kuyruğu adı verilen yapılar taşır. Histon kuyrukları artı yüklü aminoasitler açısından zengin bölgelerdir (188).

Histonların amino terminal uçlarında asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, sumolasyon, ubikitinasyon, ADP-ribozilasyon gibi bir dizi kovalan modifikasyon meydana gelir. Bu modifikasyonlar kromatin yapısını düzenleyerek transkripsiyon faktörlerinin bölgeye ulaşmasını etkilerler. Modifikasyonların histonlardaki elektrostatik yükü değiştirerek kromatin yapısını gevşettiği veya sıkıştırdığı düşünülmektedir (189).

Histon Metilasyonu

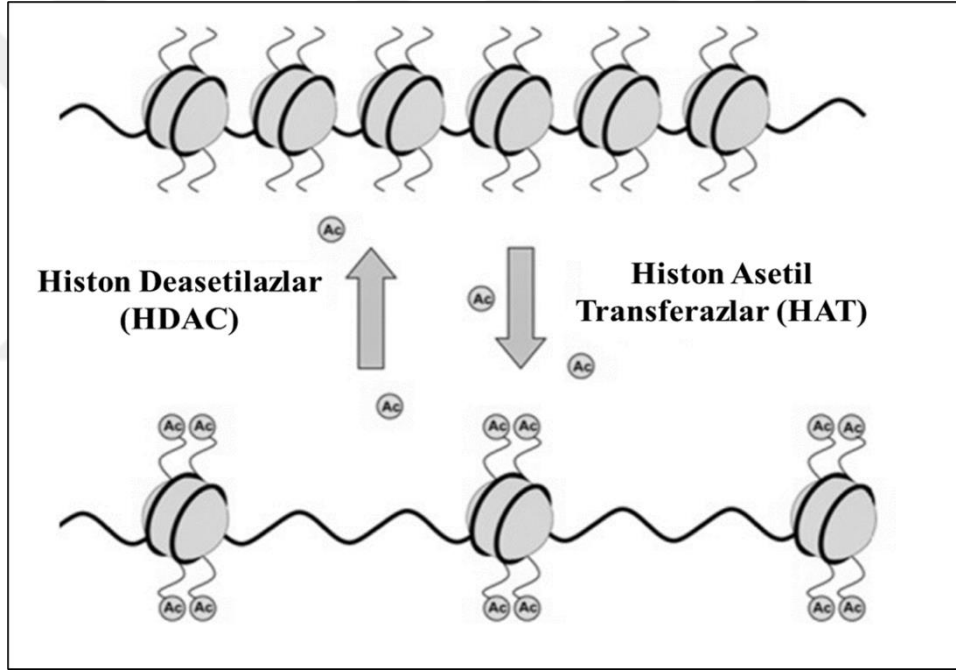
Histon metilasyonu, transkripsiyonun düzenlenmesinden heterokromatin oluşumuna kadar birçok süreçte rol alır. Asetilasyon ve fosforilasyon olaylarının aksine elektriksel yükü etkilemez. Histon metilasyonu asetilasyonun aksine kararlı bir yapı sergiler. Kromatin yapısındaki değişimler hangi aminoasidin metillendiğine göre değişim gösterir ve metilasyon olayı sıklıkla H3'te gözlenir. Histon metilasyonu histon metil transferaz (HMT) enzimleri tarafından katalizlenir. İnsan genomuna etki eden altmıştan fazla HMT gözlenmiştir. Histon 3-lizin 4 trimetilasyonu (H3K4me3) ökaryot hücrelerde promotor bölgeleri belirlemesi açısından önemlidir (190).

Histon metilasyonu, embriyonik gelişim, X kromozomu inaktivasyonu ve hücre farklılaşmasının düzenlenmesi gibi çok sayıda biyolojik süreçte rol oynar. Bu kalıplardaki dengesizlikler veya kusurlar, gelişimsel anormalliklere veya kanser dahil birçok hastalığa yol açabilir (191).

Histon Asetilasyonu

Kromatin yapısı ve gen transkripsiyonu histon moleküllerinin asetilasyonu-deasetilasyonu tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Histon asetilasyonu geri dönüşümlü bir süreçtir ve genin bir bölgesindeki histonların asetile olması o bölgenin transkripsiyonel açıdan aktif olmasını sağlar (Şekil 2.5) (192).

Histon asetilasyonunun bu dinamik yapısı ve gen transkripsiyonunda oynadığı önemli rol, histon asetilasyonunu modifiye eden ilaçların klinik açıdan önemli olmasını sağlamıştır (193). Asetilasyon, histon asetil transferazlar (HAT'lar) ve histon deasetilazlar (HDAC'lar) tarafından kontrol edilir. HAT asetil koenzim A'dan asetil grubunun histonların kuyruğundaki lizin amino asidinin amino grubuna transferini katalizler. Negatif yüklü asetil grubunun histon proteinine bağlanmasıyla pozitif yüklü lizin amino asidi elektriksel yükünü kısmen kaybetmekte ve kromatin yapısında gevşeme meydana gelmektedir. HDAC'lar ise, asetil grubunun geri alınımını destekleyerek pozitif yükün geri gelmesini sağlar. Transkripsiyonu etkilemenin yanında diğer post-translasyonel modifikasyonları da düzenleyici etkileri vardır (194).



Şekil 2.5. Asetilsyon-deasetilasyona bağlı değişen kromatin yapısı (194)

Histon Fosforilasyonu

Fosforilasyon, protein etkileşimlerini, enzimatik aktiviteleri ve kromatin yapısını etkileyebilir ve elektriksel yükü değiştirmek suretiyle kromatin yapısını değiştirebilir. Fosforilasyon olayı protein kinazlar ve protein fosfatazlar tarafından katalizlenir. Genellikle serin, treonin ve tirozin aminoasitleri üzerinden yürür. Bağlayıcı histon proteini olan H1, en sık fosforilasyona uğrayan histon proteindir.

Fosforilasyonun, histon proteinlerinin çekirdek ve DNA ile etkileşimini etkileyerek kromatin yapısının değişiminde rol oynadığı düşünülmektedir (195,196).

2.4.2. Epigenetik Mekanizmaların Alzheimer Hastalığında Etkileri

Bir bireyin hastalıklara yatkınlığı, kısmen genetik yapı ve DNA dizisi ile açıklanabilir. Ancak DNA dizileri monozygotik ikizler için aynıdır ve bu nedenle fenotiplerindeki uyumsuzluk ve çeşitli hastalıklara karşı farklı duyarlılık genetik yapı ile açıklanamaz. Bu tür farklılıklar epigenetik değişikliklerle açıklanabilir (197). Epigenetik mekanizmaların AH'nın etiyolojisine bir katkısı olduğu öne sürülmüştür (20,21). Epigenetik faktörler, hafıza ve sinaptik plastisite ile ilişkili genlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Buna göre, epigenetik mekanizmaların düzensizliğinin [DNA metilasyonu, mikro RNA (mRNA) seviyeleri, histon modifikasyonları], AH'nda sinaptik plastisite ve hafıza kaybıyla ilişkili genlerin anormal ekspresyonunun altında yatabileceğine dair artan kanıtlar vardır (198-201). Ayrıca, epigenetik mekanizmaların beyinde nörogenез sırasında önemli bir rol oynadığı görülmüştür (202).

DNA Metilasyonunun Alzheimer Hastalığında Etkileri

Alzheimer hastalığında farklılaşmış DNA metilasyonuna dair ilk kanıt 1995'te West ve ark. tarafından sağlanmıştır. Hasta bireylerde temporal lobdaki APP promotör bölgesinin metilasyon seviyelerinin, sağlıklı bir bireye kıyasla önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (23). Memelilerde, spesifik genlerin promotörleri üzerindeki CpG adacıkları dahil olmak üzere birkaç spesifik DNA bölgesinin hipermetilasyonu dışında, yaşlanma ile global DNA hipometilasyonu arasında bir ilişki vardır (203,204). İnsan korteksindeki APP promotörünün belirli konumlarındaki metilasyonun yaşla birlikte azaldığı gözlenmiştir (205). Hafıza ve öğrenme yetenekleri de DNA metilasyonunda genel bir azalma ile birlikte azalır (206). PSEN-1 gibi genlerin promotör bölgelerinin hipometilasyonunun, A β üretiminde artışa yol açtığı bulunmuştur (207).

Mastroeni ve ark. (2009) insanlarda, AH bakımından uyumsuz monozygotik ikizlerle çalışmıştır. Bu ikizler, AH'nda ciddi şekilde etkilenen bir bölge olan anterior temporal kortekste farklı DNA metilasyon seviyeleri sergilemiştir. AH'ye sahip ikizde

DNA metilasyonunun spesifik olarak azaldığı görülmüştür. Bu durumun AH ile folat eksikliği arasındaki bağlantıyı destekleyebileceği düşünülmüştür. Zira, folatın normal işlevlerinden biri DNA metilasyon reaksiyonları için metil grubu donörü olmaktır (208). DNA metilasyonunda metil donörü olarak işlev gören SAM seviyelerinin Alzheimer hastalarının serebrospinal sıvılarında ve beyinlerinde önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur (209). Mastroeni ve ark. (2010) ikiz çalışmalarının devamı olarak AH olan ve olmayan bir örnek popülasyonun entorinal korteksindeki DNA metilasyonunu incelemek için immünohistokimya yöntemini kullanmıştır. Önceki çalışmalarından elde edilen bulgularla uyumlu olarak, araştırmacılar hasta bireylerde global DNA metilasyonunda önemli bir azalma olduğunu bulmuşlardır. Daha da önemlisi, bu çalışmada 5-mC için immünoaktivitenin, beyincik gibi nispeten AH'ndan korunan bölgelerde önemli ölçüde farklı olmadığı görülmüştür. Bu da AH'nda DNA metilasyon değişikliklerinin bölgeye özgü olduğunu düşündürmüştür (210). Hastalıkta gözlenen DNA metilasyon değişikliklerin sadece beyin spesifik bölgelerine özgü olmayıp genomun da belirli bölgelerinde yoğunlaştığı düşünülebilir. Kolinerjik IMR-32 insan nöroblastoma hücreleri ile yapılan bir çalışmada, A β ₁₋₄₀ ile muamele edilmiş hücrelerin genomundaki global DNA metilasyon durumu değişmemiştir. Ancak nörogenez, nöronal farklılaşma ve apoptozu yönlendiren gen bölgelerinde değişim görülmüştür (211). AH'de, Huntington hastalığında ve bir dereceye kadar Parkinson hastalığı donörlerinde, entorinal kortekste Ankyrin 1 (ANK1) geninde DNA metilasyon değişikliklerinin gözlemlendiği; ancak AH patolojisinin yokluğunda, sadece vasküler demansı veya Lewy cisimcikli demansı olan kişilerde bu değişimin gözlenmediği vurgulanmıştır (212).

Alzheimer hastalığında genellikle hipokampal ve serebral korteks hücrelerinin DNA metilasyonunda azalmalar gözlenmiştir. Örneğin, AH'na sahip bireylerden postmortem olarak alınan beyin örneklerindeki kortikal nöronlarda, 5-mC seviyeleri sağlıklı kontrollerinkinden daha düşüktük olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde, hastaların hipokampusunda, serebral kortekste ve serebellumda düşük 5-mC seviyeleri bildirilmiştir (213,214). APP geni, promotör bölgesinin metilasyonu ile susturulur; bununla birlikte, yaşlanma sırasında bu gen demetile edilerek ekspresyonunu ve sonuç olarak beyinde A β birikimini destekler (215). Mano ve ark. (2017) normal beyin örnekleri postmortem AH beyin örnekleri ile karşılaştırmış ve DNA onarım proteinini

kodlayan meme kanseri tip 1 duyarlılık proteini (BRCA1) geninin promotörünün AH beyinde hipometile durumda olduğunu bildirmiştir (216).

DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) bellek işlevleri için çok önemli olarak kabul edilir. DNMT1 ve DNMT3a'nın protein seviyelerinin yaşlı maymunların korteksinde gençlere kıyasla azaldığı görülmüştür (217). Ayrıca, ön beyin nöronlarında DNMT1 ve DNMT3a genlerinin ekspresyonu olmayan fareler, Morris su labirenti testi gibi hipokampus ile ilgili bellek görevinde, genlerden yalnızca birinin ekspresyonundan yoksun olan veya normal yavrulara göre daha kötü performans göstermiştir (218). DNMT enzim aktivitelerinin değiştirilmesinin hastalığın genel seyrini de değiştirebileceği düşünülebilir. Oliveira ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada DNMT3a'nın ekspresyonun arttırılmasının genel metilasyonu artırdığını ve hafızayı geliştirdiği görülmüştür (219).

Histon Modifikasyonlarının Alzheimer Hastalığında Etkileri

Histon modifikasyonları, MSS'nin gelişimi, travma sonrası stres bozuklukları, hafıza oluşumu ve bağımlılık gibi geniş nörobiyolojik süreçlerde yer almıştır. Nöronal farklılaşma, kolin asetiltransferaz aktivitesinin düzenlenmesi, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) transkripsiyonu, mikrogial apoptoz gibi spesifik fizyolojik süreçlerde yer alır (220-222).

Histon hipoasetilasyonun zararlı etkilerini tersine çevirebilecek olan HDAC inhibitörleri, AH tedavisi için en çok çalışılan bileşiklerdendir ve bazı umut verici sonuçlar da göstermiştir. Kapsamlı bir şekilde incelenen HDAC inhibitörleri arasında sodyum 4-fenilbütirat, vorinostat ve valproik asit bulunur (223). Sodyum 4-fenilbütirat, AH'nın transgenik bir fare modelinde A β seviyesini düşürerek, biriken A β 'yı temizleyerek ve Tau hiperfosforilasyonunu azaltarak hafıza ve öğrenme işlevini geliştirmiştir. Bu ilaçların Tau hiperfosforilasyonunu ve A β plak birikimini etkilediği bilinmektedir. Valproik asit, hem hücre kültürü çalışmalarında hem de AH'nin transgenik hayvan modelinde A β plak birikimini azaltma potansiyeli göstermiştir (225). Transgenik fareler, valproik asit -tedavisinden sonra azalmış bir A β yükü sergilemiştir (226). Vorinostat üzerinde yürütülen birkaç çalışma, H4K12 asetilasyonunu artırma ve öğrenme ve hafıza oluşumu sırasında indüklenen genleri restore etme potansiyelini göstermiştir (227) Ayrıca birkaç AH fare modeline, sodyum

bütirat, trikostatın A ve valproik asit gibi HDAC inhibitörleri uygulanmış ve bazıları düşük A β seviyelerinden azalma ve sonuçta öğrenme ve hafızada iyileşmeler gözlenmiştir (228). AH transgenik farelerden alınan mikroglia da azaltılan HDAC1/2 ekspresyonu, amiloid yükünü azaltarak bilişsel işlevi iyileştirmiştir (229).

Yapılan bazı çalışmalar, histon asetilasyon artışlarının da nörotoksisite ile bağlantılı olabileceğini göstermiştir. Histon homeostazının düzensizliğinin, insan beyni hipokampusu ve kan örneklerinde AH patogeneğinde rol oynadığı gösterilmiştir (230,231). AH'de histon modifikasyonları ile ilgili bazı çalışmalar da bildirilmiştir. Örneğin, Alzheimer hastalarının beyinlerinde H3K18ac ve H3K23ac'de bir azalma tespit edilmiştir. Potansiyel olarak ilgili diğer modifikasyonlar, yaşlanma ve AH ile ilişkili olan H3K27me3 ve H3K4me3 modifikasyonlarıdır (232,233).

2.5. SH-SY5Y Hücre Hattı

Bir kez terminal olarak olgun nöronlara farklılaşan hücreler artık çoğaltılamadığından, embriyonik MSS dokusundan türetilmiş primer memeli nöronlarının kullanımı sınırlıdır. Dönüştürülmüş nöron-benzeri hücre hatları, bu sınırlamanın üstesinden gelmek için *in vitro* olarak kullanılabilir. SH-SY5Y hücreleri, 4 yaşında kız çocuktan alınan, kemik iliği dokusundan elde edilmiş epitelyal morfolojide nöroblastoma hücreleridir. Hem adheren, hem de süspanse hücreleri içerir. Orijinal olarak bir metastatik kemik tümörü biyopsisinden türetilmiş, SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) hücreleri, ana SK-N-SH (ATCC® HTB-11™) soyunun bir alt hücre hattıdır. SK-N-SH, önce SH-SY'ye, daha sonra SH-SY5'e ve son olarak SH-SY5Y'ye üç kez alt klonlanmıştır. SH SY5Y hücre hattı, 1970 yılında June L. Biedler tarafından Amerikan Tipi Hücre Koleksiyonu (ATCC)'ye verilmiştir (234).

SH-SY5Y hücre hattının başlangıç karakterizasyonunda, orta düzeyde dopamin- β -hidroksilaz aktivitesi ve daha düşük düzeylerde kolin asetil-transferaz, asetilkolin esterase ve butirilkolin esterase aktivitesi belirlenmiş; ayrıca bazal noradrenalin salınımı ve bazal tirozin hidroksilaz aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. Tirozin hidroksilaz, katekolamin sentez yolunun hız sınırlayan enzimidir ve tirozini, daha sonra dopamin- β -hidroksilaz tarafından noradrenaline dönüştürülecek olan dopamin öncüsü 1-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA)'ya dönüştürür. SH-SY5Y

hücre hattı hem dopamin hem de noradrenalin sentezleme mekanizmalarına sahip olduğundan, katekolaminerjik fenotip gösterebileceği belirtilmiştir (235).

2.5.1. Alzheimer Hastalığı ve SH-SY5Y Hücre Hattı

Sinirbilim alanındaki pek çok çalışmada, insan proteinlerini eksprese eden işlevsel olarak olgun nöronlara benzeyen ilgili *in vitro* modellerin kullanılmasında zorluklarla karşılaşmaktadır. Yaygın olarak kullanılan hücre modelleri, patolojide yer alan aksonları, sinapsları ve insan proteinlerini (örneğin, kemirgenlerden birincil nöronlar) içermediği için, özellikle AH gibi hastalıkların araştırılmasında yetersiz kalmaktadır. Fonksiyonel ve girişimsel çalışmalar için canlı, yetişkin insan nöronları hazır halde bulunmadığından, alternatif olarak farklı ölümsüzleştirilmiş hücre hatları kullanılır. Bununla birlikte, sıklıkla kullanılan nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y dahil olmak üzere bu hücre hatlarının, nöronal morfoloji ve nörona özgü markörlerin ekspresyonu gibi nöronları tanımlayan özelliklerden yana eksikleri olduğu da bilinmektedir. Böyle durumlarda, çalışma profiline daha uygun hale getirilmesi için hücre hatlarının farklılaştırılması mümkündür. SH-SY5Y hücrelerinin de yapılacak uygulamaya bağlı olarak birkaç farklı fenotipe farklılaştırılabildiği bilinmektedir. Yaygın olarak kullanılan farklılaştırma ajanları arasında forbol esterleri, retinoik asit (RA), BDNF, sinir büyüme faktörü (NGF) ve nörogulinler gibi büyüme faktörleri bulunur (236-238). Kullanılan farklılaştırma ajanları, nöronal farklılaşmaya doğru belirli bir eğilime neden olur; ancak, hiçbiri morfoloji ve olgun nöron markörleri gibi nöron özelliklerini tam olarak sağlayamaz. İşlevsel olarak olgun nöronlar oluşturmak için birkaç uyarıcının kombinasyonunun kullanılabileceği de bir yaklaşım olarak düşünülmektedir (239).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Sigma-Aldrich
Amiloid Beta 1-40 ELISA Kiti	Elabscience
Amiloid Beta 1-42 Peptit	Cayman
Amiloid Prekürsör Protein ELISA Kiti	Elabscience
Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF)	Sigma-Aldrich
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Duchefa Biochemical
DNA İzolasyon Kiti (Quick-DNA™ Miniprep Kit)	Zymo Research
Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Salini (DPBS)	Biowest
Dulbecco'nun Modified Eagle Besiyeri (DMEM)-Ham's F12 w/L-Glutamin w/15 mM HEPES	Biowest
Etanol	Merck
Florometrik Hücre İçi ROS Kiti	Sigma-Aldrich
Fötal Sığır Serumı (FBS)	Biowest
Global DNA Metilasyon Kiti	Cayman
Herpes Simpleks Virüs Rekombinant Glikoprotein B	Elabscience
Histon Deasetilaz 6 Aktivite Tayin Kiti	Mybiosource
Histon Deasetilaz 8 Aktivite Tayin Kiti	Mybiosource
Histon H3 Asetilasyon Kiti	Epigentek
Histon H3 Multipleks Modifikasyon Kiti	Epigentek
Histon H4 Asetilasyon Kiti	Epigentek

Histon H4 Multipleks Modifikasyon Kiti	Epigentek
Histon İzolasyon Kiti	Epigentek
İnsan Kompleman Proteini C1q ELISA Kiti	BT-Lab
İnsan Kompleman Proteini C3 ELISA Kiti	BT-Lab
İnsan Kompleman Proteini C6 ELISA Kiti	BT-Lab
İnsan Kompleman Proteini C9 ELISA Kiti	BT-Lab
İnterlökin-10 ELISA Kiti	BT-Lab
İnterlökin-1 α ELISA Kiti	BT-Lab
İnterlökin-6 ELISA Kiti	BT-Lab
Penisilin-Streptomisin	Biowest
Protein Miktar Tayini kiti (BCA kiti)	Sigma – Aldrich
Retinoik Asit	Cayman
SH-SY5Y Hücre Hattı	ATCC
Tau Proteini ELISA Kiti	Elabscience
Transforme Edici Büyüme Faktörü- β 1 (TGF- β 1) ELISA Kiti	Elabscience
Tripsin-EDTA	Sigma – Aldrich
Tümör Nekroz Faktörü- α (TNF- α) ELISA Kiti	BT-Lab

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

96 kuyucuklu plak	Greiner Bio-One
Biyogüvenlik kabini	Holten, LaminAir Model
Buz makinası	Scotsman AF100
Buzdolabı	Arçelik, 2 kapılı

Çok kanallı mikropipet (150-1200 µl)	Finpipette
Deiyonize su cihazı	Barnstead
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik, Tek kapılı
Derin dondurucu (-80°C)	Revco, Legaci
Distile su cihazı	MES, mes08/Thermo Scientific,
Etüv	Dedeoğlu
Hassas Terazı	Mettler Toledo, XS105
Hücre Kültürü Uyumlu Flask (75 cm ²)	Corning, Isolab
Işık mikroskopu	Leica DM 6000, Leica TP1020
İnkübatör	Heraeus Instruments Funvtion Line
Kriyo Tüp	Greiner Bio-One
Lamel	Isolab
Mikro Santrifüj	Heraeus, Hettich, Mikro22
Mikropipet (10 – 100 µl, 100–1000 µl, 1–5 ml)	Eppendorf, Finnpiptette, Labsystems
Nanodrop	Maestrogen Spectrophotometer
Neubauer Lamı (Hücre sayım lamı)	Marienfeld
Otoklav	Nüve NC40M
pH Metre	Isolab
Pipet ucu (0,5–10, 10–200 µl, 100– 000 µl'lik)	Eppendorf, Top-Line
Santrifüj	Heraeus, Hettich, Rotofix 32A

Spektrofotometre / Spektroflorometre	Molecular Devices, SpektraMax M2
Steril santrfüj tüpleri	Greiner Bio-One
Steril perolojik pipetler (5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One
Su banyosu	Memmert
Ultrasonik banyo	Transsonic 460/H
Vorteks	LMS, Mixer Uzusio VTX- 3000L

3.3. Kullanılan Hücre Hattı

SH-SY5Y hücre hattı, 4 yaşındaki bir kız çocuğundan alınan, kemik iliği dokusundan elde edilmiş epitelyal morfolojide nöroblastoma hücreleridir. Hem adheren hem de süspande hücreleri içerir. Orijinal olarak bir metastatik kemik tümörü biyopsisinden türetilmiş, SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) hücreleri, ana SK-N-SH (ATCC® HTB-11™) soyunun üçüncü alt klonudur (SK-N-SH>SH-SY>SHSY5>SH-SY5Y).

3.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

3.4.1. Dozlama ve Modellerin Oluşturulmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

HSV-gB (Stok çözelti: 190,5 pg/ml): Rekombinant HSV-1 gB üretici firmadan liyofilize toz halinde alınmıştır (Katolog numarası: E-PP-1341). Liyofilize toz PBS içerisinde 1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır ve bu stok çözelti alikotlanarak -80°C’de saklanmıştır. Besiyeri içerisinde nihai konsantrasyon 190,5 pg/ml olacak şekilde HSV-gB çözeltisi hazırlanmıştır.

Amiloid Beta 1-40 Agregatları (Stok çözelti: 350 µM): Aβ₁₋₄₀ peptidi (Katolog numarası: 20574) 100 µl DMSO içerisinde çözülüp daha sonra 350 µM stok

çözelti elde etmek için PBS ile seyreltilmiştir. Stok solüsyon 37°C'de 3 gün inkübe edilip ve her gün A β agregatlarının oluşumunu kolaylaştırmak için pipetleme yoluyla karıştırılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda agregatları içeren solüsyon alikotlanarak -80°C'de kullanıma hazır şekilde saklanmıştır.

Retinoik Asit (Stok çözelti: 5000 μ M): 1,5 mg retinoik asit (Katolog numarası: 11017) 1 ml etanolde çözülerek 5000 μ M'lık stok çözelti elde edilmiştir. Bu stok çözelti hücre besiyerine eklenerek istenilen konsantrasyonda hazırlanmıştır. Stok çözelti her kullanımda taze olarak hazırlanmalıdır ve karanlıkta muhafaza edilmelidir.

Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (Stok çözelti 5 μ g/ml): Vial içerisindeki 5 μ g BDNF (Katolog numarası: B3795) 1 ml PBS içerisinde çözüldü 5 μ g/ml konsantrasyondaki stok palikotlanarak -80°C'de kullanıma hazır şekilde saklanmıştır.

3.4.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

Hücrelerin büyütülmesi için kültür ortamında %10 (h/h) FBS ve %1 (h/h) penisilin/streptomisin eklenmiş; DMEM-Ham's F12 w/L-glutamin w/15 mM HEPES kullanılmıştır. Besiyeri 500 ml'lik DMEM-Ham's F12 w/L-Glutamin w/15 mM HEPES içeren şişe içerisine %10 (h/h) olacak şekilde 55 ml FBS ve %1 olacak şekilde 5,6 ml penisilin/streptomisin eklenerek hazırlanmış ve +4°C'de saklanmıştır.

3.4.3. Farklılaştırma Besiyerinin Hazırlanması

Alzheimer modelinin oluşturulması için %1 (h/h) FBS, %1 (h/h) penisilin/streptomisin ve 10 μ M RA eklenmiş DMEM-Ham's F12 w/L-glutamin w/15 mM HEPES kullanılmıştır. Hazırlamak için 50 ml'lik falkon tüp içerisinde alınmış; 49 ml DMEM-Ham's F12 w/L-Glutamin w/15 mM HEPES içerisine %1 (h/h) olacak şekilde 0,5 ml FBS ve 0,5 ml penisilin/streptomisin eklenmiştir. En son 5000 μ M'lık RA stok çözeltisinden 100 μ l eklenerek hazır hale getirilmiştir. RA ışıkla oksitleneceği için RA'nın hazırlanması ve eklenmesini takiben tüm işlemler karanlıkta yapılmıştır. Modelin dördüncü gününde eklenen besiyerinde ise hazırlanan bu farklılaştırma besiyerine son konsantrasyon 2,5 ng/ml olacak şekilde BDNF eklenmiştir. Bu çözeltinin hazırlanması için de 5 μ g/ml konsantrasyondaki stok çözeltiden 25 μ l karışıma eklenmiştir.

3.4.4. Sitotoksisite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Dimetil Sülfoksit: Oda sıcaklığında sıvı halde bulunan 1,1 g/ml yoğunluğa sahip uçucu bir bileşiktir. Kullanıma hazır şekildedir.

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum Bromür (MTT) Çözeltisi: 15 mg 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür tartılarak, 3 ml DPBS içerisinde çözünür ve 27 ml besiyeri ile 30 ml'ye tamamlanır. Bu şekilde 0,5 mg/ml konsantrasyonda MTT çözeltisi hazırlanmış olur. Hazırlanan çözelti karanlıkta saklanmalıdır ve 24 saat boyunca dayanıklıdır.

3.4.5. Hücre İçi ROS Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

ROS Tayin Reaktifi: Reaktifi oluşturmak için vial içerisine 40 µl DMSO eklenir. Pipetlenerek iyice karıştırılır. Çözelti -20°C'de saklandığında 1 ay dayanıklıdır.

Dimetil Sülfoksit: Kit 0,2 ml DMSO içermektedir. Reaktif tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır.

Deney Tamponu: Kit 20 ml deney tamponu içermektedir. -20°C'de saklandığında 1 ay dayanıklıdır.

Master Reaksiyon Karışımı: Hazırlanan ROS tayin reaktifinden 20 µl alınır ve üzerine 10 ml deney tamponu eklenir. Oda sıcaklığında 2 saat içinde kullanılmalıdır.

3.4.6. Amiloid Beta 1-42 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: Kit içerisinde konsantre halde bulunan 30 ml yıkama çözeltisi distile su ile 750 ml'ye tamamlanır. Çözelti içindeki kristallerin su banyosunda 40 °C'de çözünmesi sağlanır ve oda sıcaklığına geldikten sonra kullanılır.

Standart/Numune Seyreltici Çözelti: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Standart Çözelti: Kit içerisinde liyofilize halde bulunmaktadır. Kullanmadan önce vial 1 dakika boyunca 10000 devir/dakika santrifüj edilir. Ardından, vial içeriği 1 ml standart/numune seyreltici çözelti ile çözülür. Çözünmesi için 10 dakika boyunca birkaç defa alt üst edilerek bekletilir. Bu çözelti 1000 pg/ml konsantrasyonda standart içerir. Hazırlanan bu çözeltiden hareketle 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63 pg/ml'lik konsantrasyonda standart çözeltiler taze olarak hazırlanır.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, biyotinlenmiş deteksiyon seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır. Vial içeriği kullanılmadan önce 30 saniye 6000 devir/dakika santrifüj edilmelidir.

Yaban turpu peroksidaz (HRP) Konjugat Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

HRP Konjugat Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, HRP konjugat seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır.

Substrat Reaktif: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.4.7. Tau Proteini Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: Kit içerisinde konsantre halde bulunan 30 ml yıkama çözeltisi distile su ile 750 ml'ye tamamlanır. Çözelti içindeki kristallerin su banyosunda 40 °C'de çözünmesi sağlanır ve oda sıcaklığına geldikten sonra kullanılır.

Standart/Numune Seyreltici Çözelti: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Standart Çözelti: Kit içerisinde liyofilize halde bulunmaktadır. Kullanmadan önce vial 1 dakika 10000 devir/dakika santrifüj edilir. Ardından vial içeriği 1 ml Standart/Numune seyreltici çözelti ile çözülür. Çözünmesi için 10 dakika boyunca birkaç defa alt üst edilerek bekletilir. Bu çözelti 1000 pg/ml konsantrasyonda standart içerir. Hazırlanan bu çözeltden hareketle 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,81 pg/ml'lik konsantrasyonda standart çözeltiler taze olarak hazırlanır.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, biyotinlenmiş deteksiyon seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır. Vial içeriği kullanılmadan önce 30 saniye 6000 devir/dakika santrifüj edilmelidir.

HRP Konjugat Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

HRP Konjugat Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, HRP konjugat seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır.

Substrat Reaktifi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.4.8. Amiloid Öncü Proteini Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: Kit içerisinde konsantre halde bulunan 30 ml yıkama çözeltisi distile su ile 750 ml'ye tamamlanır. Çözelti içindeki kristallerin su banyosunda 40°C'de çözünmesi sağlanır ve oda sıcaklığına geldikten sonra kullanılır.

Standart/Numune Seyreltici Çözelti: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Standart Çözelti: Kit içerisinde liyofilize halde bulunmaktadır. Kullanmadan önce vial 1 daika boyunca 10000 devir/dakika santrifüj edilir. Ardından vial içeriği 1 ml Standart/Numune seyreltici çözelti ile çözülür. Çözünmesi için 10 dakika boyunca birkaç defa alt üst edilerek bekletilir. Bu çözelti 1000 pg/ml konsantrasyonda standart içerir. Hazırlanan bu çözeltiden hareketle 2500, 1250, 625, 312,5, 156,3, 78,1 pg/ml'lik konsantrasyonda standart çözeltiler taze olarak hazırlanır.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, biyotinlenmiş deteksiyon seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır. Vial içeriği kullanılmadan önce 30 saniye 6000 devir/dakika santrifüj edilmelidir.

HRP Konjugat Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

HRP Konjugat Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, HRP konjugat seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır.

Substrat Reaktifi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.4.9. Kompleman Protein C1q Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: 20 ml konsantre halde (25X) bulunan yıkama çözeltisi 500 ml'ye distile su ile tamamlanarak 1X konsantrasyonda çözelti elde edilir. Konsantre haldeki çözeltide kristaller oluşmuşsa kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırılır.

Standart/Numune Seyreltici Çözelti: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Standart Çözelti: Kit içerisinde çözelti halinde 32 mg/ml konsantrasyonda stok standart çözeltisi bulunmaktadır. Stok çözeltiden hareketle 16, 8, 4, 2 ve 1 mg/ml konsantrasyonda standart çözeltiler standart/numune seyreltici çözelti ile seyreltilerek hazırlanır.

Biyotinlenmiş İnsan C1q Antikoru: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Streptavidin-HRP Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Substrat Reaktifi A: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Substrat Reaktifi B: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.4.10. Kompleman Protein C3 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: 20 ml konsantre halde (25X) bulunan yıkama çözeltisi 500 ml'ye distile su ile tamamlanarak 1X konsantrasyonda çözelti elde edilir. Konsantre haldeki çözeltide kristaller oluşmuşsa kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırılır.

Standart/Numune Seyreltici Çözelti: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Standart Çözelti: Kit içerisinde çözelti halinde 32 mg/ml konsantrasyonda stok standart çözeltisi bulunmaktadır. Stok çözeltiden hareketle 16, 8, 4, 2 ve 1 mg/ml konsantrasyonda standart çözeltiler standart/numune seyreltici çözelti ile seyreltilerek hazırlanır.

Biyotinlenmiş İnsan C3 Antikoru: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Streptavidin-HRP Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Substrat Reaktifi A: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Substrat Reaktifi B: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.4.11. Kompleman Protein C6 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: 20 ml konsantre halde (25X) bulunan yıkama çözeltisi 500 ml'ye distile su ile tamamlanarak 1X konsantrasyonda çözelti elde edilir. Konsantre haldeki çözeltide kristaller oluşmuşsa kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırılır.

Standart/Numune Seyreltici Çözelti: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Standart Çözelti: Kit içerisinde çözelti halinde 9600 µg/ml konsantrasyonda stok standart çözeltisi bulunmaktadır. Stok çözeltiden hareketle 4800, 2400, 1200, 600 ve 300 µg/ml konsantrasyonda standart çözeltiler standart/numune seyreltici çözelti ile seyreltilerek hazırlanır.

Biyotinlenmiş İnsan C6 Antikoru: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Streptavidin-HRP Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Substrat Reaktifi A: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Substrat Reaktifi B: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.4.12. Kompleman Protein C9 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: 20 ml konsantre halde (25X) bulunan yıkama çözeltisi 500 ml'ye distile su ile tamamlanarak 1X konsantrasyonda çözelti elde edilir. Konsantre haldeki çözeltide kristaller oluşmuşsa kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırılır.

Standart/Numune Seyreltici Çözelti: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Standart Çözelti: Kit içerisinde çözelti halinde 9600 µg/ml konsantrasyonda stok standart çözeltisi bulunmaktadır. Stok çözeltiden hareketle 4800, 2400, 1200, 600 ve 300 µg/ml konsantrasyonda standart çözeltiler standart/numune seyreltici çözelti ile seyreltilerek hazırlanır.

Biyotinlenmiş İnsan C9 Antikoru: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Streptavidin-HRP Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Substrat Reaktifi A: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Substrat Reaktifi B: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.4.13. İnterlökin-1 α (IL-1 α) Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: 20 ml konsantre halde (25X) bulunan yıkama çözeltisi 500 ml'ye distile su ile tamamlanarak 1X konsantrasyonda çözelti elde edilir. Konsantre haldeki çözeltide kristaller oluşmuşsa kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırılır.

Standart/Numune Seyreltici Çözelti: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Standart Çözelti: Kit içerisinde çözelti halinde 480 pg/ml konsantrasyonda stok standart çözeltisi bulunmaktadır. Stok çözeltiden hareketle 240, 120, 60, 30 ve 15 pg/ml konsantrasyonda standart çözeltiler standart/numune seyreltici çözelti ile seyreltilerek hazırlanır.

Biyotinlenmiş İnsan IL-1 α Antikoru: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Streptavidin-HRP Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Substrat Reaktifi A: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Substrat Reaktifi B: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.4.14. İnterlökin-6 (IL-6) Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: 20 ml konsantre halde (25X) bulunan yıkama çözeltisi 500 ml'ye distile su ile tamamlanarak 1X konsantrasyonda çözelti elde edilir. Konsantre haldeki çözeltide kristaller oluşmuşsa kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırılır.

Standart/Numune Seyreltici Çözelti: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Standart Çözelti: Kit içerisinde çözelti halinde 640 ng/ml konsantrasyonda stok standart çözeltisi bulunmaktadır. Stok çözeltiden hareketle 320, 160, 80, 40 ve 20

ng/ml konsantrasyonda standart çözeltiler standart/numune seyreltici çözelti ile seyreltilerek hazırlanır.

Biyotinlenmiş İnsan IL-6 Antikoru: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Streptavidin-HRP Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Substrat Reaktifi A: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Substrat Reaktifi B: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.4.15. İnterlökin-10 (IL-10) Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: 20 ml konsantre halde (25X) bulunan yıkama çözeltisi 500 ml'ye distile su ile tamamlanarak 1X konsantrasyonda çözelti elde edilir. Konsantre haldeki çözeltide kristaller oluşmuşsa kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırılır.

Standart/Numune Seyreltici Çözelti: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Standart Çözelti: Kit içerisinde çözelti halinde 1600 pg/ml konsantrasyonda stok standart çözeltisi bulunmaktadır. Stok çözeltiden hareketle 800, 400, 200, 100 ve 50 pg/ml konsantrasyonda standart çözeltiler standart/numune seyreltici çözelti ile seyreltilerek hazırlanır.

Biyotinlenmiş İnsan IL-10 Antikoru: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Streptavidin-HRP Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Substrat Reaktifi A: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Substrat Reaktifi B: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.4.16. Tümör Nekroz Faktörü-Alfa (TNF- α) Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: 20 ml konsantre halde (25X) bulunan yıkama çözeltisi 500 ml'ye distile su ile tamamlanarak 1X konsantrasyonda çözelti elde edilir. Konsantre haldeki çözeltide kristaller oluşmuşsa kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırılır.

Standart/Numune Seyreltici Çözelti: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Standart Çözelti: Kit içerisinde çözelti halinde 960 ng/ml konsantrasyonda stok standart çözeltisi bulunmaktadır. Stok çözeltiden hareketle 480, 240, 120, 60 ve 30 ng/ml konsantrasyonda standart çözeltiler standart/numune seyreltici çözelti ile seyreltilerek hazırlanır.

Biyotinlenmiş İnsan TNF- α Antikoru: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Streptavidin-HRP Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Substrat Reaktifi A: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Substrat Reaktifi B: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.4.17. Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta 1 (TGF- β 1) Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: Kit içerisinde konsantre halde bulunan 30 ml yıkama çözeltisi distile su ile 750 ml'ye tamamlanır. Çözelti içindeki kristallerin su banyosunda 40 °C'de çözünmesi sağlanır ve oda sıcaklığına geldikten sonra kullanılır.

Standart/Numune Seyreltici Çözelti: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Standart Çözelti: Kit içerisinde liyofilize halde bulunmaktadır. Kullanmadan önce vial 1 dak 10000 devir/dakika santrifüj edilir. Ardından vial içeriği 1 ml Standart/Numune seyreltici çözelti ile çözülür. Çözünmesi için 10 dakika boyunca birkaç defa alt üst edilerek bekletilir. Bu çözelti 40 ng/ml konsantrasyonda standart içerir. Hazırlanan bu çözeltiden hareketle 20, 10, 5, 2,5, 1,25 ve 0,63 ng/ml'lik konsantrasyonda standart çözeltiler taze olarak hazırlanır.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, biyotinlenmiş deteksiyon seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır. Vial içeriği kullanılmadan önce 30 saniye 6000 devir/dakika santrifüj edilmelidir.

HRP Konjugat Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

HRP Konjugat Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, HRP konjugat seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır.

Substrat Reaktif: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.4.18. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

Genomik Lizis Tamponu: Kit içerisinde 50 ml çözelti bulunmaktadır. Reaktif tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır. Oda sıcaklığında saklanabilir.

DNA Ön Yıkama Tamponu: Kit içerisinde 15 ml çözelti bulunmaktadır. Reaktif tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır. Oda sıcaklığında saklanabilir.

g-DNA Yıkama Tamponu: Kit içerisinde 50 ml çözelti bulunmaktadır. Reaktif tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır. Oda sıcaklığında saklanabilir.

DNA Elüsyon Tamponu: Kit içerisinde 10 ml çözelti bulunmaktadır. Reaktif tedarik edildiği şekilde kullanıma hazırdır. Oda sıcaklığında saklanabilir.

3.4.19. Global DNA Metilasyonu Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

ELISA Tamponu: Kit içerisinde bulunan konsantre haldeki (10X) 10 ml ELISA tamponu çözeltisi 100 ml'ye distile su ile tamamlanarak 1X konsantrasyonda tampon çözeltisi hazırlanır.

Yıkama Çözeltisi: 5 ml konsantre halde (400X) bulunan yıkama çözeltisi üzerine 1 ml polisorb 20 eklenir ve 2 L'ye distile su ile tamamlanarak 1X konsantrasyonda çözelti elde edilir.

Standart Çözeltiler: 1,5 µg/ml konsantrasyondaki stok standart çözeltiyi hazırlamak için kit içerisinde bulunan 15 µg/ml konsantrasyondaki 5-metil-2-deoksisitidin çözeltisinden temiz bir tüpe 100 µl alınarak 900 µl distile su ile seyreltilir. Hazırlanan bu çözelti 4°C'de 6 hafta boyunca dayanıklıdır. Hazırlanan bu stok çözeltiden hareketle 150, 75, 37,5, 18,75, 9,38, 4,69, 2,34 ve 1,17 ng/ml konsantrasyonda standart çözeltiler ELISA tamponu ile seyreltilerek hazırlanır.

AkE Tracer Çözeltisi: Viale 6 ml ELISA tampon çözeltisi eklenerek hazır hale getirilir.

ELISA Monoklonal Antikor Çözeltisi: Viale 6 ml ELISA tampon çözeltisi eklenerek hazır hale getirilir.

Ellman Reaktifi: Viale 20 ml distile su eklenerek hazır hale getirilir. Kullanılmadan hemen önce hazırlanmalıdır.

3.4.20. Histon İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

Pre-Lizis Tamponu: Kit içerisinde bulunan 10X konsantrasyondaki pre-lizis tamponu distile su ile 1:10 oranında seyreltilerek 1X konsantrasyonda dilüe pre-lizis tamponu hazırlanır.

Lizis Tamponu: Kit içerisinde kullanıma hazırdır.

Denge-Dithiothreitol (DTT) Tamponu: Tampon kit içerisinde bulunan DTT solüsyonu ve denge tamponu 1:500 oranında karıştırılarak hazırlanır.

3.4.21. Histon H3 Asetilasyonu Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi (GF3 Çözeltisi): 10X konsantrasyondaki konsantre yıkama çözeltisi distile su ile 1:10 oranında seyreltilerek hazırlanır. Çözeltinin pH'sı 7,2-7,5 arasına ayarlanmalıdır.

Histon Tamponu (GF4 Çözeltisi): Kit içerisinde kullanıma hazırdır.

Standart Çözeltiler: Kit içerisinde bulunan 60 µg/ml konsantastondaki asetile histon H3 stok çözeltisinden hareketle 30, 15, 7,5, 3,75 ve 1,875 µg/ml konsantrasyonlardaki standart çözeltiler hazırlanır. Standartların seyreltilmesinde histon tamponu (GE4 çözeltisi) kullanılır.

