







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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**NÖRONA FARKLILAŞTIRILMIŞ SH-SY5Y HÜCRELERİNDE
AMİLOİD BETA VE ALFA SİNÜKLEİN PATOLOJİLERİNİN
İNFLAMATUVAR YANIT ÜZERİNE ETKİSİ**

EBRU KESKİN

**DANIŞMAN
DOÇ.DR.ERDİNÇ DURSUN**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Programında Yüksek Lisans öğrencisi Ebru KESKİN tarafından Doç.Dr.Erdiñ DURSUN 'un danışmanlığında hazırlanan "Nörona Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinde Amiloid beta ve Alfa sinüklein Patolojilerinin İnflamatuvar Yanıt Üzerine Etkisi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 04 /07 /2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Doç.Dr.Erdiñ DURSUN
İstanbul Üniversitesi/Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji A.D

Jüri-Danışman

Prof.Dr.Selma YILMAZER
Altınbaş Üniversitesi/Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji A.D

Jüri

Prof.Dr.Erdem TÜZÜN
İstanbul Üniversitesi/Aziz Sancar
DeneySEL Tıp Araştırma Enstitü /Sinir Bilimi A.D

Jüri

Prof.Dr.Yasemin Özdemir
Koç Üniversitesi/ Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji A.D

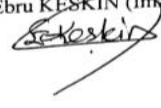
Jüri

Doç.Dr. Duygu GEZEN-AK
İstanbul Üniversitesi/Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji A.D

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ebru KESKİN (İmza)



İTHAF

Annem Birgöl Keskin; Babam Muhammer Keskin ve Rahmetli Dedem
Muzaffer Pabuçcu'ya ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan ve yönlendiren, tüm zorluklar karşısında beni yüreklendiren, karşıma çıkan her türlü sorunda çözüm yolu gösteren hiçbir zaman yardımını ve desteğini esirgemeyen, akademik kişiliği, çalışma prensipleri ve başarılarıyla bana örnek olan, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk ve memnuniyet duyacağım saygıdeğer danışmanım Doç. Dr. Erdinç DURSUN'a gerek eğitimim gerekse tezimde bilgileriyle beni her zaman aydınlatan ve yol gösteren, bana her türlü konuda yardım eden Doç. Dr. Duygu GEZEN AK'a katkıları ve her zaman yanımda olan Prof.Dr. Selma YILMAZER'e ve çalışmamda desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Turgut ULUTİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan, beni her durumda motive eden, çalışmam boyunca desteğini benden esirgemeyen, dostluğu ve yardım severliği ile bulunmaz bir çalışma arkadaşları olan MSc.Merve ALAYLIOĞLU, MSc.Büşra ŞENGÜL, B.Sc. Pelin SORDU ve tez çalışmam boyunca benden yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli çalışma arkadaşlarım, B.Sc. Zuhale Yurttaş ve B.Sc.Tugay Çamoğlu'na teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan, manevi ve maddi olarak her konuda desteğini benden esirgemeyen, her türlü zorluğa karşı beni koruyup kollayan, sevgilerini tüm kalbimle hissettiğim sevgili annem Birgül KESKİN ve sevgili babam Muhammed KESKİN'e, en sıkıntılı anlarımda yanımda olan ve beni güldürmeyi başaran kardeşlerim Pınar KESKİN ve Damla KESKİN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Proje No: 26128 tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	4
TEŞEKKÜR.....	5
İÇİNDEKİLER	6
TABLolar LİSTESİ.....	9
ŞEKİLLER LİSTESİ	10
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	12
ÖZET	18
ABSTRACT.....	19
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	21
2. GENEL BİLGİLER	23
2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar.....	23
2.2. Alzheimer Hastalığı	23
2.2.1. Sekretazlar, APP işlenmesi ve A β oluşumu.....	25
2.3. Alfa- sinükleinopatiler	27
2.3.1. Parkinson Hastalığı	28
2.3.2. Lewy Cisimcikli Demans Hastalığı	30
2.3.3. MSA.....	31
2.4. Alfa sinüklein.....	33
2.4.1. α sinüklein fizyolojik fonksiyonları	35
2.4.2. α -sinükleinin A β ve tau ile etkileşimi	37
2.5. İnflamasyon.....	38
2.5.1. Merkezi Sinir Sistemi İnflamatuvar Proteinleri	45
2.6. Nörodejeneratif Hastalıklar ve İnflamasyon	52
2.6.1. Alzheimer Hastalığı ve İnflamasyon.....	54
2.6.2. Parkinson Hastalığı ve İnflamasyon	57
2.6.3. DLB Hastalığı ve İnflamasyon	58
2.7. SH-SY5Y Hücre Hattının Özellikleri	58
2.7.1. SH-SY5Y Hücrelerinin Nörona Farklılaştırılması.....	59
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	62
3.1. İnsan SH-SY5Y Hücre Kültü Deneyleri.....	62

3.1.1. Kültür Petrilerinin Hazırlanması	62
3.1.2. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM+) Kültür Medyumunun Hazırlanması	63
DMEM+ medyumunu aşağıdaki protokole göre bir gün önceden hazırlandı.....	63
3.1.3. SH-SY5Y Hücre Kültürünün Hazırlanması.....	63
3.1.4. Hemasitometri ile Hücre Sayımının Yapılması	64
3.1.5. İnsan SH-SY5Y Hücrelerinin Pasajlanması	64
3.1.6. İnsan SH-SY5Y Hücrelerinin Nöron Karakterini Kazanması	65
3.2. SNCA Gen Plazmidinin ve Boş Plazmidin (Mock Plazmid) Çoğaltılması	66
3.2.1. Luria-Bertani (LB) ve LB-AGAR Hazırlama Protokolü	66
3.2.2. Bakteriyel Transformasyon Protokolü	66
3.2.3. Plazmid İzolasyonu	68
3.2.4. DNA Saflığı ve Miktarının Tespiti	69
İzolasyon sonucu elde edilen DNA'ların saflık ve miktar tayini Picodrop (Astranet Systems Ltd Picodrop Limited, Hinxton, United Kingdom) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.....	69
3.2.5. SNCA Geni Plazmidi veya Boş Plazmid (Mock plazmid) Varlığını Göstermek Üzere Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Yapılması.....	69
3.2.6. PZR Programı	70
3.2.7. PZR Ürünlerinin Agaroza Jel Elektroforezinde İncelenmesi	71
3.3. İnsan SH-SY5Y Kültürü Uygulamaları	71
3.3.1. Plazmid ile Transfeksiyon Aşamaları	72
6. Transfeksiyonun sağlıklı bir şekilde saptandığı saat aralığında üst sıvılar toplanıp, görüntüleme deneyleri yapılarak hedef parametreler araştırıldı.	73
3.3.2. SNCA Genini İçeren Plazmid Transfeksiyonunun İmmün Floresan İşaretlemeyle Gösterilmesi.....	73
3.3.3. Retinoik Asit ile Nörona Farklılaştırılan SH-SY5Y Hücrelerinin İmmün Floresan İşaretlemeyle Karakterlerinin Gösterilmesi	74
3.3.4. SH-SY5Y Hücrelerinde Amiloid Beta Varlığının Kongo Kırmızı Boyaması İle Gösterilmesi	75
3.4. Ray Biotech C-Series Human Inflammation Antibody Array C3	75
3.5. Sitotoksite Ölçümü.....	78
3.6. İstatiksel Analiz	79
4. BULGULAR.....	80

4.1. SH-SY5Y Hücrelerinin Morfolojik ve Mikroskopik Değerlendirmesi	80
4.1.1. Alpha Gold Competent Hücrelerinin SNCA Genini İçeren Plazmid ile Transformasyonu	81
4.1.2. İnsan SH-SY5Y Hücrelerinin SNCA Genini İçeren Plazmid ile Transfeksiyonu	81
4.1.3. İnsan SH-SY5Y Hücrelerinde A β Varlığının Gösterilmesi.....	83
4.2. Sitotoksosite Ölçüm Sonuçları.....	83
4.3. Ray Biotech C-Series Human InflammationAntibody Array C3 Analizleri	84
5. TARTIŞMA	100
KAYNAKLAR	129
HAM VERİLER	141
FORMLAR	142
ETİK KURUL KARARI	143
PATENT HAKKI İZNİ	144
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	145
ÖZGEÇMİŞ	150

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Sinüklein ailesinin üyeleri.....	34
Tablo 3-1:SOC Medyumunun Hazırlanması	68
Tablo 3-2: PZR Reaksiyonu Karışımı	70



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: APP işlenmesindeki yolaklar.	25
Şekil 2-2: Amiloid beta monomer, fibril ve oligomerlerin yapısı.	26
Şekil 2-3: PH ve DLB 'de substantia nigra'da bulunan Lewy cisimcikleri.....	27
Şekil 2-4: Normal ve Parkinson hastalığından etkilenmiş nörondaki dopamin seviyeleri.	28
Şekil 2-5: Parkinson sendromlarının çakışması.	30
Şekil 2-6: PDD, DLB ve AH için klinik kriterleri karşılayan farklı patolojik tipler.	31
Şekil 2-7 : MSA'daki glial sitoplazmik inklüzyonlar.	32
Şekil 2-8: α -sinüklein toksisitesinde bozulan yolaklar.	37
Şekil 2-9: Doğal bağışıklık ve adaptif bağışıklık arasındaki ilişki.	39
Şekil 2-10: Mikroglia aktivasyonu ve nöronal hücre ölümü.	40
2-11: Akut Enfeksiyonda İmmün Yanıtının Zaman Çizelgesi.	42
Şekil 2-12: İnflamasyonlu MSS'ye sitokin salınımı.	44
Şekil 2-13: Jak-STAT yolu üzerinden sitokin aktivasyonu.	46
Şekil 2-14: İnflamasyonun Alzheimer hastalığı patolojisi üzerine etkisi.	56
Şekil 2-15: Farklılaşmış hücre popülasyonlarında "S" ve "N" hücre tipi.	61
Şekil 3-1: 72.saatte ait gruplara ait membranlar görülmektedir.	78
Şekil 4-1: İnsan SH-SY5Y hücrelerinin kültür koşullarındaki dopaminerjik karakterlerinin TH immüno Floresan işaretleme ile gösterilmesi.	81
Şekil 4-2: Plazmid DNA'sının agaroz jel elektroforezinde gösterilmesi.	81
Şekil 4-3: İnsan SH-SY5Y hücre kültüründe SNCA plazmid transfeksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğinin gösterilmesi.....	82
Şekil 4-4: İnsan SH-SY5Y hücrelerinde A β plakların gösterilmesi.	83
Şekil 4-5: 24 saat SNCA plazmid uygulanmış farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültürüne ait tüm grupların 48. saatteki LDH miktarları.	84
Şekil 4-6: 24 saat süreyle plazmid uygulanmış farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültürüne ait tüm grupların 72. saatteki LDH miktarları.	84
Şekil 4-7: SH-SY5Y hücrelerinden 48.saatte salınan inflamatuvar protein profili ve A β uygulaması, SNCA aşırı ekspresyonu, SNCA+ A β uygulamasının bu profil üzerine etkisi.....	87

Şekil 4-8: SH-SY5Y hücrelerinden 72. saatte salınan inflamatuvar protein profili ve A β uygulaması, SNCA aşırı ekspresyonu, SNCA+ A β uygulamasının bu profil üzerine etkisi.....	89
Şekil 4-9: Kemokinler-1	89
Şekil 4-10: Kemokinler-2	91
Şekil 4-11: İnterlökinler-1	92
Şekil 4-12: İnterlökinler-2	94
Şekil 4-13: Tümör Nekroz Ailesi ve Reseptörleri	95
Şekil 4-14: Koloni Uyarıcı Faktör Ailesi.....	96
Şekil 4-15: İnterferon gamma	97
Şekil 4-16: Sınıflandırma Dışı Kalanlar	98
Şekil 5-1: Kültüre edilmiş insan SH-SY5Y hücrelerinden 48.saatte salınan inflamatuvar yanıt proteinlerinin seviyeleri	102
Şekil 5-2: Kültüre edilmiş insan SH-SY5Y hücrelerinden 72.saatte salınan inflamatuvar yanıt proteinlerinin seviyeleri	102
Şekil 5-3: α -sinüklein aşırı ekspresyonuna bağlı olarak araştırılan parametrelerdeki değişiklikler.	124
Şekil 5-4: A β uygulamasına bağlı olarak hiçbir uygulama yapılmamış kontrol hücrelerinde araştırılan parametrelerdeki değişiklikler.	124
Şekil 5-5: SNCA+A β uygulamasına bağlı olarak SNCA plazmidi uygulanmış hücrelerde araştırılan parametrelerdeki değişiklikler.	125
Şekil 5-6: SNCA+A β uygulamasına bağlı olarak A β uygulanmış hücrelerde araştırılan parametrelerdeki değişiklikler.	125
Şekil 5-7: α -sinüklein aşırı ekspresyonuna bağlı olarak araştırılan parametrelerdeki değişiklikler.	126
Şekil 5-8: A β uygulamasına bağlı olarak hiçbir uygulama yapılmamış kontrol hücrelerinde araştırılan parametrelerdeki değişiklikler.	126
Şekil 5-9: SNCA+A β uygulamasına bağlı olarak SNCA plazmidi uygulanmış hücrelerde araştırılan parametrelerdeki değişiklikler.	127
Şekil 5-10: SNCA+A β uygulamasına bağlı olarak A β uygulanmış hücrelerde araştırılan parametrelerdeki değişiklikler.	127

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

A β : Amiloid beta

AH: Alzheimer hastalığı

ALS: Amiyotrofik lateral skleroz

APP: Amiloid prekürsör protein

APC: Antijen sunan hücreler

α -syn: Alfa-sinüklein

ATP: Adenozin trifosfat

6-OHDA:6 hidroksidopamin

β : beta

β - syn: Beta sinüklein

BOS: Beyin-omurilik sıvısı

CBD: Kortikobazal dejenerasyon

CCR: CC kemokin reseptörleri

CCR2: CC-kemokin reseptörü 2

CCL5: C-C motif ligand 5

CMA(Şaperon aracılı otofaji)

CXCL8: C-X-C motif ligand 8

CXCL2: CXC-kemokin ligandı 2

CSF-1: Koloni uyarıcı faktör-1

CTL: Sitotoksik T lenfosit

COX2: Siklooksijenaz 2

CGN: Serebellar granül nöron

Da: Dalton

δ : delta

DAT: Dopamin taşıyıcılarının

DbcAMP: Dibutiril siklik AMP

DLB: Lewy cisimcikli demans

ER: Endoplazmik retikulum

EBAH: Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı

GFAP: Glial fibriler asidik protein

GCSF: Granülosit koloni uyarıcı faktör

GFAP: Glial fibriler asidik protein

γ : gama

γ -sekretaz: gama sekretaz

GM- CSF: Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör

GM-CSFR: GM CSF reseptörü

GPCR:G proteine bağlı reseptörler

GMF:Glia olgunlaştırıcı faktör

HH: Huntington hastalığı

ICAM-1: Hücre içi adezyon molekülü 1

I-309: T lenfosit salgılayan protein

IFN: İnterferonlar

IFN γ : İnterferon- γ

IP-10: İnterferon gama indüklenen protein

IL-1:İnterlökin-1

IL1 α : İnterlökin 1 alfa

IL1 β : İnterlökin 1 beta

IL-2: İnterlökin-2

IL-3: İnterlökin-3

IL-4: İnterlökin- 4

IL-6: İnterlökin-6

IL-6R: İnterlökin-6 reseptörü

IL-7: İnterlökin-7

IL-8: İnterlökin-8

IL-9: İnterlökin-9

IL-10: İnterlökin-10

IL-11: İnterlökin-11

IL-12: İnterlökin-12

IL-13: İnterlökin-13

IL-13R α 1: IL-13 reseptörü α 1 zinciri

IL-15: İnterlökin-15

IL-16: İnterlökin-16

IL-17: İnterlökin-17

IL-23: İnterlökin-15

IL-18: İnterlökin-18

IL-34: İnterlökin-34

JAK: Janus kinaz

KBB: Kan-beyin bariyeri

LDH: Laktat dehidrogenaz

LRP: Lewy ilişkili α -sinüklein patolojileri

LBD: Lewy Cisimcikli Demans

LB: Lewy cisimleri

LRRK2: Lösence zengin tekrar kinaz 2

MAPT: Mikrotübül ilişkili protein tau

MMPlar: Matriks metaloproteinaz

MMP-3: Matriks metalloproteinaz-3

MCP-1: Monosit kemoatraktan protein-1
MCP-2: Monosit kemoatraktan protein-2
M-CSF: Makrofaj koloni uyarıcı faktör
MIG: İnterferon-gama ile indüklenen monokin
MIP-1 α : Makrofaj inflamatuvar protein-1 α
MIP-1 β : Makrofaj inflamatuvar protein-1 β
MIP-1 δ : Makrofaj inflamatuvar protein-1 δ
MS: Multiple skleroz
MSA-P: Parkinsonizm ağırlıklı MSA
MSA-C: Serebellar özellikli MSA
NAC: Amiloid- β olmayan bileşen
MSS: Merkezi sinir sistemi
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
MSA: Multisistem atrofisi
NO : Nitrik oksit
PAMP: Patojen ile ilişkili moleküler kalıplar
PARK16: Parkinson hastalığı 16
PSEN1: Presenilin 1
PSEN2: PSEN2
PGE2: Prostaglandin E2
PRR: Kalıp tanıma reseptörleri
PSP: Progresif supranükleer palsi
PDGF-BB: Platelet kökenli büyüme faktörü BB
PDD: Parkinson Hastalığı demansı
ROS: Reaktif oksijen türleri
RA: Retinoik Asit

SNCA: Alfa sinüklein geni

SNCB:  -sinüklein geni

SNCG:  -sinüklein geni

SNP: Tek Nükleotid Polimorfizmleri

SH2: Src homoloji 2

STAT: Sinyal iletimi ve transkripsiyon aktivatörleri

SVZ: Subventrik ler bölge

TH: Tirozin hidroksilaz

TIMP-2: Metalloproteinazların doku inhibitörleri-2

TNF: Tümör nekroz faktör

TNF- : Tümör nekroz faktör  

TNFR1: Tümör nekroz faktör reseptör 1

TNFR2: Tümör nekroz faktör reseptör 2

TPA: 12-0-tetradekanoil-forbol-13 asetat

TH: T yardımcı hücre

TFH: T foliküler yardımcı hücre

TH: Tirozin hidroksilaz

TNF- : Tümör nekroz faktör alfa

TGF- : Transforme edici büyüme faktörü beta

TGF- 1: Transforme edici büyüme faktörü beta

UPR: Ubikitin proteozom yanıt

VAMP2: Vezikül-ilifkili membran proteini 2

VMAT: Vesiküler monamin taşıyıcısı



ÖZET

KESKİN, E (2018). Nörona farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinde amiloid beta ve alfa sinüklein patolojilerinin inflamatuvar yanıt üzerine etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi.İstanbul.