Bloke Tamponu (GF5 Çözeltisi): Kit içerisinde kullanıma hazırdır.

Antikor Seyreltme Çözeltisi (GF6 Çözeltisi): Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Yakalama Antikoru (GF7 Çözeltisi): GE6 Çözeltisi ile 1:100 oranında seyreltilerek kullanılır.

Deteksiyon Antikoru (GF8 Çözeltisi): GE6 Çözeltisi ile 1:1000 oranında seyreltilerek kullanılır.

Substrat Reaktif (GF9 Çözeltisi): Kit içerisinde kullanıma hazırdır.

Durdurma Çözeltisi (GF10 Çözeltisi): Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.4.22. Histon H4 Asetilasyonu Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi (GE3 Çözeltisi): 10X konsantrasyondaki konsantre yıkama çözeltisi distile su ile 1:10 oranında seyreltilerek hazırlanır. Çözeltinin pH'sı 7,2-7,5 arasına ayarlanmalıdır.

Histon Tamponu (GE4 Çözeltisi): Kit içerisinde kullanıma hazırdır.

Standart Çözeltiler: Kit içerisinde bulunan 60 µg/ml konsantastondaki asetile histon H4 stok çözeltisinden hareketle 30, 15, 7,5, 3,75 ve 1,875 µg/ml konsantrasyonlardaki standart çözeltiler hazırlanır. Standartların seyreltilmesinde histon tamponu (GE4 çözeltisi) kullanılır.

Bloke Tamponu (GE5 Çözeltisi): Kit içerisinde kullanıma hazırdır.

Antikor Seyreltme Çözeltisi (GE6 Çözeltisi): Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Yakalama Antikoru (GE7 Çözeltisi): GE6 Çözeltisi ile 1:100 oranında seyreltilerek kullanılır.

Deteksiyon Antikoru (GE8 Çözeltisi): GE6 Çözeltisi ile 1:1000 oranında seyreltilerek kullanılır.

Substrat Reaktif (GE9 Çözeltisi): Kit içerisinde kullanıma hazırdır.

Durdurma Çözeltisi (GE10 Çözeltisi): Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.4.23. Histon H3 Çoklu Modifikasyonlarının Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: 1X konsantrasyonda dilüe yıkama çözeltisi hazırlamak için 234 ml distile su üzerine kit içerisinde bulunan 10X konsantrasyondaki yıkama çözeltisinden 26 ml eklenir ve karıştırılır. Seyreltilmiş yıkama çözeltisi +4°C’de 6 ay saklanabilir.

Deteksiyon Antikoru: Kit içerisinde konsantre halde bulunan deteksiyon antikoru dilüe yıkama çözzeltisi (1X) 1:1000 oranında seyreltilerek hazırlanır.

Deney Kontrol Protein Çözeltisi: Kit içerisinde bulunan 100 ng/μl deney kontrol proteini antikor tamponu kullanılarak 5 ve 25 ng/μl olmak üzere iki farklı konsantrasyona seyreltilerek hazırlanır.

Substrat Çözeltisi: Kit içerisinde kullanıma hazırdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içerisinde kullanıma hazırdır.

3.4.24. Histon H4 Çoklu Modifikasyonlarının Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: 1X konsantrasyonda dilüe yıkama çözeltisi hazırlamak için 234 ml distile su üzerine kit içerisinde bulunan 10X konsantrasyondaki yıkama çözeltisinden 26 ml eklenir ve karıştırılır. Seyreltilmiş yıkama çözeltisi +4°C’de 6 ay saklanabilir.

Deteksiyon Antikoru: Kit içerisinde konsantre halde bulunan deteksiyon antikoru dilüe yıkama çözzeltisi (1X) 1:1000 oranında seyreltilerek hazırlanır.

Deney Kontrol Protein Çözeltisi: Kit içerisinde bulunan 100 ng/μl deney kontrol proteini antikor tamponu kullanılarak 5 ve 25 ng/μl olmak üzere iki farklı konsantrasyona seyreltilerek hazırlanır.

Substrat Çözeltisi: Kit içerisinde kullanıma hazırdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içerisinde kullanıma hazırdır.

3.4.25. Histon Deasetilaz 3 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: Kit içerisinde konsantre halde bulunmaktadır. Çözelti içerisinde kristaller oluşmuşsa, 40°C su banyosunda ısıtılabilir (ısıtma sıcaklığı 50°C'yi geçmemelidir) ve kristaller tamamen eriyene kadar yavaşça karıştırılabilir. 30 ml konsantre yıkama çözeltisi distile su ile 750 ml'ye seyreltilerek kullanılır.

Standart/Numune Seyreltici Çözelti: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Standart Çözelti: Kit içerisinde liyofilize halde bulunmaktadır. Kullanmadan önce vial 1 dak 10000 devir/dakika santrifüj edilir. Ardından, vial içeriği 1 ml Standart/Numune seyreltici çözelti ile çözülür. Çözünmesi için 10 dakika boyunca birkaç defa alt üst edilerek bekletilir. Bu çözelti 20 ng/ml konsantrasyonda standart içerir. Hazırlanan bu çözeltiden hareketle 10, 5, 2,5, 1,25, 0,75, 0,375 ng/ml'lik konsantrasyonda standart çözeltiler taze olarak hazırlanır.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Biyotinlenmiş Deteksiyon Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, biyotinlenmiş deteksiyon seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır. Vial içeriği kullanılmadan önce 30 saniye 6000 devir/dakika santrifüj edilmelidir.

HRP Konjugat Seyreltme Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

HRP Konjugat Çalışma Çözeltisi: Kit içinde 100 kat konsantre halde bulunan çözelti, HRP konjugat seyreltme çözeltisi ile 1/100 oranında seyreltilerek kullanılır.

Substrat Reaktifi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur. Işıktan korunmalıdır.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.4.26. Histon Deasetilaz 8 Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

Yıkama Çözeltisi: Kit içinde konsantre halde (20X) bulunan yıkama çözeltisi 1X konsantrasyona (1:20 seyreltme) distile su ile seyreltilerek kullanılır.

Standart Çözeltiler: 100, 50, 25, 12,5, 6,25 ve 3,12 ng/ml konsantrasyondaki histon deasetilaz 8 standart çözeltileri kit içerisinde kullanıma hazırdır.

Numune Seyreltici Çözelti: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

HRP-Konjugat Reaktifi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Kromojen Solüsyonu A: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Kromojen Solüsyonu B: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

Durdurma Çözeltisi: Kit içinde kullanıma hazır halde bulunur.

3.4.27. Protein Miktar Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

Bakır Reaktifi: 10 mg Bakır (II) sülfat (CuSO_4) ve 20 mg sodyum/potasyum (Na/K) tartarat ayrı ayrı 1'er ml distile suda çözülür. 2 g sodyum karbonat (Na_2CO_3) 20 ml 0,5 M sodyum hidroksit (NaOH) içerisinde çözülür. 0,2'şer ml CuSO_4 ve Na/K Tartarat, 10 mL Na_2CO_3 birleştirilerek bakır reaktifi oluşturulur.

Folin Fenol Reaktifi: Folin fenol çözeltisinin distile su ile 1:10 oranında seyreltilmesi ile hazırlanır. Fölin fenol çözeltisinden 1 mL alınıp distile su ile 10 ml'ye tamamlanır.

Standart Çözeltiler: Toz haldeki sığır serum albümininden 1000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda çözelti deiyonize su içerisinde hazırlanır. Stok çözeltiden hareketle 500, 250, 125, 62,5 ve 31,25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanır.

3.5. Deneysel İşlemler ve Yöntemler

3.5.1. Hücre Kültürü

Çalışmada insan nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y kullanılmıştır. Hücreler %15 (h/h) FBS ve %1 penisilin/streptomisin ile desteklenmiş DMEM-Ham's F12 w/L-glutamin w/15 mM HEPES içeren kültür ortamında inkübatörde (37°C ve %5 CO_2)

büyütülmüştür. Hücrelerin besiyeri uygun aralıklarla değiştirilmiş ve hücreler istenen doluluğa (%80) ulaştıklarında pasajlanarak çoğaltılmıştır.

3.5.2. Hücre Dondurma, Çözme ve Pasaj İşlemleri

Hücrelerin Çözülmesi

1. Hücrelerin içerisinde olduğu vial su banyosunda hafifçe yüzdürülerek 37°C'ye getirilir.
2. Steril falkon tüpe yaklaşık 10 ml besiyeri eklenir.
3. Vial içine az miktarda besiyeri eklenerek pipetaj işlemi ile hücreler alınır ve falkon tüpe aktarılır.
4. 1200 devir/dak hızda 5 dak süreyle santrifüj edilir.
5. Flaska 5-6 ml besiyeri konur.
6. Santifüj sonrası elde edilen hücre pelleti 1 ml besiyerinde çözülür ve flaska aktarılır.
7. İnkübatörde (37°C, %5 CO₂) çoğalmaya bırakılır.

Hücrelerin Pasajlanması

1. Uygun büyüklükteki flasklar içinde tutunmuş SH-SY5Y hücrelerinin çoğaltıldığı besiyeri çekilerek, ölü hücreler ve atıklar uzaklaştırılır.
2. Daha sonra flasklara 3 ml tripsin-EDTA çözeltisi eklenir ve flasklar inkübatörde yaklaşık 5 dakika süreyle bekletilir.
3. Hücrelerin tutundukları flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları ışık mikroskobu altında kontrol edilir.
4. Hücre kaldırma işlemi gerçekleştirildikten sonra flasklara eklenen tripsin-EDTA çözeltisinin yaklaşık 2 katı kadar besiyeri eklenerek etkisi sonlandırılır.
5. Bu karışım steril falkon tüplere alınarak 1200 devir/dak hızda 5 dakika süreyle santrifüj edilir.
6. Hücrenin pasajlanacağı yeni flasklara taze besiyeri eklenir.
7. Süpernatant uzaklaştırılarak falkon tüp içerisinde kalan hücre pelleti bir miktar besiyeri ile süspande edilir ve yeni flasklara paylaştırılır.
8. Yaklaşık %80-90 doluluğa ulaşıncaya hücreler yeniden pasajlanır.

Hücrelerin Dondurulması

1. Hücre pelleti elde edilinceye kadar pasajlama işlemindeki basamaklar tekrarlanır.
2. Pellet dondurma vasatı (besiyeri içerisine %10 DMSO eklenerek hazırlanır) ile çözülerek vial içerisine aktarılır.
3. -80°C’de saklanır.

3.5.3. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum Bromür (MTT) Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi

MTT analizi, hücre canlılığı, hücre çoğalması ve sitotoksisitenin değerlendirilmesi, hücre aktivasyonunun ve büyüme faktörleri, sitokinler ve besinlere yanıt olarak hücre proliferasyonunun incelenmesi için hücresel metabolik aktiviteyi ölçen bir yöntemdir. Bu kolorimetrik analiz esas olarak metabolik olarak aktif olan hücreler tarafından sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür’ün mor renkli formazan kristallerine indirgenmesi prensibine dayanır. Canlı hücreler, MTT’yi formazana indirgeyen NADPH’ye bağlı oksidoredüktaz enzimleri içerirler (229). Oluşan mor renkli kristaller DMSO içerisinde çözülür. Çözelti ne kadar koyu renkliyse, canlı, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı o kadar fazladır. Renkli çözeltilerin absorbansı 570 nm’de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Hücre ekimi 96 kuyucuklu plağa 100 µl’de 10000 hücre olacak şekilde yapılır.
2. Hücreler plağa tutunmaları ve çoğalmaları için 24 saat inkübasyona bırakılır.
3. Hücrelerin içinde bulunduğu besiyeri steril şekilde uzaklaştırıldıktan sonra, uygulama maddelerinin çeşitli konsantrasyonlarını içeren ve kontrol olarak hiçbir madde içermeyen yeni besiyerleri eklenerek 24 saat boyunca inkübatörde (37°C, %5 CO₂) bekletilir.
4. İnkübasyon sonunda uygulama çözeltileri steril şekilde uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 100 µl MTT çözeltisi eklenir.
5. MTT çözeltisi ışık ile okside olabileceği için deneyler karanlık ortamda gerçekleştirilir.

6. MTT çözeltisi eklenen plaklar 3 saat inkübe edilir ve sürenin sonunda MTT çözeltisi kuyucuklardan uzaklaştırılır.
7. Her bir kuyucuğa reaksiyon sonucu oluşan mor renkli formazan kristallerini çözmek amacıyla 150 µl DMSO eklenir ve plak çalkalayıcı üzerinde 5-10 dak karıştırılır.
8. Kuyucukların absorbens değerleri 570 nm’de ölçülür.

Hücre Canlılığının Hesaplanması:

Her bir madde için anlamlı bir sonuç dizisi elde edene kadar çeşitli doz aralıklarında MTT analizi yapılır ve belirlenen doz aralıklarında üç tekrar yapılarak ortalama absorbens değerleri belirlenir.

Kontrol olarak kullanılan hücrelere ait absorbens değerleri %100 olarak kabul edilerek bu hücrelerin %100 canlı olduğu varsayılır ve diğer hücrelerin canlılığı kontrole oranlanarak inhibitör konsantrasyon 50 (IC₅₀) ve inhibitör konsantrasyon 20 (IC₂₀) değerleri hesaplanır.

3.5.4. Alzheimer Modellerinin Oluşturulması

Tez kapsamında iki farklı Alzheimer modeli oluşturulmuştur. Uygulamalarda eklenen kimyasallar ve eklendikleri günler Tablo 3.1.'de özetlenmiştir.

1. Model: İlk farklılaştırma protokolü Medeiros ve ark. (2019) yaptıkları modelden uyarlanmıştır ve farklılaştırma RA ve BDNF kullanılarak yapılmıştır (241). Hücreler, 75 cm²'lik flasklara normal kültür besiyeri içerisinde ekilmiş ve flask yüzeyine tam olarak tutunmaları için 24 saat boyunca inkübatörde (37°C, %5 CO₂) bekletilmişlerdir. Hücre ekiminden sonraki ilk gün, ortamdaki FBS oranı %1'e düşürülerek ve 10 µM RA eklenerek farklılaştırma protokolü başlatılmıştır. Hücre besiyeri 3 günde bir değiştirilmiştir ve 4. günden itibaren RA'ya ek olarak besiyeri içerisine 2,5 ng/ml BDNF eklenmiştir. Farklılaşmanın başlatılmasından itibaren sekizinci günde protokol tamamlanmış ve hücre pelletleri ve kültür süpernatantları toplanmıştır.

2. Model: İkinci AH modelinde hastalık sentetik Aβ₁₋₄₂ peptidi kullanılarak simüle edilmiştir. Aβ 1-42 peptidi DMSO içerisinde çözülüp ve ardından 350 µM stok

solüsyonu oluşturmak için PBS ile seyreltilmiştir. Stok solüsyonu 3 gün boyunca 37°C'de inkübe edilmiş ve A β agregatlarının oluşumunu kolaylaştırmak için her gün pipetleme yoluyla karıştırılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda agregatları içeren çözelti alınarak ve kullanıma hazır şekilde -80°C'de saklanmıştır. Modeli oluşturmak için hücrelere 10 μ M konsantrasyonda A β ₁₋₄₂ agregatları uygulanmış ve 2 gün inkübe edilmiştir (242).

Tablo 3.1. Çalışma gruplarına yapılan uygulamalar

Gruplar	1.Gün	4.Gün	6.Gün
Kontrol	Taze DMEM F12 besiyeri (10%FBS)	Taze DMEM F12 besiyeri (10% FBS)	-
HSV	Taze DMEM F12 besiyeri (10% FBS) + HSV gB (190,5 pg/ml)	Taze DMEM F12 besiyeri (10% FBS) + HSV gB (190,5 pg/ml)	-
AD	Taze DMEM F12 besiyeri (%1 FBS) + 10 μ M RA	Taze DMEM F12 besiyeri (1%FBS) + 10 μ M RA + 2.5 ng/ml BDNF	-
ADH	Taze DMEM F12 besiyeri (1%FBS) + 10 μ M RA + HSV gB (190,5 pg/ml)	Taze DMEM F12 besiyeri (1%FBS) + 10 μ M RA + HSV gB (190,5 pg/ml) +2.5 ng/ml BDNF	-
Aβ	Taze DMEM F12 besiyeri (10% FBS)	Taze DMEM F12 besiyeri (10%FBS)	10 μ M A β 1-42 agregatları
AβH	Taze DMEM F12 besiyeri (10% FBS) + HSV gB (190,5 pg/ml)	Taze DMEM F12 besiyeri (10% FBS) + HSV gB (190,5 pg/ml)	10 μ M A β 1-42 agregatları

3.5.5. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışma gruplarına eklenen maddeler ve uygulama günleri Tablo 3.1’de özetlenmiştir. Çalışma grupları:

- Kontrol grubu
- Herpes simpleks virüsü-1 glikoprotein B uygulanan grup (HSV grubu): 190,5 ng/ml konsantrasyonda HSV-gB uygulanmıştır.
- RA+ BDNF uygulanan grup (AD grubu; Alzheimer 1. model): RA: 10 μ M; BDNF: 2,5 ng/ml konsantrasyonlarda uygulanmıştır.
- RA + BDNF + HSV-gB (ADH grubu): RA: 10 μ M; BDNF: 2,5 ng/ml; HSV-gB: 190,5 ng/ml konsantrasyonlarda uygulanmıştır.
- Alzheimer 2. model ($A\beta$ grubu): 10 μ M $A\beta$ 1-42 peptidi uygulanmıştır.
- $A\beta$ + HSV-gB ($A\beta$ H grubu): $A\beta$ 1-42: 10 μ M; HSV-gB: 190,5 ng/ml konsantrasyonlarda uygulanmıştır.

Herpes simpleks virüsü, enfekte olmuş nöronlarda latent kalabilme özelliğinden dolayı ömür boyu enfeksiyonlara neden olur (243). Bu tez çalışmasında HSV-1’in zaman zaman alevlenen kronik etkisini taklit etmek için HSV-gB hücrelere iki farklı zamanda verilmiştir.

3.5.6. Hücre İçi ROS Miktarının Belirlenmesi

Yöntemin Esası: Florometrik hücre içi ROS test kiti, canlı hücrelerde 1 saatlik inkübasyonu takiben oluşan hücre içi ROS’u tespit etmek için hassas, tek adımlı bir florometrik ölçüm sağlamaktadır. ROS, hücre geçirgen bir sensör ile reaksiyona girerek, mevcut ROS miktarıyla orantılı bir florometrik ürün meydana getirir. Oluşan ürünün floresans şiddetinin ölçülmesiyle ROS miktarı tespit edilir.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Hücreler kuyucuk başına 90 μ l’de 10.000-40.000 hücre olacak şekilde hücre plağına ekilir ve üzerine 10 μ l dozlanan maddeleri içeren besiyeri eklenir.
2. Hücre kültür plağı gece boyunca inkübatörde (37°C, %5 CO₂) bekletilir.
3. Hücreler üzerine kuyucuk başına 100 μ l Master Reaksiyon Karışımı eklenir.

4. Hücreler inkübatörde (37°C, %5 CO₂) 1 saat bekletilir.
5. Kuyucukların floresansı ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 640/675$ nm) ölçülür.

ROS Düzeylerinin Hesaplanması: Kontrol kuyucukları için hesaplanan ROS miktarı %100 kabul edilir ve diğer kuyucuklara ait ROS miktarları kontrole oranlanarak bağıl olarak hesaplanır.

3.4.7. Amiloid Beta 1-42 Düzeylerinin Ölçümü

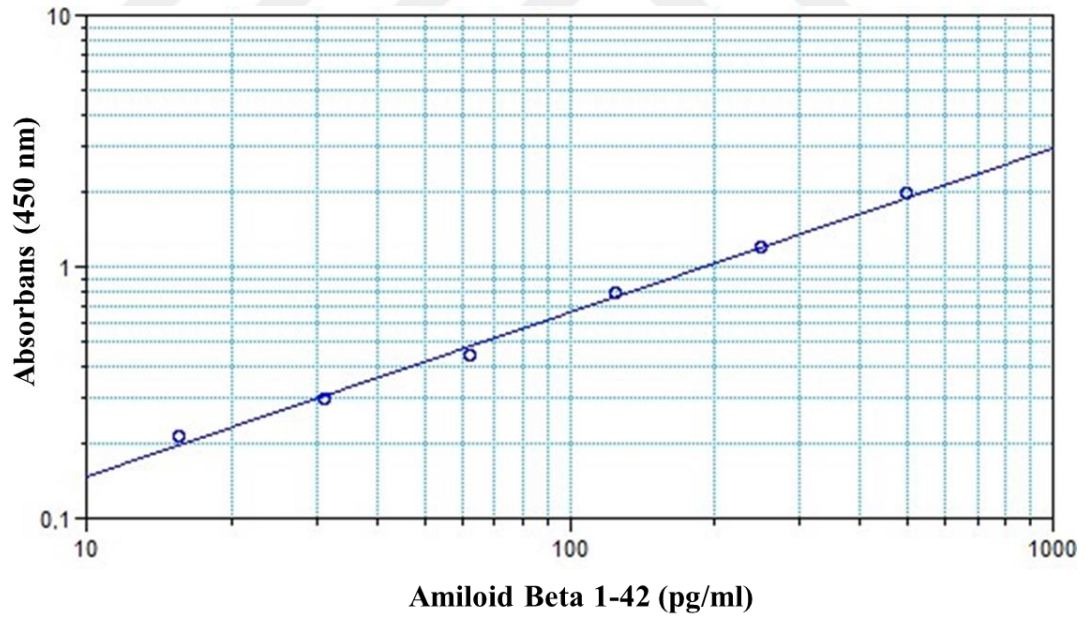
Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak insan A β ₁₋₄₂'ye özgü bir antikorla kaplanmıştır. Standart ve numune çözeltileri kuyucuklara konularak çözelti içinde bulunan A β ₁₋₄₂'nin spesifik antikorlarla bağlanması sağlanır. Plak içerisinde antikorla bağlanmayan maddeler uzaklaştırıldıktan sonra A β ₁₋₄₂ için spesifik biyotin-konjuge antikorlar kuyucuklara eklenir. Ardından avidin-HRP konjugatı eklenir ve inkübe edilir. Yıkamayı takiben substrat reaktifi eklenerek mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma çözeltisi eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan sarı renkli bileşiğin absorbansı 450 nm'de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı: Kullanılacak tüm çözeltiler oda sıcaklığında olmalıdır. Çözeltiler hazırlanırken köpürmeyi önlemek amacıyla yavaşça çalkalanmalıdır.

1. Kit içerisinde bulunan kaplanmış 96 kuyucuklu plağın her kuyucuğuna 100µL standart, kör veya hücre lizatı eklenir. Kör çözelti olarak standart/örnek seyreltme çözeltisi kullanılır. Örnek/standart/kör eklendikten sonra plak yavaşça çalkalanır ve üzeri kapatılarak 37 °C'ye ayarlanmış etüvde 90 dakika inkübe edilir.
2. Kuyucuklardaki sıvı mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara çoklu mikropipetle hızlıca 100 µL biyotinlenmiş deteksiyon çalışma çözeltisi eklenir. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üzeri kapatılarak 37 °C'de 60 dakika inkübe edilir.
3. Kuyucuklardaki çözelti mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara 200 µl yıkama çözeltisi eklenir 1-2 dakika bekletilir ve mikropipet yardımıyla çözelti çekilir. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanır. Son yıkama işleminden sonra plak adsorban kâğıt yardımıyla iyice kurutulur.

4. Her kuyucuğa 100µL HRP konjugat çalışma çözeltisi eklenir. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üstü kapatılarak 37 °C’de 60 dakika inkübe edilir.
5. 3. Basamakta yapılan yıkama işlemi 5 kez tekrarlanır.
6. Her kuyucuğa 90 µl substrat reaktifi eklenir. Plağın üstü kapatılır ve ışık almayacak şekilde 15-30 dakika 37 °C’de inkübe edilir. Reaksiyon süresi renk oluşumuna bağlı olarak değiştirilebilir.
7. Son olarak mikropipet yardımı ile hızlıca 50 µl durdurma çözeltisi eklenir.
8. Kuyucukların absorbansı spektrofotometre ile 450 nm’de ölçülür.

Amiloid Beta 1-42 Düzeylerinin Hesaplanması: A β ₁₋₄₂ düzeyleri Molecular Devices-Softmax® (Kaliforniya, ABD) programı kullanılarak hesaplanır. Standart, örnek ve kontrol gruplarına ait absorbans değerleri programa girilir. Programda bulunan log-log algoritması kullanılarak standart eğri elde edilir (Şekil 3.1). Örneklerdeki A β ₁₋₄₂ düzeyleri bu denkleme göre saptanmıştır. Sonuçlar pg/mg protein cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 3.1. Amiloid Beta 1-42 standart eğrisi.

3.4.8. Tau Proteinini Düzeylerinin Ölçümü

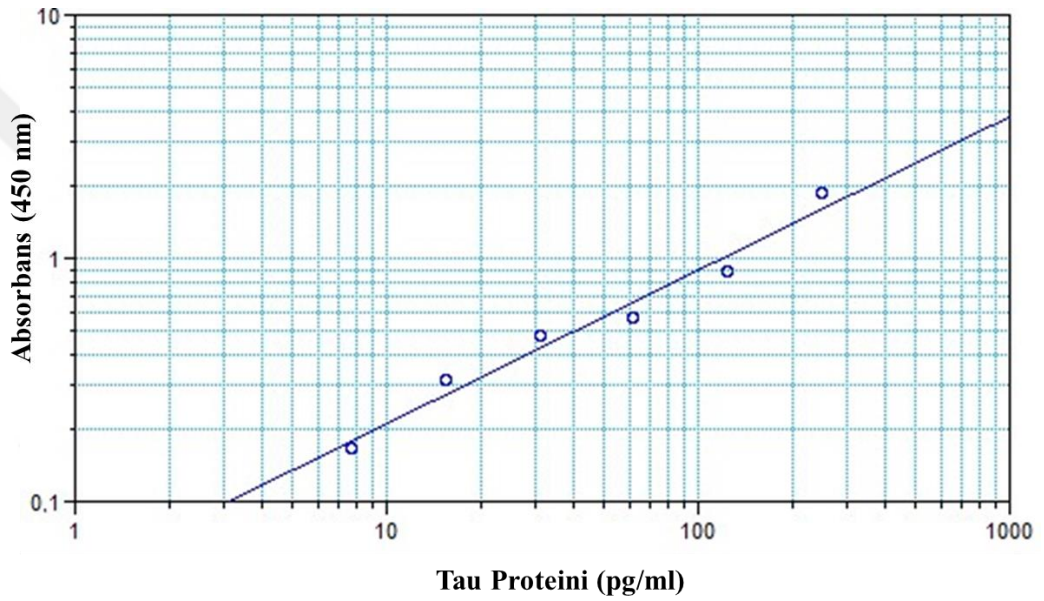
Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak insan Tau proteinine özgü bir antikora kaplanmıştır. Standart ve numune çözeltileri kuyucuklara konularak çözelti içinde bulunan tau proteininin spesifik antikolarla bağlanması sağlanır. Plak içerisinde antikora bağlanmayan maddeler uzaklaştırıldıktan sonra tau için spesifik biyotin-konjuge antikolar kuyucuklara eklenir. Ardından avidin-HRP konjugatı eklenir ve inkübe edilir. Yıkamayı takiben substrat reaktifi eklenerek mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma çözeltisi eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan sarı renkli bileşiğin absorbansı 450 nm’de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı: Kullanılacak tüm çözeltiler oda sıcaklığında olmalıdır. Çözeltiler hazırlanırken köpürmeyi önlemek amacıyla yavaşça çalkalanmalıdır.

1. Kit içerisinde bulunan kaplanmış 96 kuyucuklu plağın her kuyucuğuna 100 µL standart, kör veya hücre lizatı eklenir. Kör çözelti olarak standart/örnek seyreltme çözeltisi kullanılır. Örnek/standart/kör eklendikten sonra plak yavaşça çalkalanır ve üzeri kapatılarak 37°C’ye ayarlanmış etüvde 90 dakika inkübe edilir.
2. Kuyucuklardaki sıvı mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara çoklu mikropipetle hızlıca 100 µL biyotinlenmiş deteksiyon çalışma çözeltisi eklenir. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üzeri kapatılarak 37 °C’de 60 dakika inkübe edilir.
3. Kuyucuklardaki çözelti mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara 200 µl yıkama çözeltisi eklenir; 1-2 dakika bekletilir ve mikropipet yardımıyla çözelti çekilir. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanır. Son yıkama işleminden sonra plak adsorban kâğıt yardımıyla iyice kurutulur.
4. Her kuyucuğa 100 µL HRP konjugat çalışma çözeltisi eklenir. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üstü kapatılarak 37°C’de 60 dakika inkübe edilir.
5. 3. Basamakta yapılan yıkama işlemi 5 kez tekrarlanır.
6. Her kuyucuğa 90 µl substrat reaktifi eklenir. Plağın üstü kapatılır ve ışık almayacak şekilde 15-30 dakika 37°C’de inkübe edilir. Reaksiyon süresi renk oluşumuna bağlı olarak değiştirilebilir.

7. Son olarak mikropipet yardımı ile hızlıca 50 µl durdurma çözeltisi eklenir.
8. Kuyucukların absorbansı spektrofotometre ile 450 nm’de ölçülür.

Tau Proteini Düzeylerinin Hesaplanması: Tau proteini düzeyleri Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanır. Standart, örnek ve kontrol gruplarına ait absorbans değerleri programa girilir. Programda bulunan log-log algoritması kullanılarak standart eğri elde edilir (Şekil 3.2). Örneklerdeki Tau proteini düzeyleri bu denkleme göre saptanmıştır. Sonuçlar pg/mg protein cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 3.2. Tau proteini standart eğrisi.

3.4.9. Amiloid Öncü Proteini (APP) Düzeylerinin Ölçümü

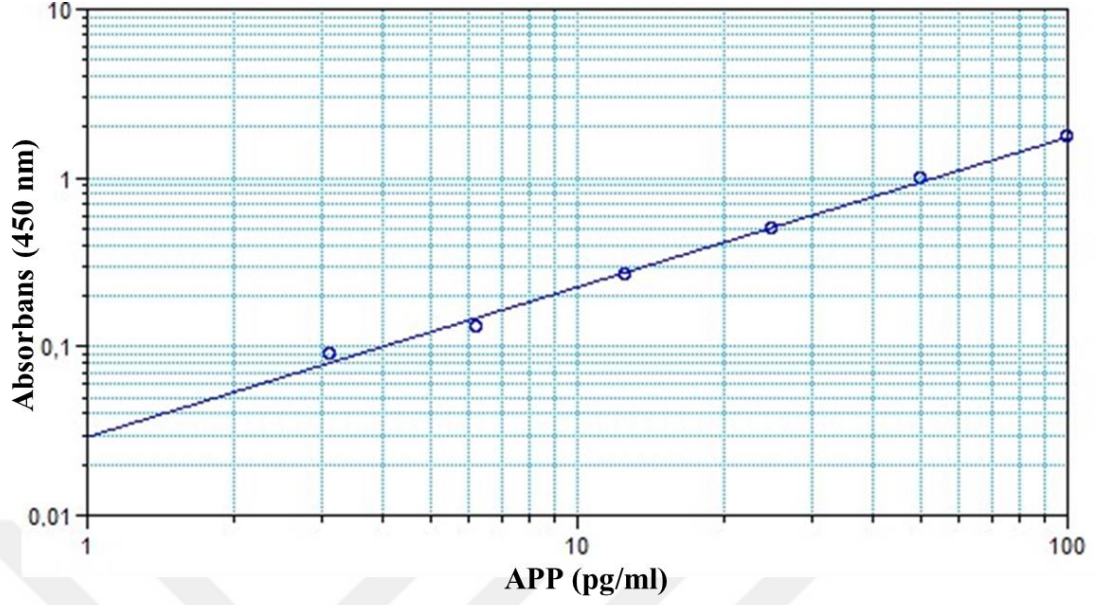
Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak insan APP'ye özgü bir antikorla kaplanmıştır. Standart ve numune çözeltileri kuyucuklara konularak çözelti içinde bulunan APP'nin spesifik antikorlarla bağlanması sağlanır. Plak içerisinde antikorla bağlanmayan maddeler uzaklaştırıldıktan sonra APP için spesifik biyotin-konjuge antikorlar kuyucuklara eklenir. Ardından avidin-HRP konjugatı eklenir ve inkübe edilir. Yıkamayı takiben substrat reaktifi eklenerek mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma

çözeltisi eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan sarı renkli bileşiğin absorbansı 450 nm’de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı: Kullanılacak tüm çözeltiler oda sıcaklığında olmalıdır. Çözeltiler hazırlanırken köpürmeyi önlemek amacıyla yavaşça çalkalanmalıdır.

1. Kit içerisinde bulunan kaplanmış 96 kuyucuklu plağın her kuyucuğuna 100µL standart, kör veya hücre lizatı eklenir. Kör çözelti olarak standart/örnek seyreltme çözeltisi kullanılır. Örnek/standart/kör eklendikten sonra plak yavaşça çalkalanır ve üzeri kapatılarak 37⁰C’ye ayarlanmış etüvde 90 dakika inkübe edilir.
2. Kuyucuklardaki sıvı mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara çoklu mikropipetle hızlıca 100µL biyotinlenmiş deteksiyon çalışma çözeltisi eklenir. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üzeri kapatılarak 37⁰C’de 60 dakika inkübe edilir.
3. Kuyucuklardaki çözelti mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara 200 µl yıkama çözeltisi eklenir 1-2 dakika bekletilir ve mikropipet yardımıyla çözelti çekilir. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanır. Son yıkama işleminden sonra plak adsorban kâğıt yardımıyla iyice kurutulur.
4. Her kuyucuğa 100 µL HRP konjugat çalışma çözeltisi eklenir. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üstü kapatılarak 37⁰C’de 60 dakika inkübe edilir.
5. 3. Basamakta yapılan yıkama işlemi 5 kez tekrarlanır.
6. Her kuyucuğa 90 µl substrat reaktifi eklenir. Plağın üstü kapatılır ve ışık almayacak şekilde 15-30 dakika 37⁰C’de inkübe edilir. Reaksiyon süresi renk oluşumuna bağlı olarak değiştirilebilir.
7. Son olarak mikropipet yardımı ile hızlıca 50 µl durdurma çözeltisi eklenir.
8. Kuyucukların absorbansı spektrofotometre ile 450 nm’de ölçülür.

Amiloid Öncü Protein Düzeylerinin Hesaplanması: APP düzeyleri Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanır. Standart, örnek ve kontrol gruplarına ait absorbans değerleri programa girilir. Programda bulunan log-log algoritması kullanılarak standart eğri elde edilir (Şekil 3.3). Örneklerdeki APP düzeyleri bu denkleme göre saptanmıştır. Sonuçlar pg/mg protein cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 3.3. Amiloid öncü proteini standart eğrisi.

3.4.10. Kompleman Protein C1q Düzeylerinin Ölçümü

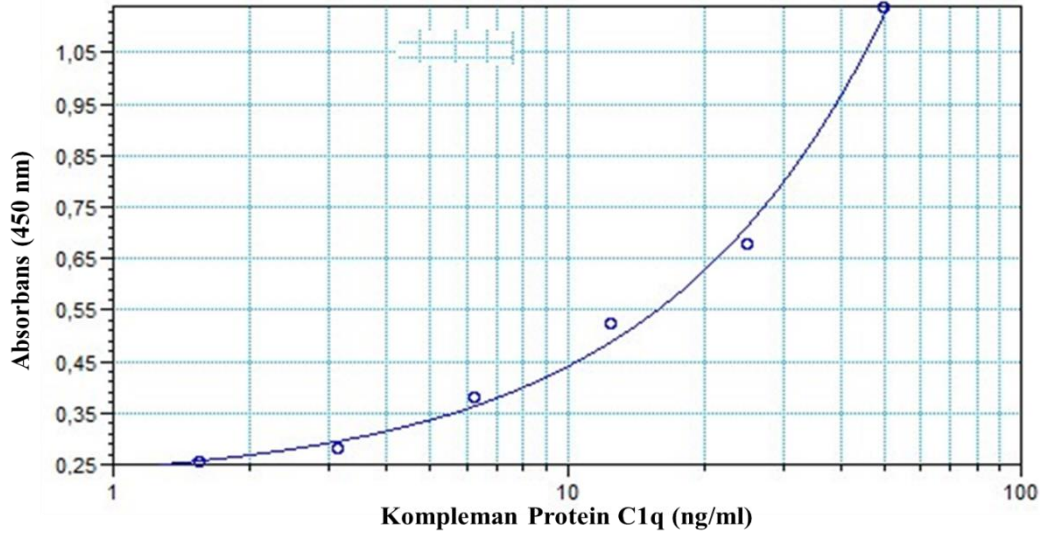
Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak insan kompleman proteini C1q'ya özgü bir antikorla kaplanmıştır. Standart ve numune çözeltileri kuyucuklara konularak çözelti içinde bulunan kompleman proteini C1q'nun spesifik antikorlarla bağlanması sağlanır. Plak içerisinde antikorla bağlanmayan maddeler uzaklaştırıldıktan sonra C1q için spesifik biyotin-konjuge antikorlar kuyucuklara eklenir. Ardından avidin-HRP konjugatı eklenir ve inkübe edilir. Yıkamayı takiben substrat reaktifi eklenerek mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma çözeltisi eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan sarı renkli bileşiğin absorbansı 450 nm'de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı: Kullanmadan önce tüm reaktif ve çözeltiler oda sıcaklığına getirilmelidir.

1. Standart kuyucuklarına hazırlanan standart çözeltilerden 50'şer µl eklenir. Kör çözelti olarak standart seyreltme çözeltisi kullanılır.
2. Örnek kuyucuklarına ise 40 µl numune eklenir.

3. Ardından örnek kuyucuklarına 10 µl biyotinlenmiş antikor eklenir. Standartlar içerisinde biyotinlenmiş antikor mevcut olduğu için kör ve standart kuyucuklarına biyotinlenmiş antikor çözeltisi eklenmez.
4. Son olarak kör kuyucukları hariç tüm kuyucuklara 50 µl Streptavidin-HRP çözeltisi eklenir.
5. Plak 37°C’de 60 dakika inkübe edilir.
6. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklardaki sıvı boşaltılır ve kuyucuklar her bir kuyucuğa 300 µl olmak üzere 5 kez yıkama çözeltisi ile yıkanır. Son yıkamadan sonra plağın adsorban kağıt yardımıyla tamamen kurutulması sağlanır.
7. Bütün kuyucuklara önce 50 µl substrat reaktifi A daha sonra da 50 µl substrat reaktifi B eklenir.
8. Plak karanlıkta ve 37°C’de 10 dakika inkübe edilir.
9. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklara 50 µl durdurma çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulur.
10. Oluşan rengin şiddeti 450 nm’de ölçülür.

Kompleman Protein C1q Düzeylerinin Hesaplanması: C1q düzeyleri Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanır. Standart, örnek ve kontrol gruplarına ait absorbans değerleri programa girilir. Programda bulunan 4-parametre algoritması kullanılarak standart eğri elde edilir (Şekil 3.4). Örneklerdeki C1q düzeyleri bu denkleme göre saptanmıştır. Sonuçlar ng/mg protein cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 3.4. Kompleman protein C1q standart eğrisi.

3.4.11. Kompleman Protein C3 Düzeylerinin Ölçümü

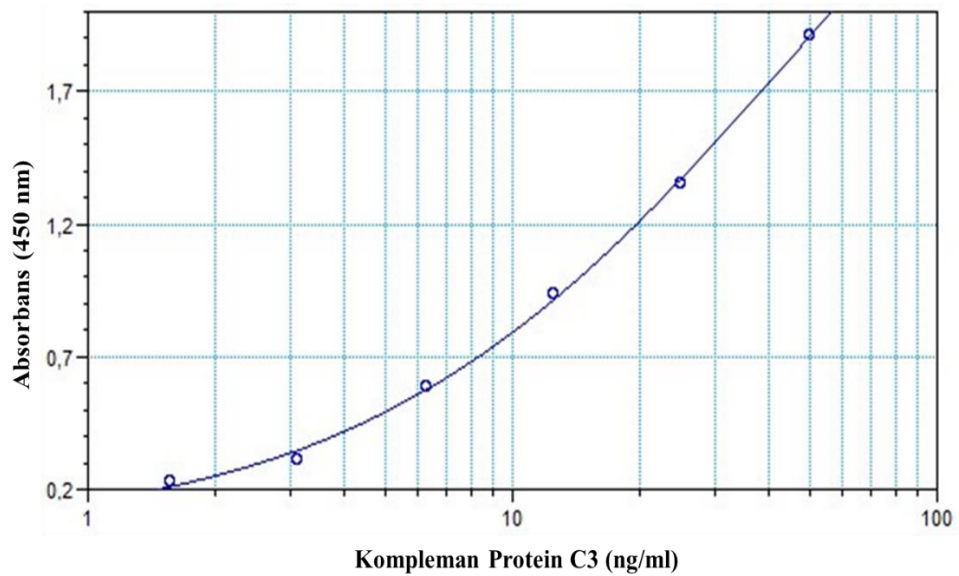
Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak insan kompleman proteini C3'e özgü bir antikorla kaplanmıştır. Standart ve numune çözeltileri kuyucuklara konularak çözelti içinde bulunan kompleman proteini C3'ün spesifik antikorlarla bağlanması sağlanır. Plak içerisinde antikorla bağlanmayan maddeler uzaklaştırıldıktan sonra C3 için spesifik biyotin-konjuge antikorlar kuyucuklara eklenir. Ardından avidin-HRP konjugatı eklenir ve inkübe edilir. Yıkamayı takiben substrat reaktifi eklenerek mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma çözeltisi eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan sarı renkli bileşiğin absorbansı 450 nm'de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı: Kullanmadan önce tüm reaktif ve çözeltiler oda sıcaklığına getirilmelidir.

1. Standart kuyucuklarına hazırlanan standart çözeltilerden 50'şer µl eklenir. Kör çözelti olarak standart seyreltme çözeltisi kullanılır.
2. Örnek kuyucuklarına ise 40 µl numune eklenir.
3. Ardından örnek kuyucuklarına 10 µl biyotinlenmiş antikor eklenir. Standartlar içerisinde biyotinlenmiş antikor mevcut olduğu için kör ve standart kuyucuklarına biyotinlenmiş antikor çözeltisi eklenmez.

4. Son olarak kör kuyucukları hariç tüm kuyucuklara 50 µl Streptavidin-HRP çözeltisi eklenir.
5. Plak 37°C’de 60 dakika inkübe edilir.
6. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklardaki sıvı boşaltılır ve kuyucuklar herbir kuyucuğa 300 µl olmak üzere 5 kez yıkama çözeltisi ile yıkanır. Son yıkamadan sonra plağın adsorban kağıt yardımıyla tamamen kurutulması sağlanır.
7. Bütün kuyucuklara önce 50 µl substrat reaktifi A daha sonra da 50 µl substrat reaktifi B eklenir.
8. Plak karanlıkta ve 37°C’de 10 dakika inkübe edilir.
9. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklara 50 µl durdurma çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulur.
10. Oluşan rengin şiddeti 450 nm’de ölçülür.

Kompleman Protein C3 Düzeylerinin Hesaplanması: C3 düzeyleri Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanır. Standart, örnek ve kontrol gruplarına ait absorbans değerleri programa girilir. Programda bulunan 4-parametre algoritması kullanılarak standart eğri elde edilir (Şekil 3.5). Örneklerdeki C3 düzeyleri bu denkleme göre saptanmıştır. Sonuçlar ng/mg protein cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 3.5. Kompleman protein C3 standart eğrisi.

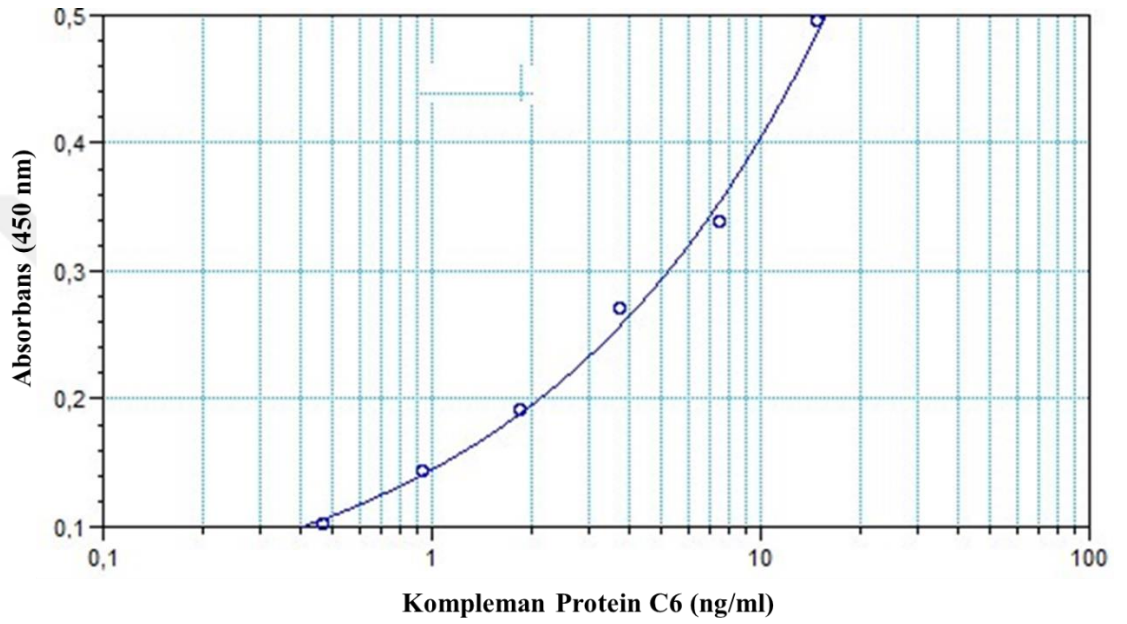
3.4.12. Kompleman Protein C6 Düzeylerinin Ölçümü

Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak insan kompleman proteini C6'ya özgü bir antikorla kaplanmıştır. Standart ve numune çözeltileri kuyucuklara konularak çözelti içinde bulunan kompleman proteini C6'nın spesifik antikorlarla bağlanması sağlanır. Plak içerisinde antikorla bağlanmayan maddeler uzaklaştırıldıktan sonra C6 için spesifik biyotin-konjuge antikorlar kuyucuklara eklenir. Ardından avidin-HRP konjugatı eklenir ve inkübe edilir. Yıkamayı takiben substrat reaktifi eklenerek mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma çözeltisi eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan sarı renkli bileşiğin absorbansı 450 nm'de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı: Kullanmadan önce tüm reaktif ve çözeltiler oda sıcaklığına getirilmelidir.

1. Standart kuyucuklarına hazırlanan standart çözeltilerden 50'şer µl eklenir. Kör çözelti olarak standart seyreltme çözeltisi kullanılır.
2. Örnek kuyucuklarına ise 40 µl numune eklenir.
3. Ardından örnek kuyucuklarına 10 µl biyotinlenmiş antikor eklenir. Standartlar içerisinde biyotinlenmiş antikor mevcut olduğu için kör ve standart kuyucuklarına biyotinlenmiş antikor çözeltisi eklenmez.
4. Son olarak kör kuyucukları hariç tüm kuyucuklara 50 µl Streptavidin-HRP çözeltisi eklenir.
5. Plak 37°C'de 60 dakika inkübe edilir.
6. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklardaki sıvı boşaltılır ve kuyucuklar herbir kuyucuğa 300 µl olmak üzere 5 kez yıkama çözeltisi ile yıkanır. Son yıkamadan sonra plağın adsorban kağıt yardımıyla tamamen kurutulması sağlanır.
7. Bütün kuyucuklara önce 50 µl substrat reaktifi A daha sonra da 50 µl substrat reaktifi B eklenir.
8. Plak karanlıkta ve 37°C'de 10 dakika inkübe edilir.
9. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklara 50 µl durdurma çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulur.
10. Oluşan rengin şiddeti 450 nm'de ölçülür.

Kompleman Protein C6 Düzeylerinin Hesaplanması: C6 düzeyleri Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanır. Standart, örnek ve kontrol gruplarına ait absorbans değerleri programa girilir. Programda bulunan 4-parametre algoritması kullanılarak standart eğri elde edilir (Şekil 3.6). Örneklerdeki C6 düzeyleri bu denkleme göre saptanmıştır. Sonuçlar ng/mg protein cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 3.6. Kompleman protein C6 standart eğrisi.

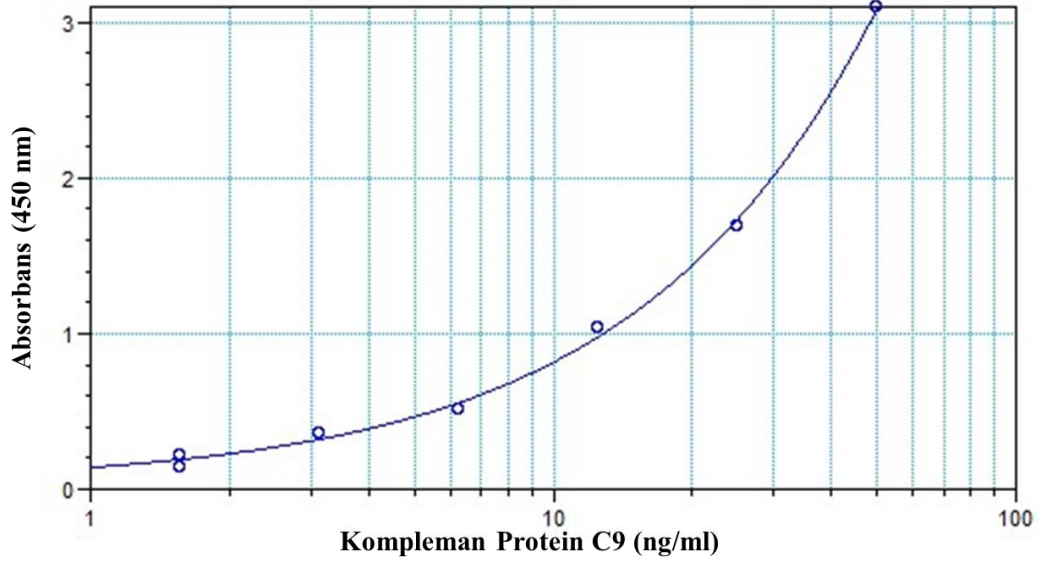
3.4.13. Kompleman Protein C9 Düzeylerinin Ölçümü

Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak insan kompleman proteini C9'a özgü bir antikorla kaplanmıştır. Standart ve numune çözeltileri kuyucuklara konularak çözelti içinde bulunan kompleman proteini C9'un spesifik antikorlarla bağlanması sağlanır. Plak içerisinde antikorla bağlanmayan maddeler uzaklaştırıldıktan sonra C9 için spesifik biyotin-konjuge antikorlar kuyucuklara eklenir. Ardından avidin-HRP konjugatı eklenir ve inkübe edilir. Yıkamayı takiben substrat reaktifi eklenerek mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma çözeltisi eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan sarı renkli bileşiğin absorbansı 450 nm'de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı: Kullanmadan önce tüm reaktif ve çözeltiler oda sıcaklığına getirilmelidir.

1. Standart kuyucuklarına hazırlanan standart çözeltilerden 50'şer µl eklenir. Kör çözelti olarak standart seyreltme çözeltisi kullanılır.
2. Örnek kuyucuklarına ise 40 µl numune eklenir.
3. Ardından örnek kuyucuklarına 10 µl biyotinlenmiş antikor eklenir. Standartlar içerisinde biyotinlenmiş antikor mevcut olduğu için kör ve standart kuyucuklarına biyotinlenmiş antikor çözeltisi eklenmez.
4. Son olarak kör kuyucukları hariç tüm kuyucuklara 50 µl Streptavidin-HRP çözeltisi eklenir.
5. Plak 37°C'de 60 dakika inkübe edilir.
6. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklardaki sıvı boşaltılır ve kuyucuklar herbir kuyucuğa 300 µl olmak üzere 5 kez yıkama çözeltisi ile yıkanır. Son yıkamadan sonra plağın adsorban kağıt yardımıyla tamamen kurutulması sağlanır.
7. Bütün kuyucuklara önce 50 µl substrat reaktifi A daha sonra da 50 µl substrat reaktifi B eklenir.
8. Plak karanlıkta ve 37°C'de 10 dakika inkübe edilir.
9. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklara 50 µl durdurma çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulur.
10. Oluşan rengin şiddeti 450 nm'de ölçülür.

Kompleman Protein C9 Düzeylerinin Hesaplanması: C9 düzeyleri Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanır. Standart, örnek ve kontrol gruplarına ait absorbans değerleri programa girilir. Programda bulunan 4-parametre algoritması kullanılarak standart eğri elde edilir (Şekil 3.7). Örneklerdeki C9 düzeyleri bu denkleme göre saptanmıştır. Sonuçlar ng/mg protein cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 3.7. Kompleman protein C9 standart eğrisi.

3.4.14. İnterlökin 1-Alfa Düzeylerinin Ölçümü

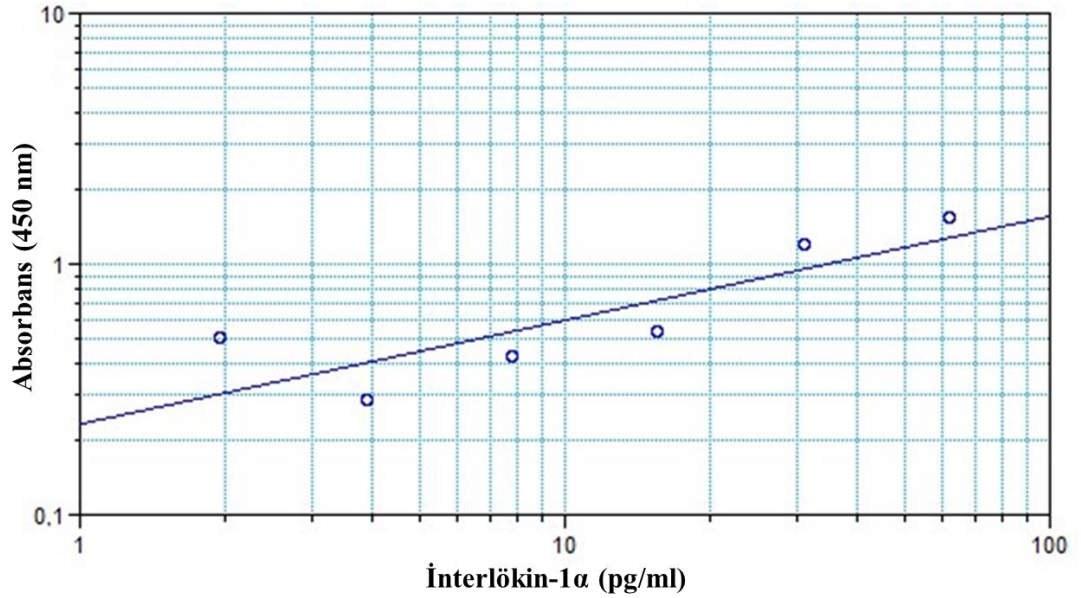
Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak insan IL-1 α 'ya özgü bir antikorla kaplanmıştır. Standart ve numune çözeltileri kuyucuklara konularak çözelti içinde bulunan IL-1 α 'nın spesifik antikorlarla bağlanması sağlanır. Plak içerisinde antikorla bağlanmayan maddeler uzaklaştırıldıktan sonra IL-1 α için spesifik biyotin-konjuge antikorlar kuyucuklara eklenir. Ardından avidin-HRP konjugatı eklenir ve inkübe edilir. Yıkamayı takiben substrat reaktif eklenerek mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma çözeltisi eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan sarı renkli bileşiğin absorbansı 450 nm'de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı: Kullanmadan önce tüm reaktif ve çözeltiler oda sıcaklığına getirilmelidir.

1. Standart kuyucuklarına hazırlanan standart çözeltilerden 50'şer μ l eklenir. Kör çözelti olarak standart seyreltme çözeltisi kullanılır.
2. Örnek kuyucuklarına ise 40 μ l numune eklenir.
3. Ardından örnek kuyucuklarına 10 μ l biyotinlenmiş antikor eklenir. Standartlar içerisinde biyotinlenmiş antikor mevcut olduğu için kör ve standart kuyucuklarına biyotinlenmiş antikor çözeltisi eklenmez.

4. Son olarak kör kuyucukları hariç tüm kuyucuklara 50 µl Streptavidin-HRP çözeltisi eklenir.
5. Plak 37°C’de 60 dakika inkübe edilir.
6. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklardaki sıvı boşaltılır ve kuyucuklar herbir kuyucuğa 300 µl olmak üzere 5 kez yıkama çözeltisi ile yıkanır. Son yıkamadan sonra plağın adsorban kağıt yardımıyla tamamen kurutulması sağlanır.
7. Bütün kuyucuklara önce 50 µl substrat reaktifi A daha sonra da 50 µl substrat reaktifi B eklenir.
8. Plak karanlıkta ve 37°C’de 10 dakika inkübe edilir.
9. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklara 50 µl durdurma çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulur.
10. Oluşan rengin şiddeti 450 nm’de ölçülür.

İnterlökin 1- α Düzeylerinin Hesaplanması: IL-1 α düzeyleri Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanır. Standart, örnek ve kontrol gruplarına ait absorbans değerleri programa girilir. Programda bulunan log-log algoritması kullanılarak standart eğri elde edilir (Şekil 3.8). Örneklerdeki IL-1 α düzeyleri bu denkleme göre saptanmıştır. Sonuçlar pg/mg protein cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 3.8. İnterlökin-1 α standart eğrisi.

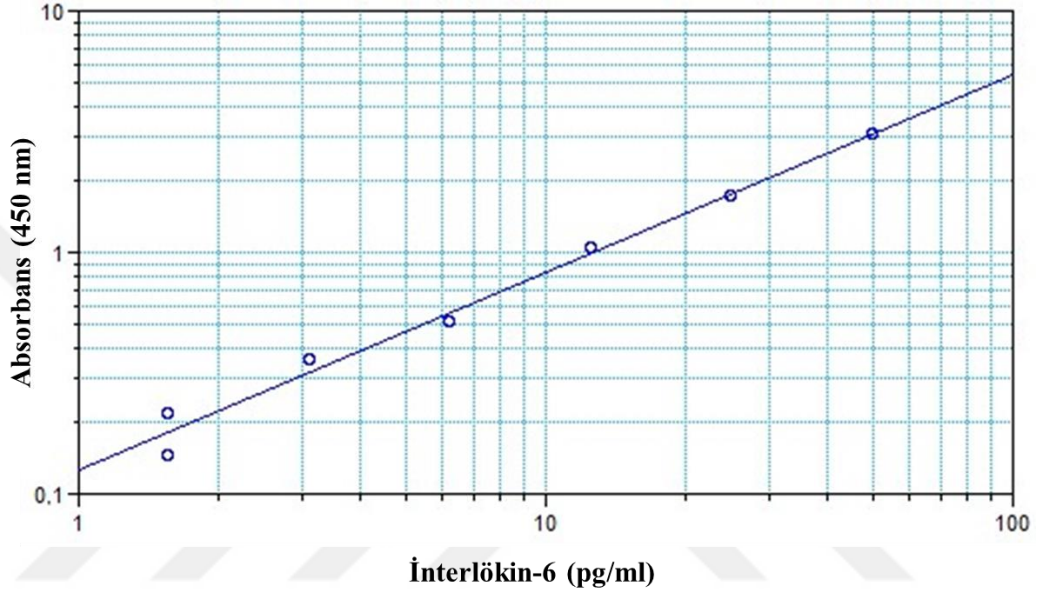
3.4.15. İnterlökin-6 Düzeylerinin Ölçümü

Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak insan IL-6'ya özgü bir antikorla kaplanmıştır. Standart ve numune çözeltileri kuyucuklara konularak çözelti içinde bulunan IL-6'nın spesifik antikorlarla bağlanması sağlanır. Plak içerisinde antikorla bağlanmayan maddeler uzaklaştırıldıktan sonra IL-6 için spesifik biyotin-konjuge antikorlar kuyucuklara eklenir. Ardından avidin-HRP konjugatı eklenir ve inkübe edilir. Yıkamayı takiben substrat reaktifi eklenerek mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma çözeltisi eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan sarı renkli bileşiğin absorbansı 450 nm'de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı: Kullanmadan önce tüm reaktif ve çözeltiler oda sıcaklığına getirilmelidir.

1. Standart kuyucuklarına hazırlanan standart çözeltilerden 50'şer µl eklenir. Kör çözelti olarak standart seyreltme çözeltisi kullanılır.
2. Örnek kuyucuklarına ise 40 µl numune eklenir.
3. Ardından örnek kuyucuklarına 10 µl biyotinlenmiş antikor eklenir. Standartlar içerisinde biyotinlenmiş antikor mevcut olduğu için kör ve standart kuyucuklarına biyotinlenmiş antikor çözeltisi eklenmez.
4. Son olarak kör kuyucukları hariç tüm kuyucuklara 50 µl Streptavidin-HRP çözeltisi eklenir.
5. Plak 37°C'de 60 dakika inkübe edilir.
6. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklardaki sıvı boşaltılır ve kuyucuklar herbir kuyucuğa 300 µl olmak üzere 5 kez yıkama çözeltisi ile yıkanır. Son yıkamadan sonra plağın adsorban kağıt yardımıyla tamamen kurutulması sağlanır.
7. Bütün kuyucuklara önce 50 µl substrat reaktifi A daha sonra da 50 µl substrat reaktifi B eklenir.
8. Plak karanlıkta ve 37°C'de 10 dakika inkübe edilir.
9. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklara 50 µl durdurma çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulur.
10. Oluşan rengin şiddeti 450 nm'de ölçülür.

İnterlökin-6 Düzeylerinin Hesaplanması: IL-6 düzeyleri Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanır. Standart, örnek ve kontrol gruplarına ait absorbands değerleri programa girilir. Programda bulunan log-log algoritması kullanılarak standart eğri elde edilir (Şekil 3.9). Örneklerdeki IL-6 düzeyleri bu denkleme göre saptanmıştır. Sonuçlar pg/mg protein cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 3.9. İnterlökin-6 standart eğrisi.

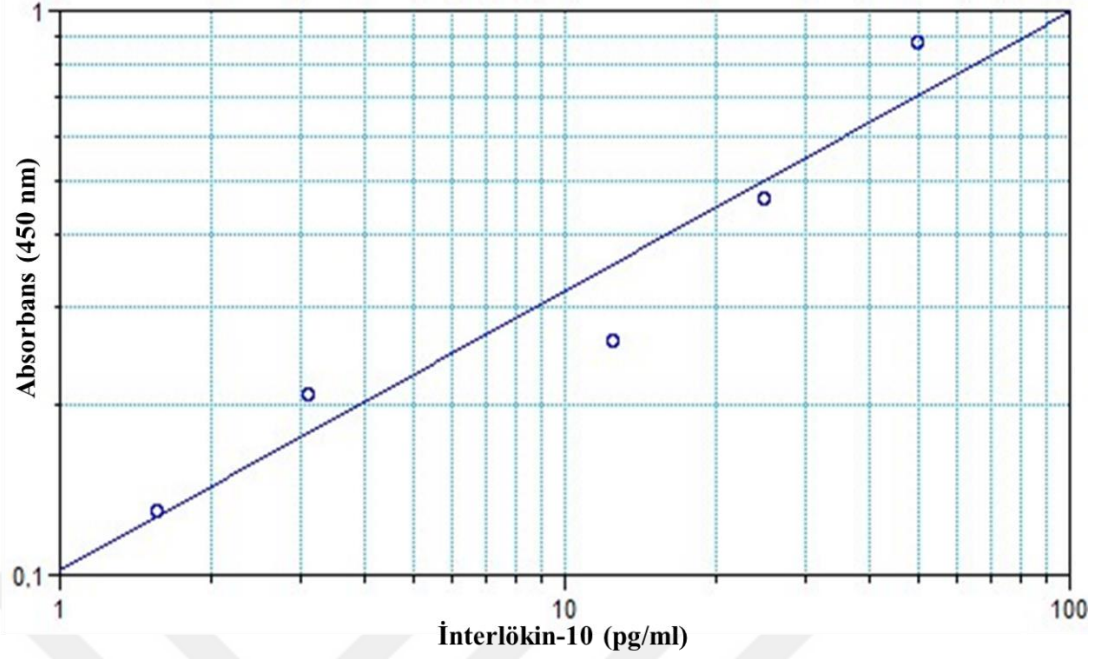
3.4.16. İnterlökin-10 Düzeylerinin Ölçümü

Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak insan IL-10'a özgü bir antikorla kaplanmıştır. Standart ve numune çözeltileri kuyucuklara konularak çözelti içinde bulunan IL-10'un spesifik antikorlarla bağlanması sağlanır. Plak içerisinde antikorla bağlanmayan maddeler uzaklaştırıldıktan sonra IL-10 için spesifik biyotin-konjuge antikorlar kuyucuklara eklenir. Ardından avidin-HRP konjugatı eklenir ve inkübe edilir. Yıkamayı takiben substrat reaktifi eklenerek mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma çözeltisi eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan sarı renkli bileşiğin absorbandsı 450 nm'de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı: Kullanmadan önce tüm reaktif ve çözeltiler oda sıcaklığına getirilmelidir.

1. Standart kuyucuklarına hazırlanan standart çözeltilerden 50'şer µl eklenir. Kör çözelti olarak standart seyreltme çözeltisi kullanılır.
2. Örnek kuyucuklarına ise 40 µl numune eklenir.
3. Ardından örnek kuyucuklarına 10 µl biyotinlenmiş antikor eklenir. Standartlar içerisinde biyotinlenmiş antikor mevcut olduğu için kör ve standart kuyucuklarına biyotinlenmiş antikor çözeltisi eklenmez.
4. Son olarak kör kuyucukları hariç tüm kuyucuklara 50 µl Streptavidin-HRP çözeltisi eklenir.
5. Plak 37°C'de 60 dakika inkübe edilir.
6. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklardaki sıvı boşaltılır ve kuyucuklar herbir kuyucuğa 300 µl olmak üzere 5 kez yıkama çözeltisi ile yıkanır. Son yıkamadan sonra plağın adsorban kağıt yardımıyla tamamen kurutulması sağlanır.
7. Bütün kuyucuklara önce 50 µl substrat reaktifi A daha sonra da 50 µl substrat reaktifi B eklenir.
8. Plak karanlıkta ve 37°C'de 10 dakika inkübe edilir.
9. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklara 50 µl durdurma çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulur.
10. Oluşan rengin şiddeti 450 nm'de ölçülür.

İnterlökin-10 Düzeylerinin Hesaplanması: IL-10 düzeyleri Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanır. Standart, örnek ve kontrol gruplarına ait absorbans değerleri programa girilir. Programda bulunan log-log algoritması kullanılarak standart eğri elde edilir (Şekil 3.10). Örneklerdeki IL-10 düzeyleri bu denkleme göre saptanmıştır. Sonuçlar pg/mg protein cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 3.10. İnterlökin-10 standart eğrisi.

3.4.17. Tümör Nekroz Faktörü- α (TNF- α) Düzeylerinin Ölçümü

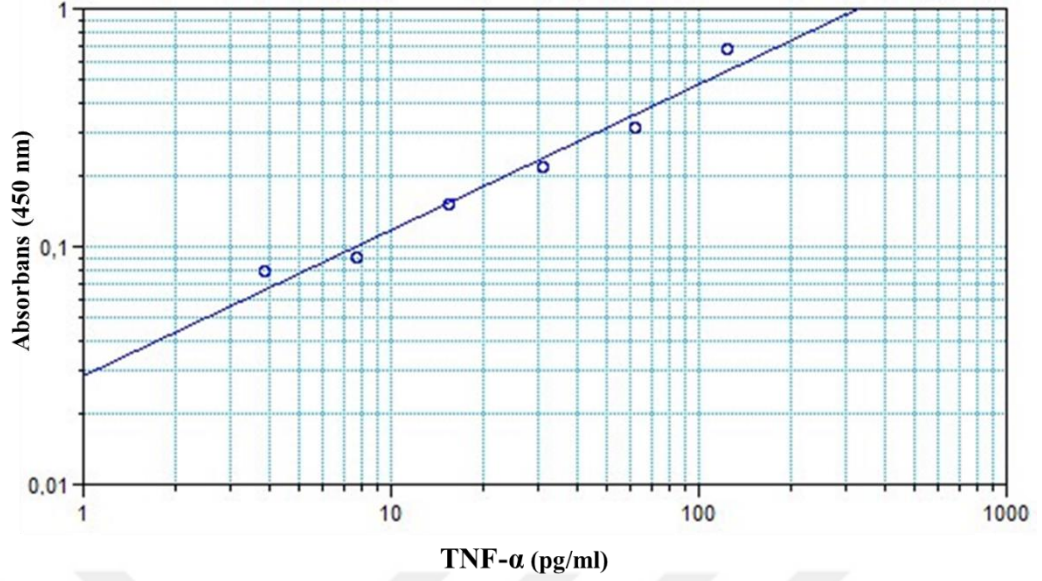
Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak insan TNF- α 'ya özgü bir antikorla kaplanmıştır. Standart ve numune çözeltileri kuyucuklara konularak çözelti içinde bulunan TNF- α 'nın spesifik antikorlarla bağlanması sağlanır. Plak içerisinde antikorla bağlanmayan maddeler uzaklaştırıldıktan sonra TNF- α için spesifik biyotin-konjuge antikorlar kuyucuklara eklenir. Ardından avidin-HRP konjugatı eklenir ve inkübe edilir. Yıkamayı takiben substrat reaktifi eklenerek mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma çözeltisi eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan sarı renkli bileşiğin absorbansı 450 nm'de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı: Kullanmadan önce tüm reaktif ve çözeltiler oda sıcaklığına getirilmelidir.

1. Standart kuyucuklarına hazırlanan standart çözeltilerden 50'şer μ l eklenir. Kör çözelti olarak standart seyreltme çözeltisi kullanılır.
2. Örnek kuyucuklarına ise 40 μ l numune eklenir.

3. Ardından örnek kuyucuklarına 10 µl biyotinlenmiş antikor eklenir. Standartlar içerisinde biyotinlenmiş antikor mevcut olduğu için kör ve standart kuyucuklarına biyotinlenmiş antikor çözeltisi eklenmez.
4. Son olarak kör kuyucukları hariç tüm kuyucuklara 50 µl Streptavidin-HRP çözeltisi eklenir.
5. Plak 37°C’de 60 dakika inkübe edilir.
6. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklardaki sıvı boşaltılır ve kuyucuklar her bir kuyucuğa 300 µl olmak üzere 5 kez yıkama çözeltisi ile yıkanır. Son yıkamadan sonra plağın adsorban kağıt yardımıyla tamamen kurutulması sağlanır.
7. Bütün kuyucuklara önce 50 µl substrat reaktifi A daha sonra da 50 µl substrat reaktifi B eklenir.
8. Plak karanlıkta ve 37°C’de 10 dakika inkübe edilir.
9. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklara 50 µl durdurma çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulur.
10. Oluşan rengin şiddeti 450 nm’de ölçülür.

Tümör Nekroz Faktörü- α Düzeylerinin Hesaplanması: TNF- α düzeyleri Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanır. Standart, örnek ve kontrol gruplarına ait absorbans değerleri programa girilir. Programda bulunan log-log algoritması kullanılarak standart eğri elde edilir (Şekil 3.11). Örneklerdeki TNF- α düzeyleri bu denkleme göre saptanmıştır. Sonuçlar pg/mg protein cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 3.11. Tümör Nekroz Faktörü- α standart eğrisi.

3.4.18. Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta 1 (TGF- β 1) Düzeylerinin Ölçümü

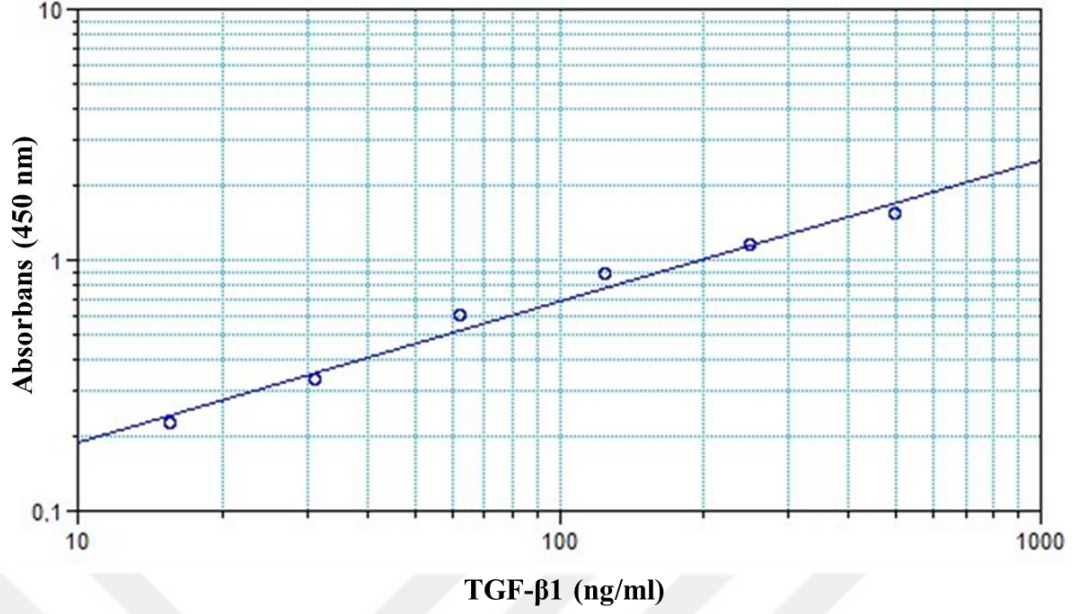
Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak insan TGF- β 1'e özgü bir antikorla kaplanmıştır. Standart ve numune çözeltileri kuyucuklara konularak çözelti içinde bulunan TGF- β 1'in spesifik antikorlarla bağlanması sağlanır. Plak içerisinde antikorla bağlanmayan maddeler uzaklaştırıldıktan sonra TGF- β 1 için spesifik biyotin-konjuge antikorlar kuyucuklara eklenir. Ardından avidin-HRP konjugatı eklenir ve inkübe edilir. Yıkamayı takiben substrat reaktifi eklenerek mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma çözeltisi eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan sarı renkli bileşiğin absorbansı 450 nm'de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı: Kullanılacak tüm çözeltiler oda sıcaklığında olmalıdır. Çözeltiler hazırlanırken köpürmeyi önlemek amacıyla yavaşça çalkalanmalıdır.

1. Kit içerisinde bulunan kaplanmış 96 kuyucuklu plağın her kuyucuğuna 100 μ L standart, kör veya hücre lizatı eklenir. Kör çözelti olarak standart/örnek seyreltme çözeltisi kullanılır. Örnek/standart/kör eklendikten sonra plak yavaşça çalkalanır ve üzeri kapatılarak 37 $^{\circ}$ C'ye ayarlanmış etüvde 90 dakika inkübe edilir.

2. Kuyucuklardaki sıvı mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara çoklu mikropipetle hızlıca 100µL biyotinlenmiş deteksiyon çalışma çözeltisi eklenir. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üzeri kapatılarak 37 °C’de 60 dakika inkübe edilir.
3. Kuyucuklardaki çözelti mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara 200 µl yıkama çözeltisi eklenir 1-2 dakika bekletilir ve mikropipet yardımıyla çözelti çekilir. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanır. Son yıkama işleminden sonra plak adsorban kâğıt yardımıyla iyice kurutulur.
4. Her kuyucuğa 100 µL HRP konjugat çalışma çözeltisi eklenir. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üstü kapatılarak 37 °C’de 60 dakika inkübe edilir.
5. 2. Basamakta yapılan yıkama işlemi 5 kez tekrarlanır.
6. Her kuyucuğa 90 µl substrat reaktifi eklenir. Plagın üstü kapatılır ve ışık almayacak şekilde 15-30 dakika 37 °C’de inkübe edilir. Reaksiyon süresi renk oluşumuna bağlı olarak değiştirilebilir.
7. Son olarak mikropipet yardımı ile hızlıca 50 µl durdurma çözeltisi eklenir.
8. Kuyucukların absorbansı spektrofotometre ile 450 nm’de ölçülür.

TGF-β1 Düzeylerinin Hesaplanması: TGF-β1 düzeyleri Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanır. Standart, örnek ve kontrol gruplarına ait absorbans değerleri programa girilir. Programda bulunan log-log algoritması kullanılarak standart eğri elde edilir (Şekil 3.12). Örneklerdeki TGF-β1 düzeyleri bu denkleme göre saptanmıştır. Sonuçlar ng/mg protein cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 3.12. TGF-β1 standart eğrisi.

3.4.19. DNA İzolasyonu

Yöntemin Esası: “Quick-DNA™ Miniprep” kiti herhangi bir biyolojik sıvı, hücre kültürü veya katı doku örneğinden total DNA ekstraksiyonu (örn. genomik, plazmit, mitokondriyal, viral) sağlayan kolay bir yöntem sunmaktadır.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Hücre pelletleri üzerine 500 µl genomik lizis tamponu eklenir.
2. Örnekler oda sıcaklığında 10 dak inkübe edilir, ardından 1500 devir/dak hızda santrifüj edilir.
3. Süpernatandan 400 µl deney kiti ile tedarik edilen kolonlara alınır, kolonlar tüp içine yerleştirilir ve 1 dakika süreyle 15000 devir/dak hızda santrifüj edilir.
4. Tüpler yenileri ile değiştirilir ve örneklere 200 µl DNA ön yıkama tamponu eklenir, 1 dakika süreyle 15000 devir/dak hızda santrifüj edilir.
5. Örnek kolonlarına 500 µl g-DNA yıkama tamponu eklenir ve 1 dak süreyle 15000 devir/dak hızda santrifüj edilir.
6. Örnek kolonları temiz tüplere alınarak, 125µl DNA elüsyon tamponu eklenir.
7. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon sonrası 30 saniye süreyle 15000 devir/dak hızda santrifüj edilir.

8. Santrifüj sonrası toplanan süpernatantlar ependorf içine alınarak ileri deneyler için -20°C’de saklanır.

3.4.20. Global DNA Metilasyonu Düzeyinin Ölçülmesi

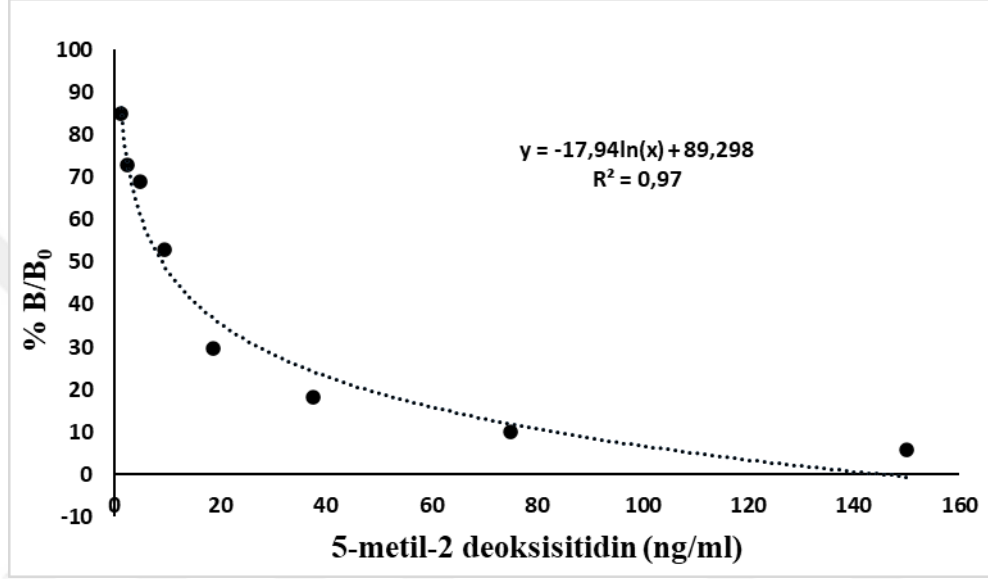
Yöntemin Esası: Kullanılan kit kompetitif ELISA yöntemiyle ölçüm yapmaktadır. Kitin prensibi, sınırlı miktarda monoklonal antikör için 5-metil-2-deoksisitidin ve 5-metil-2-deoksisitidin-AChE konjugatı (*tracer*) arasındaki rekabete dayanmaktadır. 5-metil-2-deoksisitidin konsantrasyonu değişirken tracer konsantrasyonu sabit tutulduğu için, monoklonal antikora bağlanabilen tracer miktarı kuyucuklarda bulunan 5-metil-2-deoksisitidin konsantrasyonu ile ters orantılı olmaktadır. Kuyucuklar bağlanmamış reaktiflerin uzaklaştırılması için yıkanır ve ardından AChE substratı içeren Ellman Reaktif kuyucuklara eklenir. Enzimatik reaksiyon sonucu elde edilen ürün sarı renge sahiptir ve renk şiddetinin 412 nm’de ölçülmesi ile global DNA metilasyonu hesaplanır.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Spesifik bağlanma olmayan (NSB) kuyucuklarına 100 µl tampon ve 50 µl tracer, B0 kuyucuklarına 50 µl tampon, 50 µl tracer ve 50 µl antikör çözeltisi, standart ve örnek kuyucuklarına ise 50 µl standart/örnek, 50 µl tracer ve 50 µl antikör çözeltisi eklenir. Kör kuyucuklarına ise ön inkübasyon zamanında herhangi bir çözelti eklenmez.
2. Plak 4°C’de 18 saat boyunca inkübe edilir.
3. Plak içeriği boşaltılır ve kuyucuklar yıkama çözeltisi ile 5 kez yıkanır.
4. Her kuyucuğa 200 µl Ellman reaktif eklenir.
5. Tracer (TA) kuyucuklarına 5 µl tracer eklenir.
6. Plak çalkalayıcı üzerinde ışıktan korunarak 90-120 dak süreyle inkübe edilir.
7. 412 nm’de absorbans değerleri ölçülür.

Global DNA Metilasyonu Düzeylerinin Hesaplanması: NSB ve maksimum sınır (B₀) kuyucuklarından alınan absorbans okumalarının ortalaması alınır. NSB ortalaması, B₀ ortalamasından çıkarılarak düzeltilmiş B₀ veya düzeltilmiş maksimum bağlama değeri elde edilir. Kuyucuklar için B/B₀ (Örnek veya Standart

Sınır/Maksimum Sınır) hesaplanır. Bunu yapmak için, S1 absorbansından ortalama NSB absorbansı çıkarılır ve düzeltilmiş B_0 'a bölünür. Tüm standart ve örnek kuyucukları için bu hesaplama yapılır. Standartların konsantrasyonlarına karşı B/B_0 grafiği çizilir. Logaritmik eğri çizilerek grafik denklemi elde edilir. Standart eğri grafiğinden elde edilen denklem kullanılarak örnek konsantrasyonları belirlenir. Sonuçlar pg/ng DNA şeklinde ifade edilir.



Şekil 3.13. Global DNA metilasyonu standart eğrisi.

3.4.21. Histon İzolasyonu

Yöntemin Uygulanışı:

1. Hücre pelletleri 10^7 hücre/ml konsantrasyonda olacak şekilde 1X dilüe pre-lizis tamponu ile süspande edilir. Hafifçe karıştırılarak buz üzerinde 10 dakika bekletilir.
2. Hücre lizatları 4°C'de 1 dakika boyunca 10000 rpm'de santrifüj edilir.
3. Süpernatant atılır. Hücre pelletleri 10^7 hücre/200 µl olacak şekilde lizis tamponu ile yeniden süspande edilir ve buz üzerinde 30 dakika inkübe edilir.
4. Lizat 4°C'de 5 dakika boyunca 12000 rpm'de santrifüj edilir.
5. Süpernatant temiz bir vialde alınır. Süpernatant üzerine hızlıca denge-Ditiotreitol (DTT) tamponu 0,3:1 oranında (Her 1 ml süpernatant için 0,3 ml tampon olacak şekilde) eklenir.

6. Ekstrakt -20°C 'de birkaç gün ve -80°C 'de uzun süre muhafaza edilebilir.

3.4.22. Histon H3 Asetilasyon Düzeylerinin Ölçülmesi

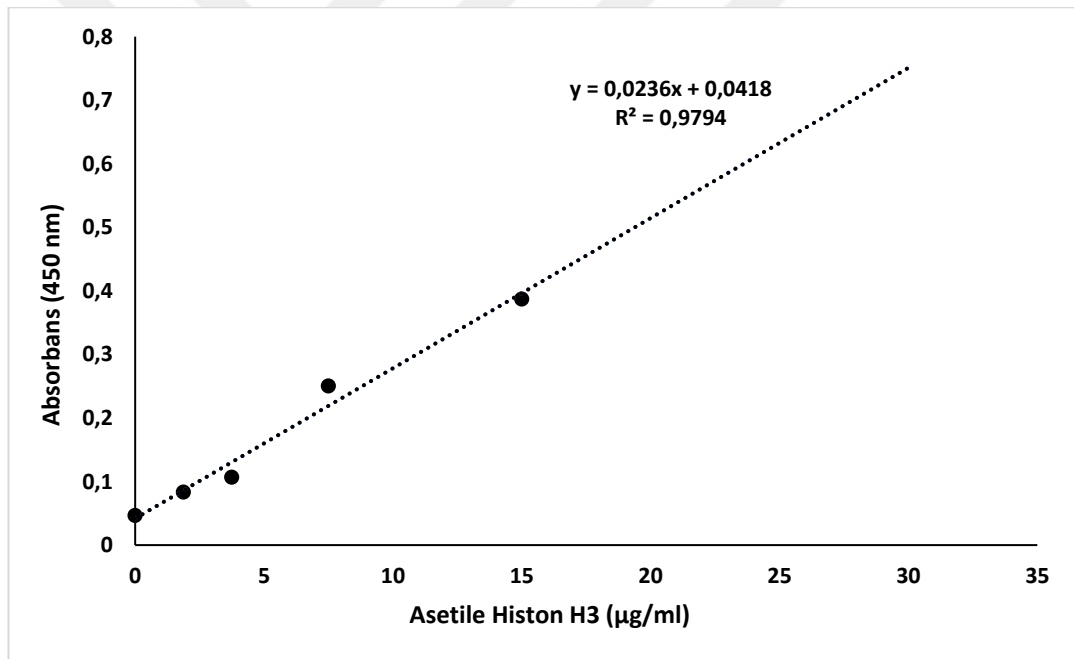
Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak insan asetile histon H3'e özgü bir antikorla kaplanmıştır. Standart ve numune çözeltileri kuyucuklara konularak çözelti içinde bulunan asetile histon H3'ün spesifik antikorlarla bağlanması sağlanır. Plak içerisinde antikorla bağlanmayan maddeler uzaklaştırıldıktan sonra asetile histon H3 için spesifik biyotin-konjuge antikorlar kuyucuklara eklenir. Ardından avidin-HRP konjugatı eklenir ve inkübe edilir. Yıkamayı takiben substrat reaktifi eklenerek mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma çözeltisi eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan sarı renkli bileşiğin absorbansı 450 nm 'de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Ekstrakte edilen histonların protein konsantrasyonu $200\text{--}400\text{ ng}/\mu\text{l}$ olacak şekilde histon tamponu (GF4) ile seyreltilir. $5\text{ }\mu\text{l}$ içerisinde $1\text{--}2\text{ }\mu\text{g}$ histon proteini olacak şekilde örnekler kuyucukların tam ortasına konur. Standartlar da $30, 15, 7,5, 3,75, 1,875\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonlarda hazırlanarak $5\text{ }\mu\text{l}$ hacimde kuyucuklara konur. Kör çözelti olarak ise GF4 kullanılır.
2. Çözeltiler birkaç kez pipetlenerek kuyucuk yüzeyine yayılır.
3. Plak 37°C 'de $60\text{--}90$ dakika inkübe edilir.
4. Kuruyan kuyucuklara $150\text{ }\mu\text{l}$ bloke tamponu (GF5) eklenir ve 37°C 'de 30 dakika inkübe edilir.
5. Kuyucuklar boşaltılır ve her kuyucuk 3 kez $150\text{ }\mu\text{l}$ dilüe yıkama çözeltisi (GF3) ile yıkanır.
6. Kuyucuklara $50\text{ }\mu\text{l}$ dilüe yakalama antikor (GF7) eklenir ve oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde 30 dakika inkübe edilir.
7. Kuyucuklar boşaltılır ve her kuyucuk 4 kez $150\text{ }\mu\text{l}$ dilüe yıkama çözeltisi (GF3) ile yıkanır.
8. Kuyucuklara $50\text{ }\mu\text{l}$ dilüe deteksiyon antikor (GF8) eklenir ve oda sıcaklığında, 30 dakika inkübe edilir.