Nörodejenerasyon, MSS bozukluklarının ortak bir bileşenidir ve nöron fonksiyonunu, yapısını ve yaşamını etkilemektedir. Nörodejeneratif hastalıklarda özel nöron tipleri ve glia hücreleri dejenerasyona uğrayarak spesifik hastalık belirtilerinin ortaya çıkmasına sebep olur. AH'de amiloid beta ($A\beta$)'nın nörodejenerasyon ve demansa yol açan patolojik yolağı başlattığı ileri sürülmektedir. PH ve DLB, nöron veya glia hücrelerinde çözünmeyen α -sinüklein proteininin anormal birikimi ile karakterize edilen nörodejeneratif hastalıklar olan α -sinükleinopatiler arasında yer alır. MSS'de çeşitli durumlara bağlı olarak ortaya çıkan ve nöroinflamasyon olarak adlandırılan inflamatuvar yanıt nöronlar, mikrogliya ve astrositlerden salınan sitokinler ve kemokinler gibi düzenleyiciler ile sağlanmaktadır. Aşırı olarak meydana gelen nöroinflamatuvar reaksiyonlar nörodejenerasyona yol açar ve nörodejenerasyon MSS'de daha fazla nöroinflamasyona neden olmaktadır. Bir nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y, nörodejeneratif hastalıklar ile ilgili çalışmalarda sıkça kullanılan bir hücre hattıdır. Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızda, insan SH-SY5Y hücrelerinde RA ile nörona farklılaştırma sağlandıktan sonra $A\beta$ 1-42 uygulaması ile AH benzeri patoloji; α -sinüklein aşırı ekspresyonu ile PH benzeri patoloji; α -sinüklein aşırı ekspresyonu yapılan hücrelere $A\beta$ 1-42 uygulaması ile de DLB benzeri patoloji oluşturularak bu patolojilerinin inflamatuvar yanıt üzerine etkisi ve söz konusu hastalık grupları ile sağlıklı bir nöron popülasyonu arasında bu cevap karşılaştırılmıştır. Human inflammation antibody array kullanılarak kemilüminesans tabanlı western/dot blot yöntemi ile SH-SY5Y hücrelerinin üst sıvılarında salınan inflamatuvar proteinlerin seviyelerindeki değişiklikler saptandı. Elde ettiğimiz veriler $A\beta$ uygulaması ve α -sinüklein aşırı üretiminin insan SH-SY5Y hücrelerinde baskın olarak MCP-1 ve TIMP-2 proteinlerini kültür üst sıvısına saldığını göstermektedir. Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma üç hastalık modelini hücresel düzeyde inflamatuvar protein profili açısından karşılaştıran ilk çalışma olacaktır.

Anahtar kelimeler: amiloid beta, α -sinüklein, insan SH-SY5Y hücre kültürü, sitokin, kemokin

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi(Proje No: 26128) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

KESKİN, E (2018). Effect of amyloid beta and alpha synuclein pathologies on inflammatory response in neuronal differentiated SH-SY5Y cells. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Biology. Master Thesis. Istanbul.

Neurodegeneration is a common component of CNS disorders and affects neuronal function and survival. In neurodegenerative diseases, specific neuron types and glial cells undergo degeneration leading to the appearance of specific disease symptoms. AD, PD and DLB are among the most common neurodegenerative diseases. In AD, A β is suggested to induce a pathological pathway that leads to neurodegeneration and dementia. PD and DLB are among α -synucleinopathies, which are neurodegenerative disorders characterized by an abnormal accumulation of α -synuclein protein that is insoluble in neurons or glial cells. The inflammatory response, called neuroinflammation in CNS, is provided by regulators such as cytokines and chemokines released from neurons, microglia and astrocytes. Excessive neuroinflammatory reactions suggested to lead to neurodegeneration and result in induced neuroinflammation in CNS. SH-SY5Y, a neuroblastoma cell line that is frequently used in studies involving neurodegenerative diseases. In our study, we established AD-like pathology by A β 1-42 administration and PD-like pathology with α -synuclein overexpression; DLB-like pathology by α -synuclein overexpression followed by A β 1-42 treatment in human SH-SY5Y cells that were differentiated into neurons with RA. The effect of these pathologies on the inflammatory response and, in particular, the response between disease groups and a healthy neuron population were compared. Alterations in the levels of released inflammatory protein were detected with chemiluminescence-based western/dot blot. The results show that A β administration and α -synuclein overexpression are predominantly attacking MCP-1 and TIMP-2 proteins in culture supernatant in human SH-SY5Y cells. To our knowledge, this study will be the first to compare three disease models in terms of inflammatory protein profile at the cellular level.

Keywords: amyloid beta, α -synuclein, cytokine, chemokine, human SH-SY5Y cell culture

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University (ProjectNo:26128).



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer hastalığı (AH) , Parkinson hastalığı (PH) ve Lewy cisimcikli demans (DLB) en sık görülen nörodejeneratif hastalıklar arasında yer almaktadır. Nörodejeneratif hastalıklarda özel nöron tipleri ve glia hücreleri dejenerasyona uğrayarak spesifik hastalık belirtilerinin ortaya çıkmasına sebep olurlar. AH'de amiloid beta ($A\beta$); PH'de α -sinüklein, DLB'de α -sinüklein ve $A\beta$ patolojileri hastalık patogeneze eşlik etmektedir. AH'nin en belirgin patolojik özellikleri arasında ana bileşeni $A\beta$ peptidi olan ve ekstraselüler alanda biriken amiloid plaklar ve intraselüler alanda biriken, hiperfosforile tau proteininden oluşan nörofibriler yumaklar yer almaktadır. α -sinükleinopatiler olarak adlandırılan PH ve DLB'de nöronal veya glial hücrelerde çözünmeyen α -sinüklein proteini birikmektedir. α -sinükleinopatilerin temel patolojik özelliği, merkezi sinir sistemi (MSS) boyunca yanlış katlanmış ve fibril oluşturmuş α -sinüklein inklüzyonlarının birikimidir.

MSS'de meydana gelen bakteriyel veya viral enfeksiyonlar, toksinler, otoimmün reaksiyonlar ve mekanik hasarın yol açtığı doku hasarı sonrasındaki inflamatuvar yanıt; nöron, mikrogliya ve astrositlerden salınan sitokinler ve kemokinler gibi düzenleyicilerin ekspresyonu ile tetiklenmektedir. MSS'nin yardımcı hücreleri olan glialara ek olarak nöronlar da salınabilir sitokinlerin bir kaynağı olarak ifade edilmektedir.

Sitokinler, hücre-hücre iletişimi ve hücrel aktivasyonda önemli rol oynayan çok fonksiyonlu pleiotropik proteinlerdir. Fonksiyonel olarak sitokinler, bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerinin dengesine bağlı olarak ya pro-inflamatuvar ya da anti-inflamatuvar olarak sınıflandırılmıştır. Sitokinler hem immun yanıtta hem de MSS'deki çeşitli olayların kontrolünde yer alırlar ve eşit ölçüde nöral fonksiyonların ve nöronal sağkalımın ve immun cevabın düzenleyicileridir. Sitokinler ve reseptörleri, hem normal hem de patolojik koşullar altında MSS'de nöronlar tarafından yapısal olarak ifade edilirler, fakat beyindeki aşırı sitokin ve kemokin ifadesi nörotoksik ve nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde önemli bir faktör olarak rol oynamaktadır. Birçok çalışma uzun süreli nöroinflamatuvar yanıtın nöronlarda fonksiyon bozukluğuna ve nöron ölümüne yol açarak AH, PH, DLB gibi nörodejeneratif hastalıkların patogeneziyle ilişkili olduğunu göstermiştir.

Hipotezimize göre sağlıklı bir nöronda sitokin ve kemokin üretiminin belirli bir seviyesi bulunmaktadır ve bu seviye A β ve/veya α -sinüklein gibi patojenler ile birlikte değişmektedir. Hücrelerde ortaya çıkan patolojik mekanizmalar nöroinflamasyonu tetiklemekte ve hücrelerin bu duruma cevap olarak saldığı sitokinler ve kemokinler patolojik unsuru ortadan kaldırmaya çalışmaktadır. Patolojik yapı ortadan kalkmadığında ise salınan sitokin ve kemokinlerin seviyesi ve tipleri değişmektedir.

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda retinoik asit ile nörona farklılaştırılmış insan SH-SY5Y hücrelerinin hangi inflamatuvar proteinleri hangi seviyelerde ürettiğini saptamayı, bu hücrelerin inflamatuvar proteinlerin salınımı açısından genel bir profilini belirlemeyi, SH-SY5Y hücrelerinin hastalık benzeri modellerimizin temelini oluşturan AH için A β 1-42; PH için α -sinüklein aşırı ifadesi ve DLB için α -sinüklein aşırı ifadesi sonrası A β uygulamalarına cevap olarak bu profilinin nasıl değiştirdiğini, böylece bir nöron popölasyonunun normal kültür şartlarında ve patolojik koşullar altında hangi inflamatuvar düzenleyicileri daha fazla ve hangilerini daha az sentezlediğini ve bu profilin farklı nörodejeneratif hastalıklarda nasıl değişebileceğini saptamayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar

Nöronlar, merkezi sinir sisteminin (MSS) temel hücreleridir ve özgün işlevleri bulunmaktadır. Nöronlar arasındaki sinaptik bağlantılar, hedef sinir hücresine uyarıcı veya inhibe edici bir sinyal göndermek üzere özelleşmiş yapılardır. Bu sinyalleri ileten hücre uzantıları aksonlar olarak adlandırılırken, sinaptik uyarıları alan uzantılar ise dendritler olarak adlandırılmaktadır. İnsan beynindeki yaklaşık 100 milyar nöronun her biri, diğer nöronlardan gelen birçok sinaptik uyarıyı bütünleştirir ve alınan her bir uyarı için bir aksonal aksiyon potansiyelini uyararak veya inhibe ederek hedef nörona sinaptik bir uyarı sağlayabilir (Ransohoff 2016).

Nörodejenerasyon, MSS bozukluklarının ortak bir bileşenidir ve nöron fonksiyonunu, yapısını ve yaşamını etkilemektedir (Ransohoff 2016). Nörodejeneratif hastalıklarda özel nöron tipleri ve glia hücreleri dejenerasyona uğrayarak spesifik hastalık belirtilerinin ortaya çıkmasına sebep olurlar (Ransohoff , Uchikado, Lin ve ark. 2006). Nöronal kaybın nerede olduğuna bağlı olarak çeşitli işlevsel bozukluklar ortaya çıkabilir ve nörodejenerasyon sürekli olarak ilerleyen bir işlemdir (Lardenoiye, Iatrou ve ark.). Alzheimer hastalığı (AH) ve Parkinson hastalığı (PH) en sık görülen nörodejeneratif hastalıklar arasında yer almaktadır (Ransohoff). Lewy cisimcikli demans (DLB) ise, AH'den sonra en sık rastlanan demans tipidir (Uchikado, Lin ve ark. 2006).

2.2. Alzheimer Hastalığı

Dünyada demansın en yaygın nedeni olan AH; hafıza ve bilişsel fonksiyonlarda kayıp, davranış ve kişilik değişiklikleriyle karakterize edilen yaşa bağlı, kompleks ve sık görülen ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır (Reddy, Manczak ve ark., Tong, Zhang ve ark. 2017). Genetik, epigenetik ve çevresel faktörler arasındaki etkileşimlerden kaynaklandığı düşünülen AH; inflamatuvar yanıt, enerji metabolizması ve hücre döngüsü kontrolü dahil olmak üzere pek çok hücresel mekanizmadaki bozuklukları içermektedir (Lardenoiye, Iatrou ve ark.). AH'nin en belirgin patolojik özellikleri arasında ekstraselüler alanda ana bileşeni amiloid beta ($A\beta$) peptidi olan amiloid plaklar ve intraselüler alanda hiperfosforile tau proteininin birikimden oluşan nörofibriler yumaklar yer almaktadır (Swirski, Miners ve ark.). $A\beta$, sadece MSS hücrelerinde

(nöronlar, astrositler ve mikroglia) değil, aynı zamanda böbrek üstü bezi, böbrek, kalp, karaciğer, dalak, pankreas, kaslar ve çeşitli kan ve endotel hücreleri gibi periferik organ ve dokularda da eksprese edildiği ileri sürülmektedir. Periferik dokulardaki ve beyindeki A β düzeylerinin bilişsel olarak normal yaşlı bireylerde AH'li hastalardan daha düşük olduğu bildirilmiştir (Wang, Gu ve ark. 2017).

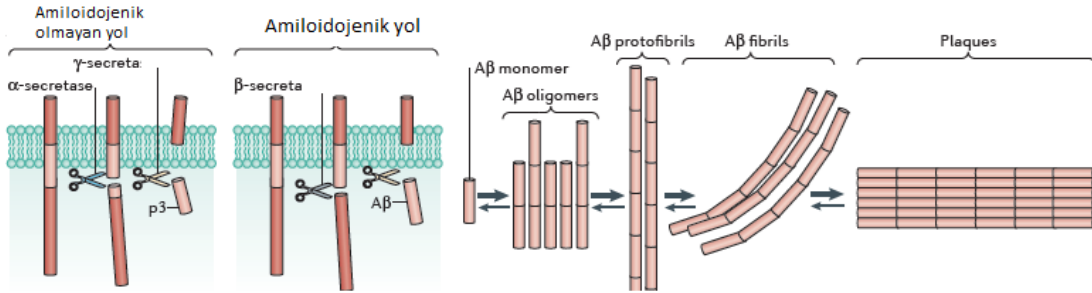
Amiloid beta peptidleri, APP'nin amiloidojenik yolda γ -sekretaz enzimi ile kesilmesi sonucunda üretilir (Coronel, Bernabeu-Zornoza ve ark. 2018). PS1, PS2, Aph-1, Pen2 ve nicastrin gibi farklı proteinlerden oluşan γ -sekretaz kompleksi, APP'yi kesen üç enzim kompleksinden biridir. Diğer iki enzimden biri ADAM10, 9 veya 17 gibi bir disintegrin ve bir metalloproteazdan (ADAM) oluşan α -sekretaz enzimi; diğer enzim ise A β 'yi kesen enzim (BACE1,2), Asp1,2 veya memapsin1,2 gibi bir aspartik proteazdan oluşan β -sekretazdır (Gezen-Ak, Atasoy ve ark. 2017). İnsan amiloid prekürsör proteini (APP) genindeki mutasyonlar, özellikle erken başlangıçlı ailesel AH'de amiloid plaklarının ve Alzheimer benzeri beyin patolojisinin gelişmesine neden olmaktadır. APP genindeki mutasyonlar γ -sekretaz kesim bölgesine yakındır ve A β 42/A β 40 oranını artırabilir. AH'ye neden olan mutasyonlar ayrıca Presenilin 1 (PSEN1) ve Presenilin 2 (PSEN2) genlerinde meydana gelmektedir. İnsan PSEN1 ve PSEN2 genlerindeki mutasyonlar γ -sekretaz aktivitesini etkileyerek ve A β 42/A β 40 oranını artırabilir. Bazı erken başlangıçlı ailesel AH'ları APP, PSEN1 veya PSEN2 genlerinde mutasyon göstermemektedirler. Geç başlangıçlı AH, genetik ve genetik olmayan faktörlerden kaynaklanmaktadır. Bu risk faktörü genleri, artmış A β üretimi ve birikimini; A β temizlenmesindeki azalmayı; artmış inflamasyonu; ve γ -sekretaz etkinliğine direnç gibi bilinen patojenik mekanizmalardan birini veya daha fazlasını etkileyerek AH'de nörodejenerasyona yol açmaktadır (Chen, Xu ve ark. 2017). Sporadik AH'nin nedeni ise büyük ölçüde bilinmemektedir (Ryan, Narrow ve ark.).

Nörofibriler yumaklar ise tau adı verilen mikrotübül ilişkili bir proteinden oluşmaktadır. Sağlıklı nöronlarda tau; besin maddelerini, vezikülleri, mitokondri ve kromozomları hücre gövdesinden akson ucuna ve geriye doğru taşıyan mikrotübüllerin ayrılmaz bir bileşenidir. Bununla birlikte AH'de, tau hiperfosforile hale gelir ve bu fosforilasyon, tau'nun birbirine yapışmasına ve eşleşmiş helikal filamentlerin oluşmasına neden olmaktadır (Rubio-Perez ve Morillas-Ruiz 2012).

2.2.1. Sekretazlar, APP işlenmesi ve A β oluşumu

A β , APP'den üretilen hücre metabolizmasının normal bir ürünüdür. APP, tek geçişli bir transmembran proteindir ve büyük bir hücre dışı glikozile N-terminal ucu ve daha kısa bir sitoplazmik C-terminal ucu içermektedir. APP, 695 ile 770 amino asit arasında değişen çeşitli izoformlar halinde üretilir. Beyinde yaygın form olan APP695, esas olarak nöronlar tarafından üretilmektedir. APP; nöronal gelişim, sinaptik oluşum ve onarım, anterograde nöronal taşıma, interselüler taşıma ve nöronal homeostazı içeren bir dizi biyolojik aktivitede önemli rol oynayan tip 1 membran glikoproteinidir (Chen, Xu ve ark. 2017).

APP'nin kesilmesi amiloidojenik olmayan veya amiloidojenik olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşmektedir (Heppner, Ransohoff ve ark. 2015)(ŞEKİL2-1).

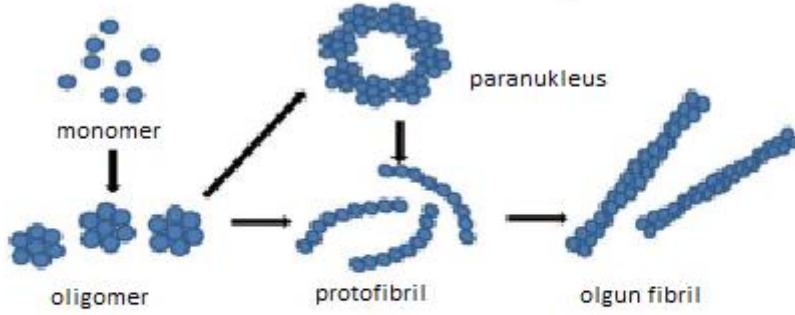


Şekil 2-1: APP işlenmesindeki yollar.

(Heppner, Ransohoff ve ark. 2015'den uyarlanmıştır).

Amiloidojenik olmayan yolda APP, önce α -sekretaz ve daha sonra γ -sekretaz ile kesilirken, A β 'nın üretildiği amiloidojenik yolda APP; önce Golgi, endozomlar ve plazma membranında lokalize olan transmembran β -sekretaz enzimi (BACE) tarafından, ardından ise intramembran γ -sekretaz enzimi tarafından kesilir. Ekstraselüler alana monomerik A β gönderilir (Heppner, Ransohoff ve ark. 2015 , Sutinen, Pirttilä ve ark.). β -sekretaz, A β üretiminin başlatılmasından sorumludur. PSEN, γ -sekretazın katalitik çekirdeğini oluşturan çok geçişli bir transmembran proteinidir. Citron ve ark. (1997), PSEN1/PSEN2 transgenik farelerin beyinde artmış A β 42 seviyelerini göstermiştir (Lin, Ho ve ark. 2017).