9. Kuyucuklar boşaltılır ve her kuyucuk 4 kez 150 µl dilüe yıkama çözeltisi (GF3) ile yıkanır.
10. Kuyucuklara 100 µl substrat reaktifi (GF9) eklenir ve oda sıcaklığında, karanlıkta 2-10 dakika inkübe edilir.
11. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklara 50 µl durdurma çözeltisi (GF10) eklenir ve oluşan rengin şiddeti 450 nm’de ölçülür.

Asetile Histon H3 Düzeylerinin Hesaplanması: Standartların asetile histon H3 konsantrasyonuna karşı verdikleri absorbans değerleri grafiğe geçirilir ve lineer kalibrasyon doğrusu çizilir. Kalibrasyon doğrusunun denklemi bulunup bu denklem kullanılarak örneklerdeki asetile histon H3 düzeyleri hesaplanır. Sonuçlar µg/mg protein olarak ifade edilir.



Şekil 3.14. Asetile histon H3 standart eğrisi.

3.4.23. Histon H4 Asetilasyon Düzeylerinin Ölçülmesi

Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak insan asetile H4’e özgü bir antikorla kaplanmıştır. Standart ve numune çözeltileri kuyucuklara konularak çözelti içinde bulunan asetile H4’ün spesifik antikorlarla bağlanması sağlanır. Plak içerisinde antikorla bağlanmayan maddeler uzaklaştırıldıktan sonra asetile H4 için spesifik biyotin-

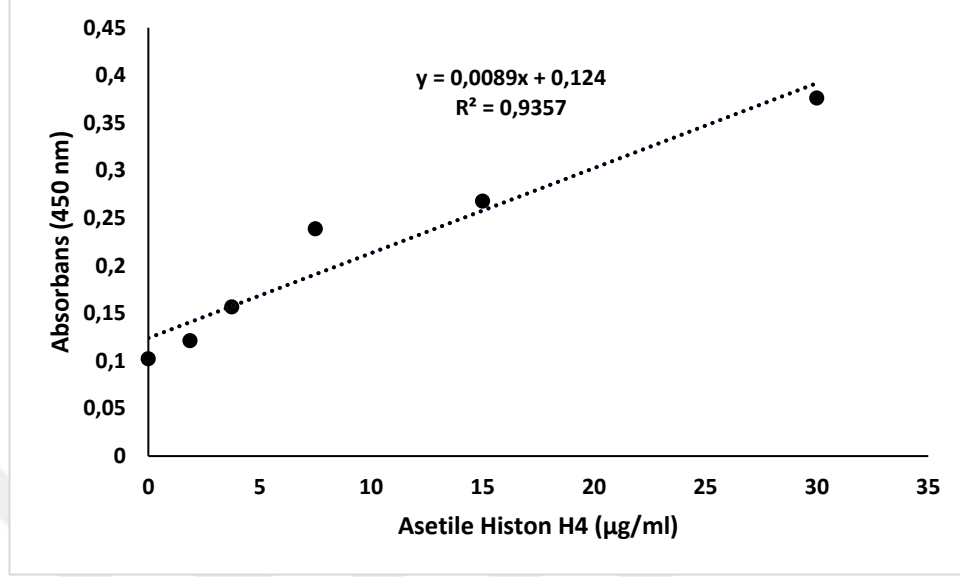
konjuge antikorlar kuyucuklara eklenir. Ardından avidin-HRP konjugatı eklenir ve inkübe edilir. Yıkamayı takiben substrat reaktifi eklenerek mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma çözeltisi eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan sarı renkli bileşiğin absorbansı 450 nm’de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Ekstrakte edilen histonların protein konsantrasyonu 200-400 ng/μl olacak şekilde histon tamponu (GE4) ile seyreltilir. 5 μl içerisinde 1-2 μg histon proteini olacak şekilde örnekler kuyucukların tam ortasına konur. Standartlar da 30, 15, 7,5, 3,75, 1,875 μg/ml konsantrasyonlarda hazırlanarak 5 μl hacimde kuyucuklara konur. Kör çözelti olarak ise GE4 kullanılır.
2. Çözeltiler birkaç kez pipetlenerek kuyucuk yüzeyine yayılır.
3. Plak 37°C’de 60-90 dakika inkübe edilir.
4. Kuruyan kuyucuklara 150 μl bloke tamponu (GE5) eklenir ve 37°C’de 30 dakika inkübe edilir.
5. Kuyucuklar boşaltılır ve her kuyucuk 3 kez 150 μl dilüe yıkama çözeltisi (GE3) ile yıkanır.
6. Kuyucuklara 50 μl dilüe yakalama antikor (GE7) eklenir ve oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde 30 dakika inkübe edilir.
7. Kuyucuklar boşaltılır ve her kuyucuk 4 kez 150 μl dilüe yıkama çözeltisi (GE3) ile yıkanır.
8. Kuyucuklara 50 μl dilüe deteksiyon antikor (GE8) eklenir ve oda sıcaklığında, 30 dakika inkübe edilir.
9. Kuyucuklar boşaltılır ve her kuyucuk 4 kez 150 μl dilüe yıkama çözeltisi (GE3) ile yıkanır.
10. Kuyucuklara 100 μl substrat reaktifi (GE9) eklenir ve oda sıcaklığında, karanlıkta 2-10 dakika inkübe edilir.
11. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklara 50 μl durdurma çözeltisi (GE10) eklenir ve oluşan rengin şiddeti 450 nm’de ölçülür.

Asetile Histon H4 Düzeylerinin Hesaplanması: Standartların asetile histon H4 konsantrasyonuna karşı verdikleri absorbans değerleri grafiğe geçirilir ve lineer kalibrasyon doğrusu çizilir. Kalibrasyon doğrusunun denklemi bulunup bu denklem

kullanılarak örneklerdeki asetile histon H4 düzeyleri hesaplanır. Sonuçlar $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein olarak ifade edilir.



Şekil 3.15. Asetile histon H4 standart eğrisi.

3.4.24. Çoklu Histon H3 Modifikasyon Düzeylerinin Ölçülmesi

Yöntemin Esası: EpiQuik™ Histon H3 Modifikasyon Multipleks Test Kiti (Kolorimetrik), aynı anda birden fazla histon H3 modifikasyonunu ölçmek için tasarlanmıştır. Analizde spesifik bölgelerde modifiye edilen her histon H3, kuyucukların üzerine kaplanan ve spesifik olarak uygun histon modifikasyon modelini hedefleyen bir antikor tarafından yakalanmaktadır. Daha sonra tutunan modifiye histon H3'ler bir deteksiyon antikor ve substrat çözeltisi ile tespit edilir. Örneklerdeki modifiye histonun oranı, 450 nm'de ölçülen renk şiddeti ile doğru orantılıdır.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Kör kuyucuklarına 49 μl antikor tamponu eklenir.
2. Kontrol kuyucuklarına 49 μl antikor tamponu ve 1 μl dilüe deney kontrol protein çözeltisi (5 ng/ μl ve 25 ng/ μl) eklenir.
3. Örnek kuyucuklarına ise eklenen toplam histon proteini konsantrasyonu 50-100 ng aralığında olacak şekilde 1-4 μl arası örnek ve toplam hacim 50 μl olacak şekilde 46-49 μl arası antikor tamponu eklenir.
4. Plak 37°C'de 2 saat boyunca inkübe edilir.

5. İnkübasyon sonunda kuyucuklar boşaltılır ve 3 kez 150 µl'şer dilüe yıkama tamponu ile yıkanır.
6. Kuyucuklara 50 µl deteksiyon antikoru eklenir.
7. Plak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir.
8. İnkübasyon sonunda kuyucuklar boşaltılır ve 4 kez 150 µl'şer dilüe yıkama tamponu ile yıkanır.
9. Kuyucuklara 50 µl substrat çözeltisi eklenir. Daha sonra plak karanlıkta ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilir.
10. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklara 50 µl durdurma çözeltisi eklenir ve oluşan rengin şiddeti 450 nm'de ölçülür.

Histon H3 Modifikasyonlarının Hesaplanması:

- Tüm okunan absorbans değerlerinden kör absorbans değeri çıkartılır.
- Her kuyucukta okunan absorbans değeri kuyucuğa konulan toplam histon proteini (ng cinsinden) miktarına bölünür ve değerler kaydedilir.
- Total H3 ve modifiye H3 miktarları deney kontrol proteini kuyucuklarından elde edilen değere bölünerek konsantrasyon hesaplanır ve sonuçlar ng/µg protein cinsinden ifade edilir.
- Son olarak her histon H3 modifikasyonu için modifiye histon miktarı toplam örnekteki toplam histon H3 miktarına oranlanarak % modifikasyon cinsinden belirlenir.

3.4.25. Çoklu Histon H4 Modifikasyon Düzeylerinin Ölçülmesi

Yöntemin Esası: EpiQuik™ Histon H4 Modifikasyon Multiplex Test Kiti (Kolorimetrik), aynı anda birden fazla histon H4 modifikasyonunu ölçmek için tasarlanmıştır. Analizde spesifik bölgelerde modifiye edilen her histon H4, kuyucukların üzerine kaplanan ve spesifik olarak uygun histon modifikasyon modelini hedefleyen bir antikor tarafından yakalanmaktadır. Daha sonra tutunan modifiye H4'ler bir deteksiyon antikoru ve substrat çözeltisi ile tespit edilir. Örneklerdeki modifiye histonun oranı, 450 nm'de ölçülen renk şiddeti ile doğru orantılıdır.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Kör kuyucuklarına 49 μ l antikor tamponu eklenir.
2. Kontrol kuyucuklarına 49 μ l antikor tamponu ve 1 μ l dilüe deney kontrol protein çözeltisi (5 ng/ μ l ve 25 ng/ μ l) eklenir.
3. Örnek kuyucuklarına ise eklenen toplam histon proteini konsantrasyonu 50-100 ng aralığında olacak şekilde 1-4 μ l arası örnek ve toplam hacim 50 μ l olacak şekilde 46-49 μ l arası antikor tamponu eklenir.
4. Plak 37°C’de 2 saat boyunca inkübe edilir.
5. İnkübasyon sonunda kuyucuklar boşaltılır ve 3 kez 150 μ l’şer dilüe yıkama tamponu ile yıkanır.
6. Kuyucuklara 50 μ l deteksiyon antikoru eklenir.
7. Plak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir.
8. İnkübasyon sonunda kuyucuklar boşaltılır ve 4 kez 150 μ l’şer dilüe yıkama tamponu ile yıkanır.
9. Kuyucuklara 50 μ l substrat çözeltisi eklenir. Daha sonra plak karanlıkta ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilir.
10. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklara 50 μ l durdurma çözeltisi eklenir ve oluşan rengin şiddeti 450 nm’de ölçülür.

Histon H4 Modifikasyonlarının Hesaplanması:

- Tüm okunan absorbans değerlerinden kör absorbans değeri çıkartılır.
- Her kuyucukta okunan absorbans değeri kuyucuğa konulan toplam histon proteini (ng cinsinden) miktarına bölünür ve değerler kaydedilir.
- Total H4 ve modifiye H4 miktarları deney kontrol proteini kuyucuklarından elde edilen değere bölünerek konsantrasyon hesaplanır ve sonuçlar ng/ μ g protein cinsinden ifade edilir.
- Son olarak her H4 modifikasyonu için modifiye histon miktarı toplam örnekteki toplam H4 miktarına oranlanarak % modifikasyon cinsinden belirlenir.

3.4.26. Histon Deasetilaz 3 Düzeylerinin Ölçülmesi

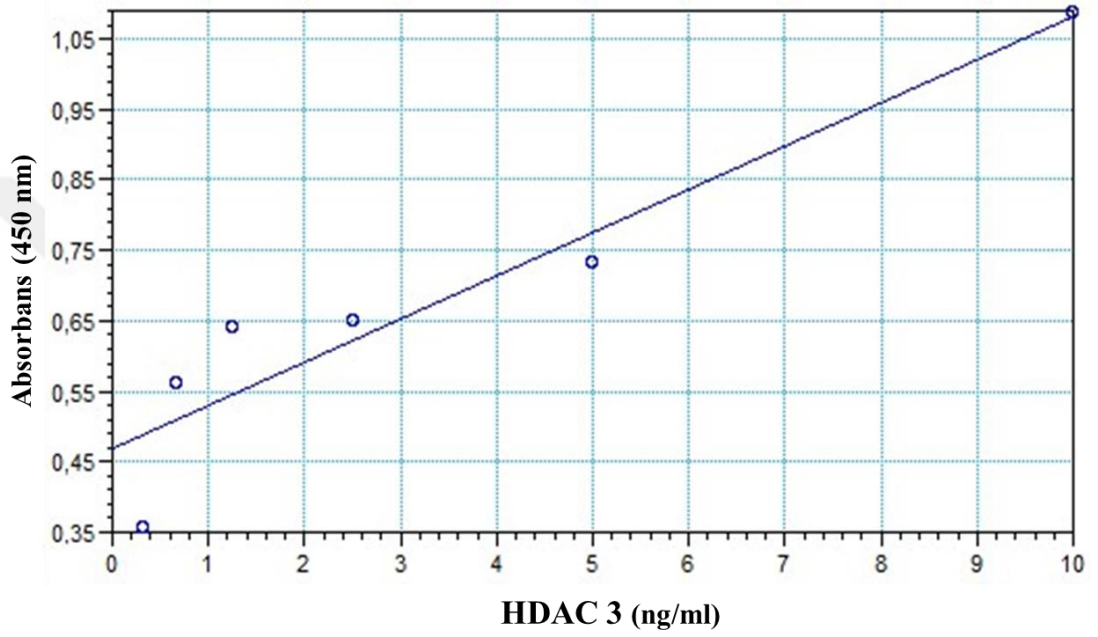
Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak insan histon HDAC3'e özgü bir antikorla kaplanmıştır. Standart ve numune çözeltileri kuyucuklara konularak çözelti içinde bulunan histon HDAC3'ün spesifik antikorlarla bağlanması sağlanır. Plak içerisinde antikorla bağlanmayan maddeler uzaklaştırıldıktan sonra asetile H4 için spesifik biyotin-konjuge antikorlar kuyucuklara eklenir. Ardından avidin-HRP konjugatı eklenir ve inkübe edilir. Yıkamayı takiben substrat reaktifi eklenerek mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma çözeltisi eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan sarı renkli bileşiğin absorbansı 450 nm'de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Kit içerisinde bulunan kaplanmış 96 kuyucuklu plağın her kuyucuğuna 100 µL standart, kör veya hücre lizatı eklenir. Kör çözelti olarak standart/örnek seyreltme çözeltisi kullanılır. Örnek/standart/kör eklendikten sonra plak yavaşça çalkalanır ve üzeri kapatılarak 37°C'ye ayarlanmış etüvde 90 dakika inkübe edilir.
2. Kuyucuklardaki sıvı mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara çoklu mikropipetle hızlıca 100 µL biyotinlenmiş deteksiyon çalışma çözeltisi eklenir. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üzeri kapatılarak 37°C'de 60 dakika inkübe edilir.
3. Kuyucuklardaki çözelti mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara 200 µl yıkama çözeltisi eklenir 1-2 dakika bekletilir ve mikropipet yardımıyla çözelti çekilir. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanır. Son yıkama işleminden sonra plak adsorban kâğıt yardımıyla iyice kurutulur.
4. Her kuyucuğa 100 µL HRP konjugat çalışma çözeltisi eklenir. Plak yavaşça çalkalandıktan sonra üstü kapatılarak 37°C'de 60 dakika inkübe edilir.
5. İnkübasyon süresi sonunda plak 4 kez yıkanır.
6. Her kuyucuğa 90 µl substrat reaktifi eklenir. Plağın üstü kapatılır ve ışık almayacak şekilde 15-30 dakika 37°C'de inkübe edilir. Reaksiyon süresi renk oluşumuna bağlı olarak değiştirilebilir.
7. Son olarak mikropipet yardımı ile hızlıca 50 µl durdurma çözeltisi eklenir.

8. Kuyucukların absorbansı spektrofotometre ile 450 nm’de ölçülür.

Histon Deasetilaz 3 Düzeylerinin Hesaplanması: HDAC3 düzeyleri Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanır. Standart, örnek ve kontrol gruplarına ait absorbans değerleri programa girilir. Programda yardımıyla lineer standart eğri elde edilir (Şekil 3.16). Örneklerdeki HDAC3 düzeyleri bu denkleme göre saptanmıştır. Sonuçlar ng/mg protein cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 3.16. Histon deasetilaz 3 standart eğrisi.

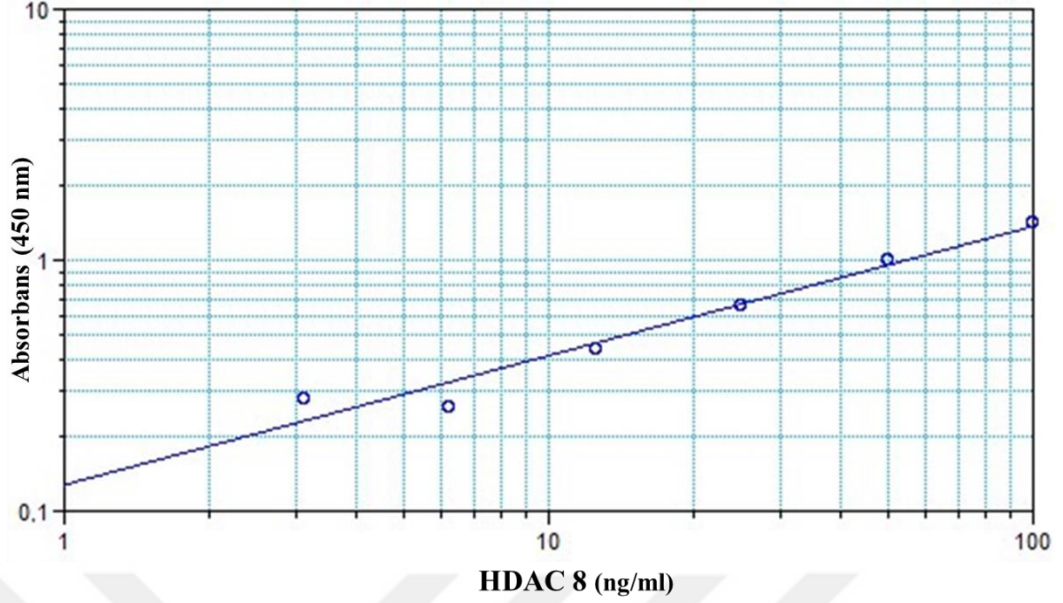
3.4.27. Histon Deasetilaz 8 Düzeylerinin Ölçülmesi

Yöntemin Esası: Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plak insan histon HDAC8’e özgü bir antikorla kaplanmıştır. Standart ve numune çözeltileri kuyucuklara konularak çözelti içinde bulunan histon HDAC8’in spesifik antikorlarla bağlanması sağlanır. Plak içerisinde antikorla bağlanmayan maddeler uzaklaştırıldıktan sonra asetile histon H4 için spesifik biyotin-konjuge antikorlar kuyucuklara eklenir. Ardından avidin-HRP konjugatı eklenir ve inkübe edilir. Yıkamayı takiben substrat reaktifi eklenerek mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma çözeltisi eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırılır. Oluşan sarı renkli bileşiğin absorbansı 450 nm’de ölçülür.

Yöntemin Uygulanışı:

1. Kit içerisinde bulunan kaplanmış 96 kuyucuklu plağın her kuyucuğuna 50 µL standart, veya hücre lizati eklenir. Kör kuyucuklarına bu aşamada çözelti eklenmez. Örnek/standart eklendikten sonra kör kuyucukları hariç er kuyucuğa 50 µL HRP konjugat çalışma çözeltisi eklenir.
2. Plak yavaşça çalkalanır ve üzeri kapatılarak 37°C'ye ayarlanmış etüvde 60 dakika inkübe edilir.
3. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklardaki çözelti mikropipet yardımıyla çekilir. Kuyucuklara 200 µl yıkama çözeltisi eklenir 1-2 dakika bekletilir ve mikropipet yardımıyla çözelti çekilir. Bu yıkama işlemi 2 kez tekrarlanır. Son yıkama işleminden sonra plak adsorban kâğıt yardımıyla iyice kurutulur.
4. Her kuyucuğa sırasıyla önce 50 µL kromojen solüsyonu A daha sonra 50 µL kromojen solüsyonu B eklenir. Plağın üstü kapatılır ve ışık almayacak şekilde 15-30 dakika 37 0C'de inkübe edilir. Reaksiyon süresi renk oluşumuna bağlı olarak değiştirilebilir.
5. Son olarak mikropipet yardımı ile hızlıca 50 µl durdurma çözeltisi eklenir.
6. Kuyucukların absorbansı spektrofotometre ile 450 nm'de ölçülür.

Histon Deasetilaz 8 Düzeylerinin Hesaplanması: HDAC8 düzeyleri Molecular Devices-Softmax® programı kullanılarak hesaplanır. Standart, örnek ve kontrol gruplarına ait absorbans değerleri programa girilir. Programda bulunan log-log algoritması kullanılarak standart eğri elde edilir (Şekil 3.17). Örneklerdeki HDAC8 düzeyleri bu denkleme göre saptanmıştır. Sonuçlar ng/mg protein cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 3.17. Histon deasetilaz 8 standart eğrisi.

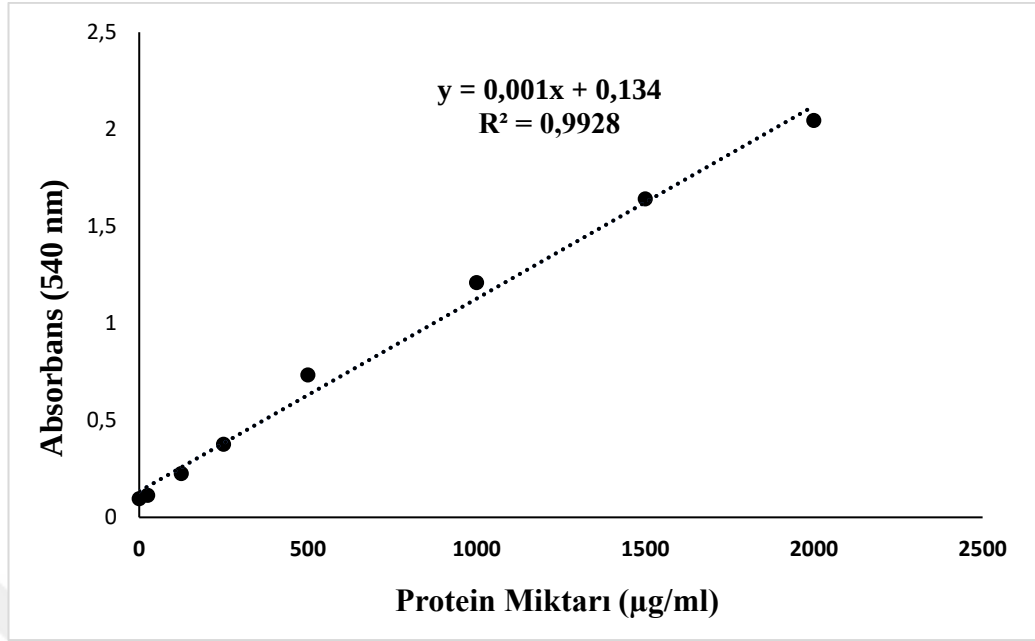
3.4.28. Total Protein Düzeylerinin Ölçülmesi

Yöntemin Esası: Yöntem, alkali koşullar altında iki değerlikli bakır iyonunun, tartarat varlığında, tek değerlikli bir iyon indirgendığı peptit bağları ile reaksiyona girerek bir kompleks oluşturması prensibine dayanmaktadır. Daha sonra oluşan bu kompleksin Folin-Fenol reaktifi ile indirgenmesiyle oluşan mavi-mor rengin 540 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile hesaplama yapılır (244).

Yöntemin Uygulanışı:

1. 96 kuyucuklu plağa 40’ar µl kör, standart veya örnek eklenir.
2. Üzerine 40 µl taze hazırlanmış bakır reaktifi eklenir.
3. Plak oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilir.
4. İnkübasyon sonrasında kuyucuklara 120 µL folin fenol çözeltisi ilave edilir.
5. Plak 10 dakika 50°C’lik su banyosunda inkübe edilir.
6. İnkübasyon süresi bitince kuyuklarda oluşan renk şiddeti 540 nm’de ölçülür.

Toplam Protein Düzeylerinin Hesaplanması: Standartların protein konsantrasyonuna karşı verdikleri absorbans değerleri grafiğe geçirilir ve lineer kalibrasyon doğrusu çizilir. Kalibrasyon doğrusunun denklemi bulunup bu denklem kullanılarak örneklerdeki protein miktarları hesaplanır. Sonuçlar µg protein/ml olarak ifade edilir.



Şekil 3.18. Protein standart eğrisi.

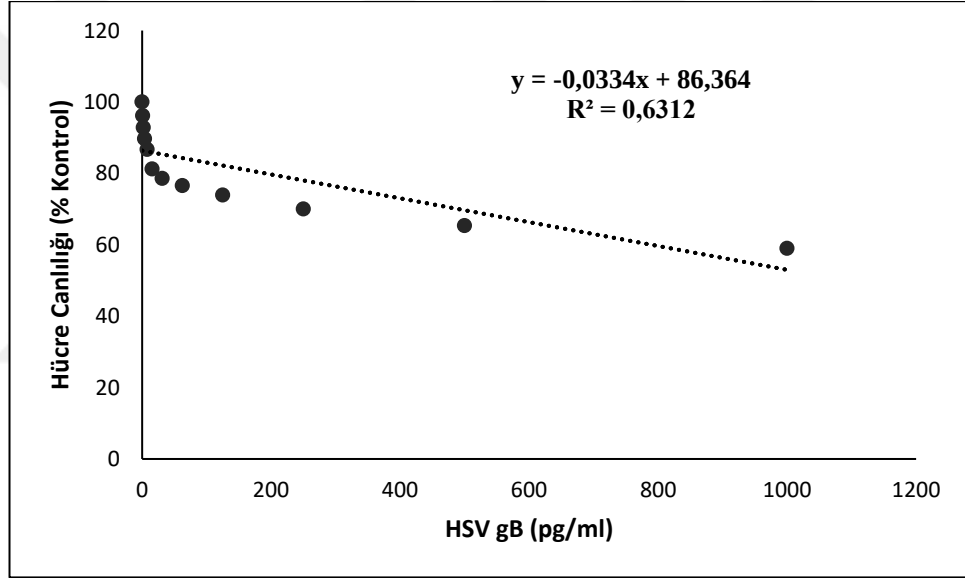
3.4.15. Verilerin Değerlendirilmesi

İstatistiksel analizde SPSS 17 (Chicago, IL) programı kullanılmıştır. Tüm gruplardan elde edilen sonuçların karşılaştırılması tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Student t testi kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD (Standart sapma) olarak ifade edilmiştir.

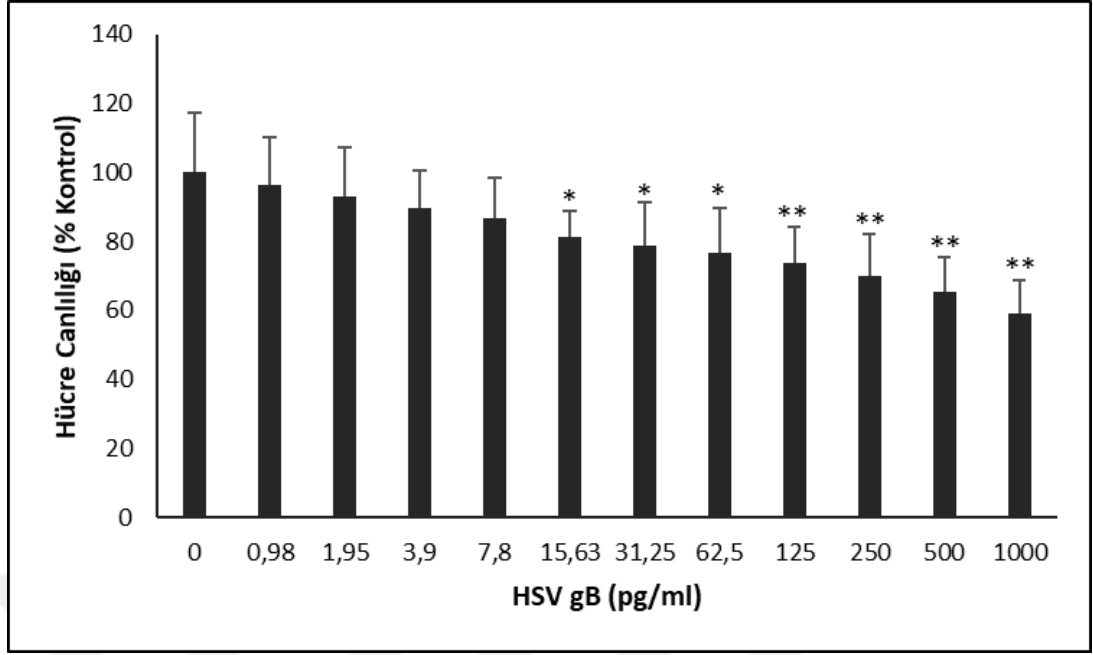
4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığı

SH-SY5Y hücreleri 0-1000 pg/ml konsantrasyon aralığında HSV-gB'ye 24 saat maruz bırakılarak MTT yöntemiyle hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Hücre canlılığı kontrol grubu hücrelerine göre % canlılık olarak hesaplanmıştır. Deneyler sonucunda HSV-gB için hücre canlılığında %50 inhibisyona neden olan konsantrasyon (IC₅₀) ve hücre canlılığında %20 inhibisyona neden olan konsantrasyon (IC₂₀) dozları sırasıyla 1088 ve 190,5 pg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1., Şekil 4.2. ve Tablo 4.1.).



Şekil 4.1. SH-SY5Y hücre hattında HSV glikoprotein B (HSV-gB)'nin (0-1000 pg/ml) hücre canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.2. SH-SY5Y hücre hattında HSV glikoprotein B (HSV-gB)'nin (0-1000 pg/ml) hücre canlılığı üzerine etkisi.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

*($p < 0,05$) ve **($p < 0,001$) üssel işaretlerini taşıyan gruplar kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklıdır.

Tablo 4.1. HSV-gB için kullanılan konsantrasyon ve hücre canlılıkları

HSV-gB (pg/ml)	Hücre canlılığı (% kontrol)
0	100±17,05
0,97	96,13±13,95
1,95	92,79±14,36
3,9	89,65±10,7
7,81	86,66±11,63
15,62	81,18±7,65*
31,25	78,56±12,56*
62,5	76,55±13,19*
125	73,88±10,48**
250	69,97±12,29**
500	65,32±9,95**
1000	58,94±9,66**

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

*($p<0,05$) ve **($p<0,001$) üssel işaretlerini taşıyan gruplar kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklıdır.

4.2. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri

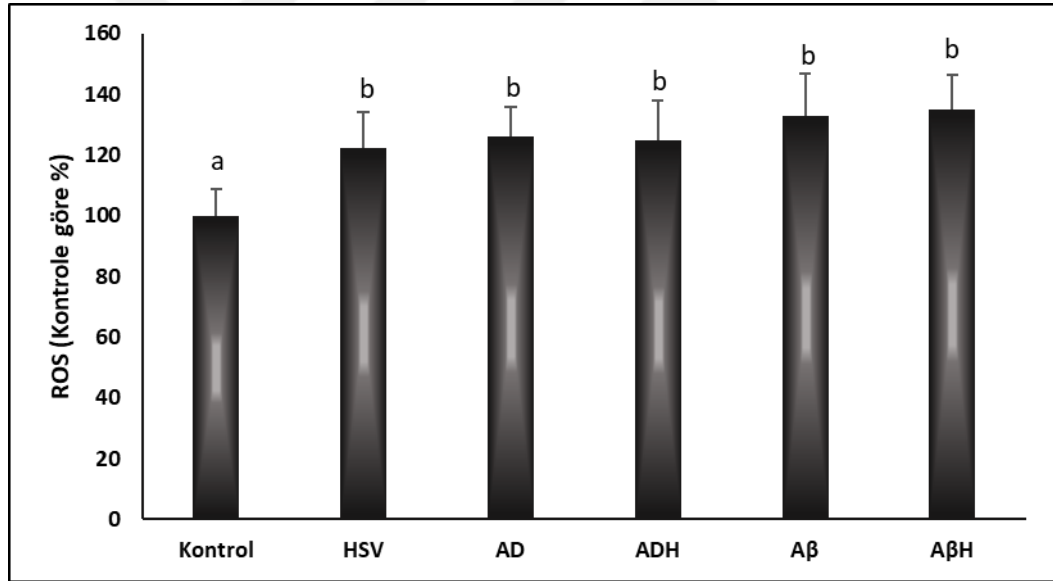
Çalışma gruplarında belirlenen hücre içi ROS kontrole kıyasla % ROS olarak hesaplanmış ve Şekil 4.3. ve Tablo 4.2.'de verilmiştir. Tüm çalışma gruplarında hücre içi ROS düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır (HSV; %22,1, AD; %26, ADH; %24,8, A β ; %33 ve ABH; %31,6, $p<0,05$). Çalışma gruplarının kendi arasında ise anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Tablo 4.2. Çalışma gruplarında hücre içi ROS düzeyleri.

Çalışma Grupları	%ROS
Kontrol	100±8,9 ^a
HSV	122,11±12,03 ^b
AD	125,98±9,68 ^b
ADH	124,81±13,3 ^b
A β	132,96±13,82 ^b
A β H	131,63±11,31 ^b

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

**Şekil 4.3.** Çalışma gruplarında hücre içi ROS düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

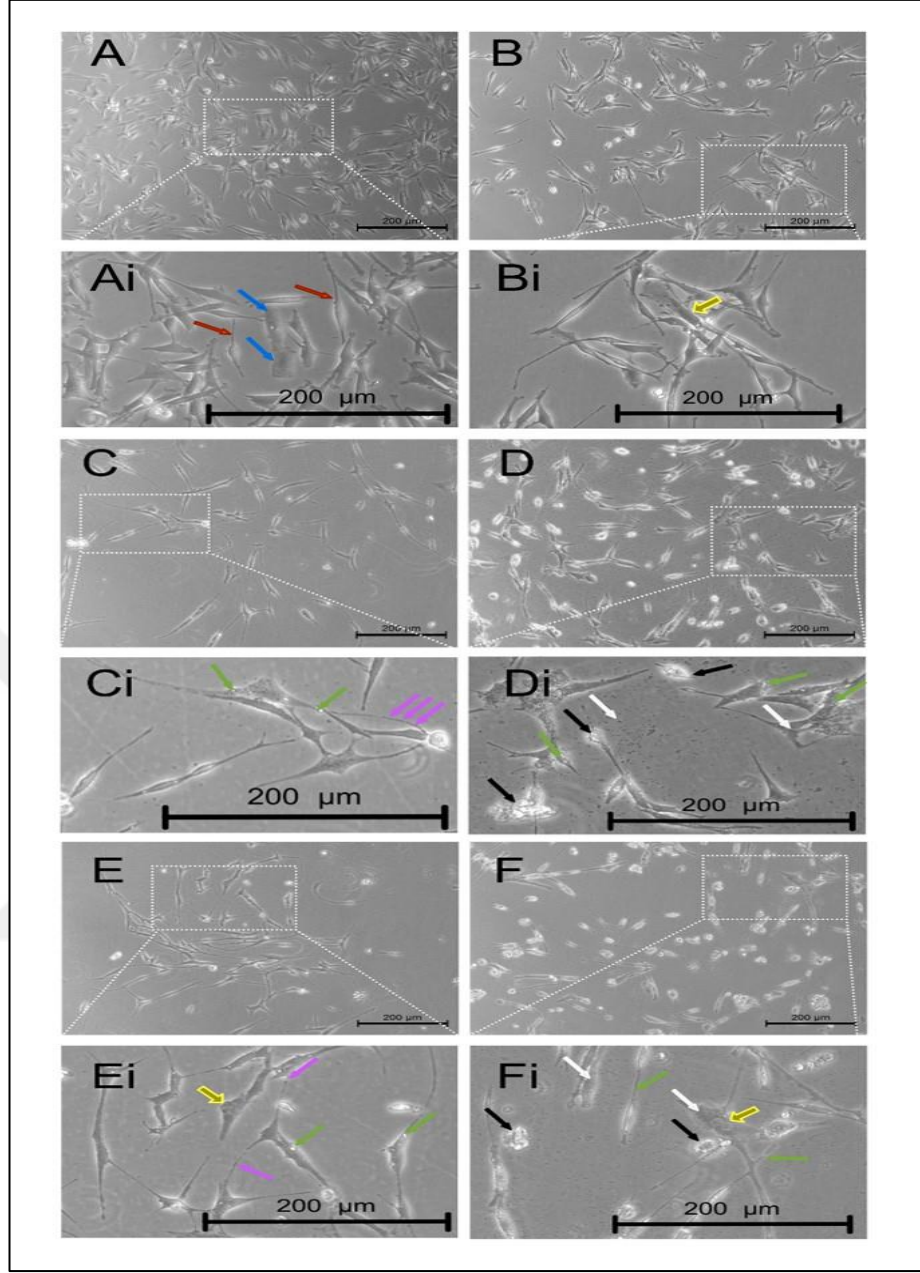
4.3. Sitopatoloji

Kontrol grubunda SH-SY5Y hücrelerinin epitel benzeri hücreler ve kısa dendrit ve aksonlu nöron benzeri hücreler ile heterojen bir popülasyon gösterdiği gözlenmiştir. Diğer gruplarda (HSV, AD, A β , ADH ve A β H grupları) hücre sayısı ve epitel benzeri hücre sayısı kontrol grubuna göre azaldığı görülmüştür. Bu gruplarda nöron benzeri hücreler ve nöronal uçlar boyunca varisler görülmüştür.

HSV grubunda az sayıda iki çekirdekli hücre gözlenmiştir. Gözlenen bu iki çekirdekli hücreler hücre bölünmesinin durduğunu göstermektedir. Hücre bölünmesinin durması hücre yaşlanmasını desteklerken, bu grupta gözlenen uzun dendrit ve aksonların varlığı nöronal farklılaşmayı desteklemiştir.

AD grubundaki hücrelerin sitoplazmalarında hücrelerin daha iğ şeklinde olduğu; daha uzun ve daha ince nöronal uçlara sahip olduğu ve dağınık vakuoller barındırdığı görülmüştür. Bu grupta ince uzun nöronal uçlar boyunca varisler belirgin gözlenmiştir.

A β grubunda sitoplazmada ve ayrıca hücre çevresinde koyu renkli birikimlerin belirgin olduğu görülmüştür. Düzensiz sınırlara sahip nöron benzeri hücreler ve hücre kümelerini oluşturan çok sayıda yuvarlak, ayırık hücre, bu gruptaki hücre dejenerasyonunu yansıtmaktadır. ADH grubunda çift çekirdekli hücreler ve vakuoller gözlenmiştir. A β H grubunda sitoplazmada birikim gösteren çift çekirdekli hücreler ve çoklu vakuolleri belirgin dejenere hücreler incelendi ve bu grupta nöronal uçlarda bile vakuollerin olduğu görülmüştür (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Çalışma gruplarının sitopatolojisi.

Kontrol grubunda kısa nöronal uçlar içeren epitel benzeri hücreler (**mavi ok**) ve nöron benzeri hücreler (**kırmızı ok**). HSV, ADH ve AβH gruplarında iki çekirdekli (**sarı ok**) hücreler. AD ve ADH gruplarında daha uzun ve ince nöronal uçlar, hücrelerin sitoplazmasında vakuoller (**yeşil ok**) ve ince uzun nöronal uçlar boyunca varisler (**pembe ok**) ile piramidal şekilli hücreler. Aβ ve Aβ H grubundaki hücrelerin sitoplazmasında ve ayrıca hücrelerin çevresinde kofullar (**yeşil ok**) ve küçük yuvarlak koyu renkli birikimler (**beyaz ok**).

Bu gruplarda çok sayıda dejenere hücre (siyah ok) da görülmektedir. A) Kontrol B) HSV C) AD D) Aβ E) ADH ve F) AβH

4.4. Amiloid Beta 1-42 Düzeyleri

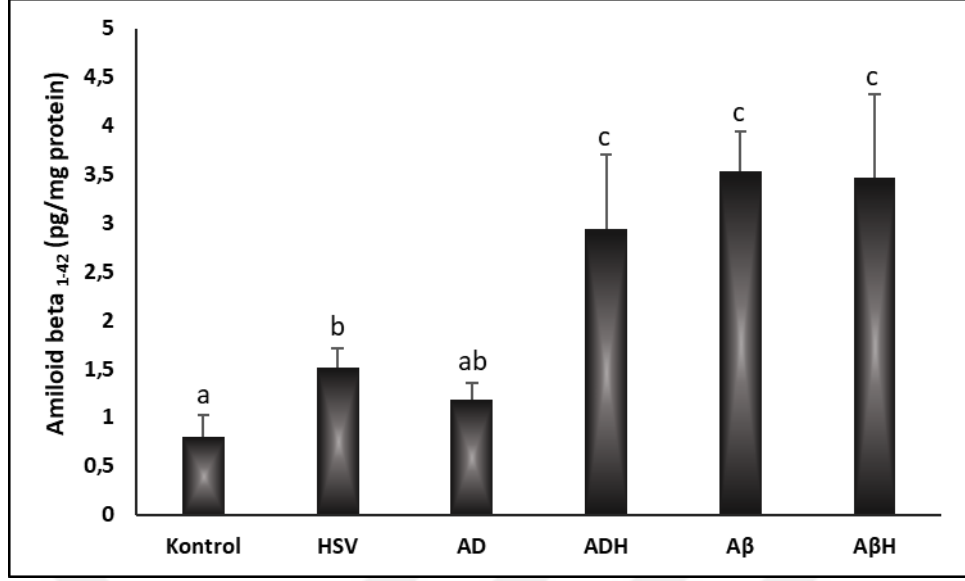
Çalışma gruplarına ait hücre lizatlarındaki $A\beta_{1-42}$ düzeyleri Tablo 4.3. ve Şekil 4.5'te verilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında HSV grubunda $A\beta_{1-42}$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış (%90,6) olmuştur ($p<0,05$). AD grubunda da kontrol grubuna göre %47,8 artış olmuştur; ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). ADH, $A\beta$ ve $A\beta H$ gruplarına bakıldığında ise tüm gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış (sırasıyla 2,6-kat, 3.4-kat ve 3,3-kat,) olmuştur ($p<0,05$). ADH grubu ve AD grubu kendi arasında kıyaslandığında, ADH grubunda $A\beta_{1-42}$ düzeyinin AD grubundan 1,5 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). İki farklı Alzheimer modeli (AD ve $A\beta$) birbiriyle kıyaslandığında ise $A\beta$ grubunda $A\beta_{1-42}$ düzeyinin AD grubundan 2 kat fazla olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Tablo 4.3. Amiloid beta 1-42 düzeyleri.

Çalışma Grupları	$A\beta_{1-42}$ Düzeyleri (pg/mg protein)
Kontrol	$0,80\pm0,22^a$
HSV	$1,52\pm0,19^b$
AD	$1,18\pm0,17^{ab}$
ADH	$2,94\pm0,77^c$
$A\beta$	$3,53\pm0,42^c$
$A\beta H$	$3,46\pm0,86^c$

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$).



Şekil 4.5. Amiloid beta 1-42 düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a,b,c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.5. Amiloid Prekürsör Protein Düzeyleri

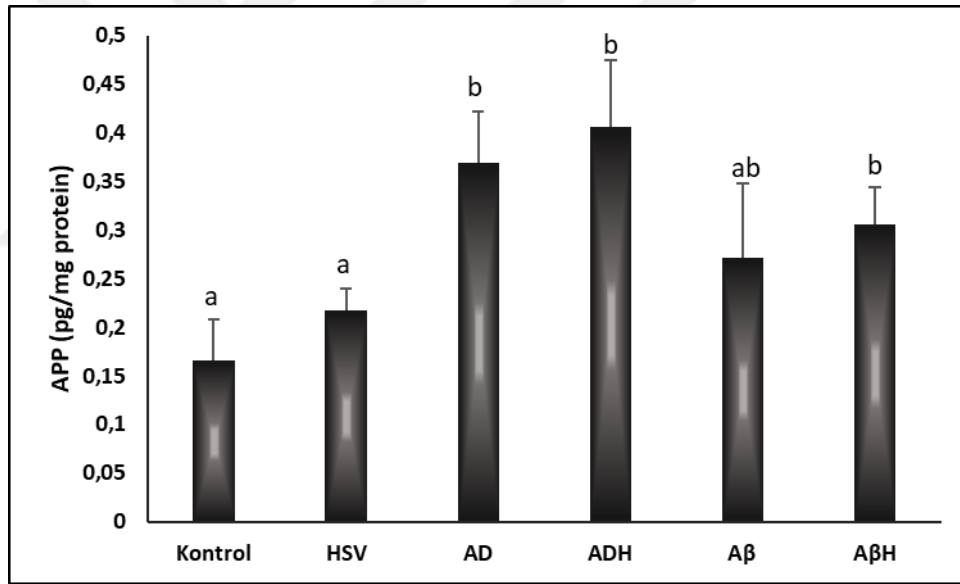
Çalışma gruplarına ait hücre lizatlarındaki APP düzeyleri Tablo 4.4. ve Şekil 4.6.'te verilmiştir. APP protein düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla en fazla artış AD ve ADH gruplarında (1,2 ve 1,5-kat, sırasıyla) olmuştur ($p < 0,05$). ADH grubundaki artış AD grubundaki artıştan %10 daha fazla olmasına rağmen iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$). HSV ve Aβ gruplarında APP düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla arttığı (sırasıyla %31 ve %63); ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). APP düzeyi AβH grubunda ise kontrol grubuna kıyasla 84% artmıştır ($p < 0,05$).

Tablo 4.4. Amiloid prekürsör protein düzeyleri.

Çalışma Grupları	APP Düzeyleri (pg/mg protein)
Kontrol	0,17±0,04 ^a
HSV	0,22±0,02 ^a
AD	0,37±0,05 ^b
ADH	0,41±0,07 ^b
A β	0,27±0,08 ^{ab}
A β H	0,31±0,04 ^b

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a,b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$).

**Şekil 4.6.** APP düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a,b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$).

4.6. Tau Proteini Düzeyleri

Çalışma gruplarına ait hücre lizatlarındaki hiperfosforile Tau proteini düzeyleri Tablo 4.5. ve Şekil 4.7.'da verilmiştir. Hiperfosforile Tau proteini düzeyleri kontrol grubuna kıyasla HSV, AD ve ADH gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p<0,05$) artmıştır (%93,4, %127,4 ve %117,3, sırasıyla). A β ve A β H gruplarında da

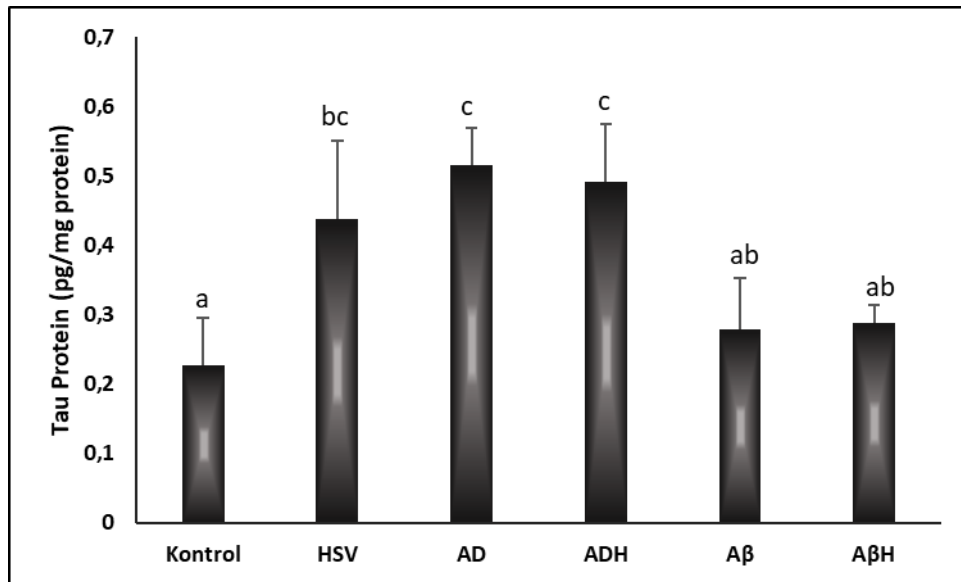
kontrol grubuna göre bir artış gözlenmekle beraber (%23 ve %27,1, sırasıyla) bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). İki Alzheimer grubu birbirleriyle karşılaştırıldığında ise AD grubundaki artışın A β grubundan %84,9 daha fazla olduğu ve aralarındaki farkın anlamlı düzeyde olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Tablo 4.5. Tau proteini düzeyleri.

Çalışma Grupları	Tau Protein Düzeyleri (pg/mg protein)
Kontrol	0,23 $\pm$ 0,07 ^a
HSV-gB	0,44 $\pm$ 0,11 ^{bc}
AD	0,51 $\pm$ 0,05 ^c
ADH	0,49 $\pm$ 0,08 ^c
A β	0,28 $\pm$ 0,07 ^{ab}
A β H	0,29 $\pm$ 0,02 ^{ab}

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a,b,c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$).



Şekil 4.7. Tau proteini düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$).

4.7. Kompleman Protein C1q Düzeyleri

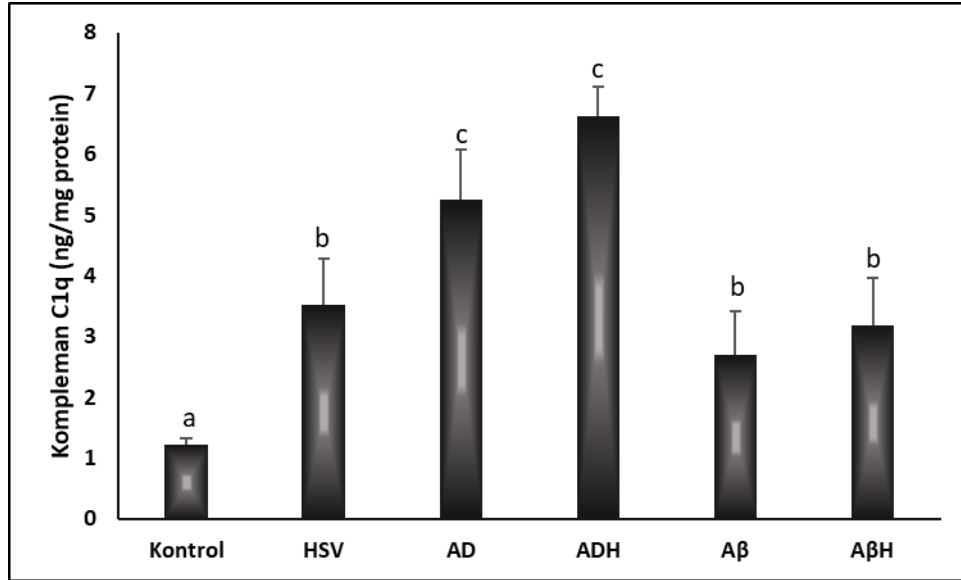
Çalışma gruplarına ait hücre süpernatantlarında ölçülen kompleman protein C1q düzeyleri Tablo 4.6 ve Şekil 4.8’de verilmiştir. Tüm çalışma gruplarında hücre içi C1q düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır (HSV; %187,92, AD; %330,25, ADH; %442,66, A β ; %121,26 ve A β H; %161,04, $p < 0,05$). En çok artış AD ve ADH gruplarında gözlemlendiği ve bu gruplardaki artışın diğer çalışma gruplarındaki artıştan anlamlı düzeyde fazla olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). İki Alzheimer grubu birbirleriyle karşılaştırıldığında ise AD grubundaki artışın A β grubundan %94,49 daha fazla olduğu ve aralarındaki farkın anlamlı düzeyde olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Ayrıca alzheimer gruplarına kombine olarak HSV-gB uygulanmasının C1q düzeylerindeki artışı arttırdığı (ADH grubundaki artış AD grubundan %26,13 ve ABH grubundaki artış AB grubundan %17,98 daha fazla); ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$).

Tablo 4.6. Kompleman Protein C1q düzeyleri.

Çalışma Grupları	C1q Düzeyleri (ng/mg protein)
Kontrol	1,22 $\pm$ 0,10 ^a
HSV	3,51 $\pm$ 0,77 ^b
AD	5,25 $\pm$ 0,83 ^c
ADH	6,62 $\pm$ 0,50 ^c
A β	2,70 $\pm$ 0,71 ^b
A β H	3,18 $\pm$ 0,78 ^b

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a,b,c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).



Şekil 4.8. Kompleman Protein C1q düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a,b,c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.8. Kompleman Protein C3 Düzeyleri Düzeyleri

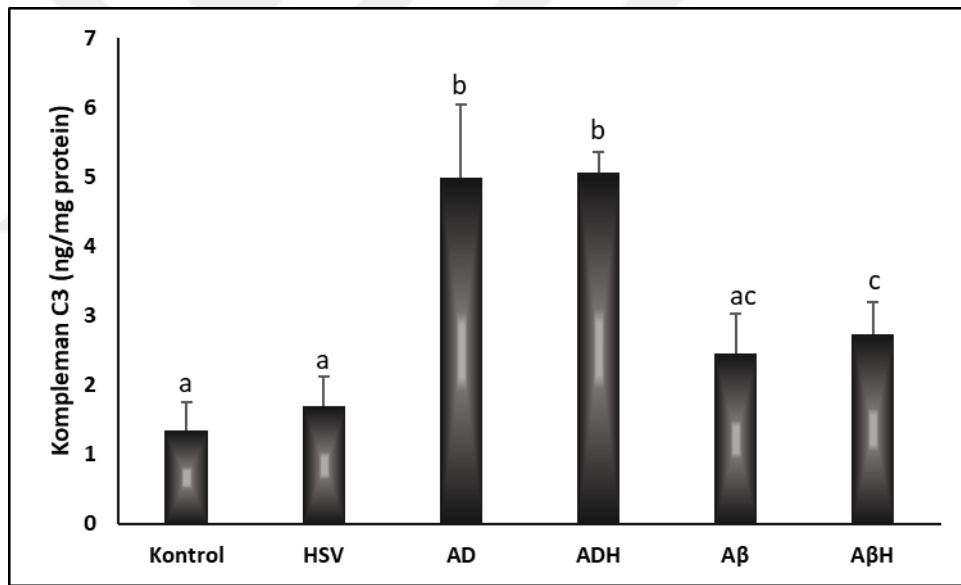
Çalışma gruplarına ait hücre süpernatantlarında ölçülen kompleman protein C3 düzeyleri Tablo 4.7 ve Şekil 4.9’da verilmiştir. HSV grubunda C3 düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla %25 arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Kontrol grubuna göre en fazla artış ise AD (~3 kat, $p < 0,05$) ve ADH (~3 kat, $p < 0,05$) gruplarında gözlenmiştir. Aβ grubunda ölçülen C3 düzeyinin kontrol grubundan %80,6 daha fazla olmasına rağmen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p > 0,05$). Bu grubun HSV-gB ile kombine edilmesiyle oluşturulan AβH grubunda ise kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğu gözlenmiştir (~2 kat, $p < 0,05$). İki Alzheimer grubu birbirleriyle karşılaştırıldığında ise AD grubundaki artışın Aβ grubundan ~2 kat daha fazla olduğu ve aralarındaki farkın anlamlı düzeyde olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Ayrıca, Alzheimer gruplarına kombine olarak HSV-gB uygulanmasının C3 düzeylerindeki artışı arttırdığı (ADH grubundaki artış AD grubundan %1,44 ve ABH grubundaki artış AB grubundan %11,44 daha fazla); ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$).

Tablo 4.7. Kompleman protein C3 düzeyleri.

Çalışma Grupları	C3 Düzeyleri (ng/mg protein)
Kontrol	1,36±0,40 ^a
HSV	1,70±0,42 ^a
AD	4,99±1,04 ^b
ADH	5,07±0,29 ^b
A β	2,45±0,59 ^{ac}
A β H	2,73±0,47 ^c

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a,b,c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$).

**Şekil 4.9.** Kompleman protein C3 düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$).

4.8. Kompleman Protein C6 Düzeyleri Düzeyleri

Çalışma gruplarına ait hücre süpernatantlarında ölçülen kompleman protein C6 düzeyleri Tablo 4.8 ve Şekil 4.10'da verilmiştir. Tüm çalışma gruplarında C6 düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır (HSV-gB; %53,59, AD; %207,53, ADH; %254,77, A β ; %120,17 ve ABH; %134,56, $p<0,05$). İki Alzheimer grubu

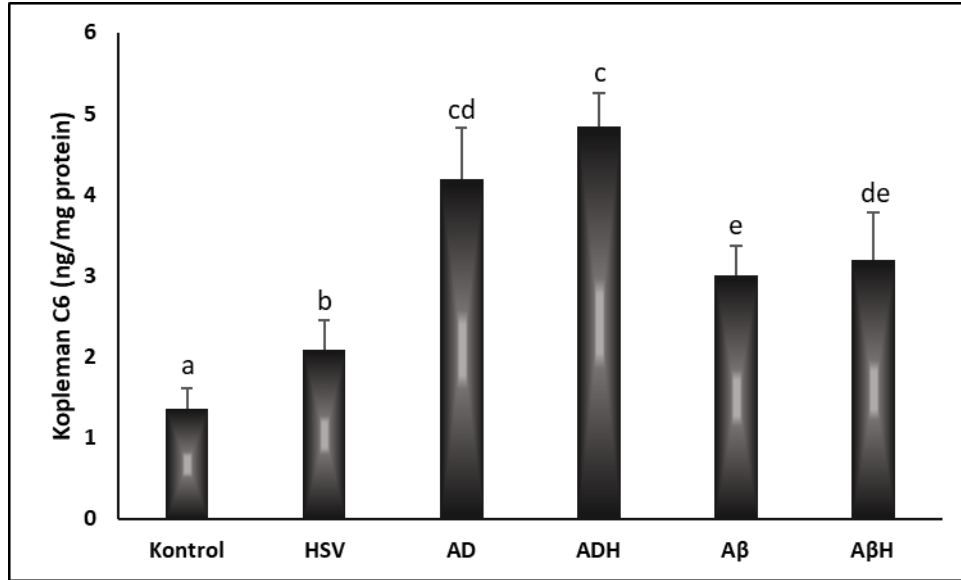
birbirleriyle karşılaştırıldığında ise AD grubundaki artışın A β grubundan %39,67 daha fazla olduğu ve aralarındaki farkın anlamlı düzeyde olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Ayrıca alzheimer gruplarına kombine olarak HSV-gB uygulanmasının C6 düzeylerindeki artışı arttırdığı (ADH grubundaki artış AD grubundan %15,36 ve ABH grubundaki artış AB grubundan %6,53 daha fazla); ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Tablo 4.8. Kompleman protein C6 düzeyleri.

Çalışma Grupları	C6 Düzeyleri (ng/mg protein)
Kontrol	1,36 $\pm$ 0,25 ^a
HSV	2,09 $\pm$ 0,36 ^b
AD	4,19 $\pm$ 0,63 ^{cd}
ADH	4,84 $\pm$ 0,42 ^c
A β	3,00 $\pm$ 0,37 ^e
A β H	3,20 $\pm$ 0,58 ^{de}

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a,b,c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$).



Şekil 4.10. Kompleman protein C6 düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.10. Kompleman Protein C9 Düzeyleri Düzeyleri

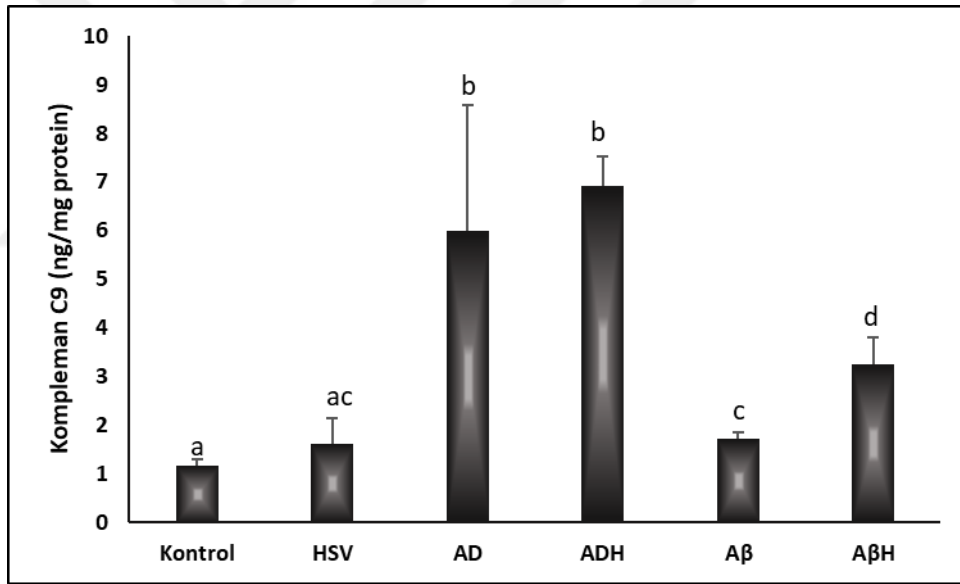
Çalışma gruplarına ait hücre süpernatantlarında ölçülen C6 düzeyleri Tablo 4.9 ve Şekil 4.11’de verilmiştir. HSV grubunda C3 düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla %39,81 arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Kontrol grubuna göre en fazla artış ise AD (%420,64, $p < 0,05$) ve ADH (%501,9, $p < 0,05$) gruplarında gözlenmiştir. Aβ ve AβH grubunda ölçülen C9 düzeylerinin de kontrol grubundan anlamlı ölçüde daha fazla olduğu bulunmuştur (%49,28 ve %183, sırasıyla, $p < 0,05$). İki Alzheimer grubu birbirleriyle karşılaştırıldığında ise, AD grubundaki artışın Aβ grubundan %248,77 daha fazla olduğu ve aralarındaki farkın anlamlı düzeyde olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Ayrıca alzheimer gruplarına kombine olarak HSV-gB uygulanmasının C6 düzeylerindeki artışı arttırdığı. AD ve ADH grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken (%15,61, $p > 0,05$), AβH grubunda C9 seviyelerinin Aβ grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı (%89,57, $p < 0,05$) gözlenmiştir.

Tablo 4.9. Kompleman protein C9 düzeyleri.

Çalışma Grupları	C9 Düzeyleri (ng/mg protein)
Kontrol	1,15±0,13 ^a
HSV-gB	1,61±0,53 ^{ac}
AD	5,99±2,58 ^b
ADH	6,93±0,61 ^b
A β	1,72±0,14 ^c
A β H	3,26±0,55 ^d

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a,b,c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$).

**Şekil 4.11.** Kompleman protein C9 düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a, b, c, d} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$).

4.11. İnterlökin-1 α Düzeyleri

Çalışma gruplarına ait hücre süpernatantlarında ölçülen IL-1 α düzeyleri Tablo 4.10 ve Şekil 4.12'de verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla sadece AD ve ADH gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğu gözlenmiştir (~2 kat, $p<0,05$). HSV grubunda kontrol grubuna kıyasla %15,57 oranında bir artış olduğu

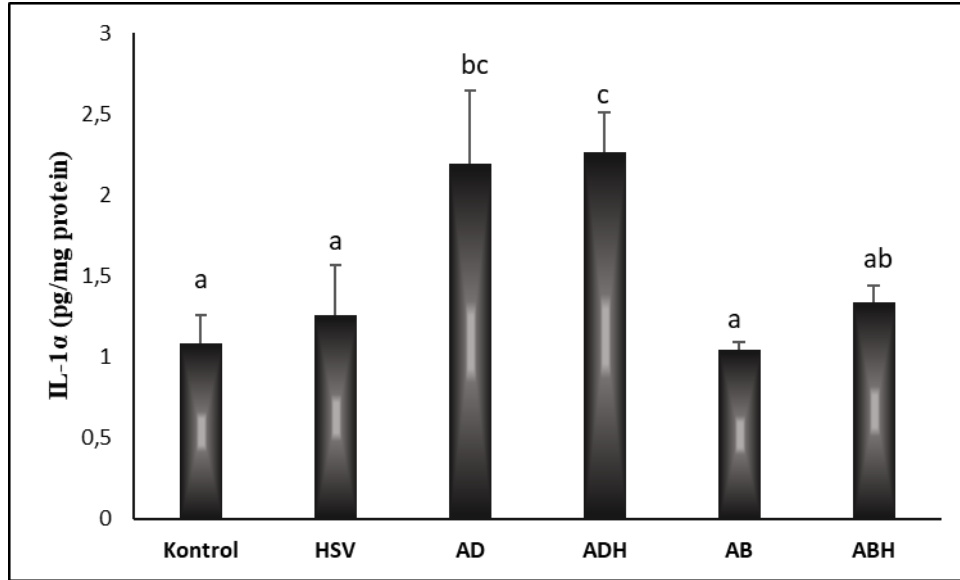
ancak bu artışın anlamlı düzeyde olmadığı ($p>0,05$) bulunmuştur. A β ile kontrol grubu arasında bir fark olmadığı görülmüştür. A β H grubunda ise kontrol grubuyla karşılaştırıldığında IL-1 α düzeyinin %22,76 oranında arttığı; ancak artışın anlamlı düzeyde olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$). İki Alzheimer grubu birbirleriyle karşılaştırıldığında ise, AD grubundaki artışın A β grubunda görülen artışın 2 katından daha fazla olduğu ve aralarındaki farkın anlamlı düzeyde olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Ayrıca alzheimer gruplarına kombine olarak HSV-gB uygulanmasının C6 düzeylerindeki artışı arttırdığı (ADH grubundaki artış AD grubundan %3,2 ve ABH grubundaki artış AB grubundan %28,04 daha fazla) ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Tablo 4.10. İnterlökin 1- α düzeyleri.

Çalışma Grupları	IL-1 α Düzeyleri (pg/mg protein)
Kontrol	1,09 $\pm$ 0,17 ^a
HSV-gB	1,26 $\pm$ 0,31 ^a
AD	2,20 $\pm$ 0,45 ^{bc}
ADH	2,27 $\pm$ 0,24 ^c
A β	1,04 $\pm$ 0,05 ^a
A β H	1,33 $\pm$ 0,11 ^{ab}

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$).



Şekil 4.12. İnterlökin 1- α düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.12. İnterlökin-6 Düzeyleri

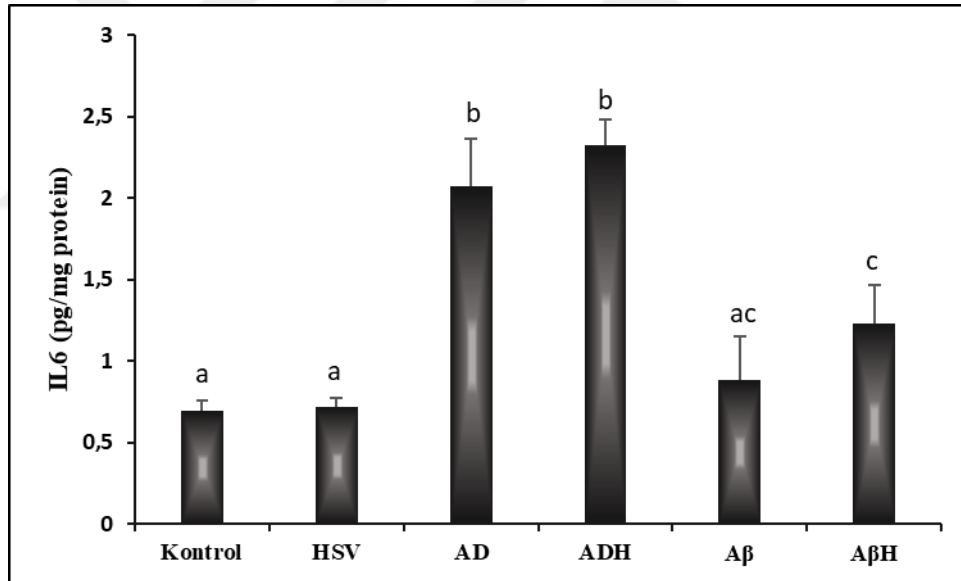
Çalışma gruplarına ait hücre süpernatantlarında ölçülen IL-6 düzeyleri Tablo 4.11 ve Şekil 4.13'te verilmiştir. HSV grubunda IL-6 düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla %3,7 arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Kontrol grubuna göre en fazla artış ise AD (%197,84, $p < 0,05$) ve ADH (~3 kat, $p < 0,05$) gruplarında gözlenmiştir. A β grubunda ölçülen IL-6 düzeyinin kontrol grubundan %26,58 daha fazla olmasına rağmen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p > 0,05$). Bu grubun HSV-gB ile kombine edilmesiyle oluşturulan A β H grubunda ise kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğu gözlenmiştir (%76,63, $p < 0,05$). İki Alzheimer grubu birbirleriyle karşılaştırıldığında ise, AD grubundaki artışın A β grubundan %135,29 daha fazla olduğu ve aralarındaki farkın anlamlı düzeyde olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Ayrıca Alzheimer gruplarına kombine olarak HSV-gB uygulanmasının IL-6 düzeylerindeki artışı daha da indüklediği (ADH grubundaki artış AD grubundan %12,13 ve ABH grubundaki artış AB grubundan %39,53 daha fazla); ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$).

Tablo 4.11. İnterlökin-6 düzeyleri.

Çalışma Grupları	IL-6 Düzeyleri (pg/mg protein)
Kontrol	0,70±0,06 ^a
HSV-gB	0,72±0,05 ^a
AD	2,07±0,29 ^b
ADH	2,32±0,16 ^b
A β	0,88±0,27 ^{ac}
A β H	1,23±0,24 ^c

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

a, b, c Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$).

**Şekil 4.13.** İnterlökin-6 düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

a, b, c Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$).

4.13. İnterlökin-10 Düzeyleri

Çalışma gruplarına ait hücre süpernatantlarında ölçülen IL-6 düzeyleri Tablo 4.12 ve Şekil 4.14'te verilmiştir. Tüm çalışma gruplarında IL-10 düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır (HSV-gB; %62,48, AD; %515,8, ADH; ~8

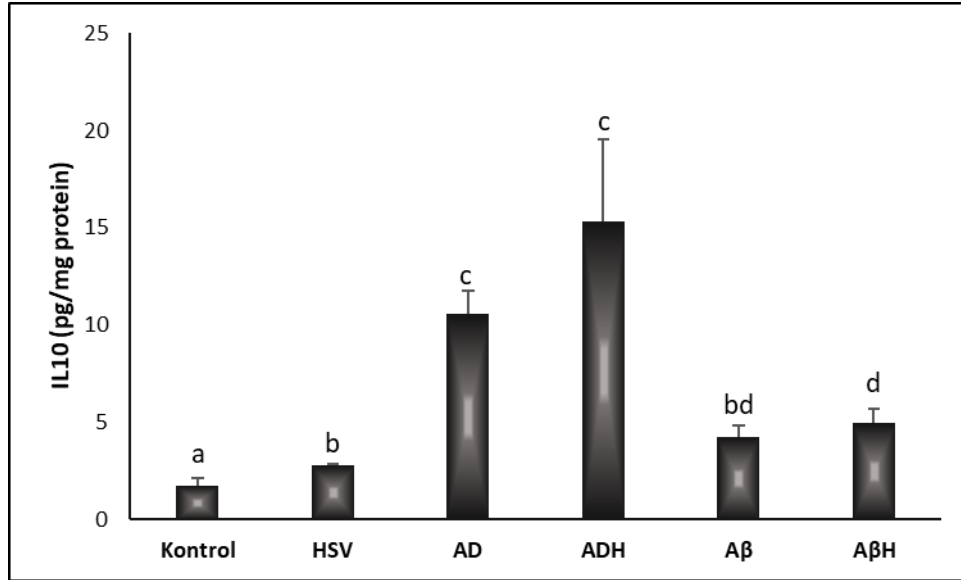
kat, A β ; ~2 kat ve ABH; ~2 kat; $p<0,05$, hepsi). En çok artışın AD ve ADH gruplarında gözlemlendiği ve bu gruplardaki artışın diğer çalışma gruplarındaki artıştan anlamlı düzeyde fazla olduğu görülmüştür ($p<0,05$). İki Alzheimer grubu birbirleriyle karşılaştırıldığında ise AD grubundaki artışın A β grubundan 2 kattan daha fazla olduğu ve aralarındaki farkın anlamlı düzeyde olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Ayrıca Alzheimer gruplarına kombine olarak HSV-gB uygulanmasının IL-10 düzeylerindeki artışı arttırdığı (ADH grubundaki artış AD grubundan %44,98 ve ABH grubundaki artış AB grubundan %16,35 daha fazla); ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Tablo 4.12. İnterlökin-10 düzeyleri.

Çalışma Grupları	IL-10 Düzeyleri (pg/mg protein)
Kontrol	1,71 $\pm$ 0,41 ^a
HSV-gB	2,79 $\pm$ 0,04 ^b
AD	10,56 $\pm$ 1,18 ^c
ADH	15,31 $\pm$ 4,20 ^c
A β	4,24 $\pm$ 0,56 ^{bd}
A β H	4,93 $\pm$ 0,75 ^d

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$).



Şekil 4.14. İnterlökin-10 düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a,b,c,d}Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.14. Tümör Nekroz Faktörü- α Düzeyleri

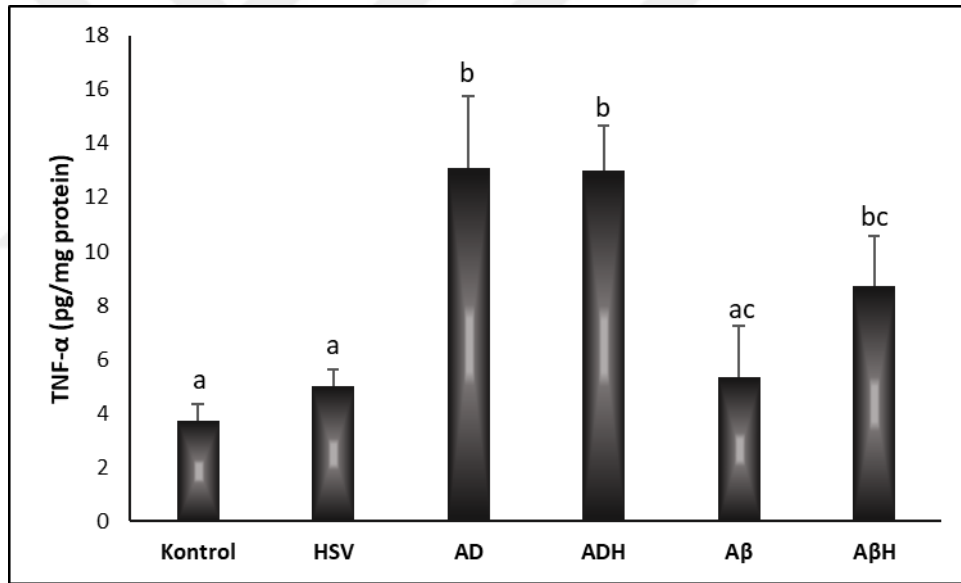
Çalışma gruplarına ait hücre süpernatantlarında ölçülen TNF- α düzeyleri Tablo 4.13 ve Şekil 4.15'te verilmiştir. HSV grubunda TNF- α düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla %34,59 arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Kontrol grubuna göre en fazla artış ise AD (~3 kat, $p < 0,05$) ve ADH (~3 kat, $p < 0,05$) gruplarında gözlenmiştir. A β grubunda ölçülen TNF- α düzeyinin kontrol grubundan %44,24 daha fazla olmasına rağmen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p > 0,05$). Bu grubun HSV-gB ile kombine edilmesiyle oluşturulan A β H grubunda ise kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğu gözlenmiştir (~2 kat, $p < 0,05$). Ayrıca A β H grubundaki artışın A β grubundan da %62,44 daha fazla olduğu ancak aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p > 0,05$). İki Alzheimer grubu birbirleriyle karşılaştırıldığında ise AD grubundaki artışın A β grubundan ~2 kat daha fazla olduğu ve aralarındaki farkın anlamlı düzeyde olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

Tablo 4.13. Tümör nekroz faktörü- α düzeyleri.

Çalışma Grupları	TNF- α Düzeyleri (pg/mg protein)
Kontrol	3,71 $\pm$ 0,65 ^a
HSV-gB	5,00 $\pm$ 0,65 ^a
AD	13,11 $\pm$ 2,65 ^b
ADH	12,97 $\pm$ 1,68 ^b
A β	5,36 $\pm$ 1,87 ^{ac}
A β H	8,70 $\pm$ 1,85 ^{bc}

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a, b, c}Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

**Şekil 4.15.** Tümör nekroz faktörü- α düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a, b, c}Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.15. Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta-1 Düzeyleri

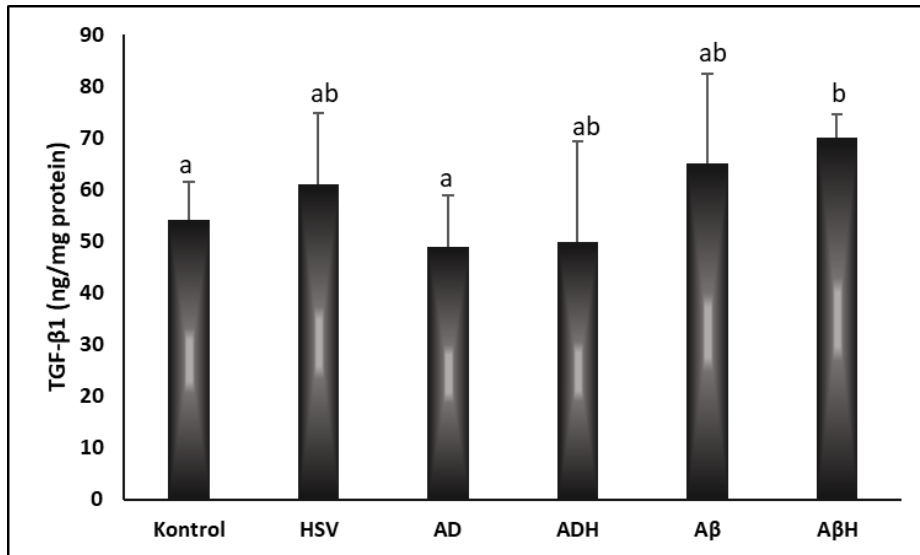
Çalışma gruplarına ait hücre süpernatantlarında ölçülen TGF- β 1 düzeyleri Tablo 4.14 ve Şekil 4.16’te verilmiştir. HSV grubunda kontrol grubuna kıyasla TGF- β 1 düzeyinin %12,87 arttığı; ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı

gözlenmiştir ($p>0,05$). Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış sadece A β H grubunda görülmüştür (%29,7, $p<0,05$). A β grubunda görülen %20,3'lük artış ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). İki Alzheimer grubu birbirleriyle karşılaştırıldığında ise A β grubundaki artışın AD grubundan %32,67 daha fazla olduğu ve aralarındaki farkın anlamlı düzeyde olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Tablo 4.14. Dönüştürücü büyüme faktörü beta-1 düzeyleri.

Çalışma Grupları	TGF- β 1 Düzeyleri (ng/mg protein)
Kontrol	54,03 $\pm$ 7,43 ^a
HSV	60,98 $\pm$ 13,72 ^{ab}
AD	48,99 $\pm$ 10,02 ^a
ADH	49,97 $\pm$ 19,32 ^{ab}
A β	64,99 $\pm$ 17,48 ^{ab}
A β H	70,07 $\pm$ 4,60 ^b

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. ^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$).



Şekil 4.16. Dönüştürücü büyüme faktörü beta-1 düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$).

4.16. DNA Metilasyonu Düzeyleri

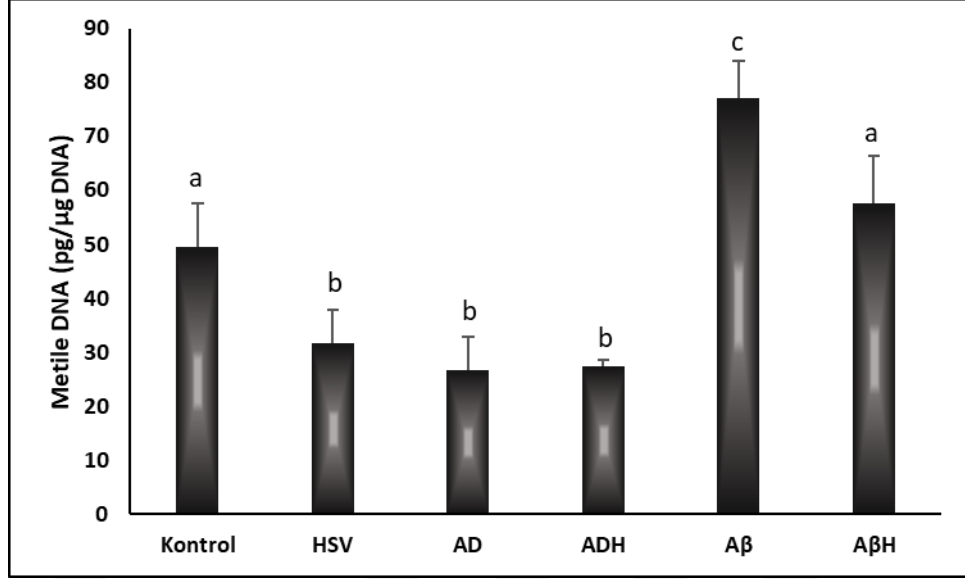
Çalışma gruplarına ait global DNA metilasyonu düzeyleri Tablo 4.15 ve Şekil 4.17’de verilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında HSV, AD ve ADH gruplarında global metilasyonun anlamlı düzeyde düştüğü görülmüştür (%35,8, %45,9, %44,8, sırasıyla; $p<0,05$). A β grubunda ise düzeyler kontrol grubuna göre %55,5 orasında artmıştır ($p<0,05$). A β H grubunda ise global metilasyon düzeyinin kontrol grubundan %16 fazla olduğu; ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$). İki Alzheimer grubu birbiriyle karşılaştırıldığında ise A β grubunda düzeyin AD grubundan %187,4 daha fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Alzheimer gruplarına kombine olarak HSV-gB uygulanması sonucunda AD ve ADH grupları arasında fark gözlenmezken A β H grubunda global metilasyon düzeyinin A β grubundan %25,3 daha düşük olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Tablo 4.15. DNA metilasyonu düzeyleri.

Çalışma Grupları	5-mC Düzeyleri (pg/ μ g DNA)
Kontrol	49,59 $\pm$ 8,10 ^a
HSV	31,80 $\pm$ 6,14 ^b
AD	26,83 $\pm$ 6,12 ^b
ADH	27,36 $\pm$ 1,27 ^b
A β	77,11 $\pm$ 6,96 ^c
A β H	57,64 $\pm$ 8,68 ^a

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a,b,c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$).



Şekil 4.17. DNA metilasyonu düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a,b,c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.17. Histon H3 Asetilasyon Düzeyleri

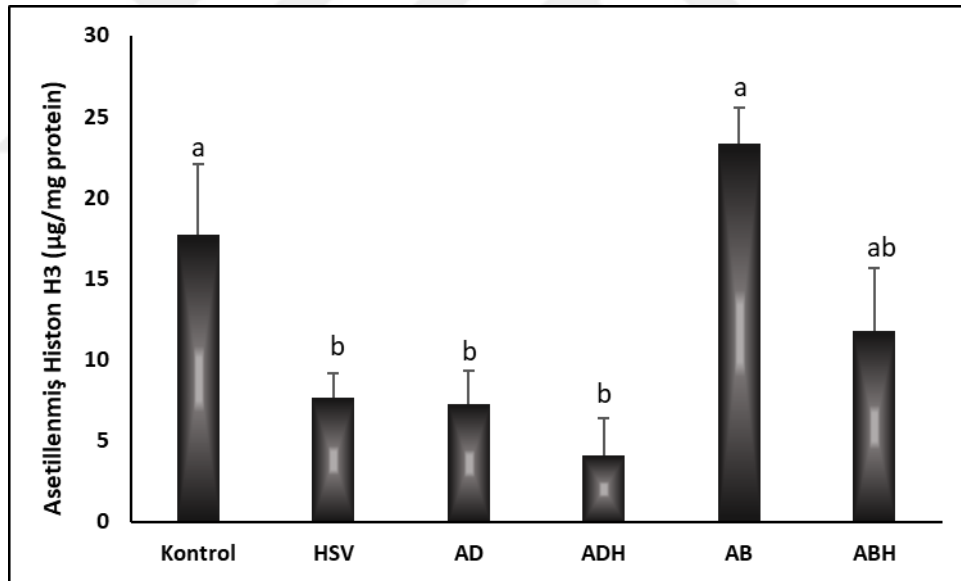
Çalışma gruplarına ait H3 asetilasyon düzeyleri Tablo 4.16 ve Şekil 4.18’de verilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında HSV, AD ve ADH gruplarında histon H3 asetilasyonunun anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür (%56,9, %58,9, %76,9, sırasıyla; $p < 0,05$). Aβ grubunda asetilasyonun kontrol grubuna göre %31,6 oranında arttığı görülmüştür; ancak artış anlamlı düzeyde değildir ($p > 0,05$). AβH grubunda da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde bir azalış (%33,5) gözlenmiştir ($p > 0,05$). HSV, AD ve ADH gruplarında H3 asetilasyon düzeyinin Aβ grubuna göre de anlamlı düzeyde düşük olduğu ölçülmüştür (%67,3, %68,8, %82,5, sırasıyla; $p < 0,05$). Bu gruplar AβH grubuyla kıyaslandığında ise bu anlamlı farkın kaybolduğu görülmüştür.

Tablo 4.16. Histon H3 asetilasyon düzeyleri.

Çalışma Grupları	H3 Asetilasyon Düzeyleri ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)
Kontrol	$17,75 \pm 4,36^a$
HSV	$7,63 \pm 1,54^b$
AD	$7,29 \pm 2,04^b$
ADH	$4,09 \pm 2,27^b$
A β	$23,37 \pm 2,18^a$
A β H	$11,80 \pm 3,88^{ab}$

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

**Şekil 4.18.** Histon H3 asetilasyon düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.18. Histon H4 Asetilasyon Düzeyleri

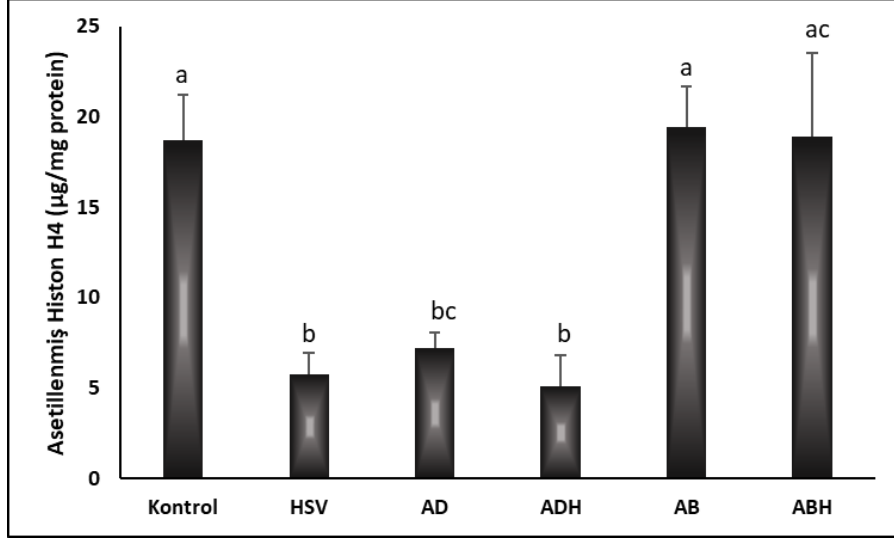
Çalışma gruplarına ait histon H4 asetilasyon düzeyleri Tablo 4.17 ve Şekil 4.19'da verilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında HSV, AD ve ADH gruplarında histon H4 asetilasyonunun anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür (%68,9, %61,5, %72,5, sırasıyla; $p<0,05$). A β ve A β H gruplarında ise kontrol grubuna göre fark olmadığı gözlenmiştir. HSV, AD ve ADH gruplarında histon H3 asetilasyon düzeyinin A β grubuna göre de anlamlı düzeyde düşük olduğu ölçülmüştür (sırasıyla %70,2, %62,9, %73,6; $p<0,05$).