Fizyolojik koşullar altında, monomerik A β , çözünür dimerlere, trimerlere, diğer düşük-n oligomerlere, küresel oligomerlere, protofibrillere ve çözünmeyen amiloid fibrillerine kümelenme eğilimi gösterir (Ryan, Narrow ve ark. 2010)(Şekil 2-2).



Şekil 2-2: Amiloid beta monomer, fibril ve oligomerlerin yapısı.

(Chen, Xu et al. 2017'den uyarlanmıştır).

Amiloidojenik yolakta APP'nin γ -sekretaz ile kesilmesi sonucu A β 1-40 veya daha fibrilojenik olduğu bildirilen A β 1-42 peptidleri ortaya çıkmaktadır (Lardenoije, Iatrou et al.). 42 aminoasitten oluşan A β 1-42'nin ekstraselüler alana salındığı ve birikerek amiloid plakları oluşturduğu bilinmektedir (Takahashi, Nagao ve ark.).

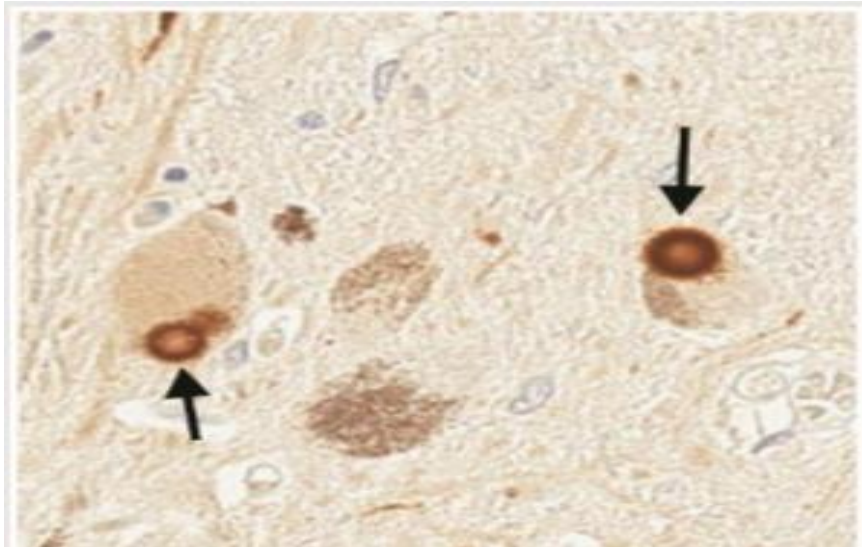
A β 'nın birincil amino asit dizisi, ilk olarak 1984 yılında hücre dışı birikimlerden ve amiloid plaklardan keşfedilmiştir. A β , 37 ile 49 aminoasit boyutunda değişen bir grup peptidi kapsamaktadır (Chen, Xu ve ark. 2017). AH patolojisi ile ilgili ileri sürülen en önemli hipotezlerden biri olan amiloid kaskad hipotezine göre A β ile ilişkili toksisitenin sinaptik fonksiyon bozukluğunun birincil nedeni olduğu nörodejenerasyon ve demansa yol açan patojenik yolağı başlattığı düşünülmektedir (Uchikado, Lin ve ark. 2006 , Tong, Zhang ve ark. 2017). Amiloid kaskad-inflamatuvar hipotezine göre ise A β 'nın tau'nun varlığı ile artmış bir inflamatuvar yanıt oluşturduğu öne sürülmektedir (Ryan, Narrow ve ark.).

2.3. Alfa- sinükleinopatiler

α -sinüklein; sinaptik fonksiyon, nöronal plastisite, öğrenme, gelişme, hücre adezyonu, fosforilasyon, hücrel farklılaşma ve dopamin alımının düzenlenmesi gibi işlevlerde önemli bir rol oynayabilmektedir (Ma, Chan ve ark. 2003). Altmış yaş üzerindeki nörolojik olarak normal yaşlı bireylerin yaklaşık % 10'unun sinir sisteminde düşük yoğunlukta α -sinüklein birikimi mevcuttur (McCann, Stevens ve ark. 2014).

α -sinükleinopati, nöronal veya glial hücrelerde çözünmeyen α -sinüklein proteinin anormal birikimi ile karakterize edilen nörodejeneratif hastalıkları tanımlamak için kullanılmaktadır (Heneka, O'Banion ve ark., Bruck, Wenning ve ark.) (Şekil 2-3). Bu hastalıklar arasında PH, DLB ve Multisistem atrofisi (MSA) yer almaktadır (Goedert, Jakes ve ark.).

α -sinükleinopatilerin temel patolojik özelliği, MSS boyunca yanlış katlanmış ve fibril oluşturmuş α -sinüklein inklüzyonlarının birikimidir (Bruck, Wenning ve ark.). Sinükleinopatilerde α -sinüklein inklüzyonlarını içeren üç ana patolojik yapı vardır. Bunlar, PH ve DLB'li hastaların nöronlarında bulunan Lewy cisimleri, Lewy nöritleri ve MSA'lı hastaların oligodendrositlerinde bulunan glial sitoplazmik inklüzyonlardır (GCI). Bu durum ayırıcı tanı için temel oluşturan farklı klinik belirtilere yol açmakla birlikte aynı zamanda motor, kognitif, davranışsal ve otonomik işlevlerde kronik ve ilerleyici gerileme gibi bazı ortak belirtileri de ortaya çıkarmaktadır (Yang ve Yu).

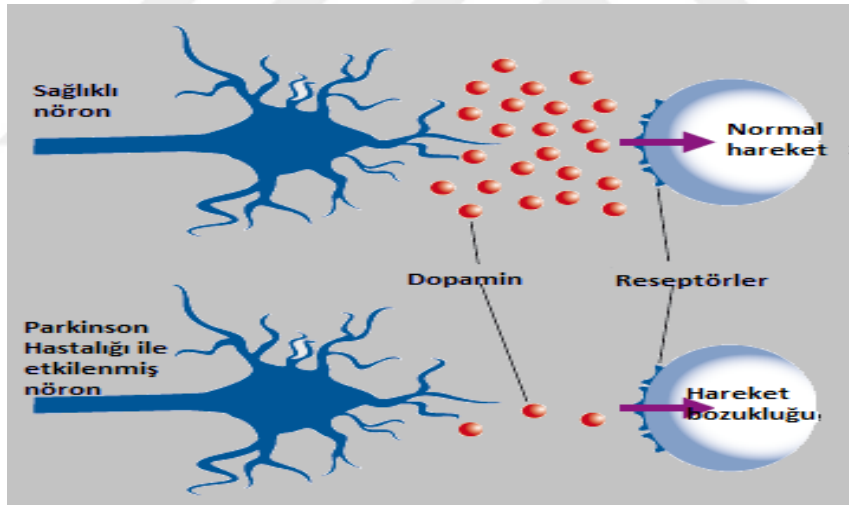


Şekil 2-3: PH ve DLB 'de substantia nigra bulunan Lewy cisimcikleri.

Burada Lewy cisimleri (oklar), Lewy cisimciklerinde bulunan α -sinükleinin patolojik fosforile formuna (serin 129) özgü bir antikor ile boyanmıştır (McFarland'dan uyarlanmıştır).

2.3.1. Parkinson Hastalığı

Parkinsonizm bir hipokinetik sendrom olarak tanımlanır ve dinlenme tremoru, rigidite, bradikinezi veya akinezi ve postural instabilite ile karakterizedir. Parkinsonizm ana başlığı altında en sık görülen nörodejeneratif hastalık PH veya idiyopatik Parkinson sendromu olarak bilinmektedir (McFarland 2016 , Levin, Kurz ve ark. 2016). Uzun bir geçmişe sahip olan PH'ya ilişkin kısmi tanımlamalar bulunmasına rağmen, hastalığın ilk eksiksiz klinik tarifi 1817'de James Parkinson tarafından yapılmıştır (Goedert, Jakes ve ark. 2017). PH, substantia nigradaki dopaminerjik nöronların kaybı ve Lewy ilişkili α -sinüklein patolojileri (LRP) olarak adlandırılan, nöronal soma ve nöritlerde α -sinüklein içeren inklüzyonların oluşumu ile karakterize en yaygın görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır (Yang ve Yu, Gualtierotti, Guarnaccia ve ark.). Substantia nigradaki dopaminerjik nöronlar, motor hareketlerin başlatılmasında önemli rol oynamaktadır (Şekil 2-4).



Şekil 2-4: Normal ve Parkinson hastalığından etkilenmiş nörondaki dopamin seviyeleri.

(Yang ve Yu, Gualtierotti, Guarnaccia ve ark 'dan uyarlanmıştır.)

PH'daki semptomlar esas olarak tremor, rigidite, bradikinezi/akinezi ve postural instabilite olarak görülmektedir (Lardenoije, Iatrou ve ark.). Hastalığın teşhisi için bu semptomların en az 2 tanesinin görülmesi gerekir ve bir tanesi mutlaka tremor veya bradikinezi olmalıdır (Stamelou ve Bhatia 2016).

Motor hareketlere bağlı olmayan semptomlar arasında ise koku almada bozukluklar, bilişsel gerilemeler, psikiyatrik semptomlar ve otonom fonksiyon

bozulukluğu yer almaktadır (Kempuraj, Thangavel ve ark.). Bu semptomlar; serotonerjik, noradrenerjik ve kolinerjik işlev bozukluklarını içeren nörotransmitter sistemlerindeki dengesizliklerle ilgilidir (Lardenoije, Iatrou ve ark.).

AH'de olduğu gibi PH'nın da, ailesel ve sporadik tipleri bulunmaktadır. Presinaptik bir protein olan α -sinüklein'i kodlayan SNCA geni, PH için başlıca risk genlerinden biridir ve bu genin N-terminal nokta mutasyonları (A30P, E46K, H50Q, G51D, A53E ve A53T) ve α -sinüklein lokusunu içeren genomik duplikasyonları/triplikasyonları yoluyla artan ekspresyonu otozomal dominant olarak kalıtılan ailesel PH'ya neden olmaktadır (Bruck, Wenning ve ark.). α -sinüklein lokus duplikasyonları geç başlangıçlı (yaklaşık 60 yaş) otozomal dominant formdaki PH'ya neden olmaktadır. Buna karşılık, α -sinüklein lokus triplikasyonu erken başlangıçlı PH'ya (<40 yıl) yol açar, bu da artmış α -sinüklein seviyelerinin PH patogenezi hızlandırdığını göstermektedir. Buna ek olarak sporadik PH'ya yatkınlığı artıran risk faktörleri olarak α -sinkleinde tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) tespit edilmiştir (Wong ve Krainc 2017).

SNCA'ya ek olarak, mikrotübül ilişki protein tau (MAPT), Parkinson hastalığı 16 (PARK16) ve ls ince zengin tekrar kinaz 2 (LRRK2)'nin de içinde yer aldığı pek çok gen, risk genleri olarak gösterilmektedir (Edwards, Scott ve ark.). LRRK2 gibi diğer PH ile ilişkili genlerde mutasyona sahip ailesel PH'ları Lewy cisim patolojisi geliştirebilirler (Wong ve Krainc 2017).

Parkinson sendromu bulunan hastaların küçük fakat önemli bir kısmı erken bunama, sık görülen düşme, oküler hareket kaybı, belirgin disotonomi ya da ataksi gibi atipik özellik gösterirler. Bu sendromlar tipik olarak çoklu sistem dejenerasyonunu içerir ve atipik parkinson sendromları olarak adlandırılırlar (şekil 2-5). Atipik parkinson sendromları, amiloidojenik proteinlerin hücre içinde birikimi ile karakterize edilen nörodejeneratif hastalıklardır. DLB, MSA ve PH sinükleinopatiler olarak adlandırılırken Progresif supranükleer palsi (PSP) ve Kortikobazal dejenerasyon (CBD)'da tau proteini dejenere olur ve bu hastalıklar tauopatiler olarak adlandırılır (Levin, Kurz ve ark. 2016).

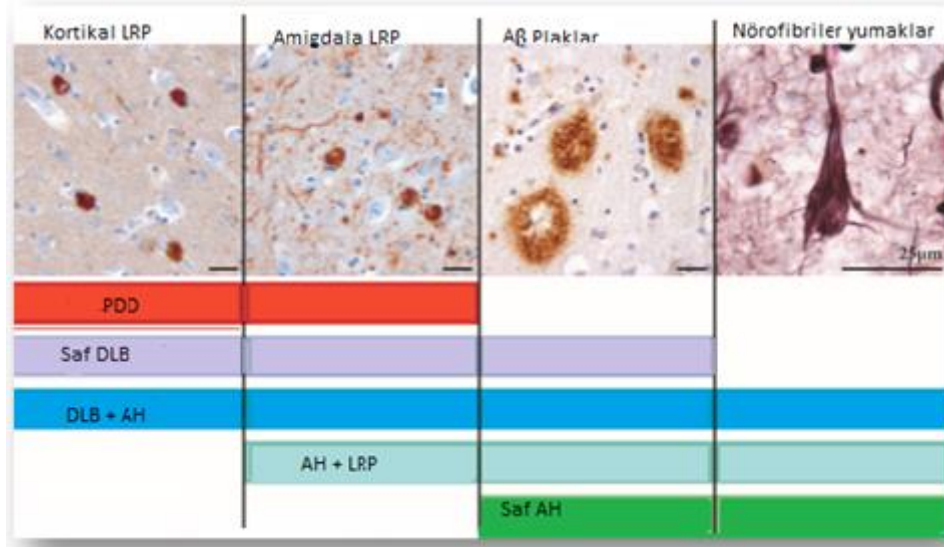


Şekil 2-5: Parkinson sendromlarının çakışması.

Atipik Parkinsonizm, Parkinson hastalığı, İkincil Parkinsonizm ve Kalıtsal Parkinsonizm ortak özelliklere sahiptir (Stamellou ve Bhatia 2016'dan uyarlanmıştır).

2.3.2. Lewy Cisimcikli Demans Hastalığı

DLB, AH'den sonra en sık görülen demans tipi olmakla birlikte en sık görülen ikinci α -sinükleinopatidir (McCann, Stevens ve ark., Yang ve Yu). DLB hastalarında substantia nigra'daki dopaminerjik nöronların kaybı daha az olmakla birlikte, birçok hastada striatum, hipokampus ve kortekste önemli miktarda A β birikimi bulunmaktadır (Yang ve Yu). Parkinson hastalığı demansı (PDD) ve DLB arasında LRP dağılımı veya seviyesi açısından çok az farklılık bulunmakla birlikte DLB'li pek çok hastada önemli miktarda kortikal amiloid birikimi yer almaktadır. Ancak klinik ve patolojik olarak doğrulanmış AH'li birçok hastada LRP, amigdala da bulunmaktadır (McCann, Stevens ve ark.). Ailesel ve sporadik Alzheimer hastalarının yaklaşık %60'ında, özellikle amigdala da olmak üzere α -sinüklein inklüzyonları bulunmaktadır (Goedert, Jakes ve ark.). Baskın demans ve LRP'si olan olguların klinikopatolojik incelemeleri sonucunda saf DLB, DLB artı AH, AH artı amigdala LRP ve saf AH olmak üzere dört farklı fenotip belirlenmiştir (McCann, Stevens ve ark. 2014) (Şekil 2-6).



Şekil 2-6: PDD, DLB ve AH için klinik kriterleri karşılayan farklı patolojik tipler.

(Wong ve Krainc 2017'den uyarlanmıştır).

PH ve DLB'yi ayırt etmek, semptom ve belirtilerin çakışması nedeniyle oldukça zordur (Bruck, Wenning ve ark.). DLB hastalığı, demansın meydana geldiği zaman açısından değerlendirilerek PDD ile klinik olarak ayrılabilir. Kognitif gerileme, motor semptomlardan önce veya motor semptomların başlamasını takip eden bir yıl içinde başlamış ise DLB tanısı konulmaktadır. Diğer taraftan motor semptomlar bir yıldan uzun bir süre görülmüş ancak kognitif gerileme görülmemiş ise PDD tanısı konulmaktadır (Lardenoije, Iatrou ve ark.). İmmunohistokimyasal çalışmalarda, PH ile karşılaştırıldığında DLB hastalarının putamen ve kaudat nukleusunda yüksek miktarda amiloid plak ve tau patolojisi ortaya çıkmaktadır. DLB'de plak patolojisinin varlığına rağmen, kognitif gerilemeden ziyade motor işlev bozukluğunun ortaya çıkması PDD'ye daha yakın bir klinik tablo ortaya çıkarmaktadır (McCann, Stevens ve ark. 2014).

Ailesel ve sporadik Alzheimer hastalarının yaklaşık %60'ında, özellikle amigdalada α -sinüklein inklüzyonları bulunmaktadır (Goedert, Jakes ve ark.).

2.3.3. MSA

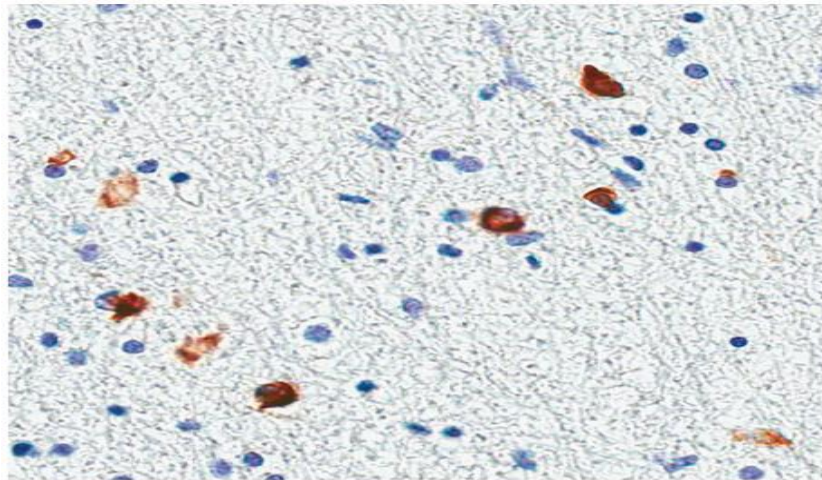
Multisistem atrofi, belirtilerin başlangıcından ölüme kadar ortalama 9 yıl süren, agresif bir klinik seyri olan yetişkin başlangıçlı bir hareket bozukluğudur. MSA insidansı yaşa ve bölgeye bağlı olarak değişmekle birlikte cinsiyet dağılımı eşit ve prevalansı 5/100.000'dir (Krismer ve Wenning 2017, Levin, Kurz ve ark. 2016). Bölgesel ve

nüfusa özgü farklılıklar, çevresel veya genetik ve epigenetik faktörlerin MSA patogenezinin katkısında bulunduğunu ortaya koymaktadır (Krismer ve Wenning 2017).

Nöropatolojik olarak MSA, yanlış katlanmış α -sinüklein içeren orak ya da oval şekilli argirofilik sitoplazmik inklüzyon cisimcikleri ile karakterizedir (McFarland). GCI'ler bazal gangliya, frontal ve primer motor korteks, retiküler formasyonda ve serebellar yapıda α -sinüklein-pozitif birikimlerinin varlığını teyit eden immünboyamalar ile birlikte beyinde dağınık şekilde yayılım göstermektedir. α -sinüklein fibriller daha az sıklıkta nöronların sitoplazmasında ve nukleusunda bulunurlar ve büyük olasılıkla MSA'nın patojenik kaskadında önemli rol oynarlar (Krismer ve Wenning 2017). MSA'nın baskın parkinsonizm (MSA-P) (Avrupa'da, bu vakaların %60'ı için geçerlidir) veya baskın serebellar semptomlar (MSA-C, %40) olmak üzere iki farklı alt tipi bulunmaktadır (Levin, Kurz ve ark. 2016).