Tablo 4.17. Histon H4 asetilasyon düzeyleri.

Çalışma Grupları	H4 Asetilasyon Düzeyleri ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)
Kontrol	18,68 $\pm$ 2,52 ^a
HSV	5,80 $\pm$ 1,16 ^b
AD	7,20 $\pm$ 0,91 ^{bc}
ADH	5,13 $\pm$ 1,70 ^b
A β	19,44 $\pm$ 2,23 ^a
A β H	18,90 $\pm$ 4,62 ^{ac}

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a, b, c} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$).



Şekil 4.19. Histon H4 asetilasyon düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.20. Çoklu Histon H3 Modifikasyon Düzeyleri

Tez deneyleri kapsamında çalışma gruplarında meydana gelen histon H3'te meydana gelen 15 farklı metilasyon, 4 farklı asetilasyon ve 2 farklı fosforilasyon modifikasyonu ölçülmüştür. Ölçümler Kontrol, HSV, AD ve ADH olmak üzere 4 çalışma grubunda gerçekleştirilmiştir. Modifikasyon düzeyleri Tablo 4.18'de verilmiştir. Histon H3 metilasyonu olarak histonun 4., 9., 27., 36. ve 79. lizin kalıntısının metilasyonu, di-metilasyonu ve tri-metilasyonu değerlendirilmiştir. HSV grubunda tüm metilasyon düzeylerinin kontrol grubundan daha düşük düzeyde olduğu görülmüştür. AD ve ADH gruplarında da HSV grubu ile benzer şekilde metilasyon modifikasyon düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla düşük seviyede olduğu gözlenmiştir. ADH grubunda özellikle 4. lizin kalıntısında meydana gelen modifikasyonlar (H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3) başta olmak üzere metilasyon düzeyindeki azalmanın HSV ve ADH grubuna kıyasla daha fazla olduğu ölçülmüştür. HSV, AD ve ADH grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında histon 3 lizin 9 pozisyonundaki asetilasyon (H3K9ac) düzeylerinin azaldığı (%14,64, %8,28, %14,31, sırasıyla) görülmüştür. H3 lizin 18 pozisyonunda ise (H3K18ac) HSV ve AD gruplarında değişim gözlenmezken ADH grubunda asetilasyonun kontrol grubuna kıyasla %20,43 oranında azaldığı görülmüştür.

Tablo 4.18. Histon H3 modifikasyon düzeyleri.

Modifikasyon	Kontrol	HSV	AD	ADH
H3K4me1	%61,10	%52,08	%54,10	%43,02
H3K4me2	%72,87	%68,65	%69,90	%52,39
H3K4me3	%61,83	%57,68	%67,55	%51,39
H3K9me1	%72,43	%56,43	%69,40	%50,42
H3K9me2	%63,95	%55,66	%63,84	%56,95
H3K9me3	%54,59	%50,28	%57,71	%48,89
H3K27me1	%62,40	%52,44	%61,55	%50,06
H3K27me2	%73,67	%68,69	%65,95	%52,85
H3K27me3	%60,42	%59,90	%55,65	%45,63
H3K36me1	%69,88	%60,56	%69,79	%54,07
H3K36me2	%64,58	%56,79	%57,55	%59,90
H3K36me3	%71,86	%68,05	%70,84	%60,94
H3K79me1	%73,23	%56,56	%58,70	%57,13
H3K79me2	%67,55	%61,03	%64,14	%68,10
H3K79me3	%58,91	%56,32	%58,18	%42,66
H3K9ac	%63,49	%54,19	%58,23	%54,40
H3K14ac	%56,92	%55,36	%55,13	%43,72
H3K18ac	%70,57	%69,70	%70,15	%56,15
H3K56ac	%58,03	%62,56	%64,96	%46,03
H3ser10P	%69,26	%65,77	%66,39	%58,69
H3ser28P	%60,80	%62,97	%66,10	%54,91

4.20. Çoklu Histon H4 Modifikasyon Düzeyleri

Çalışma gruplarında meydana gelen H4'te meydana gelen 5 farklı metilasyon, 4 farklı asetilasyon ve 1 farklı fosforilasyon modifikasyonu ölçülmüştür. Modifikasyon düzeyleri Tablo 4.19'da verilmiştir. Asetilasyon modifikasyonları olarak histon H4 proteininin 5., 8., 12. ve 16. lizin kalıntısında meydana gelen asetilasyon düzeyleri ölçülmüştür. Beşinci pozisyondaki lizin kalıntısında meydana gelen asetilasyon düzeyine bakıldığında HSV ve AD gruplarında kontrol grubuna göre sırasıyla %14,26 ve %8,57 azalış meydana gelmiştir. İki grubun kombinasyonu olan ADH grubunda ise bu pozisyondaki asetilasyon düzeyi kontrol grubuna göre %35,95 azalmıştır. Diğer asetilasyon düzeylerinin de HSV, AD ve ADH gruplarında kontrol grubuna göre azaldığı gözlenmiştir. A β ve A β H gruplarında ise asetilasyon düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığı gözlenmiştir. Histon H4 serin pozisyonundaki fosforilasyon düzeyleri incelendiğinde ise HSV ve A β gruplarında fosforilasyon düzeyinin kontrol grubuna göre azaldığı gözlenmiştir (%15,68 ve %13,76, sırasıyla). Metilasyon düzeylerine bakıldığında ise HSV grubunda kontrol grubu ile kıyaslandığında H4K20m2, H4K20m3, H4R3m2a ve H4R3m2s metilasyon düzeylerinin sırasıyla %12,01, %27,49, %21,43 ve %17,19 oranında azaldığı gözlenmiştir.

Tablo 4.19. Histon H4 modifikasyon düzeyleri.

Modifikasyon	Kontrol	HSV	AD	ADH	A β	A β H
H4K5ac	%87,25	%74,81	%79,77	%55,88	%92,09	%84,70
H4K8ac	%86,30	%77,99	%83,37	%66,76	%85,21	%88,63
H4K12ac	%75,60	%78,45	%86,75	%73,81	%91,39	%96,72
H4K16ac	%88,71	%71,94	%84,52	%92,76	%91,38	%97,16
H4K20m1	%79,13	%76,55	%80,28	%93,57	%98,22	%95,68
H4K20m2	%83,51	%73,50	%85,69	%91,32	%93,82	%88,31
H4K20m3	%94,15	%68,28	%85,69	%95,28	%93,41	%88,31
H4R3m2a	%91,50	%71,89	%80,19	%77,11	%96,18	%98,42
H4R3m2s	%97,39	%80,65	%89,12	%90,64	%94,31	%97,06
H4Ser1P	%95,58	%80,59	%97,10	%90,01	%82,43	%88,45

4.21. Histon Deasetilaz 3 Düzeyleri

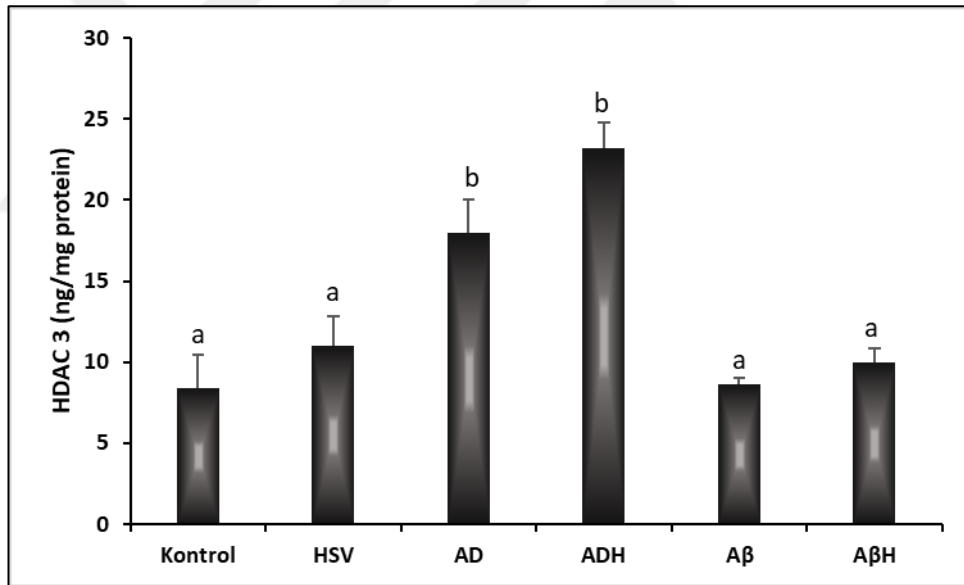
Çalışma gruplarına ait HDAC3 düzeyleri Tablo 4.20 ve Şekil 4.20’da verilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında AD ve ADH gruplarında HDAC3 düzeylerinin 2 kattan daha fazla arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). HSV grubunda da kontrol grubuna oranla %31 oranında artış gözlenmekle birlikte bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. A β ve A β H gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla önemli bir değişim gözlenmemiştir. AD ve ADH gruplarında gözlenen artışın diğer çalışma gruplarında gözlenen artıştan da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). ADH grubunda HDAC3 düzeyi AD grubundan da %28 oranında daha fazla olmakla birlikte, aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Tablo 4.20. Histon deasetilaz 3 düzeyleri.

Çalışma Grupları	HDAC3 Düzeyleri (ng/mg protein)
Kontrol	8,37±2,1 ^a
HSV	10,97±1,86 ^a
AD	17,99±2,05 ^b
ADH	23,18±1,60 ^b
A β	8,59±0,41 ^a
A β H	9,94±0,93 ^a

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

**Şekil 4.20.** HDAC3 düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

^{a, b} Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p < 0,05$).

4.19. Histon Deasetilaz 8 Düzeyleri

Çalışma gruplarına ait histon HDAC8 düzeyleri Tablo 4.21 ve Şekil 4.21’de verilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında HSV, AD ve ADH gruplarında HDAC8 düzeylerinin anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür (sırasıyla %22,5, %42,6, %92,1;

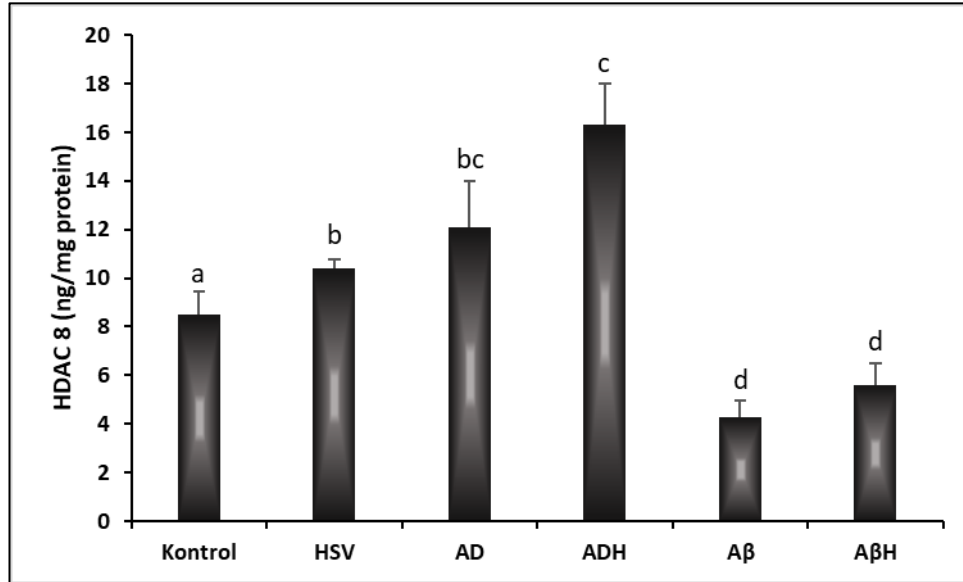
$p<0,05$). A β ve A β H gruplarında ise HDAC8 seviyesinin kontrol grubundan sırasıyla %49,7 ve %34,3 oranında daha az olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). ADH grubundaki artışın hem HSV hem de AD grubundan (%56,8 ve %34,7, sırasıyla) daha fazla olduğu görülmüştür ve HSV ile ADH grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ölçülmüştür ($p<0,05$).

Tablo 4.21. Histon deasetilaz 8 düzeyleri.

Çalışma Grupları	HDAC8 Düzeyleri (ng/mg protein)
Kontrol	8,49 $\pm$ 0,96 ^a
HSV	10,40 $\pm$ 0,40 ^b
AD	12,11 $\pm$ 1,89 ^{bc}
ADH	16,31 $\pm$ 1,72 ^c
A β	4,27 $\pm$ 0,67 ^d
A β H	5,58 $\pm$ 0,91 ^d

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

a, b, c, d Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$).



Şekil 4.21. HDAC8 düzeyleri.

Tüm değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

a, b Aynı üssel harfleri taşımayan değerler birbirinden önemli ölçüde farklıdır ($p<0,05$).

5. TARTIŞMA

Alzheimer hastalığı geriatrik popülasyonda demansın en sık nedenidir. Hastalığın başlangıcında en sık görülen semptom kısa süreli hafıza kaybıdır. Hastalık ilerledikçe motivasyon kaybı, konuşma fonksiyonlarında bozulma, öz bakımı yönetememe ve davranış sorunları görülebilir (245).

Alzheimer hastalığının nedenleri hala bilinmemektedir. Yıllar geçtikçe AH'nin patogenezi ve hastalığın ilerlemesini etkileyen faktörler konusunda farklı hipotezler ortaya atılmıştır (245). HSV-1 gibi viral enfeksiyonların AH'nin gelişiminde önemli roller oynayabileceği düşünülmektedir. HSV-1 birincil enfeksiyonu genellikle çocukluk çağında ortaya çıkar ve başlangıçta yüz mukoza zarlarındaki epitel hücrelerini ve ikincil olarak duysal sinir terminallerini etkiler. Bu bölgelerde virüs sinir sistemini istila edebilir. HSV-1'in enfekte olmuş nöronlarda saklanma kapasitesi vardır; çeşitli uyaranlara bağlı olarak aralıklı olarak aktive olabilir ve ömür boyu enfeksiyonlara neden olabilir (77, 246). Sekonder HSV-1 reaktivasyonunun bir sonucu olarak ensefalit dahil ciddi nörolojik komplikasyonlar ortaya çıkabilir (69).

Nöroinflamasyonun AH patogenezinde rol oynayabileceğine ilişkin artan kanıtlar mevcuttur. AH gelişiminde kompleman sistemin etkileri hakkında çalışmalar literatürde mevcuttur (16, 122, 149). Kompleman sistem proteinlerinin ekspresyonunun AH sürecinde arttığı gözlenmiştir (165-167). Kompleman sisteminin bileşenleri dışında inflamasyonun gelişiminde rol oynayan proinflamatuvar sitokinlerin de AH üzerinde etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. A β peptitlerinin birikmesinin ve plak oluşumunun ana patolojik sonuçlarından biri nöroinflamasyonun gelişmesidir (13). TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi sitokinlerin, kronik olarak yüksek seviyelerde üretildiğinde doğrudan sitotoksik olduğu bulunmuştur. Ayrıca TNF- α ve IL-1 β 'nin APP sentezini arttırdığı, nöroprotektif etkiye sahip olan APP alfa sekretaz enziminin ekspresyonunu azalttığı ve A β oluşumunu arttırdığı tespit edilmiştir (126,127,139).

Yaşamın erken dönemlerinde meydana gelen epigenetik değişiklikler, genel sağlığı yıllar sonra bile etkileyebilir. Nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde epigenetik mekanizmaların rolü olduğuna dair de yeni çalışmalar mevcuttur. Ayrıca epigenetik mekanizmaların nöroinflamasyon gelişiminde rol oynayabileceğine yönelik veriler de mevcuttur. CK-p25 AH fare modeli üzerine yapılan bir araştırma,

bağışıklık tepkisi işlevleriyle ilişkili genlerin ekspresyonunun arttığını ve sinaptik ve öğrenme işlevlerinde yer alan genlerin ekspresyonunun azaldığını göstermiştir (247). AH tedavisinde A β düzeylerini azaltma yaklaşımının, artan A β seviyelerinin neden olduğu epigenetik değişikliklerin de tersine çevrilmesi ile tamamlanmasının tedavi etkinliğini artırabileceği düşünülmüştür. AH tedavisinde epigenetik yaklaşımların kullanılmasının amacı, hafıza oluşumunda yer alan genlerin transkripsiyonunu arttırmak ve Tau, APP ve β -sekretaz 1 (BACE1) gibi hastalık sürecindeki patojenik ara ürünlerin transkripsiyonunu azaltmaktır (248). Çeşitli çalışmalar, AH'deki patolojik değişikliklerin, epigenetik modifikasyonlar yoluyla semptomların gelişmesinden önce tersine çevrilebileceğini düşündürmektedir (249,250). AH gelişimi ile ilişkili epigenetik süreçlerin tanımlanması, AH ilerlemesinde rol olan yolları ve mekanizmaları tam olarak belirlemek için mükemmel tanısal belirteçler sağlayacak ve AH'nin başlangıçta nasıl başladığına dair yeni epigenetik bir model ortaya konmasını beraberinde getirebilecektir. Ayrıca, DNA metilasyonu gibi tersinir olan bir süreç üzerinde yapılacak çalışmalar, genomda yaşa bağlı değişiklikleri önlemeyi veya hatta geri almayı amaçlayan epigenetik terapötiklerin geliştirilmesini sağlayabilecektir (248).

Bu tez çalışmasında HSV-1 enfeksiyonunun AH üzerindeki olası etkileri HSV-1 gB uygulamasının SH-SY5Y hücreleri üzerinde hem inflamatuvar hem de epigenetik parametreler üzerindeki etkileri ölçülerek değerlendirilmesi amaçlanmıştır. HSV-1'in nöroinflamasyon süreci üzerindeki etkilerini değerlendirmek için, kompleman sistem proteinleri (C1q, C3, C6 ve C9) ve bazı sitokinler (IL-1 α , IL-6, IL-10, TNF- α ve TGF- β 1) ölçülmüştür. Epigenetik değişimlerin değerlendirilmesi için ise DNA metilasyonu, H3 ve H4 asetilasyonu, H3 ve H4'ün farklı pozisyonlarda çoklu modifikasyonları (asetilasyon, metilasyon ve fosforilasyon), HDAC3 ve HDAC8 enzim düzeyleri ölçülmüştür. Ayrıca hücrelerde iki farklı AH modeli oluşturarak hastalığın patogeneğinde nöroinflamasyonun ve epigenetik değişikliklerin oynadığı rolün araştırılması amaçlanmıştır. Son olarak, iki AH modeline ayrı olarak kombine HSV-gB uygulamasının, hastalıkta meydana gelebilecek olası düzensizlikler üzerinde artırıcı etkisi olup olmayacağı belirlenmeye çalışılmıştır.

5.1. Hücre İçi ROS Düzeyleri

Reaktif oksijen türleri, en az bir oksijen atomu ve bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren moleküllerdir. Fizyolojik koşullar altında, aerobik solunum veya inflamatuvar süreçler gibi hücre süreçleri sırasında, özellikle hepatositlerde ve makrofajlarda düşük miktarlarda ROS oluşur. Ayrıca, ROS sinyal molekülleri olarak görev yapar; fizyolojik koşullarda hücre farklılaşmasını ve apoptozu indükleyerek doğal yaşlanma sürecine katkıda bulunurlar. UV ışınlarına aşırı maruz kalan, uzun süreli stres koşulları, yoğun fiziksel egzersiz, yetersiz/kötü beslenme ve kimyasal/biyolojik ajanlara maruziyet sonucunda ROS üretimi artar. ROS'un aşırı üretimi birçok inflamatuvar hastalığın ilerlemesinde temel rol oynar (251,252).

Beyin yüksek düzeyde oksijen tüketir ve bu nedenle ROS, yaşlanan beyinlerde ve daha da önemlisi AH beyinlerinde bulunan nöronal hasarda önemli bir rol oynayabilir. Frontal korteksten gelen hücresel oksidatif belirteçler, hafif bilişsel bozukluktan şiddetli AH'ye doğru ilerleyen bir süreçte yol açabilir. Bu da, oksidatif hasarın AH'nin gelişiminde ve ilerlemesinde aktif olarak yer alan erken bir olay olduğunu göstermektedir (253,254).

Çalışmamızda her iki Alzheimer modeli grubunda da (AD ve A β) hücre içi ROS düzeylerinin arttığı görülmüştür. Bu veriler ROS düzeyinin artmasının AH gelişimindeki rolü konusunda önceki çalışmalarla tutarlıdır (251-254). A β grubunda ROS üretiminin AD grubundan da fazla olduğu gözlenmiştir. Wang ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada A β ₁₋₄₂ peptidi uygulamasının SH-SY5Y ve U87 insan glioma hücre hatlarında ROS üretimini artırdığını göstermişlerdir (255). Aynı zamanda, ROS üretiminde artışın nöronlarda A β üretimini de arttırdığı görülmüştür (256). Bu çalışmalardan elde edilen veriler ROS ve A β peptitlerinin beyinde bir geri besleme döngüsü içerisinde olabileceğini göstermektedir. Bu durum, çalışmamızda A β ve A β H gruplarında ROS düzeyindeki artışın diğer çalışma gruplarından da daha fazla olmasını açıklamaktadır.

Viral beyin enfeksiyonuna yanıt olarak mikrogial hücreler tarafından ROS ve pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimi, hem patojenlerin temizlenmesine hem de nöronal hasara katkıda bulunur. HSV enfeksiyonunun ROS düzeylerini arttırdığı gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur (257-259). Yapılan bir *in vitro* çalışmada RA

kullanılarak nöronal fenotipe farklılaştırılmış fare P19N embriyonik karsinoma hücrelerine HSV-1 uygulanmıştır. HSV-1 enfeksiyonu sinir hücrelerinde ROS düzeylerini enfeksiyondan 1 saat sonra %21,5 artırmış ($p<0,01$) ve artış 24 saat boyunca devam etmiştir. Aynı çalışmada ısı ve UV ışıkla inaktive edilmiş HSV-1 hücrelere uygulandığında aynı etki görülmediğinden bu viral etkinin görülmesi için virüsün hücre içine girişi ve replikasyonunun gerektiği düşünülmüştür. Bu bulgular, sinir hücrelerinin HSV-1 ile enfekte olmasının oksidatif strese neden olduğunu ve enfeksiyonun ROS gelişme süreci ile sinir sisteminde patolojiye yol açabileceğini göstermiştir (257). Başka bir çalışmada HSV-1 enfeksiyonu, U937 monositik hücrelerinde NF- κ B yolağını aktive edebilecek şekilde ani bir ROS üretimini indüklemiştir. ROS düzeyi uygulamadan yarım saat sonra 4 kat artmıştır ($p<0,01$) ve zamanla ROS düzeyi düşmüştür (258). Hu ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada, fare mikroglialarında HSV-1 ile indüklenen NADPH oksidaz türevli ROS'un, mitojenle aktive edilen protein kinazları (MAPK) aktive etmedeki ve sitokin/kemokin ekspresyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. HSV enfeksiyonunun ardından, hücre içi ROS düzeylerinin oldukça yüksek olduğu bulunmuş ve virüsün neden olduğu ROS'un çoğunluğunun bir NADPH oksidaz inhibitörü olan difenileniyodonyum ve aposinin uygulamasının ardından bloke edildiği görülmüştür. Buna bağlı olarak, NADPH oksidazın inhibisyonu virüs kaynaklı proinflamatuvar sitokin ve kemokin üretimini azaltmıştır. Burada sunulan veriler, HSV enfeksiyonunun, NADPH oksidaza bağımlı ROS ve MAPK'lerin aktivasyonu yoluyla mikrogliadaki proinflamatuvar yanıtları indüklediğini göstermektedir (259).

Çalışmamızda SH-SY5Y hücrelerine HSV-1 gB uygulanmasının ROS düzeyini anlamlı düzeyde artırdığı gözlenmiştir. Bu durum daha önce yapılan benzer çalışmalardan elde edilen veriler ile uyumludur (257-259). Çalışmalarda ROS oluşumu için virüsün hücre içine girişinin gerekli olduğu görülmüştür ve HSV gB'nin hücre içine girişte füzojen görevi görmesi sebebiyle virüsün ROS oluşturma potansiyelinin bir kısmından gB'nin sorumlu olduğu düşünülebilir (61,259). Bu bulgular HSV enfeksiyonun ROS oluşumu yoluyla nöronal hasara sebep olabileceğini ve AH patogeneze bu şekilde katkıda bulunabileceğini kanıtlamaktadır.

5.2. Alzheimer Hastalığı ile İlgili Parametrelerdeki Değişiklikler

Alzheimer hastalığı (AH) patogenezi, anormal A β metabolizması, Tau hiperfosforilasyonu, oksidatif stres, reaktif glial ve mikrogial değişiklikler ve diğer patolojik süreçleri içeren karmaşık bir süreçtir. Hastalığa ilişkin iki önemli patolojik bulgu tanımlanmıştır. Bunlar, A β içeren ekstraselüler plaklar ve hiperfosforile edilmiş Tau proteinlerinden oluşan intraselüler NFY'lerdir (4). NFY'ler, mikrotübüllerle ilişkili hiperfosforile hücre iskelet proteini Tau'nun fibriler kümeleridir ve hem hücre içi hem de hücre dışında bulunabilirler. Ekstraselüler plaklar ise, APP'nin düzensiz bölünmesinin ürünleri olan A β peptitlerinin aşırı birikmesi sonucu oluşur (260). Yapılan bir *in vitro* çalışmada RA ve BDNF uygulanarak farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinde Tau proteininin hem düzeyinin hem de fosforilasyon oranının arttığı bulunmuştur. Tau fosforilasyonunun, ser-199, ser-202, thr-205, ser-396 ve ser-404 bölgelerinde arttığı görülmüştür. Ayrıca farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinde Tau fosforilasyonunun mekanizmasında GSK3 β enzimin etkisi olup olmadığı araştırılmıştır ve GSK3 β inhibisyonu yoluyla Tau fosforilasyonunun doza bağlı azaldığı bulunmuştur. Böylece RA ve BDNF ile farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinin, Tau fosforilasyon mekanizmalarının incelenmesi ve potansiyel GSK3 β inhibitörlerinin taranması için uygun bir model görevi görebileceği düşünülmüştür (261).

Yaptığımız çalışmada oluşturulan iki farklı AH modelinde A β ₁₋₄₂, fosforile Tau proteini ve APP düzeyleri ölçülerek modellerin geçerliliği test edilmiştir. RA ve BDNF kullanarak yapılan birinci model olan AD grubunda fosforile Tau proteini ve APP düzeylerinin anlamlı olarak arttığı görülmüştür. A β ₁₋₄₂ peptit düzeyinde ise artış görülmekle birlikte aradaki farkın anlamlı düzeyde olmadığı saptanmıştır. Tam tersine A β agregatları kullanılarak oluşturulan ikinci modelde (A β grubu), fosforile Tau ve APP düzeylerine artış gözlenmekle birlikte bu artışın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı; A β ₁₋₄₂ peptit düzeyinin ise 3 kattan daha fazla arttığı görülmüştür. AD grubunda fosforile Tau proteini düzeyinin artması SH-SY5Y hücrelerinin benzer şekilde farklılaştırılması ile yapılan deneylerden elde edilen sonuçlarla benzerdir. İki farklı AH modelinden elde edilen sonuçların farklı olması ise, modellerin AH patogenezinin farklı yönlerini yansıttığını düşündürmektedir. Bulunan sonuçlar değerlendirildiğinde birinci modelin Tau patofizyolojisi üzerinden ikinci modelin ise

amiloid patolojisi üzerinden AH'nin değerlendirilmesine olanak sağladığı düşünülebilir.

Herpes simpleks virüsü-1'in AH ile ilişkili olabileceğini gösteren pek çok kanıt sunulmuştur (9-11, 78-80). Wozniak ve ark. (2007), HSV-1 enfeksiyonunun insan SH-SY5Y hücrelerinde A β birikimine neden olduğunu göstermiştir (10). Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada ise, HSV-2 enfeksiyonunun SK-N-MC nöroblastoma hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır ve virüsün hücrelerde A β ve hiperfosforile Tau düzeylerini arttırdığı bulunmuştur (262). Yine SH-SY5Y hücreleri kullanılarak yapılan başka bir çalışmada da Wozniak ve ark. (2009) HSV-1 enfeksiyonunun hücrelerde ser-202, tre-212, ser-214, ser-396 ve ser-404 dahil çeşitli bölgelerde Tau fosforilasyonuna neden olduğunu ve GSK3 β enzimini indüklediğini göstermişlerdir (263). Bu veriler aynı hücre hattında RA ve BDNF ile yapılan hücre farklılaştırması sonucu yapılan deneyden elde edilen verilerle benzer bulunmuştur (261). Bu durum HSV-1 enfeksiyonunun AH üzerinde benzer mekanizmalar üzerinden etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Santana ve ark. (2012)'nin yaptıkları bir çalışmada, HSV-1'in SH-SY5Y hücrelerinde APP düzeylerini artırdığı, APP'nin non-amiloidojenik metabolizmasını inhibe ettiği ve hücrelerde A β birikimine yol açtığı bulunmuştur (264).

Çalışmamızda hücrelere HSV-gB uygulanmasının fosforile Tau ve A β ₁₋₄₂ peptit düzeylerini anlamlı ölçüde arttırdığı, APP düzeyinde ise artışa neden olmakla birlikte bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Çalışmada HSV uygulaması ile fosforile Tau düzeyinde gözlenen artışın, AD grubu ile benzer olması HSV enfeksiyonunun benzer mekanizmalar üzerinden AH gelişimine etkisi olabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda elde edilen veriler önceki benzer çalışmalardan elde edilen veriler de tutarlılık göstermektedir. Bir diğer önemli bulgu ise, RA ve BDNF ile indüklenen AH modelinde (AD grubu) A β düzeylerinde anlamlı bir artış olmazken, aynı grubun HSV-gB ile kombine edilmesiyle oluşturulan ADH grubunda A β ₁₋₄₂ peptit düzeyi anlamlı ölçüde artmıştır. Bu, HSV-1 gB uygulamasının ve dolayısıyla HSV-1 enfeksiyonunun AH'nin ilerlemesine katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

5.3. Sitopatolojik Değişiklikler

Nöroblastoma hücrelerinin RA ve BDNF kullanılarak farklılaştırıldığı bazı çalışmalar yapılmıştır. Nöronal farklılaşmayı takiben, SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin proliferasyon oranında azalma olduğu; nöron dejenerasyonu ve nörit oluşumu ve hücrelerin uzaması ve olgun nöron belirteçlerinin ekspresyonu da dahil olmak üzere bir dizi morfolojik ve biyokimyasal olayı ortaya çıkar ve böylece hücreler fenotipik olarak birincil nöronlara daha yakın hale gelir (241). Yapılan bir çalışmada, SH-SY5Y hücrelerine RA uygulamasını takiben hücrelerin inceliği uzadığı ve nöronal uçlar boyunca varislerin görüldüğü gözlenmiştir (265). HSV-1 enfeksiyonunun da nöronlarda sağlıklı kontrollere göre dendritik uç sayılarını azalttığı ve dejenerasyona sebep olduğu bulunmuştur (266).

Çalışmamızda kontrol grubunda SH-SY5Y hücrelerinin epitel benzeri hücreler ve kısa dendrit ve aksonlu nöron benzeri hücreler ile heterojen bir popülasyon gösterdiği gözlenmiştir. Diğer gruplarda (HSV, AD, A β , ADH ve A β H grupları) hücre sayısı ve epitel benzeri hücre sayısı kontrol grubuna göre azaldığı görülmüştür. Bu gruplarda nöron benzeri hücreler ve nöronal uçlar boyunca varisler görülmüştür. HSV grubunda az sayıda iki çekirdekli hücre gözlenmiştir ve hücre bölünmesinin olmaması yaşlanmayı desteklerken, bu grupta uzun dendrit ve aksonların varlığı nöronal farklılaşmayı desteklemiştir. AD grubundaki hücrelerin sitoplazmalarında hücreler daha içi şeklinde, daha uzun ve daha ince nöronal uçlara sahip olarak belirlenmiş ve dağınık vakuoller görülmüştür. Bu grupta, ince uzun nöronal uçlar boyunca varisler belirgin olarak gözlenmiştir. A β grubunda ise sitoplazmada ve ayrıca hücre çevresinde koyu renkli birikimler belirgin olarak görülmüştür. Düzensiz sınırlara sahip nöron benzeri hücreler ve hücre kümelerini oluşturan çok sayıda yuvarlak, ayrık hücre, bu gruptaki hücre dejenerasyonunu yansıtmaktadır. ADH grubunda çift çekirdekli hücreler ve vakuoller gözlenmiştir. A β H grubunda sitoplazmada birikim gösteren çift çekirdekli hücreler ve çoklu vakuolleri belirgin dejenere hücreler belirlenmiş ve bu grupta nöronal uçlarda bile vakuollerin olduğu görülmüştür. HSV ve AD gruplarında benzer sitopatolojik değişikliklerin gözlenmesi HSV-gB uygulamasının hücreler üzerinde birinci AH modeli ile benzer etki potansiyeline sahip olabileceğini göstermiştir. A β grubunda sitoplazma ve hücre çevresinde koyu renkli birikimler

görülmesi ve bu bulguya paralel olarak bu grupta ölçülen A β ₁₋₄₂ peptit düzeylerinin artmış olmasının hücre içi ve hücreler arası A β birikimine işaret edebileceği düşünülebilir. Önemli bir bulgu olarak ise, ADH grubu ve A β H grubunda gözlenen dejenerasyon düzeyinin tek başlarına AD ve A β grubunda gözlenenden daha fazla olduğu belirlenmiştir ki bu durum HSV-1 enfeksiyonunun AH'nin ilerlemesine katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

5.4. Kompleman Sistem Proteini Düzeyleri

Kompleman sistemi, mikropalara ve antikor aracılı doku hasarına karşı savunmada görev alan, hücre zarında yer alan bir grup proteinden oluşur. Bu sistem, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bir bileşenidir (267). Kompleman proteinleri C1q, C3 ve C4'ün sinir sisteminde iyi eksprese edildiği ve sağlıklı deneklerle karşılaştırıldığında AH hastalarında birkaç kat daha yüksek düzeyde eksprese edildiği gösterilmiştir (16). Kompleman sisteminin bileşenlerinin ve diğer inflamatuvar moleküllerin AH'nin gelişiminde rol oynadığı giderek daha fazla kabul edilmektedir (13). Bu tez çalışmasında kompleman sistemin AH üzerindeki rolü ve HSVgB'nin bu sistem üzerindeki olası etkileri C1q, C3, C6 ve C9 proteinlerinin ölçülmesi ile değerlendirilmiştir.

Zhou ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada farelerde artan C1q seviyelerinin Tau proteini düzeylerinde artışa karşılık geldiğini göstermiştir (16). Başka bir çalışmada ise, Tg2576-AH farelerde C1q ekspresyonu baskılanarak C1q'nun etkileri araştırılmıştır. A β plaklarını çevreleyen aktif glia sayısının C1q eksikliği olan farelerde daha düşük olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda bu farelerde sinaptofizin ve miktotübül ilişkili protein-2 (MAP2) düzeylerinde azalmanın daha az olduğu bulunmuştur. Bu bulgular C1q'nin bir inflamatuvar tepki başlatarak nöronun bütünlüğü üzerinde zararlı bir etkiye sahip olabileceği sonucuna yol açmıştır (268). Sarvari ve ark. (2003) yaptıkları *in vitro* çalışmada ise C1 kompleks inhibitörü C1-Inh'nin hipokampal hücreler üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. C1q inhibisyonunun hipokampal hücreleri A β kaynaklı kompleman lizisinden koruduğu gösterilmiştir (269). Hipokampustaki ve korteksteki nöronlar, genellikle konakçı dokuyu kompleman parçalanmasından koruyan kompleman inhibitörlerinden eksik olduklarından, kompleman aracılı hasara karşı daha savunmasızdır (270). C1q, hem

hipokampusta hafıza oluşturan biyokimyasal süreçlerde önemli bir rol oynar; hem de A β oligomerlerinin sinapslardaki toksisitesini artırır (271).

Çalışmamızda tüm çalışma gruplarında C1q seviyesinin arttığı gözlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla en fazla artış AD ve ADH gruplarında olmuştur. Bu iki grubun aynı zamanda Tau proteini ve APP düzeylerinin de en fazla arttığı grup daha önceki çalışmalarda ortaya sunulan C1q ve Tau proteini düzeylerinin eş zamanlı artması hipotezini destekler niteliktedir. Diğer çalışma gruplarında da, C1q ve Tau proteini düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla benzer oranlarda arttığı görülmüştür. HSV grubunda C1q seviyelerinin artması da HSV-gB uygulamasının nöroinflamasyona sebep olarak AH patolojisine katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda ADH grubunda gözlenen artışın AD grubundan, A β H grubunda gözlenen artışın ise A β grubundan daha fazla olması HSV enfeksiyonunun kompleman sistem aktivasyonu yoluyla hastalığın seyrini kötüleştirebileceğini düşündürmüştür.

5.5. Sitokin Düzeyleri

Kompleman sisteminin bileşenleri dışında inflamasyonun gelişiminde rol oynayan proinflamatuvar sitokinlerin de AH üzerinde etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bazı çalışmalarda bu sitokinlerin nöronları AH kaynaklı toksisiteden koruduğu gösterilmiştir. Örneğin; IL-6 ekspresyonunun AH'nin erken evrelerinde gelişen inflamatuvar hasara karşı koruma sağlayabileceği ileri sürülmüştür (124). Başka bir *in vitro* çalışmada hastalığın klinik öncesi evrelerinde düşük konsantrasyonlarda üretilen TNF- α 'nın A β kaynaklı toksisiteyi önleyebildiği gösterilmiştir (122). Bununla birlikte, AH sürecinde bağışıklık sisteminin uzun süreli uyarılmasının dezavantajları, avantajlarından daha ağır basmaktadır (125). TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi sitokinlerin, kronik olarak yüksek seviyelerde üretildiğinde, doğrudan sitotoksik olduğu bulunmuştur. Ayrıca TNF- α ve IL-1 β 'nin APP sentezini arttırdığı, nöroprotektif etkiye sahip APP alfa sekretaz enziminin ekspresyonunu azalttığı ve A β oluşumunu arttırdığı bulunmuştur (126,127,138). AH'de plaklarda TGF β 1 tespit edilmiştir. AH'li hastaların BOS ve serumunda, demansı olmayan kontrol hastalarına göre daha yüksek TGF β 1 seviyeleri bulunmuştur ki, bu da anti-inflamatuvar savunma mekanizmalarının hastalık sürecinde çalıştığını göstermektedir (142). Ayrıca anti-

inflamatuvar ajanların kullanımı ile AH başlangıcındaki gecikmeyi ilişkilendiren çok sayıda epidemiyolojik çalışma, bu demansa yol açan patojenik olaylarda inflamatuvar süreçlerin katkısını desteklemektedir (272,273). Yapılan bir araştırmada da yaygın bir anti-inflamatuvar ilaç olan ibuprofenin APP'yi aşırı eksprese eden transgenik farelere oral yoldan verilmesinin, IL-1 β ve A β peptitlerinin MSS'deki düzeylerini azalttığı görülmüştür (274).

Çalışmamızda interlökin (IL-1 α , IL-6, IL-10) ve TNF- α düzeylerindeki artışların APP düzeyindeki artışa karşılık geldiği görülmüştür. AD grubunda IL-1 α , IL-6, IL-10 ve TNF- α düzeylerinin 3 kattan fazla düzeyde arttığı görülmüştür. Veriler hücrelerin RA ve BDNF ile farklılaştırma sürecinde proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu artırdığını göstermektedir ve bu durum yaşlanma ve AH gelişim sürecinde bağışıklık tepkisinin uzun süreli aşırı artışının etkisi olabileceğini doğrulamaktadır. Hücrelere A β uygulamasının ise, IL-10 ve TNF- α düzeylerini anlamlı ölçüde arttırdığı görülmüştür. IL-1 α , IL-6 ve TGF- β 1 düzeylerinde ise artış görülmekle birlikte bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar da hücrelerde A β birikiminin hücrelerin bağışıklık tepkisini uyararak sitokin salınımını artırdığını göstermektedir.

HSV-1 enfeksiyonunun, insan mikrogial ve kornea epitel hücrelerinde interferonların ve IL-1 α , TNF- α , IL-6 ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (275,276). Çalışmamızda HSV-1 gB uygulamasının IL-10 düzeylerini anlamlı düzeyde arttırdığı; IL-1 α , IL-6, TNF- α ve TGF- β 1 düzeylerinde ise anlamlı düzeyde artışa yol açmadığı gözlemlenmiştir. HSV grubunda AH parametrelerinde meydana gelen değişiklikler ve sitokin düzeyleri birlikte ele alındığında, HSV enfeksiyonunun AH patolojisi üzerindeki olası mekanizmalarından birinin bağışıklık tepkisinin uzun süreli uyarılması olduğu düşünülebilir. Ayrıca, hem ADH hem de A β H grubunda gözlenen sitokin düzeylerinin tek başına AD ve A β grubunda gözlenen düzeylerden daha fazla olması, HSV enfeksiyonunun AH sürecinde MSS'de meydana gelen inflamasyon sürecini şiddetlendirerek hastalığın gelişmesini hızlandırabileceğini göstermektedir.

5.6. DNA Metilasyonu

Genlerin promotor bölgelerinde meydana gelen DNA metilasyonu, transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını inhibe ederek doğrudan gen ekspresyonunun durdurulmasına yol açar (185). PSEN-1 gibi genlerin promotör bölgelerinin hipometilasyonu A β gibi ürünlerin üretiminin artması ile sonuçlanır (207). Mano ve ark. (2017)'nin yaptıkları çalışmada, normal beyin örnekleri postmortem AD beyin örnekleri ile karşılaştırılmıştır. DNA onarım proteinini kodlayan BRCA1 geninin promotör bölgesinin AH beyinde hipometile olduğu bulunmuştur (216). PSEN-1 gibi genlerin promotör bölgelerinin hipometilasyonunun, A β üretiminde artışa yol açtığı bulunmuştur (207). APP geninin, promotör bölgesi normal fizyolojik koşullarda metilasyonu ile susturulur. Bununla birlikte, yaşlanma sırasında bu gen demetile duruma geçerek, APP ekspresyonunu ve sonuç olarak beyinde A β birikimini artırır (215). AH'de genellikle spesifik olarak hipokampal ve serebral korteks hücrelerinin DNA metilasyonunda azalmalar gözlenmiştir. Örneğin, postmortem AH beyinlerinden alınan kortikal nöronlarda, 5-mc seviyeleri sağlıklı kontrollerinkinden daha düşük bulunmuştur. Benzer şekilde, AH hastalarının hipokampusunda, serebral kortekste ve serebellumda düşük 5-mc düzeyleri bildirilmiştir. Ayrıca, DNMT-1 ve metillenmiş DNA-bağlayıcı 2 gibi bazı metilasyon koruma faktörlerinin, sağlıklı kontrollerin aksine AH'li beyinlerin hipokampusunda azaldığı bulunmuştur (213,214). DNMT1 enzimi gibi metilasyonla ilgili bazı faktörlerin de, AH hastalarında entorhinal korteks tabakasının nöronlarında önemli ölçüde azaldığı ve buna bağlı azalan metilasyon düzeyleri sergiledikleri gözlenmiştir (210). Yaşlı farelerin hipokampusunda DNMT3a2'nin aşırı ekspresyonu ise genel metilasyon düzeyini artırmış ve hafızayı geliştirmiştir (219).

Çalışmamızda HSV, AD ve ADH gruplarında kontrole göre anlamlı ölçüde azalmış DNA metilasyonu seviyeleri gözlenmiştir. Birinci Alzheimer modelinde görülen global hipometilasyon yapılan çalışmalardan elde edilen verilerle tutarlıdır (216-219). HSV grubunda da AD grubu ile benzer bir metilasyon düzeni görülmesi HSV-1 enfeksiyonunun hipometilasyon mekanizması yoluyla hücre yaşlanmasına ve AH patogeneze katkıda bulunabileceğini göstermiştir. Bunun tersine ikinci Alzheimer modeli olan A β grubunda DNA metilasyonu düzeyinin kontrol grubu ve diğer çalışma gruplarına göre anlamlı düzeyde arttığı bulunmuştur. Böylece iki farklı

Alzheimer modelinin farklı DNA metilasyon profili gösterdiği bulunmuştur. Taher ve ark. (2014)'nın yaptıkları *in vitro* çalışmada kolinerjik IMR-32 insan nöroblastoma hücrelerinin A β ₁₋₄₀ peptidine maruz bırakılması sonucunda global DNA metilasyonunun değişmediğini göstermişlerdir. Ancak, nöral farklılaşma ve apoptozu yönlendiren gen bölgelerinde hem hipermetilasyon hem de hipometilasyon durumu görülmüştür (211). İki Alzheimer modeli arasında meydana gelen DNA metilasyonu profili farklılığına birinci modelin (AD grubu) hücre yaşlanmasını temel alması sebebiyle yaşlanma ile birlikte görülen hipometilasyon çalışmaları ile benzerlik göstermesi (203,204); hücrelere A β ₁₋₄₂ peptidi uygulanması ile oluşturulan A β grubunda ise nörogenezde görev alan ve α -sekretaz gibi normal fizyolojik koşullar için gerekli olan enzimleri kodlayan genlerin promotor bölgelerinde oluşabilecek hipermetilasyonun toplam DNA metilasyonu oranını artırması şeklinde yorumlanabilir. Bie ve ark. (2014) yaptıkları *in vivo* çalışmadan da bu hipotezi destekleyebilecek veriler elde edilmiştir. Çalışmada A β ₁₋₄₂ enjekte edilen sıçanların beyinlerinde neuroligin-1 (NLGN1) geninin promotör bölgelerinde hipermetilasyon görülmüştür. Bu da NLGN1 ekspresyonunda azalma ile birlikte sinaptik plastisitenin azalmasına ve bunun sonucunda hafıza ve öğrenmede bozulmaya neden olmuştur (277).

5.7. Histon Modifikasyonları

Histon modifikasyonları MSS'nin gelişimi, travma sonrası stres bozuklukları, hafıza oluşumu ve bağımlılık gibi geniş nörobiyolojik süreçlerde yer alır. Ayrıca, histon modifikasyonlarının nöronal farklılaşma, kolin asetiltransferaz aktivitesinin düzenlenmesi, BDNF transkripsiyonu, mikrogial apoptoz, akson oluşumu ve sinaptik budama gibi birçok spesifik fizyolojik olayda da önemli görevleri vardır (220,222). Nörodejeneratif hastalıklar için en dikkate değer risk faktörü yaştır ve yaşlanma doğrudan bilişsel kapasitedeki düşüşle ilişkilidir. Bu nedenle, beyin yaşlandıkça görülen kromatin değişiklikleri, bilişsel bozulmayı önlemek için önemli hedefler olabilir. Ek olarak, bu tür değişiklikler dejeneratif hastalıkların gelişimine katkıda bulunabilir. Değişen histon asetilasyon ve metilasyon düzeyleri ileri yaşla ilişkilendirilmiştir (278). Yaşlanma ile birlikte histon modifikasyonlarının farklı düzeylerde ve yönlerde değişebileceği gözlenmiştir. Hayvan modellerinde yapılan incelemelerde yaşlanma ile birlikte serebral korteks ve hipokampüste H3K9me2,

H3K9me3 ve H3K27me3 seviyelerinde azalma; H3K36me3 ve H3K27ac düzeylerinde ise artış gözlenmiştir (279). Yaşlı farelerde BDNF gen promotör bölgelerinde H3K27ac düzeyinin azaldığı, H3K27me3 düzeyinin ise arttığı bulunmuştur (280).

Histon asetilasyonu gibi post-translasyonel modifikasyonlar, beyindeki gen aktivasyonu ve baskılanmasındaki rolleri için giderek daha fazla tanınmaktadır. Epigenetik faktörler, hafıza ve uzun süreli sinaptik plastisite ile ilgili genlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (201). AH'nin fare modellerinde genellikle H3 ve H4 hipoasetilasyonu görülmüştür. Son zamanlarda yapılan bir araştırmada, histon H3 ve H4'te hipoasetilasyonun NLGN1 ekspresyonunda azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (277). Normal yaşlanma, sağlıklı yaşlı kortekste H4K16ac düzeylerindeki artışlarla ilişkilidir. Buna karşılık, H4K16ac, AH'li bireylerin korteksinde dramatik bir şekilde kaybolur ve bu durum yaşlı AH durumunda beyindeki nöronların H4K16ac modifikasyonunu yukarı yönlü regüle edemediğine işaret eder (281). Marzi ve ark. (2018) AH'li bireylerin entorinal korteksinde gen ekspresyonunun kritik bir belirteci olan H3K27'nin asetilasyonunu (H3K27ac) incelemişlerdir. Bu araştırmada AH patolojisi ile ilişkili gen bölgelerinde (APP, PSEN1, PSEN2, vb.) asetilasyon düzeylerinin değiştiği gözlenmiştir (282). Benzer şekilde, Klein ve ark. (283) 669 kişilik büyük bir kohortta H3K9'un (H3K9ac) asetilasyonunu A β veya Tau protein ekspresyonu için önemli gen bölgelerinde araştırmışlardır. Özellikle, Tau patolojisi ile ilgili gen bölgelerinde H3K9ac düzeylerinde büyük genomik değişiklikler gözlemlemişlerdir (283). Bu çalışmaların yanında histon H3 hiperasetilasyonunun da A β ile ilişkili patogeneze başta olmak üzere, AH patolojisinde etkili olabileceğine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bir çalışmada, kontrollere kıyasla AH vakalarının post-mortem incelenen neokortekslerinde lys-9'da histon H3'ün hiperasetilasyonu gözlenmiştir (284). Gu ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada ise, SH-SY5Y hücrelerinde hidrojen peroksit uygulaması sonucu indüklenen oksidatif stres histon asetilasyon seviyelerini arttırmıştır (285).

Çalışmamızda HSV, AD ve ADH gruplarında histon H3 ve H4 proteinlerinde global asetilasyon seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla 2 kattan daha fazla azaldığı bulunmuştur. Histon H3 ve H4 hipoasetilasyonu gözlenmesi yapılan diğer bazı AH çalışmalarında elde edilen verilerle uyumludur. HSV grubunda gözlenen

hipoasetilasyon düzeyinin AD grubu ile benzer olması diğer parametrelerde olduğu gibi HSV-gB'nin histon asetilasyon düzeyini etkileyerek hücre yaşlanmasına yol açabileceği ve AH patolojisine katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Ayrıca birinci Alzheimer modeli ile kombine olarak HSV-gB uygulanan ADH grubunda asetilasyon düzeylerinin hem HSV hem de AD grubundan daha düşük düzeyde olması HSV enfeksiyonunun hastalığın seyrini de kötüleştirebileceğini göstermektedir. Çalışmamızda kullanılan ikinci Alzheimer modeli olan A β grubunda ise anlamlı düzeyde olmamakla birlikte, histon H3 ve H4'te asetilasyon düzeyinin arttığı gözlenmiştir. A β ₁₋₄₂ peptidinin HSV-gB ile birlikte kombine olarak uygulandığı A β H grubunda ise, asetilasyon düzeyinin kontrol grubu ile benzer olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla, RA ve BDNF ile indüklenen ve hücre yaşlanması mekanizması ile işleyen birinci model ve A β ₁₋₄₂ peptidini ile doğrudan indüklenen ikinci modelin asetilasyon kalıplarının farklı olması, AH'nin iki modelde farklı patolojilerle ortaya çıkabileceğine işaret eder niteliktedir. A β H grubunda ise, kontrol grubu ile benzer toplam asetilasyon düzeyinin gözlenmesi HSV-gB'nin histonun bazı pozisyonlarında hipoasetilasyona, A β ₁₋₄₂ peptidinin ise histonun bazı pozisyonlarında hiperasetilasyona neden olması ile açıklanabilir.

Çalışmamızda histon H3 ve H4'ün çoklu modifikasyonlarının ölçülmesi sonucu elde edilen verilerden de önemli bulgular elde edilmiştir. H3 lys-9 pozisyonundaki asetilasyon (H3K9ac) düzeylerinin ölçülen tüm çalışma gruplarında kontrol grubuna kıyasla azaldığı bulunmuştur. H3K14ac ve H3K18ac düzeyleri ölçüldüğünde ise, AD ve HSV gruplarında tek başlarına asetilasyonun değişmediği ancak; iki grubun kombine maruziyeti olan ADH grubunda asetilasyonun anlamlı ölçüde düştüğü görülmüştür. Bu modifikasyonlarda gözlenen farklar ADH grubunda HSV ve AD grubunda ölçülen toplam H3 asetilasyon düzeyinden daha düşük asetilasyon düzeyinin gözlenmesinin nedenleri olarak düşünülebilir. Histon H4 lys-5 pozisyonunda asetilasyon (H4K5ac) düzeylerine bakıldığında ise, HSV ve AD gruplarında asetilasyon seviyesinin kontrol grubuna göre azaldığı; ADH grubunda ise asetilasyon düzeylerinde azalma görülmekte ve bu azalmanın HSV ve AD gruplarında görülen azalmanın iki katından olduğu görülmüştür. Bu durum, HSV enfeksiyonunun AH hastalığının seyrinin kötüleşmesinde etkili olmasının mekanizmasının H4K5ac modifikasyonu üzerinden olabileceğini göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, H4K5

hipoasetilasyonunun farelerde azalan hafıza fonksiyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (286). A β grubunda ise, H4K12 ve H4K16 pozisyonlarında asetilasyon seviyelerinin arttığı bulunmuştur. Bu bulgular hücrelerde A β ₁₋₄₂ peptiti birikmesinin AH patogenezinde etkili genlerin ekspresyonunda artışa sebep olarak hastalığın seyrine etki edebileceğine işaret etmektedir.

Yaşlanma ve bilişsel işlevlerde azalma ile histon metilasyon proteinlerinin global birikimi veya kaybına ve ardından birçok genin ekspresyonunun değişmesine yol açabilir (191). Smith ve ark. (2021) yaptıkları çalışmada ANK1 geninde H3K4me3 ve H3K27me3 modifikasyonlarını ölçülmüştür. Ölçülen genomik bölgelerde H3K4me3 seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir. H3K4me3'teki azalma, genellikle azalan gen ekspresyonu ile ilişkilendirilir ve ANK1 gen ekspresyonunun azalmasının AH patolojisine katkıda bulunacağı düşünülmüştür (287).

En çok çalışılan histon modifikasyonlarından ikisi, sırasıyla gen ekspresyonu ve baskılama belirteçleri olan H3'ün (H3K4me3 ve H3K27me3) 4 ve 27 pozisyonlarındaki lizinin tri-metilasyonudur (288). Çalışmamızda hem H3K4me3 hem de H3K27me3 düzeylerinin ölçülen tüm çalışma gruplarında kontrol grubuna kıyasla azaldığı bulunmuştur. İki modifikasyon da incelendiğinde, ADH grubunda gözlenen azalmanın tek başına HSV ve AD gruplarında gözlenen azalmadan daha fazla olduğu görülmüştür. Bu bulguya dayanarak HSV-gB uygulamasının bu pozisyonlarda hipometilasyonu indükleyebileceği ve AH seyrine etki edebileceği düşünülebilir. A β grubunda ise H4K20m1 ve H4K20m2 düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla arttığı gözlenmiştir. Elde edilen bu veriler, çalışmamızda kullanılan iki farklı Alzheimer modelinin histon metilasyonu düzeylerin farklı mekanizmalar üzerinden etkileyerek farklı AH patolojilerine yol açtığına işaret eder niteliktedir.

Ogawa ve ark. (2003)'nın yaptıkları çalışmada, AH'li bireylerden alınan hipokampus dokularında incelenen nöronlarda H3 fosforilasyonunun kontrol grubuna kıyasla arttığı görülmüştür. Özellikle dikkat çekici olan ise H3 ser-10 pozisyonundaki fosforilasyon (H3Ser10P) artışlarının, fosforile edilmiş Tau dağılımıyla hemen hemen aynı olmasıdır (289). Çalışmamızda deney gruplarında ölçülen H3Ser10P düzeylerine bakıldığında ise, HSV ve AD gruplarında kontrol grubuna kıyasla değişim gözlenmezken; ADH grubunda fosforilasyon düzeyinin azaldığı gözlenmiştir. Daha

önce yapılan çalışma ile elde ettiğimiz buğuların farklı olmasının nedeni HSV'nin AH gelişiminde farklı mekanizmaları etkilemesi olduğu düşünülebilir.

Gjoneska ve ark. (2015) p25 AD fare modeli kullanarak yaptıkları çalışmada, AH sürecinde meydana gelen epigenetik değişikliklerin bağışıklık tepkisi ile ilişkili genlerin ekspresyonunu artırdığını; sinaptik işlevler ve öğrenme süreci ile ilişkili genlerin ekspresyonunu ise azalttığını göstermişlerdir. Bu veriler AH sürecinde epigenetik değişiklikler ve nöro-immün cevaplardaki dengesizliğin birbirleriyle ilişkili olabileceğini göstermektedir (290). Yaptığımız çalışmada tüm çalışma gruplarında meydana gelen DNA metilasyonu, histon metilasyonu ve histon asetilasyonu düzensizliklerinin inflamatuvar sitokin üretimi ve kompleman sistem aktivasyonu ile birlikte geliştiği gözlenmiştir ve bu durum hem epigenetik düzensizliklerin hem de nöroinflamasyon belirteçlerinin eşgüdüm içerisinde AH patolojisini oluşturabileceğini düşündürmektedir.

5.8. Histon Deasetilaz Seviyeleri

Histon deasetilaz ekspresyonu ve aktivitesi doğrudan histon asetilasyonu ile ilgili bir biyomarkör olarak kullanılabilir. Artan HDAC2 seviyeleri CK-p35 fare modellerinde bilişsel bozulma ile ilişkilendirilmiştir. Farelerin beyinlerinde yapılan post-mortem çalışmalar, hipokampüste HDAC1 veya HDAC3'ün değil, HDAC2'nin arttığını göstermiştir. Bu durum, farklı enzim alt gruplarının farklı etkileri olabileceğini göstermektedir (198,199). Farelerde yapılan çalışmalar, HDAC2'nin nörona özgü aşırı ekspresyonunun dendritik uç yoğunluğunu, sinaps sayısını, sinaptik plastisiteyi ve hafıza fonksiyonunu azalttığını ortaya koymuştur. Bununla birlikte, HDAC2'nin eksikliği sinaptik uç sayısını arttırmış ve hafıza fonksiyonlarını güçlendirmiştir (199). Ayrıca monozygotik ikizlerle yapılan bir çalışmada da periferik kan hücrelerinde HDAC2 ve HDAC9 ekspresyon düzeyleri, AH olan ikizlerde sağlıklı olanlara göre daha yüksek bulunmuştur (291).

Ding ve ark. (2008) yaptıkları *in vitro* çalışmada insan embriyonik böbrek hücrelerinin HDAC6 artışının Tau fosforilasyonunu artırdığı ve aynı hücrelerde HDAC6'nın baskılanmasının Tau fosforilasyonunu azalttığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada, AH'li bireylerden alınan post-mortem beyin örneklerinde, HDAC6 seviyelerinin kortekste ve hipokampüste sırasıyla %52 ve %91 oranında arttığı

bulunmuştur. Tau proteinlerinin de hipokampüste HDAC6 ile kolokolize olduğu gözlenmiştir (292) *Drosophila* ve farelerde yapılan son çalışmalar ise, HDAC6 düzeylerindeki artışın AH gelişiminde etkili olduğunu göstermiştir (293,294). Janczura ve ark. (2018) yaptıkları bir çalışmada, 3xTg-AH fare modeli ve HEK-293 hücrelerinde HDAC3 ekspresyonundaki artışın H3 ve H4 asetilasyonunun artışına ve BDNF miktarındaki azalma ile birlikte Tau fosforilasyonuna neden olduğunu belirlemişlerdir (295). Bu bilgiler AH patogeneziyle ilişkili bulunan histon hipoasetilasyonunun altında HDAC enzim ekspresyonu ve aktivitesindeki artışların olabileceğine işaret eder niteliktedir.

Çalışmamızda HDAC3 düzeyinin AD ve ADH gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı; HSV grubunda daha az belirgin bir artış olduğu ve A β ve A β H gruplarında ise değişim olmadığı görülmüştür. HDAC8 düzeylerine bakıldığında ise kontrol grubuna kıyasla HSV, AD ve ADH gruplarında artış, A β ve A β H gruplarında ise azalma olduğu ve bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu görülmüştür. HDAC düzeyleri ve H3 ve H4 asetilasyon düzeyleri birlikte incelendiğinde ise, sonuçların birbirini desteklediği görülmüştür. HDAC düzeylerinde en fazla artışın görüldüğü AD ve ADH grupları aynı zamanda histon asetilasyonunda en fazla azalmanın görüldüğü gruplar olmuştur. Bu korelasyon gözlenen hipoasetilasyonun mekanizmasının HDAC seviyelerinin artmasına bağlı olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, hem HSV grubunda artış gözlenmesi hem de AH modellerinin HSV-gB ile kombine edildiği gruplarda (ADH ve A β H) HDAC düzeyindeki artışın ayrı ayrı AD ve A β H gruplarında gözlenen artıştan fazla olması HSV-gB uygulamasının bağımsız olarak HDAC düzeyini artırarak hücrelerde epigenetik düzensizliğe sebep olabileceğini göstermiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sunulan bu tez çalışmasında HSV-1 enfeksiyonunun AH üzerindeki olası etkileri HSV-1 gB uygulamasının SH-SY5Y hücreleri üzerinde hem inflamatuvar hem de epigenetik parametreler üzerindeki etkileri ölçülerek değerlendirilmesi amaçlanmıştır. HSV-1'in nöroinflamasyon süreci üzerindeki etkilerini değerlendirmek için kompleman sistem proteinleri (C1q, C3, C6 ve C9) ve bazı sitokinler (IL-1 α , IL-6, IL-10, TNF- α ve TGF- β 1) ölçülmüştür. Epigenetik düzensizliğin değerlendirilmesi için ise DNA metilasyonu, H3 ve H4 asetilasyonu, H3 ve H4'ün farklı pozisyonlarda çoklu modifikasyonları (asetilasyon, metilasyon ve fosforilasyon) ve HDAC3 ve HDAC8 enzim düzeyleri ölçülmüştür. Ayrıca hücrelerde iki farklı AH modeli oluşturarak hastalığın patogenezinde nöroinflamasyonun ve epigenetik değişikliklerin oynadığı rolün araştırılması amaçlanmıştır. Son olarak iki AH modeline ayrı olarak kombine HSV-gB uygulamasının hastalıkta meydana gelebilecek olası düzensizlikler üzerinde artırıcı etkisi olup olmayacağı belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

1. HSV-gB'nin sitotoksik etkisinin belirlenmesi için yapılan MTT testinde SH-SY5Y hücrelerinde 24 saatlik uygulama ile HSV-gB için IC₅₀ ve IC₂₀ değerleri sırasıyla 1088 pg/ml ve 190,5 pg/ml olarak bulunmuştur.
2. Tüm gruplarda hücre içi ROS düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). En fazla artış A β uygulanan gruplarda belirlenmiştir (A β 'da ~%33 ve A β H gruplarında ~%32). AD grupları değerlendirildiğinde, ROS düzeylerinde artış kontrole göre AD grubunda ~%26, ADH grubunda ise ~%25 olarak belirlenmiştir. HSV-gB uygulana grupta ROS oluşumunun kontrol grubuna göre ~%22 oranında arttığı bulunmuştur. Ancak, HSV-gB uygulamasının her iki AH model grubunda da hücre içi ROS üretimi üzerinde ek bir etkiye neden olmadığı görülmüştür.
3. HSV-gB grubunda kontrole göre A β ₁₋₄₂ düzeyinde anlamlı bir artış (~%91) gözlenmiştir ($p < 0,05$). AD grubunda artış gözlenmesine rağmen (~%48) bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). ADH, A β ve A β H grupları incelendiğinde, tüm gruplarda A β ₁₋₄₀ düzeyleri kontrole göre anlamlı derecede yüksek (sırasıyla 2,6 kat, 3,4 kat ve 3,3 kat) olarak gözlenmiştir.

4. Fosforile Tau protein düzeyleri HSV, AD ve ADH gruplarında kontrole kıyasla önemli ölçüde artmıştır (sırasıyla ~%93, ~%127 ve ~%117, $p<0,05$). A β ve A β H gruplarında hafif bir artış olmasına rağmen bu artışlar kontrole göre anlamlı bulunmamıştır. HSV grubu A β gruplarından önemli ölçüde farklılık göstermezken, AD ve ADH gruplarında fosforile Tau protein seviyeleri A β gruplarından anlamlı derecede yüksek olarak belirlenmiştir ($p<0,05$).
5. Çalışma gruplarındaki APP düzeyleri incelendiğinde, kontrol grubuna göre en yüksek artışın AD ve ADH gruplarında olduğu görülmüştür (sırasıyla 1,2 kat ve 1,5 kat; her ikisi de $p<0,05$). ADH grubundaki artış AD grubundaki artıştan (~%10) daha yüksek olmasına rağmen, AD ve ADH grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). HSV ve A β grubunda kontrole kıyasla APP seviyelerinde artışlar gözlenmiş (sırasıyla ~%31 ve ~%63); ancak bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).
6. Interlökin 1 α düzeyleri incelendiğinde kontrole göre sadece AD ve ADH gruplarında yaklaşık 2 kat olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür. HSV ve A β H gruplarında ise kontrole göre artış bulunmakla birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (sırasıyla %15,57 ve %22,76, $p>0,05$). HSV'nin A β ile birlikte uygulandığı grupta ise sadece A β uygulanan gruba göre IL-1 α düzeyi %28,04 daha yüksek olarak belirlenmiştir ($p>0,05$).
7. Interlökin 6 düzeylerinin HSV-gB uygulamasıyla değişmediği görülmüştür. AD ve ADH gruplarında kontrole göre ~3 kat artış gözlenmiştir ($p<0,05$). ADH grubunda IL-6 düzeyleri AD grubuna göre daha yüksek olmasına rağmen arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). A β grubunda IL-6 düzeyleri kontrol grubuna göre %26,6 daha yüksek bulunmuştur ($p>0,05$). A β H grubunda ise IL-6 düzeyleri kontrol grubuna göre %76,6 oranında artmıştır ($p<0,05$).
8. Tüm çalışma gruplarında IL-10 düzeylerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenmiştir. AD ve ADH gruplarında kontrole göre en yüksek IL-10 düzeyleri belirlenmiştir (sırasıyla 6 kat ve 8 kat). Bu gruplardaki artış, diğer çalışma gruplarına göre de anlamlı derecede yüksek olarak belirlenmiştir. HSV-gB uygulaması IL-10 düzeylerini %62 artırmıştır. A β ve A β H gruplarında

da IL-10 düzeyleri kontrole göre belirgin şekilde yüksek bulunmuştur (sırasıyla %147 ve %187; $p<0.05$).

9. Tümör nekroz faktörü α düzeyleri AD ve ADH gruplarında kontrol grubuna göre neredeyse 3 kat daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). A β H grubunda da kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış (%134) gözlemlenmiştir. A β grubunda ise (%44) artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p>0.05$).
10. Tümör büyüme faktörü β 1 düzeyleri karşılaştırıldığında kontrole göre tek anlamlı değişiklik %29'luk artışla A β H grubunda görülmüştür. AD ve ADH gruplarında düzeylerin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeylerde azaldığı bulunmuştur (sırasıyla %9,3 ve %7,5).
11. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm çalışma gruplarında C1q düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. En fazla artışın görüldüğü gruplar AD ve ADH grupları olmuştur (sırasıyla 4,3 kat ve 5,4 kat). Bu gruplardaki artışın diğer çalışma gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. ADH grubundaki artış AD grubundaki artıştan daha yüksek olmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. HSV-gB uygulamasının C1q düzeylerini ~2 kat arttırdığı görülmüştür. A β ve A β H grupları da C1q seviyelerini sırasıyla her iki grupta da ~2 kat arttırdığı görülmüştür.
12. Kompleman C3 düzeyleri AD ve ADH gruplarında kontrole göre 3,6 kat artmıştır ($p<0.05$). ADH grubunda da kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış (~2 kat) gözlemlendi. A β grubunda artış (%80,6) olmasına rağmen, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).
13. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm çalışma gruplarında C6 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. C6 düzeyleri HSV grubunda kontrol grubuna göre %53,6 artmıştır ($p<0.05$). Diğer gruplarla karşılaştırıldığında en fazla artışın ADH grubunda olduğu bulunmuştur (kontrol grubuna göre 3,5 kat daha yüksek). A β ve A β H gruplarında ise kontrole göre C6 düzeylerinin sırasıyla 2,3 ve 2,5 kat arttığı görülmüştür ($p<0.05$). AD grubunda A β grubuna kıyasla belirgin şekilde daha yüksek (%39,7) C6 seviyeleri olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

14. HSV-gB uygulamasıyla C9 seviyelerinin değişmediği görülmüştür. En fazla artışın görüldüğü gruplar ise AD ve ADH grupları olmuştur (sırasıyla 5,2 kat ve 6 kat). A β grubunda C9 düzeyleri kontrol grubuna göre %49,3 daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). A β H grubunda ise C9 düzeyleri kontrole göre 2,83 kat yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca A β H grubunun C9 düzeyleri A β grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek (%89,57) bulunmuştur.
15. Kontrol grubu ile kıyaslandığında DNA metilasyon düzeylerinin HSV, AD ve ADH gruplarında anlamlı düzeyde düştüğü görülmüştür (%35,8, %45,9, %44,8, sırasıyla; $p<0,05$). A β grubunda, global DNA metilasyonu kontrol grubuna göre %55,5 oranında artmıştır ($p<0,05$). A β H grubunda ise global metilasyon düzeyinin kontrol grubundan %16 fazla olduğu; ancak, bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$). İki Alzheimer grubu birbiriyle karşılaştırıldığında ise A β grubunda global metilasyon düzeyinin AD grubundan ~2 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Alzheimer gruplarına HSV-gB uygulanması sonucunda, AD ve ADH grupları arasında fark gözlenmezken, A β H grubunda global metilasyon düzeyinin A β grubundan %25,3 daha düşük olduğu görülmüştür ($p<0,05$).
16. Kontrol grubu ile kıyaslandığında HSV, AD ve ADH gruplarında H3 asetilasyonunun anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür (%56,9, %58,9, %76,9, sırasıyla; $p<0,05$). A β grubunda asetilasyonun kontrol grubuna göre %31,6 oranında arttığı görülmüştür ancak artış anlamlı değildir ($p>0,05$). A β H grubunda da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde bir azalış gözlenmiştir (%33,5; $p>0,05$). HSV, AD ve ADH gruplarında H3 asetilasyon düzeyinin A β grubuna göre de anlamlı düzeyde düşük olduğu ölçülmüştür (%67,3, %68,8, %82,5, sırasıyla; $p<0,05$).
17. Kontrol grubu ile kıyaslandığında HSV, AD ve ADH gruplarında H4 asetilasyonunun anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür (%68,9, %61,5, %72,5, sırasıyla; $p<0,05$). A β ve A β H gruplarında ise kontrol grubuna göre fark olmadığı gözlenmiştir. HSV, AD ve ADH gruplarında H3 asetilasyon düzeyinin A β grubuna göre de anlamlı düzeyde düşük olduğu ölçülmüştür (sırasıyla %70,2, %62,9, %73,6; $p<0,05$).

18. HSV grubunda H3 metilasyon düzeylerinin kontrol grubundan daha düşük düzeyde olduğu görülmüştür. AD ve ADH gruplarında da HSV grubu ile benzer şekilde metilasyon modifikasyon düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir. ADH grubunda özellikle lys-4 kalıntısında meydana gelen modifikasyonlar (H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3) başta olmak üzere metilasyon düzeyindeki azalmanın, HSV ve ADH grubuna kıyasla daha fazla olduğu ölçülmüştür.
19. Kontrol grubu ile kıyaslandığında AD ve ADH gruplarında HDAC3 düzeylerinin 2 kattan daha fazla arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). HSV grubunda da kontrol grubuna oranla %31 oranında artış gözlenmekle birlikte, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. A β ve A β H gruplarında ise, kontrol grubuna kıyasla önemli bir değişim gözlenmemiştir. AD ve ADH gruplarında gözlenen artışın diğer çalışma gruplarında gözlenen artıştan da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). ADH grubunda HDAC3 seviyesi AD grubundan da %28 oranında daha fazla olmakla birlikte, aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).
20. Kontrol grubu ile kıyaslandığında HSV, AD ve ADH gruplarında HDAC8 düzeylerinin anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür (sırasıyla %22,5, %42,6, %92,1; $p<0,05$). A β ve A β H gruplarında ise, HDAC8 düzeyinin kontrol grubundan sırasıyla %49,7 ve %34,3 oranında daha düşük olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). ADH grubundaki artışın hem HSV hem de AD grubundan (%56,8 ve %34,7, sırasıyla) daha yüksek olduğu görülmüştür ve HSV ile ADH grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ölçülmüştür ($p<0,05$).

Bu tez çalışmasından elde edilen veriler birlikte ele alındığında, kronik nöroinflamasyonun AH gelişiminde önemli bir rol oynayabileceği görülmüştür. Ayrıca HSV-1'in indüklediği inflamatuvar faktörlerin ekspresyonunun AH'nin başlangıcına veya ilerlemesine katkıda bulunabileceğini gösterilmiştir. AH gibi çok faktörlü bir hastalıkta, her faktörün katkısının ve altta yatan mekanizmaların belirlenmesi, hastalığı önlemek ve/veya ilerlemesini yavaşlatmak için yeni terapötik stratejiler geliştirmede kritik öneme sahip olmaktadır. Bu verilerden yola çıkarak anti-

inflatuar tedavilerin AH gelişimini ve ilerlemesini yavaşlatmaya yönelik yeni terapötik yaklaşımlar olarak belirlenebileceği düşünülebilir.

Çalışmamızdan elde edilen bulgular ışığında, epigenetik düzensizliklerin AH gelişiminde etkili olabileceği söylenebilir. AH gelişimi ile ilişkili epigenetik işaretlerin tanımlanması, AH ilerlemesini haritalamak için mükemmel tanısal belirteçler sağlayacak ve AH'nin başlangıçta nasıl başladığına dair yeni epigenetik bir model önerecektir. Ayrıca, tez kapsamında AH'de DNA metilasyonu gibi tersine çevrilebilir bir süreç ile ilgili verilerin literatüre sunulması genomda yaşa bağlı değişiklikleri önlemeyi veya hatta geri almayı amaçlayan epigenetik terapötiklerin geliştirilmesine katkı sağlayabilecektir. Bu konuda yapılacak ve spesifik genleri hedef alan daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu görülmektedir. Bu tezden elde edilen verilerin değerlendirilmesiyle, ileride epigenetik modifikasyonları düzenlemeye yönelik yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi sağlanabilir. Ayrıca, elde edilen veriler AH'de meydana gelen nörodejenerasyonun yavaşlatılması ve iyileştirilmesi yönünde yeni çalışmaların yapılması için bir yol açabilir.

7.KAYNAKLAR

1. Ferrari R, Kapogiannis D, Huey ED, Momeni P. FTD and ALS: a tale of two diseases. *Curr Alzheimer Res.* 2011;8(3):273-94.
2. Burns A, Byrne EJ, Maurer K. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2002;360(9327):163-5.
3. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2010;362(4):329-44.
4. Wang J, Gu BJ, Masters CL, Wang YJ. A systemic view of Alzheimer disease - insights from amyloid- β metabolism beyond the brain. *Nat Rev Neurol.* 2017;13(10):612-623.
5. Imtiaz B, Tolppanen AM, Kivipelto M, Soininen H. Future directions in Alzheimer's disease from risk factors to prevention. *Biochem Pharmacol.* 2014;88(4):661-70.
6. Piacentini R, De Chiara G, Li Puma DD, Ripoli C, Marcocci ME, Garaci E, ve ark. HSV-1 and Alzheimer's disease: more than a hypothesis. *Front Pharmacol.* 2014;5:97.
7. Lewandowski G, Zimmerman MN, Denk LL, Porter DD, Prince GA. Herpes simplex type 1 infects and establishes latency in the brain and trigeminal ganglia during primary infection of the lip in cotton rats and mice. *Arch Virol.* 2002;147(1):167-79.
8. Dobson CB, Wozniak MA, Itzhaki RF. Do infectious agents play a role in dementia? *Trends Microbiol.* 2003;11(7):312-7.
9. Ball MJ. "Limbic predilection in Alzheimer dementia: is reactivated herpesvirus involved?". *Can J Neurol Sci.* 1982;9(3):303-6.
10. Wozniak MA, Itzhaki RF, Shipley SJ, Dobson CB. Herpes simplex virus infection causes cellular beta-amyloid accumulation and secretase upregulation. *Neurosci Lett.* 2007;429(2-3):95-100.
11. De Chiara G, Marcocci ME, Civitelli L, Argnani R, Piacentini R, Ripoli C, ve ark. APP processing induced by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) yields several APP fragments in human and rat neuronal cells. *PLoS One.* 2010;5(11):e13989.
12. Cheng SB, Ferland P, Webster P, Bearer EL. Herpes simplex virus dances with amyloid precursor protein while exiting the cell. *PLoS One.* 2011;6(3):e17966.
13. Dorey E, Chang N, Liu QY, Yang Z, Zhang W. Apolipoprotein E, amyloid-beta, and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull.* 2014;30(2):317-30.
14. Mirzaei M, Deng L, Gupta VB, Graham S, Gupta V. Complement pathway in Alzheimer's pathology and retinal neurodegenerative disorders - the road ahead. *Neural Regen Res.* 2020;15(2):257-258.
15. Mosher KI, Wyss-Coray T. Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol.* 2014;88(4):594-604.

16. Zhou J, Fonseca MI, Pisalyaput K, Tenner AJ. Complement C3 and C4 expression in C1q sufficient and deficient mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2008;106(5):2080-92.
17. Ziabska K, Ziemka-Nalecz M, Pawelec P, Sypecka J, Zalewska T. Aberrant complement system activation in neurological disorders. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9):4675.
18. Shah A, Kishore U, Shastri A. Complement System in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2021;22(24):13647.
19. Ng A, Tam WW, Zhang MW, Ho CS, Husain SF, McIntyre RS, Ho RC. IL-1 β , IL-6, TNF- α and CRP in Elderly Patients with Depression or Alzheimer's disease: Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci Rep*. 2018;8(1):12050.
20. Smith RG, Lunnon K. DNA Modifications and Alzheimer's Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2017;978:303-319.
21. Lunnon K, Mill J. Epigenetic studies in Alzheimer's disease: current findings, caveats, and considerations for future studies. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2013;162B(8):789-99.
22. Cacabelos R, Torrellas C. Epigenetics of aging and Alzheimer's Disease: Implications for pharmacogenomics and drug response. *Int J Mol Sci*. 2015;16(12):30483-543.
23. West RL, Lee JM, Maroun LE. Hypomethylation of the amyloid precursor protein gene in the brain of an Alzheimer's disease patient. *J Mol Neurosci*. 1995;6(2):141-6.
24. Kilgore M, Miller CA, Fass DM, Hennig KM, Haggarty SJ, Sweatt JD, et al. Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(4):870-80.
25. Morris JC. Classification of dementia and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl*. 1996;165:41-50.
26. Cipriani G, Dolciotti C, Picchi L, Bonuccelli U. Alzheimer and his disease: a brief history. *Neurol Sci*. 2011;32(2):275-9.
27. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. 2018;25(1):59-70.
28. Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. Alzheimer disease. *Dis Mon*. 2010;56(9):484-546.
29. Daviglus ML, Plassman BL, Pirzada A, Bell CC, Bowen PE, Burke JR, et al. Risk factors and preventive interventions for Alzheimer disease: state of the science. *Arch Neurol*. 2011;68(9):1185-90.
30. Sala Frigerio C, Wolfs L, Fattorelli N, Thrupp N, Voytyuk I, Schmidt I, et al. The Major Risk Factors for Alzheimer's Disease: Age, Sex, and Genes Modulate the Microglia Response to A β Plaques. *Cell Rep*. 2019;27(4):1293-1306.e6.

31. Livingston G, Huntley J, Sommerlad A, Ames D, Ballard C, Banerjee S, ve ark. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet*. 2020;396(10248):413-446.
32. Broce IJ, Tan CH, Fan CC, Jansen I, Savage JE, Witoelar A, ve ark. Dissecting the genetic relationship between cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2019;137(2):209-226.
33. Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Ch  telat G, Holtzman DM, Hyman BT, ve ark. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):33.
34. Xin SH, Tan L, Cao X, Yu JT, Tan L. Clearance of Amyloid Beta and Tau in Alzheimer's Disease: from Mechanisms to Therapy. *Neurotox Res*. 2018;34(3):733-748.
35. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*. 2020;25(24):5789.
36. Price DL, Sisodia SS. Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu Rev Neurosci*. 1998;21:479-505.
37. Schindler SE, Fagan AM. Autosomal Dominant Alzheimer Disease: A Unique Resource to Study CSF Biomarker Changes in Preclinical AD. *Front Neurol*. 2015;6:142.
38. Tam JH, Pasternak SH. Amyloid and Alzheimer's disease: inside and out. *Can J Neurol Sci*. 2012;39(3):286-98.
39. Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, ve ark. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*. 2012;488(7409):96-9.
40. Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, ve ark. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science*. 1992;258(5082):668-71.
41. Pires M, Rego AC. Apoe4 and Alzheimer's Disease Pathogenesis-Mitochondrial Deregulation and Targeted Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci*. 2023;24(1):778.
42. Yamazaki Y, Zhao N, Caulfield TR, Liu CC, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nat Rev Neurol*. 2019;15(9):501-518.
43. Karran E, Mercken M, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(9):698-712.
44. van der Kant R, Goldstein LS. Cellular functions of the amyloid precursor protein from development to dementia. *Dev Cell*. 2015;32(4):502-15.
45. Coronel R, Bernabeu-Zornoza A, Palmer C, Mu  iz-Moreno M, Zambrano A, Cano E, ve ark. Role of Amyloid Precursor Protein (APP) and Its Derivatives in the Biology and Cell Fate Specification of Neural Stem Cells. *Mol Neurobiol*. 2018;55(9):7107-17.

46. Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res.* 1986;387(3):271-80.
47. Sjölin K, Kultima K, Larsson A, Freyhult E, Zjukovskaja C, Alkass K, ve ark.. Distribution of five clinically important neuroglial proteins in the human brain. *Mol Brain.* 2022;15(1):52.
48. Wang JZ, Liu F. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog Neurobiol.* 2008;85(2):148-75.
49. Li HL, Wang HH, Liu SJ, Deng YQ, Zhang YJ, Tian Q, ve ark. Phosphorylation of tau antagonizes apoptosis by stabilizing beta-catenin, a mechanism involved in Alzheimer's neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(9):3591-6.
50. Khatoon S, Grundakikae-Iqbal I, Iqbal K. Levels of normal and abnormally phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains. *FEBS Lett.* 1994;351(1):80-4.
51. Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* 2009;118(1):5-36.
52. LaFerla FM. Pathways linking Abeta and tau pathologies. *Biochem Soc Trans.* 2010;38(4):993-5.
53. Qian W, Shi J, Yin X, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX, ve ark. PP2A regulates tau phosphorylation directly and also indirectly via activating GSK-3beta. *J Alzheimers Dis.* 2010;19(4):1221-9.
54. Leroy K, Ando K, Héraud C, Yilmaz Z, Authelet M, Boeynaems JM, ve ark. Lithium treatment arrests the development of neurofibrillary tangles in mutant tau transgenic mice with advanced neurofibrillary pathology. *J Alzheimers Dis.* 2010;19(2):705-19.
55. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2011 Mar 19;377(9770):1019-31.
56. Leroy K, Yilmaz Z, Brion JP. Increased level of active GSK-3beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2007;33(1):43-55.
57. Tricco AC, Vandervaat S, Soobiah C, Lillie E, Perrier L, Chen MH, ve ark. Efficacy of cognitive enhancers for Alzheimer's disease: protocol for a systematic review and network meta-analysis. *Syst Rev.* 2012;1:31.
58. Lan K, Luo MH. Herpesviruses: epidemiology, pathogenesis, and interventions. *Virol Sin.* 2017;32(5):347-348.
59. Chayavichitsilp P, Buckwalter JV, Krakowski AC, Friedlander SF. Herpes simplex. *Pediatr Rev.* 2009;30(4):119-29.
60. Whitley RJ. Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. *Antiviral Res.* 2006;71(2-3):141-8.

61. Reske A, Pollara G, Krummenacher C, Chain BM, Katz DR. Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virol.* 2007;17(3):205-15.
62. Akhtar J, Shukla D. Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J.* 2009;276(24):7228-36.
63. Subramanian RP, Geraghty RJ. Herpes simplex virus type 1 mediates fusion through a hemifusion intermediate by sequential activity of glycoproteins D, H, L, and B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(8):2903-8.
64. Jambunathan N, Clark CM, Musarrat F, Chouljenko VN, Rudd J, Kousoulas KG. Two Sides to Every Story: Herpes Simplex Type-1 Viral Glycoproteins gB, gD, gH/gL, gK, and Cellular Receptors Function as Key Players in Membrane Fusion. *Viruses.* 2021;13(9):1849.
65. Knipe DM. The role of viral and cellular nuclear proteins in herpes simplex virus replication. *Adv Virus Res.* 1989;37:85-123.
66. Arduino PG, Porter SR. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(2):107-21.
67. Mahalingam R, Wellish MC, Dueland AN, Cohrs RJ, Gilden DH. Localization of herpes simplex virus and varicella zoster virus DNA in human ganglia. *Ann Neurol.* 1992;31(4):444-8.
68. Jakob NJ, Lenhard T, Schnitzler P, Rohde S, Ringleb PA, Steiner T, et al. Herpes simplex virus encephalitis despite normal cell count in the cerebrospinal fluid. *Crit Care Med.* 2012;40(4):1304-8.
69. Agostini S, Clerici M, Mancuso R. How plausible is a link between HSV-1 infection and Alzheimer's disease? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014;12(3):275-8.
70. Ball MJ, Lukiw WJ, Kammerman EM, Hill JM. Intracerebral propagation of Alzheimer's disease: strengthening evidence of a herpes simplex virus etiology. *Alzheimers Dement.* 2013;9(2):169-75.
71. Amin I, Younas S, Afzal S, Shahid M, Idrees M. Herpes Simplex Virus Type 1 and Host Antiviral Immune Responses: An Update. *Viral Immunol.* 2019;32(10):424-429.
72. Egan KP, Wu S, Wigdahl B, Jennings SR. Immunological control of herpes simplex virus infections. *J Neurovirol.* 2013;19(4):328-45.
73. Chew T, Taylor KE, Mossman KL. Innate and adaptive immune responses to herpes simplex virus. *Viruses.* 2009;1(3):979-1002.
74. Blue CE, Spiller OB, Blackbourn DJ. The relevance of complement to virus biology. *Virology.* 2004;319(2):176-84.
75. Jamieson GA, Maitland NJ, Wilcock GK, Yates CM, Itzhaki RF. Herpes simplex virus type 1 DNA is present in specific regions of brain from aged people with and without senile dementia of the Alzheimer type. *J Pathol.* 1992;167(4):365-8.