Parkinsonizm ağırlıklı MSA'da (MSA-P) nöronal kayıp en belirgin olarak striatonigral sistemde iken; serebellar özellikli MSA'da (MSA-C) ise olivopontoserebellar projeksiyonlardadır. MSA'da Parkinsoniyan ve serebellar semptomlar sıklıkla örtüşür ve birçok hasta karışık bir fenotip gösterir (Krismer ve Wenning 2017).

MSA-P'de hipokinetik-rijit parkinson sendromu baskındır ve genel olarak PH'ye göre daha simetrik ve levodopa tedavisine yetersiz yanıt vermektedir. MSA-C'de en sık görülen semptom geniş tabanlı hareketler ile yürüme ataksisidir. Ayrıca, ekstremitelerin ataksisi yaygın olmakla birlikte serebellar okülomotor bozukluklar ve intansiyon tremoru ortaya çıkmaktadır (Levin, Kurz ve ark.2016).



Şekil 2-7 : MSA'daki glial sitoplazmik inklüzyonlar.

Oligodendroglial sitoplazmik inklüzyonlar insan α -sinüklein antikoru ile boyanmıştır (McFarland 2016'dan uyarlanmıştır).

2.4. Alfa sinüklein

α -sinüklein, ağırlıklı olarak hipokampus, striatum, talamus, serebellum ve neokortekste nöronların presinaptik terminallerinde bulunan 14 kDa'luk sitozolik bir proteindir (Bruck, Wenning ve ark.). Son yıllarda, biriken kanıtlar, α -sinükleinin beyin omurilik sıvısı, serum / plazma ve tükürük gibi biyolojik sıvılarda tespit edilebileceğini ortaya koymuştur (Kang, Chen ve ark. 2016). α -sinüklein yapısal olarak katlanmamış bir protein olarak sınıflandırılmıştır. α -sinüklein kendiliğinden düzensiz bir yapıdadır ve amiloidojenik oligomerleri de içeren çok sayıda konformasyon oluşturabilir. Aminoasit dizisinin genel olarak N terminal, merkezi bölge ve C terminal olmak üzere üç büyük bölgeden oluştuğu kabul edilmektedir: 1. 1-60 aminoasitten oluşan N terminal ucunda lipid bağlama bölgesi, 2. oligomerizasyona katkıda bulunan, kristalize, NAC (amiloid- β olmayan bileşen olarak da adlandırılan 61-95 aminositlik merkezi hidrofobik bölge, 3. asidik aminoasitler ve prolinler ile zenginleştirilmiş C-terminali. Oldukça hidrofiliktir ve N-terminali veya diğer proteinler ile geçici etkileşimler oluşturabilmektedir (De Franceschi, Fecchio ve ark., Wong ve Krainc 2017).

Yapılan çalışmalar α -sinükleinin, Lewy cisimcikleri ve Lewy nöritlerini oluşturan anormal filamentlerin önemli bir bileşeni olduğunu öne sürmektedir (Goedert, Jakes ve ark.).

140 aminoasitten oluşan α -sinüklein, SNCA tarafından kodlanır. α -sinüklein geni 6 ekzon ve 5 introndan oluşmaktadır. Bu genin dışında insanda β -sinüklein geni (SNCB) ve γ -sinüklein geni (SNCG) olmak üzere iki farklı sinüklein geni daha bulunmaktadır (Bruck, Wenning ve ark.). İnsanda α -sinüklein ve β sinüklein aminoasit dizisi %62 oranında γ sinüklein aminoasit dizisi ise %55 oranında α -sinüklein ile benzerlik göstermektedir.

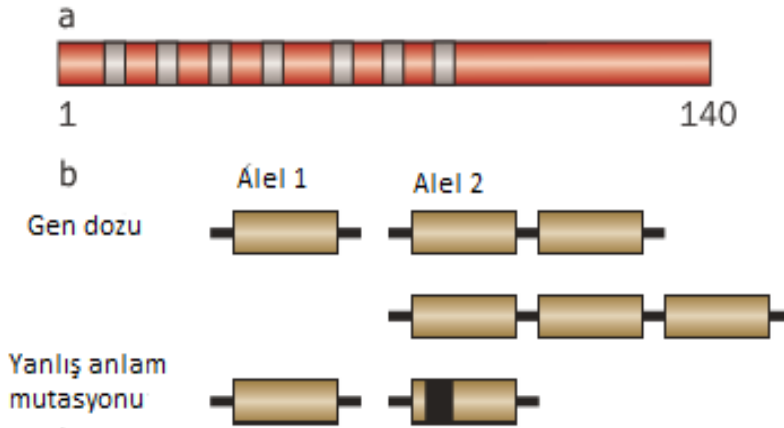
Synoretin, δ sinüklein olarak adlandırılan sinüklein ailesinin yeni bir üyesidir ve α -sinüklein ile aminoasit dizisi %55 oranında benzerdir. δ sinüklein yüksek derecede retina da ifade edilmekle birlikte daha az sıklıkta da beyinde ifade edilmektedir. α -sinüklein β , γ , δ sinükleinden içerdiği hidrofobik amiloidojenik olmayan yapı (NAC) ile ayrılmaktadır (Ma, Chan ve ark. 2003) (Tablo 2-1).

Sinüklein ailesi	Diğer adı	Kromozom	Ekzon	Aminoasit	Ekspresyon
α-sinüklein	NACP,synelfin sinüklein 1	4q21.3-q22.6	6	140	MSS/PSS
B-sinüklein	PNP-14	5q35.3	6	134	MSS
γ- sinüklein	Persyn,BCSG1	10q23.2	5	127	MSS/PSS
δ- sinüklein	synoretin	?	?	127	Meme kanseri, retina hücreleri

Tablo 2-1: Sinüklein ailesinin üyeleri

NACP: A β olmayan öncü protein; MSS: merkezi sinir sistemi; PSS: periferik sinir sistemi; PNP-14: fosfonöroprotein 14; BCSG1: meme kanserine özgü gen1. (Ma, Chan ve ark. 2003'den uyarlanmıştır).

SNCA'da meydana gelen nokta mutasyonlarının veya kopya sayısındaki artışın PH'ye yol açtığı gösterilmiştir (De Franceschi, Fecchio ve ark.) (Şekil 2-7). α -sinüklein β , γ , δ sinükleinden içerdiği hidrofobik amiloidojenik olmayan bileşen (NAC) ile ayrılmaktadır. α -sinükleinin mutasyona uğraması ve konsantrasyonundaki artış bu proteinin yanlış katlanmasına yol açmaktadır. Bu yanlış katlanmış α -sinüklein agregatları glia hücreleri ve diğer immün-inflamatuvar hücreleri harekete geçirerek substantia nigra'da nörodejenerasyonun indüklenmesine, inflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin salınmasına neden olur (Kempuraj, Thangavel ve ark.). α -sinükleinin direkt olarak vezikül membranlarının fosfolipidleri ile ilişkide olması hem inhibitör hem de uyarıcı transmitter salınımında düzenleyici rol oynadığını düşündürmektedir (Bruck, Wenning ve ark.).



Şekil 2-7: İnsan α-sinüklein geni ve hastalıklara neden olan mutasyonlar.

(a) 140 amino asitten oluşan insan α-sinüklein proteininin şekli. Amino-terminal tekrarları mavi çubuk olarak gösterilmiştir.

(b) SNCA'yı içeren kromozomal bölgenin gen dozajında bir artış (duplikasyon veya triplikasyon) ya da yanlış anlam mutasyonu PH ve DLB gibi hastalıklara neden olmaktadır (Goedert, Jakes ve ark.2017'den uyarlanmıştır).

2.4.1. α sinüklein fizyolojik fonksiyonları

İnsanlarda beyinde çözünen proteinlerin %1'ini oluşturan α-sinüklein; dopamin üretimi, alınması, depolanması ve nörotransmitter veziküllerin geri dönüşümünde rol oynamaktadır. α-sinüklein proteini aynı zamanda bir kalsiyum kanal aktivatörü ve kalsiyum girişinin aracısı gibi davranabilir ve oksidatif stres ile hücre toksisitesini artırabilir (Okita, Rcom-H'cheo-Gauthier ve ark.). α-sinüklein toksisitesi; sinaptik veziküller, mitokondri, ER ve Golgi, lizozomlar ve otofagozomlar ve nükleus da dahil olmak üzere birden fazla organeli kapsamaktadır. Ayrıca bu toksisite organeller arası iletişimlerinde bozmaktadır (Wong ve Krainc 2017) (Şekil 2-8).

Sinaptik vezikül trafiği

α-sinüklein normalde sinaptik veziküller ile ilişkilendirilen presinaptik terminale lokalize olur, membranlara bağlanır ve membranın vezikül oluşturmak üzere eğilmesini başlatır. α-sinüklein, presinaptik terminalde sinaptik vezikül - membran füzyonunu teşvik etmek için SNARE protein synaptobrevin-2 / vezikül-ilişkili membran proteini 2 (VAMP2)'ye bağlanarak çözünür SNARE kompleksini düzenler. Büyük α-sinüklein oligomerleri tercihen VAMP2'ye bağlanır ve SNARE kompleks oluşumunun, dopamin salınımının ve sinaptik-vezikül hareketliliğinin bozulmasına yol açar. Sinaptik vezikül geri dönüşümünün azalması nedeniyle α-sinüklein seviyelerinin yükselmesi

nörotransmitter salınmasını engellemektedir. Bu nedenle, α -sinükleinin normal fonksiyonunun sinükleinopatilerde bozulabileceği ileri sürülmektedir (Wong ve Krainc 2017).

Mitokondriyal fonksiyon

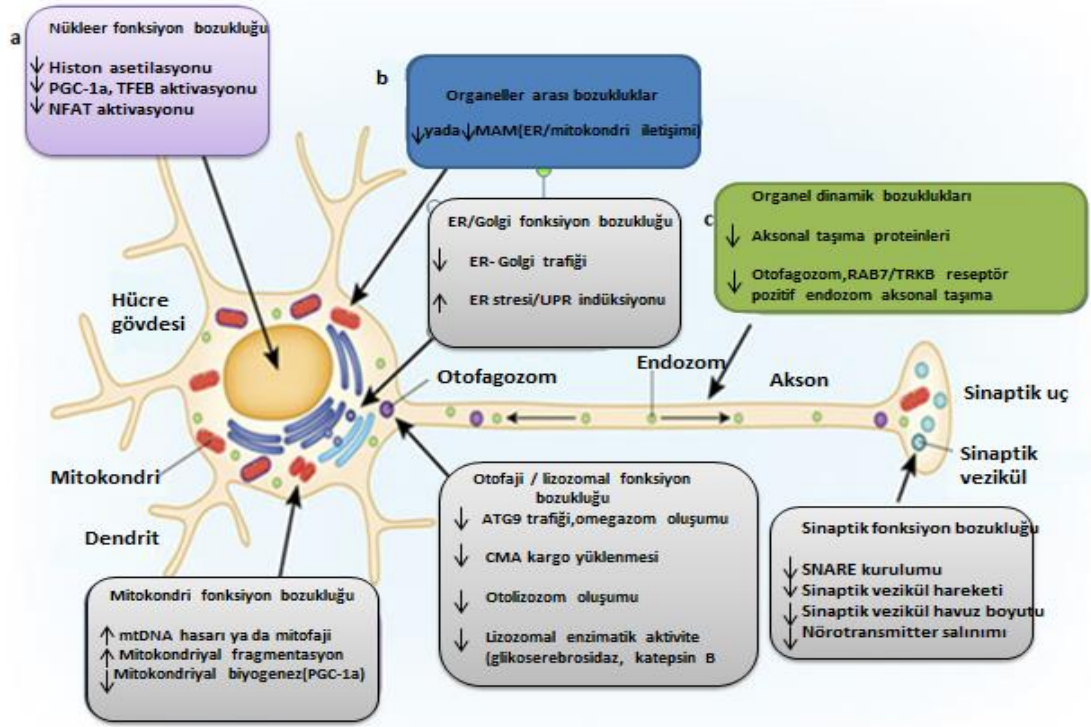
Mitokondri; ATP sentezi, kalsiyum depolanması, lipid metabolizması ve nöronal sağkalım için çok önemlidir. α -sinüklein toksisitesi mitokondri homeostazını direkt etkileyebilir. A53T α -sinüklein mutasyonuna sahip farelerin mitokondriyal DNA hasarının artması, artmış mitofajiye sahip olmaları, artan α -sinüklein seviyelerin dinamin ilişkili protein 1 (DRP1)'den bağımsız mitokondriyal fizyonu uyarması buna kanıt olarak gösterilmektedir. α -sinükleinin post-translasyonel olarak modifiye edilmiş türlerinin mitokondriyal protein importunu bozarak mitokondriyal fonksiyonu engellediği ileri sürülmüştür. Buna karşın, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, mitokondriyal biyogenez faktörü PGC-1 α seviyelerinin α -sinüklein toksisitesine bağlı olarak azalması ile de indüklenebilmektedir (Wong ve Krainc 2017).

Endoplazmik retikulum ve Golgi fonksiyonu

Endoplazmik retikulum (ER), proteinin katlanması, Golgi'ye taşınması, kalsiyum tamponlama ve katlanmamış protein yanıtında (UPR) rol oynamaktadır. Artan α -sinüklein seviyeleri ayrıca, toksik bir kalmodulin-kalsinörin kaskadı aktivasyonuna yol açan ve ER'de kalsiyum tamponlanmasının, α -sinüklein ile bozulabileceğini düşündüren sitoplazmik kalsiyum seviyelerini arttırmaktadır. PH'de artan α -sinüklein seviyeleri aynı zamanda sitoplazmik kalsiyum düzeylerini de yükselterek toksik bir şekilde bağlanmaktadır (Wong ve Krainc 2017).

Nükleer fonksiyon

α -sinükleinin nukleusa hedeflenmesi, TRIM28 nükleer proteini tarafından düzenlenmektedir. Ayrıca α -sinükleindeki PH ile ilişkili mutasyonlar (A30P, A53T ve G51D), yabanıl tip α -sinüklein ile karşılaştırıldığında artmış nükleer lokalizasyon göstermektedir.



Şekil 2-8: α -sinüklein toksisitesinde bozulan yollar.

(a–c) Organel fonksiyon bozukluğu (a, mor kutu), Organeller arası bozukluk (b, mavi kutu) ve Organel dinamiğinin bozulması (c, yeşil kutu) ile gösterilmiştir (Wong ve Krainc 2017'den uyarlanmıştır).

2.4.2. α -sinükleinin A β ve tau ile etkileşimi

AH patofizyolojisinde iki anahtar protein olan A β ve tau'nun fibrilizasyonunu α -sinüklein proteini düzenlemektedir. α -sinüklein AH'de hipokampal ve kolinerjik nörodejenerasyona aracılık edebilir ve Lewy cisim patolojisi AH'larının yaklaşık yarısında görülmektedir. Çözülebilir α -sinüklein seviyesi AH'li beyinlerde artmakla birlikte bilişsel gerileme ile koreledir. Transgenik fare modelleri ile yapılan çalışmalar, in vitro ve in vivo ortamda A β 'nın α -sinüklein fibrilizasyonunu arttırdığını ve α -sinükleinin in vitro ortamda A β 1-38 agregasyonunu arttırdığını ortaya koymuştur (Wong ve Krainc 2017). Hem A β hem de α -sinüklein eksprese eden transgenik fareler ve yalnız α -sinüklein eksprese eden fareler ile yapılan başka bir çalışma da hem A β hem de α -sinüklein eksprese eden transgenik farelerin yalnız α -sinüklein ifade edenlere kıyasla, öğrenme ve hafıza bakımından ciddi eksikliklere ve daha fazla Lewy cisimciği patolojisine sahip olduğu görülmüştür. Bu çalışmalar A β ve α -sinüklein arasında sinerjistik bir ilişki olduğunu düşündürmektedir (Swirski, Miners ve ark.). α -sinüklein'in A β ile doğrudan etkileşime girip girmediğini, A β birikiminin önüne geçip toksik A β oligomerlerin seviyelerini arttırıp arttırmadığını ve plak oluşumunda bir azalmaya

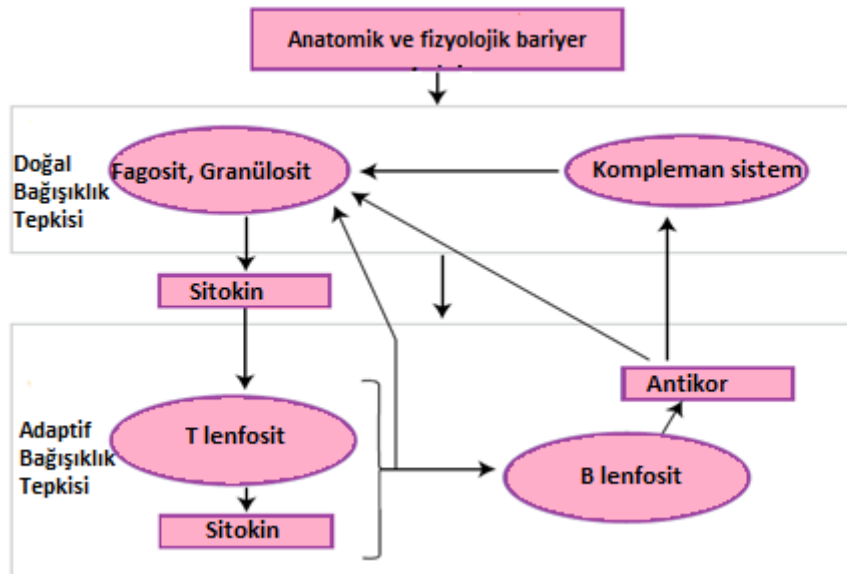
rağmen nöronal fonksiyon bozukluğuna katkıda bulunup bulunmadığını incelemek için daha fazla çalışmalar yapılması gerekmektedir (Wong ve Krainc 2017).

2.5. İnflamasyon

İnflamasyon, hücre veya dokuların maruz kaldığı hasar, enfeksiyon ve travmaya bağlı olarak ortaya çıkan önemli bir biyolojik süreçtir (Shabab, Khanabdalı ve ark.). Bu biyolojik süreç bağışıklık sistemi tarafından yönetilir. Bağışıklık sistemi, doğal bağışıklık ve sonradan kazanılan bağışıklık (adaptif bağışıklık) sistemi olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Kaplan 2016).

Doğal Bağışıklık Sistemi

Doğal bağışıklık sistemi, vücudun enfeksiyöz ajanlara karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır ve fiziksel (anatomik) engelleri, fizyolojik engelleri (pH, sıcaklık) doğuştan hücresel yanıtı (fagositler ve granülositler), kompleman sistemi ve inflamasyonu içermektedir. Doğal bağışıklık cevapları ayrıca beyin fonksiyonu üzerinde hücre ve bölgeye özgü etkiler gösterebilen inflamatuvar düzenleyicilerin sentezlenmesine neden olmaktadır (Klein, Garber ve ark. 2017). Doğal bağışıklık sistemi doğum ile var olur; antijen için sınırlı bir çeşitliliğe sahiptir ve aynı patojen ile kaç kez karşılaştığına bakmaksızın mikroplara karşı verdiği immun yanıtı aynı güçtedir (Kaplan 2016)(Şekil 2-9).



Şekil 2-9: Doğal bağışıklık ve adaptif bağışıklık arasındaki ilişki

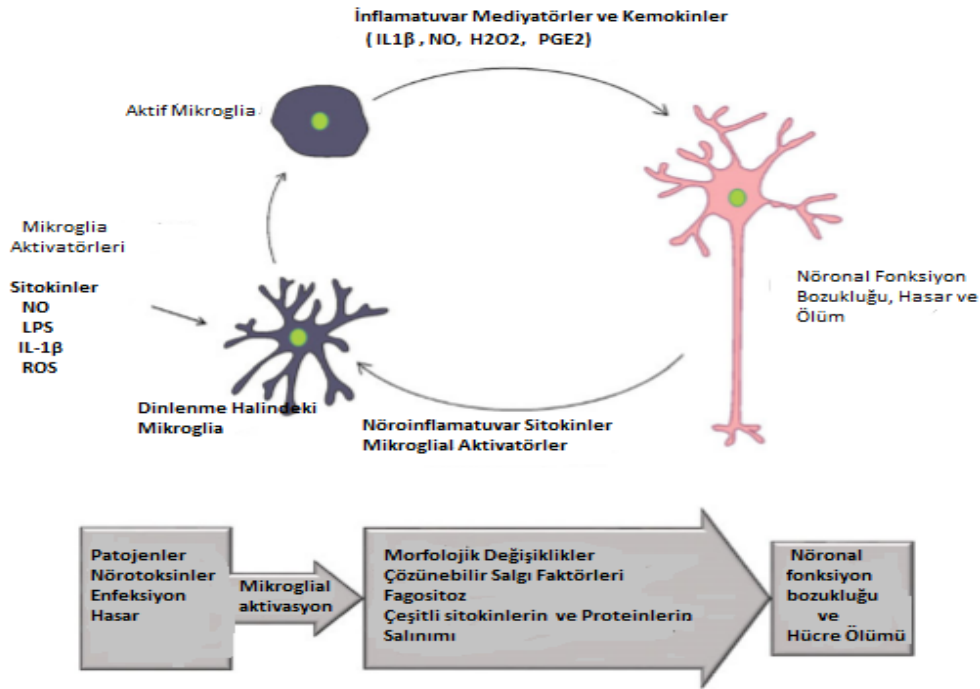
(Kaplan 2016'dan uyarlanmıştır).

Fagositik hücreler (monositler / makrofajlar, nötrofiller ve dendritik hücreler) işgalci patojenlere karşı savunma hattının ilk parçasını oluşturmaktadır. Patojenler, konak hücrelerde sentezlenmeyen ortak moleküller aracılığıyla tanınmaktadır. Enfeksiyonların kontrolünden sorumludurlar ve bazen onları yok etme yeteneğine sahiptirler. Fagositik hücreler, spesifik T lenfositlerin uyarılmasını kolaylaştırmak için belirli bağışıklık tepkilerinin başlatılmasını tetikleyen sitokinlerin salınmasında antijeni işler ve sunar. Fagositler ve T lenfositler tarafından salınan sitokinler, B lenfositlerinin plazma hücrelerine farklılaşmasını sağlar.

Fagositik hücreler, fagositoya yol açan çeşitli kalıp tanıma reseptörleri (PRR) aracılığıyla, patojen ile ilişkili moleküler kalıpları (PAMP) bağlayarak patojenleri tanımaktadır (Kaplan 2016).

Mikroglia

Mikroglia MSS'de ana doğal bağışıklık hücreleridir. Mikroglia, fizyolojik koşullar altında fetal gelişim, çocukluk ve ergenlik döneminde sinaptik bağlantıları budayarak ve nörotrofik faktörler üreterek dokunun yeniden şekillenmesini sağlar. Enfeksiyon veya MSS hasarına tepki olarak, mikroglia aktive olur ve bir anti-inflamatuvar fenotipten, MSS hücre tiplerinin uyarılmasına neden olan pro-inflamatuvar fenotipe geçer (Şekil 2-10). Genel olarak bu yanıt kendiliğinden sınırlayıcı olmakla birlikte, inflamasyon devam ederse, MS ve ilk olarak inflamatuvar olarak düşünülmeyen AH ve PH gibi uzun süreli nörodejeneratif hastalıklara neden olabileceği ileri sürülmektedir (Dendrou, McVean ve ark. 2016).



Şekil 2-10: Mikroglia aktivasyonu ve nöronal hücre ölümü.

Enfeksiyon, oksidatif stres ve nörotoksinler mikroglüyayı aktif hale getirir. Aktif hale gelen mikroglia, nöronal fonksiyon bozukluğuna ve hücre ölümüne neden olan inflamatuvar proteinleri salgılamaktadır (Shabab, Khanabdalı ve ark. 2017'den uyarlanmıştır).

İnflamazom, doğal bağışıklık sisteminin önemli bir parçasıdır (Kaplan 2016). İnflamazom bileşenleri, esas olarak monositler ve makrofajlar gibi doğal immün hücrelerde, aynı zamanda dendritik hücrelerde ve nötrofillerde ayrıca keratinositler gibi bazı immün olmayan hücrelerde de ifade edilmektedir (Awad, Assrawi ve ark. 2018). İnflamazom aktivasyonu, inflamatuvar sitokinler olan IL-1 β ve IL-18'in üretimiyle gerçekleşmektedir (Kaplan 2016). Periferik dokularda, dendritik hücreler, adaptif bağışıklık sisteminin hücrelerine bilgi verir ve fagositoz yeni bağ dokusunun oluşması gibi güçlü inflamatuvar cevaplara yol açar (Xanthos ve ark. Sandkuhler 2014).

Adaptif Bağışıklık

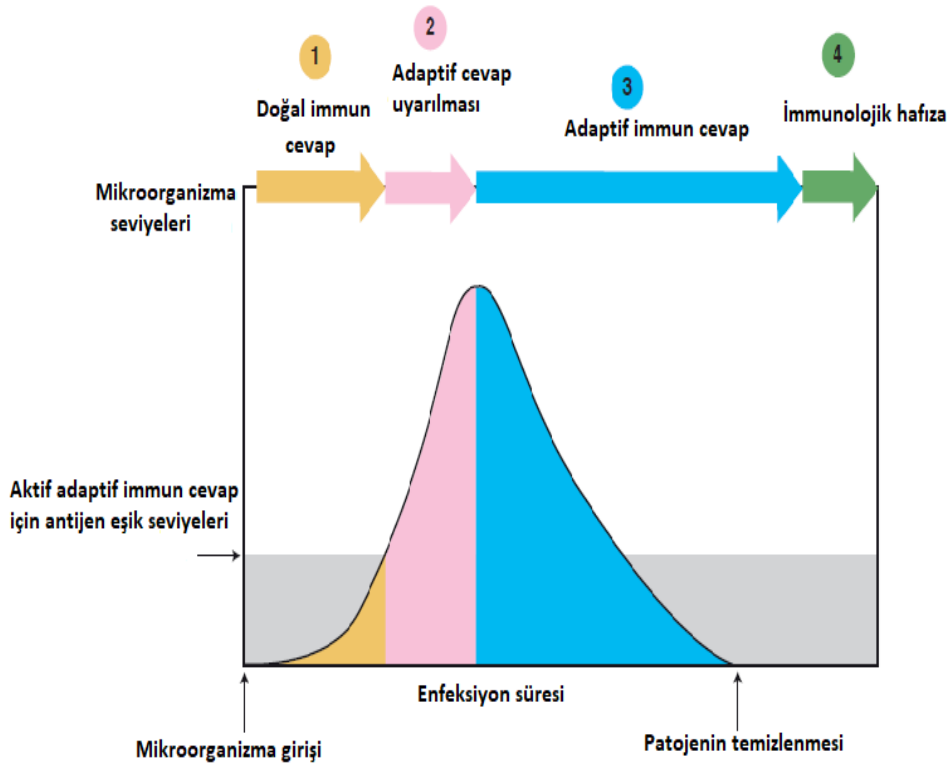
Bir patojen, anatomik ve fizyolojik engelleri aştığında, doğal bağışıklık hemen harekete geçerek çoğu kez enfeksiyonu tutabilir ve ortadan kaldırabilir. Doğal bağışıklık yanıtı, bir patojenin replikasyonunu kontrol edemediğinde, doğal bağışıklık ile antijene spesifik şekilde aktive edilmiş adaptif bağışıklık yanıtı devreye girer ve etkinleştirilir. Adaptif immün yanıtın bileşenleri B ve T lenfositleri ve efektör hücreleridir.

Adaptif bağışıklık savunmaları bazı ortak özelliklere sahiptir.

- Her bir B ve T lenfosit belirli bir antijen için spesifiktir.
- Lenfositlerin çeşitliliği geniştir.
- Tekrar aynı antijene maruz kalındığında immünolojik hafıza ile savunma sisteminin verdiği cevap daha hızlı olmaktadır.
- Kendi antijenleri ile yabancı antijenleri ayırt etme yeteneği, bir otoimmün yanıtı inhibe etmek açısından hayati bir önem taşımaktadır.

Adaptif immün yanıt, primer enfeksiyondan 1-2 hafta sonra, efektör hücreler ve antikorların etkisi ile enfeksiyonun temizlenmesine başlamaktadır. Enfeksiyon ortadan kalktıktan sonra hem doğal hem de adaptif bağışıklık yanıtları kesilmektedir. Hafıza hücreleri sonraki enfeksiyonlardan uzun vadeli immünolojik korumayı sağlarken antikorlar ve kalan efektör hücreler koruyucu olarak bağışıklık sağlamaya devam etmektedirler (Şekil 2-11).

Adaptif bağışıklık sistemi çok spesifik bir yanıt geliştirirken, doğal bağışıklık sistemi istilacı mikroplara hızlı bir şekilde tepki vermek ve konağı canlı tutmaktan sorumludur. Doğal bağışıklık sistemi patojenler üzerindeki 1.000 diziyi tanımakta iken adaptif bağışıklık sistemi 1 milyardan fazla spesifik diziyi tanıyabilmektedir (Kaplan 2016).



2-11: Akut Enfeksiyonda İmmun Yanıtının Zaman Çizelgesi

(Kaplan 2016'dan uyarlanmıştır).

B Lenfosit

B lenfositleri patojenlere karşı etkili bir bağışıklık için kritik önem taşır, antikorları ve sitokinleri üretir. Ayrıca T lenfositlerine antijenleri sunarak bağışıklık tepkilerini düzenlemektedirler. B lenfositinin seçilimi ve yanıtları, hastalıklardan kaçınmak için sıkı bir regülasyona ihtiyaç duymaktadır (Taher, Bystrom ve ark. 2017). Kemik iliğindeki B hücre üretimi, ortak lenfoid progenitörlerden B hücresi öncüllerinin hızla farklılaşmasını içerir. Erken evrelerde gerçekleşen bu gelişme, sitokinler tarafından yönlendirilir (Boothby ve Rickert 2017). B lenfositleri göç ettikten sonra periferde sıkı bir tolerans mekanizmasından geçerler. Olgun B hücrelerinin aktivasyonu, birlikte uyarıcı reseptörlerin kontrollü ifadesi ve hücre içi sinyal eşik değerleri aracılığıyla B lenfositlerinin, apoptoz veya çoğalmaya uğrayarak antijenlere karşı nasıl cevap verip vermeyeceğini belirlemektedir. Sitokin üretimi ve sitokin reseptör ekspresyonunun dinamik olarak düzenlenmesi; B hücre gelişimi, farklılaşması ve etkili bir bağışıklık yanıtı için gereklidir. Farklılaşma ve B lenfosit yanıtlarına katılan

sitokinler, interferonları (IFN'ler), interlökinleri (IL'leri) ve TNF (Tümör nekroz faktör) ailesinin ligandları ve reseptörlerinin üyelerini içerir (Taher, Bystrom ve ark. 2017).

T Lenfosit

T hücreleri, bağışıklığın düzenleyicileri ve dengeleyicileri olarak hareket eden adaptif bağışıklık sisteminin önemli bir bileşenini oluşturmaktadır. Bu nedenle, T hücreleri, konak organizmayı istilacı patojenlerden korumakta etkili rol oynamaktadırlar (Bantug, Galluzzi ve ark. 2018). T hücrelerinin, farklı transkripsiyon faktörleri tarafından spesifik sitokinlerin üretilmesine neden olan farklı kökenleri bulunmaktadır (Becher, Spath ve ark. 2017).

T hücrelerinin aktivasyonu hücre kaderinin belirlenmesinde etkin rol oynayan epigenetik faktörlerin ve artan enerji ihtiyaçlarının desteklenmesi için metabolizmada değişikliklere neden olmaktadır ve hücrel metabolizma gen transkripsiyonunu ve transkripsiyon sonrası regülasyonunu değiştirerek doğrudan hücre sinyal olaylarını etkilemektedir. Sinyallerin aktive edilmesiyle T hücrelerinin eş zamanlı uyarımı ve ekstraselüler metabolitlerin birikimindeki inflamasyona bağlı olarak ortaya çıkan değişiklikler efektör hücre oluşumunu ve büyümesini desteklemek üzere bir araya getirilir. CD8+T hücreleri öncelikle sitotoksik T lenfositlerine (CTL) farklılaşırken; naif CD4+T hücreleri, çoklu efektör T yardımcı (TH) hücre soyları (TH1, TH2, TH17 ve T foliküler yardımcı (TFH) hücrelere farklılaşmaktadır. Bununla birlikte, hücre içi veya hücre dışı faktörlerden dolayı uygun olmayan bir şekilde aktive edildiğinde, T hücreleri geniş bir hastalık yelpazesine neden olmaktadır (Bantug, Galluzzi ve ark. 2018). CD4+T hücreleri kemokin reseptörleri ve integrinlerin özgün kombinasyonlarını ifade etmelerinden dolayı, TH hücresi alt üniteleri farklı dokulara özel olarak çağrılmaktadır (Korn ve Kallies 2017). Naif T hücrelerinin popülasyonu AH'larında belirgin şekilde azalmakta, hafıza T hücrelerinde ise yaşları uygun sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında artış görülmektedir. AH'larının daha kısa telomere sahip T hücrelerine sahip olduğu ve telomer uzunluğunun AH şiddeti ile anlamlı derecede korelasyona sahip olduğu bildirilmiştir (McManus ve Heneka 2017).

(spesifik olmayan) bir şekilde tepki verirler. Bu durum, hafif homeostatik yanıtlardan büyük çapta inflamasyona geçişe kadar değişen doku reaksiyonlarına yol açmaktadır

4). MSS, çeşitli özel koşullar nedeniyle immün ayrıcalıklı bir bölge olarak kabul edilir ve inflamatuvar reaksiyonlar diğer dokulara göre önemli oranda farklılık gösterir (Korn ve Kallies 2017, Xanthos ve Sandkuhler 2014). Birincisi, MSS parankiması yerleşik dendritik hücrelerden yoksundur ve perivasküler makrofajlar ve vasküler perisitler MSS'de olgun dendritik hücrelerin işlevlerini üstlenmektedir. İkincisi, astrositler, mikroglialar ve MSS mast hücrelerinin bazı bölgeleri MSS'nin doğal parankimal immün hücreleridir. MSS'deki mikrodamarların geçirgenliği büyük moleküllerin ve kan hücrelerinin ekstrasvazasyonu için patolojik olmayan koşullar altında 'kan beyin bariyeri' ile vücudun geri kalanına oranla azaltılır. Dolayısıyla, kompleman yolakları harekete geçirmek ve lökositler gibi adaptif immün yanıtta yer alan hücreleri MSS parankiması içine almak daha da zordur. Hasar görmemiş KBB'ye nüfuz eden aktif T hücrelerinin dışında, MSS doğal bağışıklık hücreleri, periferik dokulardaki dendritik hücrelerin yaptığı gibi adaptif bağışıklık yanıt hücrelerine bilgi veremez. Bu nedenle, MSS'de yerleşik doğal bağışıklık hücreleri genellikle patojenler ve doku hasarı ile ilgilenmektedir (Xanthos ve Sandkuhler 2014).

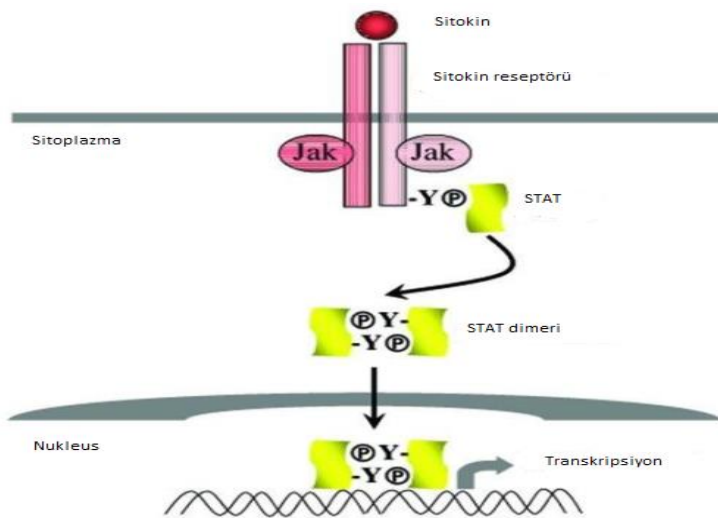
2.5.1. Merkezi Sinir Sistemi İnflamatuvar Proteinleri

Embriyonik gelişim esnasında MSS oluşumu ilk olarak hücre-hücre etkileşimleri ve ekstraselüler matris tarafından sağlanmaktadır. Sitokinler, MSS hücreleri için büyüme ve hayatta kalma faktörleri olarak görev yapmaktadır ve memeli MSS kompleks hücresel organizasyonunun şekillendirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Sitokinler, gelişimin başlangıcında beyinde üretilir ve önemli sitokin reseptörlerinin genetik kaybı MSS organogenezinde ciddi anormalliklere yol açar. TGF β ve IL-6 süper aileleri, gelişmekte olan beyinde oldukça etkili proteinlerdir. Günümüzde kemokinler, lenfokinler, IFN'lar ve büyüme faktörlerini içeren 300'den fazla sitokin bilinmektedir (Becher, Spath ve ark. 2017). Sinir sisteminde sitokinler ve kemokinler nörogelişimin, nöroinflamasyonun ve sinaptik transmisyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar (Ramesh, MacLean ve ark. 2013).

Sitokinler, pikomolar ve nanomolar konsantrasyonlarda büyüme, canlılık ve farklılaşma gibi hücresel aktivitelerin ve inflamasyonun düzenlenmesinde sinyal molekülleri olarak rol oynayan 8.000 ila 40.000 Da arasında değişen moleküler ağırlığa

sahip küçük bir protein sınıfıdır (Ramesh, MacLean ve ark. 2013 , Becher, Spath ve ark. 2017). Sitokinlerin ortak özellikleri pleiotrofik doğalarıdır. Bir sitokin bir hücre tipinde proliferasyona neden olabilirken aynı sitokin başka bir hücrede büyümeyi engelleyebilmektedir (Becher, Spath ve ark. 2017).

40 sitokin reseptörünün JAK'lar ve sinyal iletimi ve transkripsiyon aktivatörleri (STAT'ler) aracılığıyla hücre içi sinyalleme başlattığı bilinmektedir. JAK ve STAT'ların aktif hale getirilmesi ile sitokinler, Ras ve PI3K'lerin aktive edilmesi gibi diğer sinyal yollarını da başlatabilir. Sitokinlerin reseptörlerine bağlanması reseptörlerin dimerizasyonunu veya polimerizasyonunu başlatır ve JAK'leri aktive eder. Aktifleştirilmiş JAK'lar, fosforilasyonu başlatır ve STAT'ların homodimer ve heterodimerleşmesine neden olur. Dimerize STAT'lar hedef genlerinin transkripsiyonunu başlatmak üzere nukleusa taşınır. Dört JAK (JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK2) ve bilinen yedi STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6) bulunmaktadır. JAK1 ve TYK2 yoluyla tip 1 IFN sinyalleri için reseptörler sinyal verirken IL-12 ve IL-23 için reseptörler JAK2 ve TYK2 yoluyla sinyal verirler. IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 ve IL-23 için ise reseptörler JAK1 ve JAK3 aracılığıyla sinyal verirken, IFN γ reseptörü JAK1 ve JAK2 aracılığıyla sinyal verir (Taher, Bystrom ve ark.2017) (Şekil 2-13).



Şekil 2-13: Jak-STAT yolu üzerinden sitokin aktivasyonu.

Sitokin ligasyonu ve plazma membran reseptörlerinin dimerizasyonu reseptöre bağlı Jak kinazların aktivasyonuna ve reseptör sitoplazmik alan tirozin rezidülerinin fosforilasyonuna neden olur. STAT'lar, bu fosfotirozin motiflerine Src homoloji 2 (SH2) alanları aracılığıyla yerleştirilir. STAT'lar korunmuş bir karboksi-terminal tirozin üzerinde fosforile edilir, dimerleşir ve gen transkripsiyonunu etkinleştirmek için nukleusa taşınır. Transkripsiyonel yanıtlar reseptör ligasyonu ile birkaç dakika içinde tespit edilebilir. Jak, Janus kinaz; STAT, sinyal iletimi ve transkripsiyon aktivatörü (Ivashkiv ve Hu 2004' den uyarlanmış).

Sitokinler, geleneksel olarak inflamatuvar sisteme ait çeşitli hücre tiplerinden salınmasına rağmen, son zamanlarda genel sinyal molekülleri olarak tanımlanmaktadır. Mikroglia hücreleri sinir dokularında sitokinlerin önemli bir kaynağıdır, ancak astrositler gibi diğer glia hücreleri ve nöronlar da sitokin salgılamaktadır. Nöronlar tipik olarak sinir membranlarında ifade edilen çeşitli sitokin reseptörleri ile sitokin sinyal yolları için bir hedef olarak incelenmektedir (Lim, Lu ve ark.).

Sitokinler tarafından indüklenen biyolojik etkiler, hücre proliferasyonunun, sitotoksikite ve apoptozun, antiviral aktivitenin, hücre büyümesinin ve farklılaşmasının, inflamatuvar yanıtların ve yüzey membran proteinlerinin ekspresyonunun uyarılmasını veya inhibe edilmesini içermektedir (Rubio-Perez ve Morillas-Ruiz 2012). Sitokinler, onları salgılayan hücreleri (otokrin etki), komşu hücreleri (parakrin etki) veya bazı durumlarda uzak hücreleri (endokrin etki) etkileyebilir (Zhang ve An 2007). İnflamasyonu teşvik eden sitokinler pro-inflamatuvar sitokinler olarak adlandırılmaktadır. Pro-inflamatuvar sitokinler sadece nöronal ölüme neden olmazlar, aynı zamanda APP işlenmesi ve tau fosforilasyonu gibi klasik nörodejeneratif yollarını da etkileyebilirler. Pro-inflamatuvar sitokinlerin aktivitesini bastıran sitokinler ise anti-inflamatuvar sitokinler olarak adlandırılmaktadır (Rubio-Perez ve Morillas-Ruiz 2012).

İnterlökin1(IL-1) ailesi inflamasyon ve konak savunmasında önemli bir rol oynamakla birlikte aynı zamanda (Allan, Tyrrell ve ark. 2005) çok işlevli bir sitokin olarak tanımlanmaktadır (Schliebs, Heidel ve ark. 2006). IL-1 ailesi, spesifik membran reseptörleri ile bağlanarak hücre aktivasyonunu tetikleyen iki agonist protein olan IL-1 α ve IL-1 β 'yı içerir (Rubio-Perez ve Morillas-Ruiz 2012). Bunlar, farklı genlerin ürünleri olmalarına rağmen, yüksek dizi homolojisine sahiptir. Lenfositler ve monositler de dahil olmak üzere periferik ve merkezi bağışıklık sistemindeki birçok hücre tipleriyle büyük öncü proteinler halinde sentezlenirler. Pro-IL-1 α , biyolojik açıdan aktiftir ve calpain ile bölünerek daha küçük olgun proteinleri oluşturur. Pro-IL-1 β ise biyolojik olarak inaktiftir ve henüz tam olarak tanımlanmamış klasik olmayan bir yolak tarafından

salgılanan aktif 17 kDa bir protein üretmek üzere caspase1 ile kesilmektedir (Allan, Tyrrell ve ark.2005).

IL-1 ailesine 23 kDa'lık glikozile edilmiş bir salgı proteini olan IL-1 reseptör antagonisti (IL-1RA) de dahildir. Hastalığın veya hasarın olmadığı durumlarda IL-1'in MSS'de fizyolojik yanıtlara etkisi konusunda tartışmalar olmakla birlikte, uzun süreli potensiyalizasyona aracılık ettiği rapor edilmiştir (Schneider, Pitossi ve ark. 1998). MSS inflamasyonu veya hasarı sırasında üretilen IL-1, sadece bölgesel çevreyi etkilemekle kalmaz, aynı zamanda nöroendokrin işlevi ve periferik bağışıklık fonksiyonunu da içeren sistemik işlevleri etkileyen lokal etkilere sahiptir. IL-1'in nöronal fonksiyon üzerindeki doğrudan etkileri nöronal hasara neden olsa da, bu etkilerin doğası hakkında çelişkili raporlar vardır. Primer kortikal nöron kültürleri üzerinde yapılan çalışmalar, IL-1'in eksitotoksik hasarı arttırmadığını, bunun yerine sinir büyüme faktörü ekspresyonunu başlatarak nöroprotektif olduğunu ortaya koyarken, IL-1RA farklı olarak nöroprotektif etkiler göstermemektedir. IL-1, AH, PH, travmatik beyin hasarı, epilepsi ve inme gibi çeşitli nörolojik hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır. ve IL-1'in, postmortem beyin dokularında artan ekspresyonu ile birlikte hastaların BOS'larında da artmış konsantrasyonu gösterilmiştir (Allan, Tyrrell ve ark. 2005).

İnterlökin 4 (IL-4), olgun Th2 hücreleri tarafından üretilen Th hücre farklılaşmasını etkileyebilen, mast hücresi veya bazofil soyundan gelen 20 kDa'lık bir glikoproteindir (Tuppo ve Arias 2005, Rubio-Perez ve Morillas-Ruiz 2012). IL-4, pro-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu ve salınımı üzerinde inhibe edici etkilere sahiptir ve IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8 ve MIP-1 α gibi monosit türevi sitokinleri bloke edebilir ve IL-1RA'nın sentezini uyarabilir (Rubio-Perez ve Morillas-Ruiz 2012).

İnterlökin 6 (IL-6), T hücrelerinin aktivasyonunu, B hücrelerinin farklılaşmasını ve akut faz tepkisinin regülasyonunu düzenleme yeteneğine göre sınıflandırılmıştır (Tuppo ve Arias 2005). IL-6 pleiotropiktir ve vasküler hastalık, lipit metabolizması, insülin direnci, mitokondriyal aktivite, nöroendokrin sistem ve nöropsikolojik davranışı etkileyen hormon benzeri özelliklere sahiptir. İnsan serumunda IL-6'nın normal fizyolojik konsantrasyonları nispeten düşüktür (1-5 pg / ml), ancak hastalık koşulları altında bu konsantrasyon hızla yükselmektedir (Hunter ve Jones 2015). TGF β ve IL-6 süper aileleri, beyin gelişiminde son derece etkili olan proteinlerdir. Kemik morfojenik

proteinleri (BMP'ler); TGF β süper ailesine aittir ve nöronal farklılaşmayı düzenlemektedir (Becher, Spath ve ark. 2017).

İnterlökin12 (IL-12) mikrobiyal patojenlere cevap olarak dendritik hücrelerden, makrofajlardan ve B hücrelerinden üretilen bir pro-inflamatuvar sitokindir. Biyoaktif sitokinlerden sadece IL-12 ailesi (IL-12, IL-23, IL-27 ve IL-35) heterodimerik sitokindir ve özgün ve farklı özelliklere sahiptir. Heterodimerik IL-12 sitokin ailesi α zinciri (p19, p28 yada p35) ve β (p40 yada Ebi3) zincirinden oluşmaktadır. Dörtlü sarmal demet yapısından oluşan α zincirleri IL-6 süper ailesinde olduğu gibi IL-12 ailesinin de karakteristik bir özelliğini oluşturmaktadır. Aksine β zincirleri IL-6R α gibi çözülebilir sınıf I sitokin reseptörleri ile ortak bir homoloji göstermektedirler (Vignali ve Kuchroo 2012). p40 zinciri sıralı olarak IL-12 yada IL-23'ün p35 ya da p19 formu ile eşleşebilirken; Ebi3 sıralı olarak IL-27 yada IL-35'in p28 ya da p35 formu ile eşleşebilmektedir.

İnterlökin 17 (IL-17); Bu sitokini ifade eden T hücre alt kümesi, IL-17 üreten yardımcı T hücreleri (TH17 hücreleri) olarak sınıflandırılmıştır (Veldhoen 2017). IL-17 genellikle aktive hafıza T lenfositleri tarafından üretilir fakat doğal bağışıklığı ve konak savunmasını da uyarmaktadır (Kolls ve Linden 2004). IL-17, tek başına inflamasyonun güçlü bir indükleyicisi değildir. İnflamasyon sırasındaki kuvvetli etkileri, bağışıklık hücrelerinin kemokin ekspresyonu yoluyla çağrılması ve TNF reseptörünün ekspresyonunun uyarılmasının yanı sıra diğer sitokinler ile sinerjik etkisinden kaynaklanmaktadır. Sitokinlerin ekspresyonunun ayrı olarak düzenlenmesine rağmen IL-17'yi ifade eden hücreler aynı zamanda TNF, IL-10 ve IL-22'yi eksprese edebilir (Veldhoen 2017).

İnterlökin 34 (IL-34), normal doku homeostazı sırasında merkezi sinir sistemi hücresi olan mikroglianin gelişimini düzenleyen önemli bir sitokindir. Koloni uyarıcı faktör 1 (CSF1, ayrıca M-CSF olarak da bilinir) ile ilişkilidir ve her iki sitokin CSF1 reseptörüne bağlanır. CSF1, fizyolojik olarak kararlı durum şartları altında diğer organlarda bulunan çoğu doku makrofajının oluşması ve hayatta kalması için önemlidir, ancak bu fonksiyon MSS'de IL-34 tarafından gerçekleştirilmiş gibi görünmektedir (Becher, Spath ve ark. 2017).

Transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), çeşitli hücre tiplerinde birçok role sahip bir molekül ailesine aittir. Şu ana kadar bu ailenin 40'dan fazla üyesi

bilinmektedir. Bu proteinler dimerik yada küme şeklinde bir araya gelebilen yapılardan oluşmaktadırlar. TGF- β alt ailesi, üçü memelilerde ifade edilen altı izoform içerir. Transforme edici büyüme faktörü 1 beta (TGF- β 1), immün ve immün olmayan hücrelerin büyüme, farklılaşma ve fonksiyonlarını düzenleyen çok fonksiyonlu bir sitokindir. Araştırmacılar, TGF- β 1'in inflamasyonda güçlü bir negatif düzenleyici olduğunu göstermiştir (Tiwari ve Pal 2017). Aynı zamanda TGF- β 1 embriyogenez ile ilişkilidir ve immün sistemdeki en belirgin rolü T hücre farklılaşması ve B hücre izotipinin değişimidir. TGF- β başlangıçta inaktif bir proteindir ve çok aşamalı bir olgunlaşma sürecinden geçerek aktif hale gelmektedir (Banchereau, Pascual ve ark. 2012).

İnterferon gama (IFN- γ) çoğunlukla aktif T ve NK hücreleri tarafından üretilen ve pro-inflamatuvar etkileri ile bağlantılı olan Th-1 yanıtları oluşturmak için ve pleiotropik fonksiyonları için ise anti-inflamatuvar aktivite gösteren bağışıklık sisteminde merkezi ve ikili bir rol oynayan bir sitokindir. Böylece, IFN- γ , bazı fizyolojik ortamlarda iltihaplı Th-1'e bağlı immün yanıtları ortaya çıkararak ve diğerlerinde Treg (T regülatör) hücre aktivitesini indükleyerek çelişkili işlevlere sahiptir (Millan ve Brunet 2016).

Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), intraselüler ölüm domaini ile tanımlanmış homolog sitoplazmik dizi içeren reseptörlerin aktivasyonu ile apoptozu başlatabilen bir multipotent inflamatuvar sitokindir. TNFR1 (p55) ya da TNFR2(p75) ve CD95 (APO-1/Fas) ile ölüm ligandlarından, TNF- α ve yapısal olarak ilişkili tip II transmembran proteinlerinden ve FasL'den oluşmaktadır (Shabab, Khanabdali ve ark. 2017). TNF- α doku inflamasyonunun ana mediyatörlerinden biridir ve çeşitli nörolojik koşulların patogeneğinde bozulmaktadır. Bu sitokin nöron üzerinde hem yıkıcı hem de koruyucu etkilere sahiptir ve bu zıt etkiler p55 ve p75 olmak üzere iki farklı TNF sinyal yolağının varlığı ile açıklanabilir. MSS'de her iki reseptörün izoformu da tespit edilmiştir. Beyinde p75'in fonksiyonu tam olarak bilinmese de p55 aktivasyonu nöronal apoptoza neden olan sinyalleri başlatmaktadır. MSS'de makrofajlar, astrositler ve mikroglia akut faz MSS inflamatuvar yanıtı sırasında pro-inflamatuvar olarak; kronik faz sırasında ise immunbaskılayıcı olarak TNF- α sentezleyebilmektedir (Lucas, Rothwell ve ark. 2006).

Kemokinler

Kemokinler sitokin ailesi içinde genel işlevi hücre göçünü başlatmak olan salgılanabilir protein sınıfı olmak ile birlikte (Ramesh, MacLean ve ark. 2013) hücresel iletişim ve doku homeostazı gibi fizyolojik koşullarda işlevlerini yerine getiren küçük heparin bağlayıcı proteinlerdir (Camara-Lemarroy, Guzman-de la Garza ve ark. 2010). Kemokin ailesi; kemotaksi, doku ekstrasvazasyonu ve inflamasyonu sırasında lökosit fonksiyonunun düzenlenmesini sağlayan 50'nin üzerinde farklı molekülden oluşmaktadır (Rubio-Perez ve Morillas-Ruiz 2012). Kemotaktik sitokinler veya kemokinler, hedef hücre popülasyonlarının migrasyonunu ve adezyonunu teşvik eden ve esas olarak patofizyolojik koşullarda (nöroinflamasyon ve nörodejeneratif hastalıklar) inflamatuvar bölgedeki immün hücrelerin kimyasal olarak hareket ettirilmesinden-yönlendirilmesinden sorumludur (Janssens, Struyf ve ark. 2017).

Kemokinler, yapısal olarak, korunmuş NH₂-terminal sistein kalıntılarının konumuna göre dört gruba ayrılırlar. Kemokinlerin en büyük alt grubu olan CC kemokinleri iki bitişik korunmuş sistein kalıntısına sahipken, C kemokinlerinin sadece bir NH₂-terminal sistein kalıntısı vardır. CXC ve CX₃C kemokinleri, korunmuş NH₂-terminal sistein kalıntıları arasında sırasıyla bir veya üç amino asite sahiptir (Luster 1998). Kemokinler, CC kemokin reseptörleri (CCR'ler), XCR'ler, CXCR'ler ve CX₃CR'ler olarak benzer şekilde kategorize edilen ilgili yedi-transmembran bölgesi G proteine bağlı reseptörlerini (GPCR'ler) aktive ederek biyolojik işlevlerini yerine getirmektedir (Locati ve Murphy 1999).

Kemokinler başka bir sınıflandırmaya göre homeostatik kemokinler ve inflamatuvar kemokinler olarak ikiye ayrılmaktadır. Homeostatik kemokinler doku türüne bağlı olarak farklı kalıplarda eksprese edilir. Kemik iliği ve timusta hematopoez sırasında lökositleri yönlendiren ve sağlıklı periferik dokuların bağışıklık gözetimine katkıda bulunarak fizyolojik koşulların yerine getirilmesi ile ilişkilidir. Buna karşın, inflamatuvar kemokinler enfeksiyon esnasında ya da inflamatuvar uyarılara cevap olarak üretilirler ve doğal ve adaptif immün sistem hücrelerini hedefleyerek immün yanıtı kolaylaştırmaktadırlar (Ramesh, MacLean ve ark. 2013). Kemokinler, hücre hedefine ve çevresel koşullara bağlı olarak ya pro-apoptatik ya da anti-apoptotik etki gösterebilirler. MSS bağışıklık hücresi olan mikrogliya, hasara bağlı aktivasyon sonrasında kemokin üretiminden ve salınmasından sorumludur. Yine de, son bulgular

kemokinlerin sadece mikroglialar tarafından değil aynı zamanda astrositler, oligodendrositler, endotel hücreleri ve nöronlar tarafından da üretildiğini göstermiştir (Gualtierotti, Guarnaccia ve ark. 2017). CXCL1 ve CXCL8 dahil olmak üzere bir dizi kemokin serebellar nöronların sinaptik aktivitelerinde nöromodülatör etki göstermektedir. Kemokin reseptör kompleksleri, nöronlar ve inflamatuvar faktörler arasındaki iletişime aracılık ettiğinden; kemokinlerin, nörodejeneratif hastalıklarda potansiyel ilaç olarak kullanılabileceğine dair umutlar bulunmaktadır. AH ve sağlıklı bireyler arasında serum, BOS ve beyin dokusundaki kemokinlerin ve reseptörlerinin seviyelerinde belirgin farklılıklar olduğu kanıtlanmıştır. AH şiddeti kemokinlerin ekspresyonu ile paralellik gösterdiğinden, MCP-1 ve reseptörü CCR2'nin ürünü olan kemokinler ve bunların reseptörleri, AH'nin ilerlemesinde biyolojik belirteç olarak görülmektedir (Liu, Cui ve ark. 2014).

C-X-C motif ligand 8(CXCL8)/ IL-8: İnsan beyninde bulunan onaylanmış ilk kemokindir. A β ve / veya pro-inflamatuvar sitokin uyarımı üzerine, mikrogliya, astrosit ve nöronlar in vitro olarak IL-8 üretebilir. IL-8 parakrin veya otokrin döngü ile nöronları korur ve nöronal fonksiyonları düzenler. IL-8 tek başına nöronal sağkalımı değiştirmemesine rağmen, A β 'nin neden olduğu nöronal apoptozu inhibe ederek ve nöronal BDNF üretimini arttırmaktadır (Liu, Cui ve ark. 2014).

Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1), monosit / makrofajlar ve endotel hücreleri tarafından sentezlenip salgılanmasının yanı sıra astrositler tarafından da salgılanmaktadır ve sentezi TNF- α gibi inflamatuvar faktörlerin uyarılması ile artmaktadır. MCP-1 doku hasarı veya enfeksiyonuna bağlı olarak üretilen monositler, hafıza T hücreleri ve dendritik hücreleri inflamasyon bölgesine toplayarak önemli kemotaktik aktiviteler göstermektedir. Çeşitli klinik veriler MCP-1'in AH'larının hem BOS, hem de serumlarında arttığını göstermiştir (Liu, Cui ve ark. 2014).

2.6. Nörodejeneratif Hastalıklar ve İnflamasyon

AH ve PH, büyük bir sosyoekonomik yüke neden olan ve yaygın görülen nörodejeneratif hastalıklar arasında yer almaktadır (Prinz ve Priller 2017). DLB hastalığı ise tüm demans hastalarının en az % 4.2'sini oluşturmaktadır ve yaşlı insanlarda dejeneratif demansın bir nedeni olarak AH'dan sonra ikinci sırada yer almaktadır (Liu, Cui ve ark. 2014). Günümüzde bu hastalıklar için herhangi bir tedavi

yoktur ve bu durum HH, ALS, Creutzfeldt-Jakob hastalığı gibi daha nadir görülen nörodejeneratif hastalıklar için de geçerlidir. Bu nörodejeneratif hastalıkların ortak nöropatolojik özellikleri arasında MSS'nin hastalık ile ilgili spesifik bölgelerinde meydana gelen nöronal kayıp ile ilişkili olan hücre içi ve / veya hücre dışı proteinlerin bir araya toplanması ve biriktirilmesi yer almaktadır. Ayrıca 'gliosis' olarak adlandırılan glial hücrelerin çoğalması ve aktivasyonu da bu hastalıkların iyi bilinen bir özelliğini oluşturmaktadır.

MSS'ne yerleşik immun hücreler esas olarak doğal bağışıklık hücrelerinden oluşur ve homeostatik koşullar altında düzenlenir. MSS parankimasındaki miyeloid hücreler son derece özel aynı zamanda MSS homeostazındaki değişikliklere hemen tepki gösteren AH veya PH gibi nörodejeneratif hastalıklarda reaktif hale gelen hücrelerdir. Adaptif bağışıklık tepkileri, T ve B lenfositlerinin özgün özelliklerine dayalı olarak bağışıklık özgüllüğü (antijenler için) ve hafıza (antijene yeniden maruz kalma durumunda hızlanan bir reaksiyona işaret eder) içerir. T ve B lenfositleri gibi diğer hematopoietik hücrelerin MSS içinde bulunması, tipik olarak bakteriyel, viral ve otoimmün MSS hastalıklarında görülen 'nöroinflamasyon' terimini destekleyebilir (Prinz ve Priller 2017). MSS'deki inflamatuvar reaksiyonları diğer dokulardaki inflamasyondan ayırmak için 'nöroinflamasyon' terimi ortaya çıkmıştır (Xanthos ve Sandkuhler 2014). Nöroinflamasyon, MSS'deki hasarlı glia hücrelerini ve nöronları onaran koruyucu bir mekanizmadır (Kempuraj, Thangavel ve ark.). AH, PH, HD ve ALS gibi başlıca nörodejeneratif hastalıkların yanı sıra şizofreni gibi diğer nörolojik hastalıkların önemli bir bileşenini oluşturmaktadır (Dendrou, McVean ve ark. 2016). Nöroinflamasyona; nöron, mikroglia, astrosit, T hücresi, nötrofil, mast hücresi ve bu hücrelerden salınan inflamatuvar düzenleyiciler aracılık etmektedir (Kempuraj, Thangavel ve ark.). Hasar sonrasında meydana gelen doğal immun yanıt, sitokinler ve kemokinler gibi moleküler ve hücrelerel düzenleyicilerin ekspresyonu ve salınmasıyla tetiklenir (Gualtierotti, Guarnaccia ve ark.). Başarılı bir inflamatuvar yanıt mekanizması, istilacı patojenleri ortadan kaldırarak hasarın iyileşmesini başlatır (Shabab, Khanabdali ve ark.). Nöroinflamasyon beyinde koruyucu bir yanıt olmasına karşın, uzun süreli inflamatuvar yanıtlar zararlı etkiler meydana getirmektedir. Düşük dereceli akut inflamatuvar cevaplar, doku hasarından sonra iyileşmenin sağlanması için enfektif ajanları, toksinleri ve ölü hücreleri temizlemek için önemlidir. Tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve kemokin (C-C motifi) ligand 2 (CCL2) gibi sitokinlerin ve kemokinlerin bazal olarak salınması,

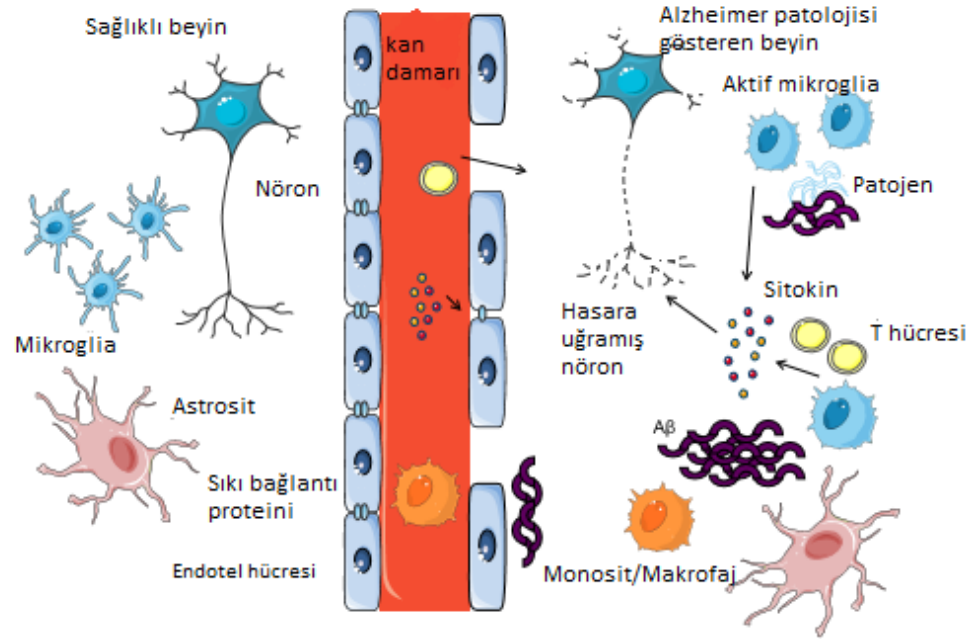
vücudun normal fizyolojik işlevlerini yerine getirmesi için gereklidir (Bolos, Perea ve ark.). Birçok çalışma uzun süreli nöroinflamatuvar yanıtın nöronlarda fonksiyon bozukluğuna ve nöron ölümüne yol açarak AH, PH gibi nörodejeneratif hastalıkların patogeneziyle ilişkili olduğunu göstermiştir.

Bu zamana kadar yapılan nöroinflamasyon ile ilgili çalışmaların büyük bir çoğunluğu mikrogliya ve astrositlerden salınan sitokin veya kemokinler üzerinde durmaktadır. Bunun sebebi, son yıllara kadar nöronların nöroinflamasyon sürecine katılmadığının düşünülmesiydi. Ancak literatürde AH gibi nörodejeneratif hastalıklarda nöronların lokal inflamasyon ve nörodejenerasyonu şiddetlendirebilen IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi sitokinlerin üretimine katkıda bulunduğu dair kanıtlar bulunmaktadır (McCann, Stevens ve ark.). Diğer taraftan, nörona spesifik sitokin salınımının belirlenebilmesi için saf bir nöron popülasyonunun izolasyonu gerekmektedir (Lim, Lu ve ark.). Aynı hücre içindeki bir sitokin, işlev gördüğü fonksiyonel duruma bağlı olarak proliferasyon, hücre ölümü ve hayatta kalma gibi paradoksal etkilere sahip olabilir (McCann, Stevens ve ark.). Bununla birlikte, artmış sitokin ve kemokin seviyelerinin nörodejenerasyonun ana tetikleyicilerinden biri olduğu düşünülmektedir (Bolos, Perea ve ark.). Birçok çalışma uzun süreli nöroinflamatuvar yanıtın nöronlarda fonksiyon bozukluğuna ve nöron ölümüne yol açarak AH, PH gibi nörodejeneratif hastalıkların patogeneziyle ilişkili olduğunu göstermiştir. Nörodejeneratif hastalıklarda görülen nörodejenerasyon ve nöron ölümü, öncelikli olarak IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8-33, CCL2(MCP-1), kemokin (C-C motif ligand 5 (CCL5), matriks metalloproteinaz-3 (MMP-3), glia olgunlaştırıcı faktör (GMF), prostaglandin E2 (PGE2), siklooksigenaz 2 (COX2), reaktif oksijen türevleri (ROS), histamin ve triptaz, proteaz tarafından aktive edilen reseptör 2 (PAR-2), CD40, CD40L, CD88 ve hücre içi adezyon molekülü 1 (ICAM-1) gibi proinflamatuvar ve nörotoksik düzenleyicilerin seviyelerinin artmasına neden olmaktadır (Kempuraj, Thangavel ve ark.).

2.6.1. Alzheimer Hastalığı ve İnflamasyon

AH patolojisi mikrogliya, perivasküler miyeloid hücreler ve astrositler gibi MSS'deki immün hücreler tarafından öncelikli olarak yönlendirilir ve hastalık seyrinde ortaya çıkan patolojik olaylara karşı dokunun tepkisini yansıtır (Heppner, Ransohoff ve ark. 2015). Beyinde A β temizlenmesinin temel yollarından biri; fagositler ve mikroglialar

ile astrositler, oligodendrositler ve nöronlar tarafından gerçekleştirilen fagositoz veya endositozdur. Periferdeki A β birikimi benzer şekilde kandaki monosit ve nötrofiller ve dokulardaki makrofajlar tarafından fagositize edilebilir (Dendrou, McVean et al. 2016, Wang, Gu ve ark. 2017) (Şekil 2-14). On yıldan fazla bir süredir, AH'de bağışıklık sisteminin rol oynayabileceğini gösteren veriler mevcut olmakla birlikte, inflamasyonun AH patogeneze katkıda bulunduğu ve hastalığın patolojisini şiddetlendirdiği çok yakın zamanda anlaşılmıştır (Heppner, Ransohoff ve ark. 2015). A β peptidleri, AH'de amiloid plakların ana bileşenlerini oluşturmaktadır. A β 'nin çözünür formları nöronal fonksiyon bozukluğuna neden olmakta ve primer mikroglianin pro-inflamatuvar aktivasyonunun uyarılmasında belirgin bir rol oynamaktadır. A β 'nin fibriler formlarına kıyasla, oligomer A β plakları in vitro mikrogliya ve astrositler tarafından daha fazla veya farklı pro-inflamatuvar sitokin üretilmesini tetiklemektedir. Primer gliadaki çalışmalar, oligomer A β ile uyarılmış nitrik oksit, TNFa ve TNF β gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımını arttırdığını ve fibriler A β 'nin neden olduğu artıştan daha büyük olduğunu ortaya koymaktadır. Dolayısıyla, A β 'nin farklı formları için AH'nin farklı evrelerindeki seviyelerini belirleyerek, ürettikleri inflamatuvar yanıt ve bunların altında yatan mekanizmalar (örneğin reseptör aracılı) tedavi için kritik bilgi sağlayabilir (Heppner, Ransohoff ve ark. 2015). TNF- α , AH'de serum ve beyin-omurilik sıvısında seviyesi arttığı gösterilen önemli bir pro-inflamatuvar sitokindir ve hastalığın gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. TNF- α 'nın AH gelişimindeki rolünün neprilsin, endotelin dönüştürücü enzim, insülin parçalanma enzimi ve anjiyotensin dönüştürücü enzim gibi A β -indirgeyici enzimlerini üretimini düzenlemek olduğu ileri sürülmektedir (Culpan, Palmer ve ark.). Nöronları hasara karşı koruyan bir anti-inflamatuvar sitokin olan tümör büyüme faktörü- β (TGF- β), A β patolojisinde karmaşık bir role sahiptir. Transgenik farelerde astrositler tarafından gerçekleştirilen uzun süreli TGF- β sentezi, aktif mikroglialar tarafından A β plaklarının temizlenmesinde artışa ve A β ile indüklenen davranış bozukluğunun iyileştirilmesine yol açmaktadır (Zheng, Zhou ve ark.).



Şekil 2-14: İnflamasyonun Alzheimer hastalığı patolojisi üzerine etkisi

(McManus ve Heneka 2017'den uyarlanmış).

Astrositler: Astrositler, reaktif glioz yoluyla patolojik uyarılara cevap veren, mikrogliaya benzeyen nöroektodermal kökenli MSS hücreleridir. Ayrıca, miyeloid hücrelere benzer şekilde, astrositler A β plaklarının etrafını sarmaktadır ve hastalık patogenezin başlangıcında aktif hale gelmektedirler. AH'nin transgenik fare modellerinde, astrositler A β plaklarıyla ilgili astrogliosis'den önce atrofi geçirmekte ve sonuç olarak, bilişsel bozukluğa katkıda bulunan yetersiz glutamaterjik iletimine neden olmaktadır (McManus ve Heneka 2017).

Mikroglia ve astrositler yanında, endotel hücreleri, oligodendrositler ve nöronlar gibi MSS'de bulunan diğer hücrelerde nöroinflamasyona katkıda bulunurlar. Oligodendrositler ve miyelin, MS gibi nörolojik hastalıklarda bağışıklık reaksiyonlarının bilinen hedefleridir. Nöronlar, iltihaplanmadan koruyan çeşitli moleküller ile donatılmıştır; fractalkine, tamamlayıcı savunma proteini CD59 ve CD200'ün AH beyninde patolojiden etkilenmiş bölgelerde azaldığı gösterilmiştir. Böylece, nöronlar belki de en başta, inflamasyon önleyicilerinin hücre ölümü veya işlev bozukluğundan dolayı bunların sentezlenmesini azaltarak AH'nin nöroinflamatuvar yönüne potansiyel olarak katkıda bulunabilir (McManus ve Heneka 2017).

2.6.2. Parkinson Hastalığı ve İnflamasyon

MSS'de inflamatuvar aktivasyon, klasik olarak enfeksiyonlara bağlı olarak uyarılmış olsada, PH gibi nörodejeneratif hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir. İnflamasyonun koruyucu veya hastalığa neden olan faktörlere ne ölçüde hizmet ettiğiyle ilgili tartışmalar devam etmekle birlikte inflamasyon iki ucu keskin kılıç olarak ifade edilmektedir (Abeliovich ve Gitler 2016). PH'nin inflamatuvar bileşenleri, genetik yatkınlık ve yaşlanma ile ilişkili inflamatuvar değişiklikleri ve nöronal hasara bağlı olarak ortaya çıkan glia aktivasyonu ile sonuçlanan inflamatuvar yolların düzenlenmesini içermektedir. Çeşitli araştırmacılar, dopaminerjik nöronların dejenerasyona karşı savunmasız hale getirilmesinde substantia nigra pars compacta (SNpc) 'da kronik hafif derecedeki inflamasyon ile yaşlanmayı ilişkilendirmektedir. PH'deki aktif periferik inflamasyon, dopaminerjik nörodejenerasyonu teşvik etmek için merkezi inflamatuvar cevap ile şiddetlenerek ve sinerjik hale gelerek hastalığın başlamasına ve/veya ilerlemesine katkıda bulunmaktadır. Çeşitli çalışmalar inflamasyonun ve immün yanıtların hastalığın ilerlemesinde belirleyici faktör olduğunu ve ailesel ve sporadik PH'nin hastalık başlangıcındaki patojenik süreçlerden sorumlu olduğunu göstermiştir. PH'nin ilerlemesinden hem merkezi hem de periferik inflamasyon sorumludur (Tiwari ve Pal 2017). PH ile ilgili postmortem araştırmalar sonucunda; az dallanmış uzantılar ile morfolojik olarak değiştirilmiş mikrogia ve interlökin-1 β , tümör-nekroz faktör- α ve interferon- γ gibi inflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin salınması inflamasyona dair işaretler olarak belirlenmiştir. PH'de nöronlar proteotoksik stresle aşırı yüklendiğinde doğal immün hücrelere bitişik olarak bulunan lizozomal bozunma mekanizmasının destekleyici bir rol üstlendiği varsayılmaktadır. Bununla birlikte, lizozomal yıkım veya doğuştan gelen immün hücreler, α -sinüklein birikimleri gibi hücre artıkları ile sarıldıktan sonra mikrogia ve diğer doğal bağışıklık hücreleri aşırı olarak aktif hale gelmekte ve nöron hasarına neden olmaktadır (Abeliovich ve Gitler 2016).

PH ile ilgili çalışmalar, yüksek IL-6 seviyelerinin PH riskini artırdığını ve hastalığın başlatılmasına neden olmakla ilişkili olabileceğini ileri sürmektedir. Bu bulgular, IL-6'nın hastalığın ilerlemesi ile daha karmaşık bir ilişki gösterebileceğini, belki de hastalıkta erken ve geç evrede artabileceğini göstermektedir (King, O'Brien ve ark.).

2.6.3. DLB Hastalığı ve İnflamasyon

DLB, dejeneratif demansa neden olan en sık rastlanan ikinci nörodejeneratif hastalıktır ve AH ile birçok klinik özellik paylaşmaktadır. Yeni bir meta-analiz çalışması, DLB ile yakından ilişkili olan PH'de sistemik inflamasyonun arttığını göstermiştir. Bu nedenle AH'de ortaya çıkan nöroinflamatuvar süreçlerin DLB'de nörodejenerasyona neden olabileceği varsayılmaktadır. DLB'li hastalarda BOS kullanılarak inflamasyonu değerlendiren yalnızca iki çalışma bulunmaktadır. Bir çalışmada düşük IL-6 seviyesi ortaya çıkarken bir diğer çalışmada anlamlı bir fark bulunamamıştır. Yapılan az sayıdaki araştırmalarda periferik IL-6 seviyelerinin DLB'li hastalarda bilişsel bozukluk ile ilişkili olduğu bulunmasına rağmen, kandaki inflamatuvar belirteçleri kontrollerle karşılaştıran hiçbir çalışma bulunmamaktadır (King, O'Brien ve ark. 2018).

2.7. SH-SY5Y Hücre Hattının Özellikleri

Bir nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y, nöroblastoma ve nörodejeneratif hastalıklar ile ilgili çalışmalarda sıkça kullanılan bir hücre hattıdır. SH-SY5Y hücre hattı, bir nöroblastoma hastasının kemik iliği biyopsisinden elde edilen ana hücre hattı olan SK-N-SH'nin bir alt klonudur (Krishna, Biryukov ve ark.). SK-N-SH hücre hattı nöronal (N tipi), Schwannian (S tipi) ve İntermediyer (I tipi) olmak üzere üç farklı fenotipte hücre içerir (Şekil 2-15). SH-SY5Y hücre hattı ise homojen bir nöroblast benzeri hücre hattıdır. SH-SY5Y hücreleri insan kökenli olduğundan, kemirgen primer kültürlerinde doğal olarak bulunmayan bir dizi insana spesifik protein ve protein izoformlarını eksprese eder (Kovalevich ve Langford). Farklılaşmamış SH-SY5Y hücreleri sürekli çoğalır, olgunlaşmamış nöronlara özgü belirteçleri eksprese eder ve olgun nöron belirteçlerinden yoksundurlar (McCann, Stevens ve ark.). İndükleyici ajanlarla yapılan uygulamalar, SH-SY5Y hücrelerinin olgun primer nöronlara morfolojik olarak benzer olmasını sağlamaktadır. Retinoik asit, forbol ester, dibutiril siklik adenosin mono fosfat gibi ajanlar kolinerjik, dopaminerjik, noradrenerjik gibi çeşitli nöronal fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Krishna, Biryukov ve ark.). Nörona farklılaşma, nörit oluşumu ve uzaması, plazma membranının elektriksel uyarılabilme özelliğindeki artış, sinaptofisin pozitif fonksiyonel sinapsların oluşumu, nörona spesifik enzimlerin, nörotransmitterlerin ve nörotransmitter reseptörlerinin

indüksiyonu da dahil olmak üzere birçok olayı içermektedir (Kovalevich ve Langford). Nöronlarda fonksiyon bozukluklarına ve hücre kaybına yol açan mekanizmalar in-vitro modeller ile araştırılabilmektedir (Schlachetzki, Saliba ve ark.). Literatürde, AH ve PH, SH-SY5Y hücre soyunda en sık çalışılan hastalıklar arasındadır (Krishna, Biryukov ve ark.). SH-SY5Y hücre soyu çalışmaları, intraselüler alanda biriken ya da ekstraselüler alana salınan α -sinükleinin aşırı ifadesinin patojenik etkilerinin çalışılması için güncel hücresel bir model olarak görülmektedir. Nörona farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinde yabancı tip insan α sinükleininin indüklenabilir aşırı ekspresyonuna dayanan bu model, kademeli olarak hücresel dejenerasyonu göstermektedir (Gouarne, Tracz ve ark.). SH-SY5Y, PC12, HEK293 gibi farklı hücre soyları; nörodejenerasyona katılan farklı moleküllerin mutant formları ile transfekte edilerek nörodejenerasyonu modelleyen in-vitro kültür çalışmaları için yaygın olarak kullanılmaktadır (Schlachetzki, Saliba ve ark.).

2.7.1. SH-SY5Y Hücrelerinin Nörona Farklılaştırılması

Retinoik Asit (RA)

SH-SY5Y hücrelerinde farklılaşmanın başlatılması için en yaygın olarak uygulanan ve en iyi tanımlanmış yöntemlerden biri, hücre kültürü ortamına RA eklenmesidir (Bove ve Perier 2012 , Kovalevich ve Langford 2013). Retinoik asit, büyümeyi önleyen ve hücresel farklılaşmayı teşvik eden özelliklere sahip olan bir A vitamini türevidir (Lotan 1996, Melino, Thiele ve ark. 1997). Aslında, vitamin A eksikliği, çeşitli epitel dokularında skuamöz metaplazi gelişimiyle bağlantılı iken, A vitamini uygulaması bu etkileri tersine çevrilebilir ve normal hücresel farklılaşmayı eski haline getirebilir. Tipik olarak ortamda bazı değişiklikler bildirildiği halde, farklılaşmayı indüklemek için serumsuz veya düşük serum ortamında en az 3-5 gün süreyle 10 uM konsantrasyonda RA uygulanır (Bove ve Perier 2012, Bonifati, Rizzu ve ark. 2003). Retinoik asit uygulamasının fosfatidilinositol 3-kinaz/Akt sinyal yolağının aktivasyonu ve antiapoptotik Bcl-2 proteininin yukarı regülasyonu yoluyla SH-SY5Y hücrelerinin hayatta kalmasını teşvik ettiği gösterilmiştir. SH-SY5Y hücreleri, artmış kolin asetil transferaz (ChAT) aktivitesi ve vesiküler monamin taşıyıcısı (VMAT) ekspresyonu ile kanıtlandığı üzere, RA uygulaması ile ilk olarak bir kolinergik nöron fenotipine farklılaşır (Lopes, Schroder ve ark. 2010, Presgraves, Ahmed ve ark. 2004). Hücreler aynı zamanda RA uygulaması ile olgun bir dopaminerjik fenotipe doğru

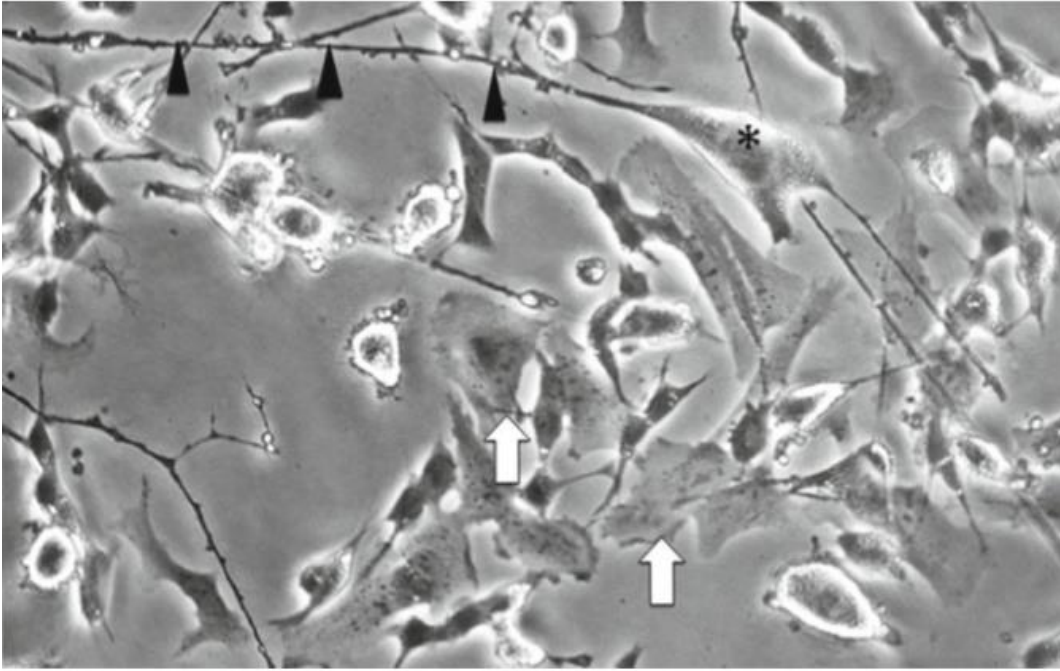
yönlendirilebilir, ancak bu tipik olarak, forbol esterler gibi ilave maddelerin birlikte uygulanmasını gerektirmektedir. Farklılaşmamış SH-SY5Y hücrelerinde dopaminerjik belirteçlerin bulunup bulunmadığı ve RA kaynaklı farklılaşma sırasında belirgin şekilde artıp artmadığı üzerine literatürde tartışmalar sürerken, çalışmalar forbol ester ile birlikte uygulanan RA'nın tirozin hidroksilaz (TH), dopamin reseptörü 2 ve 3 alt tipleri (D2R ve D3R) ve dopamin taşıyıcılarının (DAT) ekspresyonunun arttığını göstermiştir (Tiwari ve Pal 2017).

Forbol Ester

RA aracılı farklılaşmaya ek olarak, SH-SY5Y hücrelerinin, 12-0-tetradekanoil-forbol-13 asetat (TPA) gibi forbol esterleri ile farklılaştığı gösterilmiştir (Pahlman, Odelstad ve ark.). TPA uygulaması kısmen büyüme inhibisyonu, NSE aktivitesinde yaklaşık iki kat artış ve elektron mikroskobu ile görülebilen sitoplazmik nörosekretör granülün ortaya çıkmasına neden olmuştur (Pahlman, Odelstad ve ark. 1981). Bu nedenle, SH-SY5Y hücrelerinin farklılaşmasını tetiklemek uygulanan TPA baskın olarak adrenerjik hücre fenotipi ortaya koymaktadır (Murphy, Ball ve ark. 1991, Scott, Akerman ve ark. 1986 , Frey, Huang ve ark. 1993).

Dibutril Siklik Adenosin Mono Fosfat

Hücre içi siklik AMP (cAMP) seviyelerini yükselten hormonlar ve nörotransmitterler, nöronal hücrelerde farklılaşma ve uzun süreli potansiyelizasyona neden olmaktadır. (Frey, Huang ve ark. 1993 , Sanchez, Jimenez ve ark. 2004). SH-SY5Y hücrelerinin dibutiril siklik AMP'ye (dbcAMP) maruz kalması, nöritin uzatılmasına ve aynı zamanda olgun nöronal markör büyümesi ile ilişkili protein 43 (GAP43)'nin artmış ifadesine neden olmaktadır. Çalışmalar, 1 mM dbcAMP ile 3 gün süren uygulamanın, farklılaşmamış kültürlerde yaygın olarak gözlemlenen hücre kümelenmesini azalttığını ve belirgin nörit uzamasına ve dallanmaya neden olduğunu göstermektedir (Sanchez, Jimenez ve ark. 2004). Bu çalışmalar SH-SY5Y hücrelerinin dbcAMP ile farklılaşmasının RA ve TPA ile farklılaşmış hücrelerde görülen morfolojik fenotipe benzer olduğunu ve öncelikle adrenerjik nöron benzeri hücrelerden oluştuğunu göstermektedir (Kovalevich ve Langford 2013).



Şekil 2-15: Farklılaşmış hücre populasyonlarında "S" ve "N" hücre tipi.

"S" tipi hücre, uzantı göstermeyen epitel hücre benzeri iken (oklar), "N" tipi hücreler ise, piramidal şekilli (yıldız) ve uzun uzantılar (ok başları) ile daha fazla nörona benzemektedir. (Kovalevich ve Langford 2013'den uyarlanmış).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada ticari olarak alınan insan SH-SY5Y hücreleri kullanılarak (ATCC® CRL2266) hücre kültürü deneyleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında, SNCA genini içeren plazmidlerin bakteriyel transformasyonu İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Organotipik kültür ve Gen Aktarımı Laboratuvarında; hücre kültürleri, Amiloid beta 1-42 uygulamaları, SNCA genini içeren plazmid uygulamaları, total protein izolasyonları ve immunfloresan işaretlemeleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar Araştırma Laboratuvarında; kemilüminesans tabanlı western/dot blot deneyleri ise aynı Anabilim Dalı Moleküler Nörogenetik Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. İnsan SH-SY5Y Hücre Kültü Deneyleri

İnsan SH-SY5Y hücre kültürleri; Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucunda aşağıda ifade edilen protokole göre yapılmıştır.

3.1.1. Kültür Petrilerinin Hazırlanması

İnsan SH-SY5Y hücrelerinin (ATCC® CRL2266) ilk ekimi 100 mm çapındaki petrilere (Corning 3506. Corning Inc. New York, USA) gerçekleştirildi. Deney gününde ekimi yapılacak petrilere aşağıdaki protokole uygun olarak poly-L-ornithin (PLO) (Sigma P-4957. Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, GE) ile kaplanarak hazırlandı.

1. Stok PLO solüsyonu, 100 µl PLO ve 49 ml 0.20 µm filtreden (Sartorius 16534. Sartorius Biotech GmbH, Goettingen, GE) geçirilmiş MiliQ dH₂O ile karıştırılarak hazırlandı.
2. 100 mm'lik petrilere hazırlanan 5 ml PLO solüsyonu konuldu.
3. PLO ile kaplanmış olan petrilere 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde 2 saat bekletildi.
4. 2 saatin sonunda PLO ile kaplanan petrilere 3 kere filtreden geçirilmiş MiliQ dH₂O ile yıkandı.

5. Her bir petriye 5 ml DMEM+ medyumunu eklendi ve 37°C’de %5 CO₂ içeren etüve konuldu.

3.1.2. Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM+) Kültür Medyumunun Hazırlanması

DMEM+ medyumunu aşağıdaki protokole göre bir gün önceden hazırlandı.

- 88 ml DMEM Medyum (Gibco 41966-029) içine,
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco 10270-098) kültürdeki final konsantrasyonu %10,
- MEM Non-Essential Amino Acids (Gibco 11140-050) kültürdeki final konsantrasyonu %1,
- Antibiotic-Antimycotic 100X (Gibco 15240-062) kültürdeki final konsantrasyonu %1,

DMEM+ hazırlandıktan sonra 0,20 µ’luk filtreden geçirildi ve kullanılabileceği kadar +4 °C’de saklandı.

3.1.3. SH-SY5Y Hücre Kültürünün Hazırlanması

- Sıvı nitrojenden çıkarılan hücreler dikkatli bir şekilde 37°C’de su banyosuna alındı ve 2 dakika su banyosunda çözündürüldü.
- Su banyosundan çıkarılan tüplerin etrafı %70 izopropanol ile dezenfekte edildi ve Sınıf II biyolojik güvenlik kabinine alındı.
- Santrifüj tüpüne alınan hücreler 130 xg’de 6 dakika santrifüj edildi.
- Hücre çökeltisi üzerindeki üst sıvı atıldı ve üzerine önceden ısıtılmış 2-3 mL’lik DMEM + medyumunu eklendi pipet ile 3-4 kez karıştırıldı.
- Hücre sayısı hemasitometri ile hesaplandı. Hücreler, 100 mm’lik petrilere, her bir petride total hacmi 10 ml olan DMEM+ medyumunu içerisine 1×10^6 hücre olacak şekilde ekildi.
- Ekimi gerçekleştirilen hücreler %5 CO₂ içeren etüvde 37°C’de inkübe edildi.
- SH-SY5Y hücreleri haftada 2-3 kere taze medyum ile değiştirildi.

3.1.4. Hemasitometri ile Hücre Sayımının Yapılması

- Tüpte toplanan hücrelerden 10 µl alınıp temiz bir tüpe konuldu.
- Üzerine 10 µl tripan mavisi (GibcoBRL, 15250061. Invitrogen Inc., New York, USA) eklendi.
- Hemasitometrinin her iki tarafına 10 µl örnek konuldu.
- İçine boya almayan ve parlak görünen hücreler canlı olarak değerlendirilipiki farklı araştırmacı tarafından sayıldı.
- Toplam hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Toplam hücre sayısı = Hücre sayısı x $10^4/\text{ml}$ x hücrelerin içinde bulunduğu DMEM+ medyumunun miktarı x 2

Ekim yapılacak 100 mm'lik petri sayısı = Toplam hücre sayısı/ 1×10^6

3.1.5. İnsan SH-SY5Y Hücrelerinin Pasajlanması

- Hücre yoğunluğu %80-90'a ulaştığında pasajlama yapıldı.
- DMEM+ kültür medyumunu flasktan uzaklaştırıldı. Hücreler kalsiyum ve magnezyum içermeyen veya fenol kırmızısı içeren 1X HBSS (Thermo 14170-088), ile bir kez yıkandı.
- HBSS uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine %0,05 tripsin-EDTA(Sigma T4049. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, GE) konuldu. Hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı her 5 dakikada bir petrinin yanına nazıkçe vurularak ve hücreler ileri geri ve sağ sol olmak üzere hareket ettirilerek kontrol edildi.
- Tripsin aktivitesini nötralize etmek için 1:1 oranında DMEM+kültür medyumunu eklendi. Hücreleri içeren tüm sıvı toplanarak 15 ml'lik tüplere aktarıldı.
- Tüp 130 xg'de 6 dakika santrifüj edildi.
- Üst sıvı atıldı ve çökelti üzerine önceden ısıtılmış DMEM+kültür medyumunu eklendi.
- Hemasitometre ve tripan mavisi kullanarak hücre sayısı ve canlılığı belirlendi.

- Hücreler, 35 mm'lik 6 kuyulu petrilere, her bir petride total hacmi 1.5 ml olan DMEM+ medyumunu içerisine cm^2 'de 1×10^6 hücre olacak şekilde ekildi.
- SH-SY5Y hücreleri 37°C 'de %5 CO_2 içeren bir inkübatörde yaşatıldı.

Ekim yapılacak 35 mm'lik 6 kuyulu petri sayısı=Toplam hücre sayısı/ $\text{cm}^2 \times 1 \times 10^6$

3.1.6. İnsan SH-SY5Y Hücrelerinin Nöron Karakterini Kazanması

Farklılaştırma Medyumunun Hazırlanması

DMEM+ farklılaştırma medyumunu aşağıdaki protokole göre farklılaştırmanın yapılacağı gün hazırlandı.

- 9.290 ml piruvat içermeyen DMEM (Gibco 41966039) içine,
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco 10270-098) kültürdeki final konsantrasyonu %5,
- MEM Non-Essential Amino Acids (Gibco 11140-050) kültürdeki final konsantrasyonu %1,
- Antibiotic-Antimycotic 100X (Gibco 15240-062) kültürdeki final konsantrasyonu %1,

DMEM+ farklılaştırma medyumunu hazırlanıp $0,20\mu\text{l}$ 'luk filtreden geçirildikten sonra $20\mu\text{M}$ all-trans retinoik asit medyuma eklendi. Retinoik asidin ışığa duyarlı olması nedeniyle işlemler karanlıkta gerçekleştirildi.

İnsan SH-SY5Y Hücrelerine All Trans Retinoik Asidin (ATRA) Uygulanması

- 35 mm'lik 6 kuyulu petrilere %10 yoğunlukta ekilen SH-SY5Y hücrelerine ekimin ertesi gününde yukarıdaki protokole uygun bir şekilde hazırlanmış total hacmi 1.5 ml olacak şekilde $20\mu\text{M}$ all-trans retinoik asit (Sigma, R2625) 6 gün boyunca uygulandı.
- Retinoik asit ile farklılaştırmanın 3.gününde taze medyum hazırlanarak medyum değişimi yapıldı.

3.2. SNCA Gen Plazmidinin ve Boş Plazmidin (Mock Plazmid) Çoğaltılması

3.2.1. Luria-Bertani (LB) ve LB-AGAR Hazırlama Protokolü

Tablo 3-1:LB Hazırlanması:

%0.5*	