76. Balin BJ, Gérard HC, Arking EJ, Appelt DM, Branigan PJ, Abrams JT, ve ark. Identification and localization of Chlamydia pneumoniae in the Alzheimer's brain. *Med Microbiol Immunol*. 1998;187(1):23-42.
77. Mawanda F, Wallace R. Can infections cause Alzheimer's disease? *Epidemiol Rev*. 2013;35(1):161-80.
78. Alvarez G, Aldudo J, Alonso M, Santana S, Valdivieso F. Herpes simplex virus type 1 induces nuclear accumulation of hyperphosphorylated tau in neuronal cells. *J Neurosci Res*. 2012;90(5):1020-9.
79. Martin C, Aguila B, Araya P, Vio K, Valdivia S, Zambrano A, ve ark. Inflammatory and neurodegeneration markers during asymptomatic HSV-1 reactivation. *J Alzheimers Dis*. 2014;39(4):849-59.
80. Itzhaki RF, Lin WR, Shang D, Wilcock GK, Faragher B, Jamieson GA. Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet*. 1997;349(9047):241-4.
81. Mancuso R, Baglio F, Cabinio M, Calabrese E, Hernis A, Nemni R, Clerici M. Titers of herpes simplex virus type 1 antibodies positively correlate with grey matter volumes in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2014;38(4):741-5.
82. Lövheim H, Gilthorpe J, Adolfsson R, Nilsson LG, Elgh F. Reactivated herpes simplex infection increases the risk of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2015;11(6):593-9.
83. Letenneur L, Pérès K, Fleury H, Garrigue I, Barberger-Gateau P, Helmer C, ve ark. Seropositivity to herpes simplex virus antibodies and risk of Alzheimer's disease: a population-based cohort study. *PLoS One*. 2008;3(11):e3637.
84. Jamieson GA, Maitland NJ, Wilcock GK, Craske J, Itzhaki RF. Latent herpes simplex virus type 1 in normal and Alzheimer's disease brains. *J Med Virol*. 1991 Apr;33(4):224-7.
85. Ikeda K, Akiyama H, Kondo H, Arai T, Arai N, Yagishita S. Numerous glial fibrillary tangles in oligodendroglia in cases of subacute sclerosing panencephalitis with neurofibrillary tangles. *Neurosci Lett*. 1995;194(1-2):133-5.
86. Kobayashi A, Arima K, Ogawa M, Murata M, Fukuda T, Kitamoto T. Plaque-type deposition of prion protein in the damaged white matter of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease MM1 patients. *Acta Neuropathol*. 2008;116(5):561-6.
87. Urban BA, Fishman EK, Goldman SM, Scott WW Jr, Jones B, Humphrey RL, ve ark. CT evaluation of amyloidosis: spectrum of disease. *Radiographics*. 1993;13(6):1295-308.
88. Sy M, Kitazawa M, Medeiros R, Whitman L, Cheng D, Lane TE, ve ark. Inflammation induced by infection potentiates tau pathological features in transgenic mice. *Am J Pathol*. 2011;178(6):2811-22.
89. Kahn MS, Kranjac D, Alonzo CA, Haase JH, Cedillos RO, McLinden KA, ve ark. Prolonged elevation in hippocampal A β and cognitive deficits following

- repeated endotoxin exposure in the mouse. *Behav Brain Res.* 2012;229(1):176-84.
90. Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, ve ark. The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One.* 2010;5(3):e9505.
 91. Bourgade K, Garneau H, Giroux G, Le Page AY, Bocti C, Dupuis G, ve ark. β -Amyloid peptides display protective activity against the human Alzheimer's disease-associated herpes simplex virus-1. *Biogerontology.* 2015;16(1):85-98.
 92. Harris SA, Harris EA. Molecular Mechanisms for Herpes Simplex Virus Type 1 Pathogenesis in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2018;10:48.
 93. Erlich KS, Mills J. Passive immunotherapy for encephalitis caused by herpes simplex virus. *Rev Infect Dis.* 1986;8(4):439-45.
 94. Fillit H, Hess G, Hill J, Bonnet P, Toso C. IV immunoglobulin is associated with a reduced risk of Alzheimer disease and related disorders. *Neurology.* 2009;73(3):180-5.
 95. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2018;14:49.
 96. Paludan SR, Pradeu T, Masters SL, Mogensen TH. Constitutive immune mechanisms: mediators of host defence and immune regulation. *Nat Rev Immunol.* 2021;21(3):137-150.
 97. Davis MM, Brodin P. Rebooting Human Immunology. *Annu Rev Immunol.* 2018;36:843-864.
 98. Brodin P, Davis MM. Human immune system variation. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(1):21-29.
 99. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:3-23.
 100. Alam R. A brief review of the immune system. *Prim Care.* 1998;25(4):727-38.
 101. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(23):6008.
 102. Xie WR, Deng H, Li H, Bowen TL, Strong JA, Zhang JM. Robust increase of cutaneous sensitivity, cytokine production and sympathetic sprouting in rats with localized inflammatory irritation of the spinal ganglia. *Neuroscience.* 2006;142(3):809-22.
 103. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol.* 2007;37:34-45.
 104. Copray JC, Mantingh I, Brouwer N, Biber K, Küst BM, Liem RS, ve ark. Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. *J Neuroimmunol.* 2001;118(2):203-11.
 105. Mendiola AS, Cardona AE. The IL-1 β phenomena in neuroinflammatory diseases. *J Neural Transm (Vienna).* 2018;125(5):781-795.

106. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:519-50.
107. Yang H, Xuefeng Y, Jianhua X. Systematic review of the roles of interleukins in hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta.* 2020;506:33-43.
108. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* 2001;344(14):1058-66.
109. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010;20(1):34-50.
110. Kojouharova M, Reid K, Gadjeva M. New insights into the molecular mechanisms of classical complement activation. *Mol Immunol.* 2010;47(13):2154-60.
111. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol.* 2015;6:262.
112. Crehan H, Hardy J, Pocock J. Microglia, Alzheimer's disease, and complement. *Int J Alzheimers Dis.* 2012;2012:983640.
113. Carroll MC, Isenman DE. Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity.* 2012;37(2):199-207.
114. Xie CB, Jane-Wit D, Pober JS. Complement Membrane Attack Complex: New Roles, Mechanisms of Action, and Therapeutic Targets. *Am J Pathol.* 2020;190(6):1138-1150.
115. Dantzer R. Neuroimmune Interactions: From the Brain to the Immune System and Vice Versa. *Physiol Rev.* 2018;98(1):477-504.
116. Gimsa U, Mitchison NA, Brunner-Weinzierl MC. Immune privilege as an intrinsic CNS property: astrocytes protect the CNS against T-cell-mediated neuroinflammation. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:320519.
117. O'Reilly ML, Tom VJ. Neuroimmune System as a Driving Force for Plasticity Following CNS Injury. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:187.
118. Scheiblich H, Trombly M, Ramirez A, Heneka MT. Neuroimmune Connections in Aging and Neurodegenerative Diseases. *Trends Immunol.* 2020;41(4):300-12.
119. El Khoury J. Neurodegeneration and the neuroimmune system. *Nat Med.* 2010;16(12):1369-70.
120. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem.* 2016;139(2):136-53.
121. Neumann H, Wekerle H. Neuronal control of the immune response in the central nervous system: linking brain immunity to neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998;57(1):1-9.
122. Barger SW, Hörster D, Furukawa K, Goodman Y, Kriegstein J, Mattson MP. Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and

- attenuation of peroxide and Ca^{2+} accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(20):9328-32.
123. Flanders KC, Ren RF, Lippa CF. Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol*. 1998;54(1):71-85.
 124. Bauer J, Strauss S, Schreiter-Gasser U, Ganter U, Schlegel P, Witt I, ve ark. Interleukin-6 and alpha-2-macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices. *FEBS Lett*. 1991;285(1):111-4.
 125. Blasko I, Grubeck-Loebenstien B. Role of the immune system in the pathogenesis, prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Drugs Aging*. 2003;20(2):101-13.
 126. Jeohn GH, Kong LY, Wilson B, Hudson P, Hong JS. Synergistic neurotoxic effects of combined treatments with cytokines in murine primary mixed neuron/glia cultures. *J Neuroimmunol*. 1998;85(1):1-10.
 127. Goldgaber D, Harris HW, Hla T, Maciag T, Donnelly RJ, Jacobsen JS, ve ark. Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(19):7606-10.
 128. Koenigsknecht-Talboo J, Landreth GE. Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines. *J Neurosci*. 2005;25(36):8240-9.
 129. Li Y, Liu L, Kang J, Sheng JG, Barger SW, Mrak RE, ve ark. Neuronal-glia interactions mediated by interleukin-1 enhance neuronal acetylcholinesterase activity and mRNA expression. *J Neurosci*. 2000;20(1):149-55.
 130. Sheng JG, Jones RA, Zhou XQ, McGinness JM, Van Eldik LJ, Mrak RE, ve ark. Interleukin-1 promotion of MAPK-p38 overexpression in experimental animals and in Alzheimer's disease: potential significance for tau protein phosphorylation. *Neurochem Int*. 2001;39(5-6):341-8.
 131. Combarros O, Sánchez-Guerra M, Infante J, Llorca J, Berciano J. Gene dose-dependent association of interleukin-1A [-889] allele 2 polymorphism with Alzheimer's disease. *J Neurol*. 2002;249(9):1242-5.
 132. Griffin WS, Sheng JG, Gentleman SM, Graham DI, Mrak RE, Roberts GW. Microglial interleukin-1 alpha expression in human head injury: correlations with neuronal and neuritic beta-amyloid precursor protein expression. *Neurosci Lett*. 1994;176(2):133-6.
 133. Eriksson UK, Pedersen NL, Reynolds CA, Hong MG, Prince JA, Gatz M, ve ark. Associations of gene sequence variation and serum levels of C-reactive protein and interleukin-6 with Alzheimer's disease and dementia. *J Alzheimers Dis*. 2011;23(2):361-9.
 134. Quintanilla RA, Orellana DI, González-Billault C, Maccioni RB. Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Exp Cell Res*. 2004;295(1):245-57.
 135. Licastro F, Grimaldi LM, Bonafè M, Martina C, Olivieri F, Cavallone L, ve ark. Interleukin-6 gene alleles affect the risk of Alzheimer's disease and levels of the cytokine in blood and brain. *Neurobiol Aging*. 2003;24(7):921-6.

136. Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Woolford J, Dean C, Kerr S, ve ark. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology*. 2009;73(10):768-74.
137. Janelins MC, Mastrangelo MA, Park KM, Sudol KL, Narrow WC, Oddo S, ve ark. Chronic neuron-specific tumor necrosis factor- α expression enhances the local inflammatory environment ultimately leading to neuronal death in 3xTg-AD mice. *Am J Pathol*. 2008;173(6):1768-82.
138. Blasko I, Marx F, Steiner E, Hartmann T, Grubeck-Loebenstien B. TNF α plus IFN γ induce the production of Alzheimer beta-amyloid peptides and decrease the secretion of APPs. *FASEB J*. 1999;13(1):63-8.
139. Tobinick E, Gross H, Weinberger A, Cohen H. TNF- α modulation for treatment of Alzheimer's disease: a 6-month pilot study. *MedGenMed*. 2006;8(2):25.
140. Montgomery SL, Mastrangelo MA, Habib D, Narrow WC, Knowlden SA, Wright TW, ve ark. Ablation of TNF-RI/RII expression in Alzheimer's disease mice leads to an unexpected enhancement of pathology: implications for chronic pan-TNF- α suppressive therapeutic strategies in the brain. *Am J Pathol*. 2011;179(4):2053-70.
141. Veerhuis R, Janssen I, De Groot CJ, Van Muiswinkel FL, Hack CE, Eikelenboom P. Cytokines associated with amyloid plaques in Alzheimer's disease brain stimulate human glial and neuronal cell cultures to secrete early complement proteins, but not C1-inhibitor. *Exp Neurol*. 1999;160(1):289-99.
142. van der Wal EA, Gómez-Pinilla F, Cotman CW. Transforming growth factor-beta 1 is in plaques in Alzheimer and Down pathologies. *Neuroreport*. 1993;4(1):69-72.
143. Teseur I, Zou K, Esposito L, Bard F, Berber E, Can JV, ve ark. Deficiency in neuronal TGF- β signaling promotes neurodegeneration and Alzheimer's pathology. *J Clin Invest*. 2006;116(11):3060-9.
144. Gasque P, Dean YD, McGreal EP, VanBeek J, Morgan BP. Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS. *Immunopharmacology*. 2000;49(1-2):171-86.
145. Erickson MA, Banks WA. Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(10):1500-13.
146. Walker DG, Kim SU, McGeer PL. Complement and cytokine gene expression in cultured microglial derived from postmortem human brains. *J Neurosci Res*. 1995;40(4):478-93.
147. Wallis R, Dodds AW, Mitchell DA, Sim RB, Reid KB, Schwaeble WJ. Molecular interactions between MASP-2, C4, and C2 and their activation fragments leading to complement activation via the lectin pathway. *J Biol Chem*. 2007;282(11):7844-51.
148. Héja D, Kocsis A, Dobó J, Szilágyi K, Szász R, Závodszy P, ve ark. Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of

- serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(26):10498-503.
149. Coulthard LG, Hawksworth OA, Woodruff TM. Complement: The Emerging Architect of the Developing Brain. *Trends Neurosci*. 2018;41(6):373-384.
 150. von Zahn J, Möller T, Kettenmann H, Nolte C. Microglial phagocytosis is modulated by pro- and anti-inflammatory cytokines. *Neuroreport*. 1997;8(18):3851-6.
 151. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, ve ark. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*. 2012;74(4):691-705.
 152. Allendorf DH, Puigdellívol M, Brown GC. Activated microglia desialylate their surface, stimulating complement receptor 3-mediated phagocytosis of neurons. *Glia*. 2020;68(5):989-98.
 153. Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, ve ark. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med*. 2003;9(4):453-7.
 154. Vasek MJ, Garber C, Dorsey D, Durrant DM, Bollman B, Soung A, ve ark. A complement-microglial axis drives synapse loss during virus-induced memory impairment. *Nature*. 2016;534(7608):538-43.
 155. Eikelenboom P, Stam FC. Immunoglobulins and complement factors in senile plaques. An immunoperoxidase study. *Acta Neuropathol*. 1982;57(2-3):239-42.
 156. Bradt BM, Kolb WP, Cooper NR. Complement-dependent proinflammatory properties of the Alzheimer's disease beta-peptide. *J Exp Med*. 1998;188(3):431-8.
 157. Shen Y, Lue L, Yang L, Roher A, Kuo Y, Strohmeyer R, ve ark. Complement activation by neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2001;305(3):165-8.
 158. Jiang H, Burdick D, Glabe CG, Cotman CW, Tenner AJ. beta-Amyloid activates complement by binding to a specific region of the collagen-like domain of the C1q A chain. *J Immunol*. 1994;152(10):5050-9.
 159. Rogers J, Cooper NR, Webster S, Schultz J, McGeer PL, Styren SD, ve ark. Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(21):10016-20.
 160. Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, ve ark. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*. 2007;131(6):1164-78.
 161. Rahpeymai Y, Hietala MA, Wilhelmsson U, Fotheringham A, Davies I, Nilsson AK, ve ark. Complement: a novel factor in basal and ischemia-induced neurogenesis. *EMBO J*. 2006;25(6):1364-74.

162. Hirai H, Pang Z, Bao D, Miyazaki T, Li L, Miura E, ve ark. Cbln1 is essential for synaptic integrity and plasticity in the cerebellum. *Nat Neurosci.* 2005;8(11):1534-41.
163. Lu J, Kishore U. C1 Complex: An Adaptable Proteolytic Module for Complement and Non-Complement Functions. *Front Immunol.* 2017;8:592.
164. Ma Y, Ramachandran A, Ford N, Parada I, Prince DA. Remodeling of dendrites and spines in the C1q knockout model of genetic epilepsy. *Epilepsia.* 2013;54(7):1232-9.
165. Bergamaschini L, Canziani S, Bottasso B, Cugno M, Braidotti P, Agostoni A. Alzheimer's beta-amyloid peptides can activate the early components of complement classical pathway in a C1q-independent manner. *Clin Exp Immunol.* 1999;115(3):526-33.
166. Wang P, Ye Y. Filamentous recombinant human Tau activates primary astrocytes via an integrin receptor complex. *Nat Commun.* 2021;12(1):95.
167. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, ve ark. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature.* 2017;541(7638):481-487.
168. Lian H, Yang L, Cole A, Sun L, Chiang AC, Fowler SW, ve ark. NFκB-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease. *Neuron.* 2015;85(1):101-115.
169. Lacy M, Jones J, Whittemore SR, Haviland DL, Wetsel RA, Barnum SR. Expression of the receptors for the C5a anaphylatoxin, interleukin-8 and FMLP by human astrocytes and microglia. *J Neuroimmunol.* 1995;61(1):71-8.
170. O'Barr S, Cooper NR. The C5a complement activation peptide increases IL-1β and IL-6 release from amyloid-beta primed human monocytes: implications for Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol.* 2000;109(2):87-94.
171. Litvinchuk A, Wan YW, Swartzlander DB, Chen F, Cole A, Propson NE, ve ark. Complement C3aR Inactivation Attenuates Tau Pathology and Reverses an Immune Network Deregulated in Tauopathy Models and Alzheimer's Disease. *Neuron.* 2018;100(6):1337-53.
172. Woodruff TM, Nandakumar KS, Tedesco F. Inhibiting the C5-C5a receptor axis. *Mol Immunol.* 2011;48(14):1631-42.
173. Hernandez MX, Jiang S, Cole TA, Chu SH, Fonseca MI, Fang MJ, ve ark. Prevention of C5aR1 signaling delays microglial inflammatory polarization, favors clearance pathways and suppresses cognitive loss. *Mol Neurodegener.* 2017;12(1):66.
174. Houston I, Peter CJ, Mitchell A, Straubhaar J, Rogaev E, Akbarian S. Epigenetics in the human brain. *Neuropsychopharmacology.* 2013;38(1):183-97.
175. Moosavi A, Motevalizadeh Ardekani A. Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases. *Iran Biomed J.* 2016;20(5):246-58.

176. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 2010;28(10):1057-68.
177. Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature.* 2007;447(7143):433-40.
178. Retis-Resendiz AM, González-García IN, León-Juárez M, Camacho-Arroyo I, Cerbón M, Vázquez-Martínez ER. The role of epigenetic mechanisms in the regulation of gene expression in the cyclical endometrium. *Clin Epigenetics.* 2021;13(1):116.
179. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003;33 Suppl:245-54.
180. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer.* 2011;2(6):607-17.
181. Greenberg MVC, Bourc'his D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(10):590-607.
182. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet.* 2000;9(16):2395-402.
183. Goto K, Numata M, Komura JI, Ono T, Bestor TH, Kondo H. Expression of DNA methyltransferase gene in mature and immature neurons as well as proliferating cells in mice. *Differentiation.* 1994;56(1-2):39-44.
184. Joseph DB, Strand DW, Vezina CM. DNA methylation in development and disease: an overview for prostate researchers. *Am J Clin Exp Urol.* 2018;6(6):197-218.
185. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet.* 2000;1(1):11-9.
186. Audia JE, Campbell RM. Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8(4):a019521.
187. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011;21(3):381-95.
188. Alaskhar Alhamwe B, Khalaila R, Wolf J, von Bülow V, Harb H, Alhamdan F, et al. Histone modifications and their role in epigenetics of atopy and allergic diseases. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2018;14:39.
189. Zhang Y, Zhang Q, Zhang Y, Han J. The Role of Histone Modification in DNA Replication-Coupled Nucleosome Assembly and Cancer. *Int J Mol Sci.* 2023;24(5):4939.
190. Jambhekar A, Dhall A, Shi Y. Author Correction: Roles and regulation of histone methylation in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(1):59.
191. Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet.* 2012;13(5):343-57.

192. Gujral P, Mahajan V, Lissaman AC, Ponnampalam AP. Histone acetylation and the role of histone deacetylases in normal cyclic endometrium. *Reprod Biol Endocrinol*. 2020;18(1):84.
193. Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol*. 2007;1(1):19-25.
194. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*. 1997;389(6649):349-52.
195. Rossetto D, Avvakumov N, Côté J. Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics*. 2012;7(10):1098-108.
196. Li J, Mahata B, Escobar M, Goell J, Wang K, Khemka P, ve ark. Programmable human histone phosphorylation and gene activation using a CRISPR/Cas9-based chromatin kinase. *Nat Commun*. 2021;12(1):896.
197. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, ve ark. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(30):10604-9.
198. Gräff J, Rei D, Guan JS, Wang WY, Seo J, Hennig KM, ve ark. An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature*. 2012;483(7388):222-6.
199. Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J, ve ark. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature*. 2009;459(7243):55-60.
200. Mehler MF, Mattick JS. Noncoding RNAs and RNA editing in brain development, functional diversification, and neurological disease. *Physiol Rev*. 2007;87(3):799-823.
201. Vecsey CG, Hawk JD, Lattal KM, Stein JM, Fabian SA, Attner MA, ve ark. Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *J Neurosci*. 2007;27(23):6128-40.
202. Ma DK, Marchetto MC, Guo JU, Ming GL, Gage FH, Song H. Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Nat Neurosci*. 2010;13(11):1338-44.
203. Hadad N, Masser DR, Logan S, Wronowski B, Mangold CA, Clark N, ve ark. Absence of genomic hypomethylation or regulation of cytosine-modifying enzymes with aging in male and female mice. *Epigenetics Chromatin*. 2016;9:30.
204. Dzitoyeva S, Chen H, Manev H. Effect of aging on 5-hydroxymethylcytosine in brain mitochondria. *Neurobiol Aging*. 2012;33(12):2881-91.
205. Miller CA, Sweatt JD. Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron*. 2007;53(6):857-69.
206. Liu L, van Groen T, Kadish I, Tollefsbol TO. DNA methylation impacts on learning and memory in aging. *Neurobiol Aging*. 2009;30(4):549-60.

207. Mulder C, Schoonenboom NS, Jansen EE, Verhoeven NM, van Kamp GJ, Jakobs C, ve ark. The transmethylation cycle in the brain of Alzheimer patients. *Neurosci Lett*. 2005;386(2):69-71.
208. Mastroeni D, McKee A, Grover A, Rogers J, Coleman PD. Epigenetic differences in cortical neurons from a pair of monozygotic twins discordant for Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2009;4(8):e6617.
209. Morrison LD, Smith DD, Kish SJ. Brain S-adenosylmethionine levels are severely decreased in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 1996;67(3):1328-31.
210. Mastroeni D, Grover A, Delvaux E, Whiteside C, Coleman PD, Rogers J. Epigenetic changes in Alzheimer's disease: decrements in DNA methylation. *Neurobiol Aging*. 2010;31(12):2025-37.
211. Taher N, McKenzie C, Garrett R, Baker M, Fox N, Isaacs GD. Amyloid- β alters the DNA methylation status of cell-fate genes in an Alzheimer's disease model. *J Alzheimers Dis*. 2014;38(4):831-44.
212. Smith AR, Smith RG, Burrage J, Troakes C, Al-Sarraj S, Kalaria RN, ve ark. A cross-brain regions study of ANK1 DNA methylation in different neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*. 2019;74:70-76.
213. Chouliaras L, Mastroeni D, Delvaux E, Grover A, Kenis G, Hof PR, Steinbusch HW, ve ark. Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging*. 2013;34(9):2091-9.
214. Condliffe D, Wong A, Troakes C, Proitsi P, Patel Y, Chouliaras L, ve ark. Cross-region reduction in 5-hydroxymethylcytosine in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging*. 2014;35(8):1850-4.
215. Tohgi H, Utsugisawa K, Nagane Y, Yoshimura M, Genda Y, Ukitsu M. Reduction with age in methylcytosine in the promoter region -224 approximately -101 of the amyloid precursor protein gene in autopsy human cortex. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999;70(2):288-92.
216. Mano T, Nagata K, Nonaka T, Tarutani A, Imamura T, Hashimoto T, Bannai T, ve ark. Neuron-specific methylome analysis reveals epigenetic regulation and tau-related dysfunction of BRCA1 in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(45):9645-54.
217. Bihaqi SW, Huang H, Wu J, Zawia NH. Infant exposure to lead (Pb) and epigenetic modifications in the aging primate brain: implications for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2011;27(4):819-33.
218. Feng J, Zhou Y, Campbell SL, Le T, Li E, Sweatt JD, ve ark. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci*. 2010;13(4):423-30.
219. Oliveira AM, Hemstedt TJ, Bading H. Rescue of aging-associated decline in Dnmt3a2 expression restores cognitive abilities. *Nat Neurosci*. 2012 Jul 1;15(8):1111-3.

220. MacDonald JL, Roskams AJ. Epigenetic regulation of nervous system development by DNA methylation and histone deacetylation. *Prog Neurobiol.* 2009;88(3):170-83.
221. Gupta S, Kim SY, Artis S, Molfese DL, Schumacher A, Sweatt JD, ve ark. Histone methylation regulates memory formation. *J Neurosci.* 2010;30(10):3589-99.
222. Kular RK, Cvetanovic M, Siferd S, Kini AR, Opal P. Neuronal differentiation is regulated by leucine-rich acidic nuclear protein (LANP), a member of the inhibitor of histone acetyltransferase complex. *J Biol Chem.* 2009;284(12):7783-92.
223. Sharma VK, Mehta V, Singh TG. Alzheimer's Disorder: Epigenetic Connection and Associated Risk Factors. *Curr Neuropharmacol.* 2020;18(8):740-53.
224. Ricobaraza A, Cuadrado-Tejedor M, Marco S, Pérez-Otaño I, García-Osta A. Phenylbutyrate rescues dendritic spine loss associated with memory deficits in a mouse model of Alzheimer disease. *Hippocampus.* 2012;22(5):1040-50.
225. Qing H, He G, Ly PT, Fox CJ, Staufenbiel M, Cai F, ve ark. Valproic acid inhibits Abeta production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models. *J Exp Med.* 2008;205(12):2781-9.
226. Wang Z, Zhang XJ, Li T, Li J, Tang Y, Le W. Valproic acid reduces neuritic plaque formation and improves learning deficits in APP(Swe) /PS1(A246E) transgenic mice via preventing the prenatal hypoxia-induced down-regulation of neprilysin. *CNS Neurosci Ther.* 2014;20(3):209-17.
227. Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, ve ark. Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science.* 2010;328(5979):753-6.
228. Sung YM, Lee T, Yoon H, Di Battista AM, Song JM, Sohn Y, ve ark. Mercaptoacetamide-based class II HDAC inhibitor lowers A β levels and improves learning and memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 2013;239:192-201.
229. Datta M, Staszewski O, Raschi E, Frosch M, Hagemeyer N, Tay TL, ve ark. Histone Deacetylases 1 and 2 Regulate Microglia Function during Development, Homeostasis, and Neurodegeneration in a Context-Dependent Manner. *Immunity.* 2018;48(3):514-529.e6.
230. Frost B, Hemberg M, Lewis J, Feany MB. Tau promotes neurodegeneration through global chromatin relaxation. *Nat Neurosci.* 2014 Mar;17(3):357-66.
231. Rao JS, Keleshian VL, Klein S, Rapoport SI. Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer's disease and bipolar disorder patients. *Transl Psychiatry.* 2012;2(7):e132.
232. Zhang K, Schrag M, Crofton A, Trivedi R, Vinters H, Kirsch W. Targeted proteomics for quantification of histone acetylation in Alzheimer's disease. *Proteomics.* 2012;12(8):1261-8.

233. Watson CT, Roussos P, Garg P, Ho DJ, Azam N, Katsel PL, ve ark. Genome-wide DNA methylation profiling in the superior temporal gyrus reveals epigenetic signatures associated with Alzheimer's disease. *Genome Med.* 2016;8(1):5.
234. Kovalevich J, Langford D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol.* 2013;1078:9-21.
235. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJ. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener.* 2017;12(1):10.
236. Pålman S, Hoehner JC, Nånberg E, Hedborg F, Fagerström S, Gestblom C, ve ark. Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. *Eur J Cancer.* 1995;31A(4):453-8.
237. Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Ceña V, ve ark. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem.* 2000;75(3):991-1003.
238. Esper RM, Pankonin MS, Loeb JA. Neuregulins: versatile growth and differentiation factors in nervous system development and human disease. *Brain Res Rev.* 2006;51(2):161-75.
239. Gerecke KM, Wyss JM, Carroll SL. Neuregulin-1beta induces neurite extension and arborization in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2004;27(4):379-93.
240. Agholme L, Lindström T, Kågedal K, Marcusson J, Hallbeck M. An in vitro model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(4):1069-82.
241. de Medeiros LM, De Bastiani MA, Rico EP, Schonhofen P, Pfaffenseller B, Wollenhaupt-Aguiar B, Grun L, Barbé-Tuana F, Zimmer ER, Castro MAA, Parsons RB, Klamt F. Cholinergic Differentiation of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line and Its Potential Use as an In vitro Model for Alzheimer's Disease Studies. *Mol Neurobiol.* 2019;56(11):7355-7367.
242. Isobe I, Yanagisawa K, Michikawa M. A possible model of senile plaques using synthetic amyloid beta-protein and rat glial culture. *Exp Neurol.* 2000;162(1):51-60.
243. Guzman-Sanchez F, Valdivieso F, Burgos JS. Aging-related neurostructural, neuropathological, and behavioral changes associated with herpes simplex virus type 1 brain infection in mice. *J Alzheimers Dis.* 2012;30(4):779-90.
244. Winters AL, Minchin FR. Modification of the Lowry assay to measure proteins and phenols in covalently bound complexes. *Anal Biochem.* 2005;346(1):43-8.
245. Salmon DP. Neuropsychological features of mild cognitive impairment and preclinical Alzheimer's disease. *Curr Top Behav Neurosci.* 2012;10:187-212.
246. Alisky JM. The coming problem of HIV-associated Alzheimer's disease. *Med Hypotheses.* 2007;69(5):1140-3.

247. Gjoneska E, Pfenning AR, Mathys H, Quon G, Kundaje A, Tsai LH, ve ark. Conserved epigenomic signals in mice and humans reveal immune basis of Alzheimer's disease. *Nature*. 2015;518(7539):365-9.
248. Adwan L, Zawia NH. Epigenetics: a novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther*. 2013;139(1):41-50.
249. Abel T, Zukin RS. Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Curr Opin Pharmacol*. 2008;8(1):57-64.
250. New M, Olzscha H, La Thangue NB. HDAC inhibitor-based therapies: can we interpret the code? *Mol Oncol*. 2012;6(6):637-56.
251. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(7):1126-67.
252. Solleiro-Villavicencio H, Rivas-Arancibia S. Effect of Chronic Oxidative Stress on Neuroinflammatory Response Mediated by CD4+T Cells in Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:114.
253. Markesbery WR, Lovell MA. DNA oxidation in Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(11-12):2039-45.
254. Ansari MA, Scheff SW. Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69(2):155-67.
255. Wang H, Ma J, Tan Y, Wang Z, Sheng C, Chen S, ve ark. Amyloid-beta1-42 induces reactive oxygen species-mediated autophagic cell death in U87 and SH-SY5Y cells. *J Alzheimers Dis*. 2010;21(2):597-610.
256. Bhatt S, Puli L, Patil CR. Role of reactive oxygen species in the progression of Alzheimer's disease. *Drug Discov Today*. 2021;26(3):794-803.
257. Kavouras JH, Prandovszky E, Valyi-Nagy K, Kovacs SK, Tiwari V, Kovacs M, ve ark. Herpes simplex virus type 1 infection induces oxidative stress and the release of bioactive lipid peroxidation by-products in mouse P19N neural cell cultures. *J Neurovirol*. 2007;13(5):416-25.
258. Marino-Merlo F, Papaiani E, Frezza C, Pedatella S, De Nisco M, Macchi B, ve ark. NF- κ B-Dependent Production of ROS and Restriction of HSV-1 Infection in U937 Monocytic Cells. *Viruses*. 2019;11(5):428.
259. Hu S, Sheng WS, Schachtele SJ, Lokensgard JR. Reactive oxygen species drive herpes simplex virus (HSV)-1-induced proinflammatory cytokine production by murine microglia. *J Neuroinflammation*. 2011;8:123.
260. Adalbert R, Gilley J, Coleman MP. Abeta, tau and ApoE4 in Alzheimer's disease: the axonal connection. *Trends Mol Med*. 2007;13(4):135-42.
261. Jämsä A, Hasslund K, Cowburn RF, Bäckström A, Vasänge M. The retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;319(3):993-1000.

262. Kristen H, Santana S, Sastre I, Recuero M, Bullido MJ, Aldudo J. Herpes simplex virus type 2 infection induces AD-like neurodegeneration markers in human neuroblastoma cells. *Neurobiol Aging*. 2015;36(10):2737-47.
263. Wozniak MA, Frost AL, Itzhaki RF. Alzheimer's disease-specific tau phosphorylation is induced by herpes simplex virus type 1. *J Alzheimers Dis*. 2009;16(2):341-50.
264. Santana S, Recuero M, Bullido MJ, Valdivieso F, Aldudo J. Herpes simplex virus type I induces the accumulation of intracellular β -amyloid in autophagic compartments and the inhibition of the non-amyloidogenic pathway in human neuroblastoma cells. *Neurobiol Aging*. 2012;33(2):19-33.
265. Pählman S, Ruusala AI, Abrahamsson L, Mattsson ME, Esscher T. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ*. 1984;14(2):135-44.
266. Acuña-Hinrichsen F, Covarrubias-Pinto A, Ishizuka Y, Stolzenbach MF, Martin C, Salazar P, ve ark. Herpes Simplex Virus Type 1 Neuronal Infection Triggers the Disassembly of Key Structural Components of Dendritic Spines. *Front Cell Neurosci*. 2021;15:580717.
267. Bajic G, Degn SE, Thiel S, Andersen GR. Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases. *EMBO J*. 2015;34(22):2735-57.
268. Fonseca MI, Zhou J, Botto M, Tenner AJ. Absence of C1q leads to less neuropathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2004;24(29):6457-65.
269. Sárvári M, Vágó I, Wéber CS, Nagy J, Gál P, Mák M, ve ark. Inhibition of C1q-beta-amyloid binding protects hippocampal cells against complement mediated toxicity. *J Neuroimmunol*. 2003;137(1-2):12-8.
270. Singhrao SK, Neal JW, Rushmere NK, Morgan BP, Gasque P. Spontaneous classical pathway activation and deficiency of membrane regulators render human neurons susceptible to complement lysis. *Am J Pathol*. 2000;157(3):905-18.
271. Kolev MV, Ruseva MM, Harris CL, Morgan BP, Donev RM. Implication of complement system and its regulators in Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol*. 2009;7(1):1-8.
272. McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology*. 1996;47(2):425-32.
273. Lee YJ, Han SB, Nam SY, Oh KW, Hong JT. Inflammation and Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res*. 2010;33(10):1539-56.
274. Lim GP, Yang F, Chu T, Chen P, Beech W, Teter B, ve ark. Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2000;20(15):5709-14.

275. Li H, Zhang J, Kumar A, Zheng M, Atherton SS, Yu FS. Herpes simplex virus 1 infection induces the expression of proinflammatory cytokines, interferons and TLR7 in human corneal epithelial cells. *Immunology*. 2006;117(2):167-76.
276. Lokensgard JR, Hu S, Sheng W, vanOijen M, Cox D, Cheeran MC, ve ark. Robust expression of TNF-alpha, IL-1beta, RANTES, and IP-10 by human microglial cells during nonproductive infection with herpes simplex virus. *J Neurovirol*. 2001;7(3):208-19.
277. Bie B, Wu J, Yang H, Xu JJ, Brown DL, Naguib M. Epigenetic suppression of neuroligin 1 underlies amyloid-induced memory deficiency. *Nat Neurosci*. 2014;17(2):223-31.
278. Berson A, Nativio R, Berger SL, Bonini NM. Epigenetic Regulation in Neurodegenerative Diseases. *Trends Neurosci*. 2018;41(9):587-98.
279. Akbarian S, Beeri MS, Haroutunian V. Epigenetic determinants of healthy and diseased brain aging and cognition. *JAMA Neurol*. 2013;70(6):711-8.
280. Palomer E, Martín-Segura A, Baliyan S, Ahmed T, Balschun D, Venero C, ve ark. Aging Triggers a Repressive Chromatin State at Bdnf Promoters in Hippocampal Neurons. *Cell Rep*. 2016;16(11):2889-900.
281. Nativio R, Donahue G, Berson A, Lan Y, Amlie-Wolf A, Tuzer F, ve ark. Dysregulation of the epigenetic landscape of normal aging in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*. 2018;21(4):497-505.
282. Marzi SJ, Leung SK, Ribarska T, Hannon E, Smith AR, Pishva E, ve ark. A histone acetylome-wide association study of Alzheimer's disease identifies disease-associated H3K27ac differences in the entorhinal cortex. *Nat Neurosci*. 2018;21(11):1618-27.
283. Klein HU, McCabe C, Gjoneska E, Sullivan SE, Kaskow BJ, Tang A, ve ark. Epigenome-wide study uncovers large-scale changes in histone acetylation driven by tau pathology in aging and Alzheimer's human brains. *Nat Neurosci*. 2019;22(1):37-46.
284. Lithner CU, Lacor PN, Zhao WQ, Mustafiz T, Klein WL, Sweatt JD, ve ark. Disruption of neocortical histone H3 homeostasis by soluble A β : implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2013;34(9):2081-90.
285. Gu X, Sun J, Li S, Wu X, Li L. Oxidative stress induces DNA demethylation and histone acetylation in SH-SY5Y cells: potential epigenetic mechanisms in gene transcription in A β production. *Neurobiol Aging*. 2013;34(4):1069-79.
286. Park CS, Rehrauer H, Mansuy IM. Genome-wide analysis of H4K5 acetylation associated with fear memory in mice. *BMC Genomics*. 2013;14:539.
287. Smith AR, Smith RG, Macdonald R, Marzi SJ, Burrage J, Troakes C, ve ark. The histone modification H3K4me3 is altered at the ANK1 locus in Alzheimer's disease brain. *Future Sci OA*. 2021;7(4):FSO665.
288. Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, ve ark. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*. 2002;419(6905):407-11.

289. Ogawa O, Zhu X, Lee HG, Raina A, Obrenovich ME, Bowser R, ve ark. Ectopic localization of phosphorylated histone H3 in Alzheimer's disease: a mitotic catastrophe? *Acta Neuropathol.* 2003;105(5):524-8.
290. Gjoneska E, Pfenning AR, Mathys H, Quon G, Kundaje A, Tsai LH, ve ark. Conserved epigenomic signals in mice and humans reveal immune basis of Alzheimer's disease. *Nature.* 2015;518(7539):365-9.
291. D'Addario C, Candia SB, Arosio B, Di Bartolomeo M, Abbate C, Casè A, ve ark. Transcriptional and epigenetic phenomena in peripheral blood cells of monozygotic twins discordant for alzheimer's disease, a case report. *J Neurol Sci.* 2017;372:211-216.
292. Ding H, Dolan PJ, Johnson GV. Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *J Neurochem.* 2008;106(5):2119-30.
293. Xiong Y, Zhao K, Wu J, Xu Z, Jin S, Zhang YQ. HDAC6 mutations rescue human tau-induced microtubule defects in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(12):4604-9.
294. Govindarajan N, Rao P, Burkhardt S, Sananbenesi F, Schlüter OM, Bradke F, ve ark. Reducing HDAC6 ameliorates cognitive deficits in a mouse model for Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med.* 2013;5(1):52-63.
295. Janczura KJ, Volmar CH, Sartor GC, Rao SJ, Ricciardi NR, Lambert G, ve ark. Inhibition of HDAC3 reverses Alzheimer's disease-related pathologies in vitro and in the 3xTg-AD mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(47):11148-57.

8.EKLER

EK-1. Tez Çalışması Orijinallik Raporu Ekran Görüntüsü

ALZHEİMER HASTALIĞININ İN VİTRO MODELLERİNDE HERPES
SİMPEKS PROTEİNLERİNİN KOMPLEMAN SİSTEM,
SİTOKİNLER VE EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ-ANIL YİRÜN-173 SAYFA

ORJİNALLİK RAPORU

% 29	% 29	% 2	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 15
2	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	% 6
3	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 2
4	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
5	paperity.org İnternet Kaynağı	<% 1
6	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<% 1
7	tr.wikipedia.org İnternet Kaynağı	<% 1
8	docs.neu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

EK-2. Turnitin Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Anıl Yürün
Ödev başlığı: ALZHEİMER HASTALIĞININ İN VİTRO MODELLERİNDE HERPE...
Gönderi Başlığı: ALZHEİMER HASTALIĞININ İN VİTRO MODELLERİNDE HERPE...
Dosya adı: ANIL_DOKTORA_TEZ.docx
Dosya boyutu: 14.07M
Sayfa sayısı: 174
Kelime sayısı: 39,161
Karakter sayısı: 268,486
Gönderim Tarihi: 16-Kas-2023 10:04ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2230342294

1. GİRİŞ

Nörodejeneratif hastalıklar, dünya çapında engelli ve ölümüne neden olan hastalıklardır. Nörodejeneratif süreçler, sinirlerin fonksiyonunu bozarak, bu da sinirsel bağlantı ve fonksiyon kaybına yol açar (1). Alzheimer hastalığı (AH), genellikle korteks yaşıyla ilişkili olarak, bilişsel işlevlerde düşüş ve demansla karakterize kronik nörodejeneratif bir hastalıktır (2). Patolojik süreçler bir yandan olarak beyin fonksiyonunu bozarken diğer taraftan ve temporal loba ataklarda sinirsel bağlantıların kopmasıyla sonuçlanır (3). AH vakalarının çoğu (4-6) sporadiktir. Ancak, bir kısmı genetik veya etiyolojik kökenli olabilir ve "kalıtsal AH" olarak adlandırılır. AH için ana risk faktörü yaşlanmadır. Hastalık 65 yaşın üzerindeki nüfusun %10'unu ve 85 yaşın üzerindeki nüfusun %50'sini etkiler. Hastalığa bağlı iki önemli patolojik bulgu tanınmaktadır: Buzlu amiloid beta (A β) plakları ve hiperfosforile Tau proteinlerinden oluşan nörofibriler yamuklar (NFT) (7-9).

Çiftli faktörler AH gelişme riskini artırabilir (5). Çevresel risk faktörleri arasında ise özellikle *Herpes simplex virus tip-1* (HSV-1) tarafından indüklenenler buya örnek olarak beyin enfeksiyonlarının en yaygın bir türü olarak kabul edilmektedir (10). HSV-1, genellikle viral enfeksiyonun sonucunda *Herpesviridae* ailesinin üyesidir. HSV-1, esas olarak oral ve nazal mukozadan genital bulaşarak enfeksiyon eden nörotropik çift sarmallı bir DNA virüsüdür. Oral ve nazal mukozada virüs aktif replikasyonu sağlar; yeni üretilen viral partiküller, doku sıvılarına girer ve aksoral sıvıya yayılır, genellikle göz bir enfeksiyonu oluşturan trigeminal gangliona ulaşabilir. Virüs, yeni oluşan viral partiküllerle aksonal sinirler yoluyla beynin enfeksiyonu bölgesine geri taşınır ve iyi bilinen klinik koryanlara neden olduğu periyodik reaktivasyon döngülerinden geçer. Bununla birlikte, tipik trigeminal ganglion sinirleri, beyin sapında bulunan trigeminal gangliyonlara da yansır. Nörodejenere hastalarda, sinirde dolaşan virüsler daha da yayılır, virüsün daha da olumsuz etkileri, özellikle *Herpes simplex* (HSV-1) gibi akut nörolojik hastalıklara veya hafif klinik olarak asemptomatik veya ömür boyu latent kalan enfeksiyonlara neden olabilir (11). Merkezi sinir sisteminde (MSS) ulaşabileceği yollar (7, 8). HSV-1'in Alzheimer hastalığı ile ilişkisi, 1980'lerin başında Melvyn B. (1982) tarafından ortaya konulmuş ve bu nedenle bu hastalığın kaynağı olarak HSV-1'in etkili olduğu düşünülmüştür. AH ile beyin beyin

EK-3. Tez Çalışması ile İlgili Yayın ve Bildiriler

1. Yirün A, Çakır DA, Sanajou S, Erdemli Köse SB, Özyurt AB, Zeybek D, Bozdemir Ö, Baydar T, Erkekoglu P. Evaluation of the effects of herpes simplex glycoprotein B on complement system and cytokines in in vitro models of Alzheimer's disease. J Appl Toxicol. 2023;43(9):1368-1378.
2. Yirün A, Erdemli Köse SB, Erkekoglu P. Alzheimer Hastalığında Kompleman Sistemin Rolü. J. Fac. Pharm. Ankara. 2024;48(1).



9.ÖZGEÇMİŞ

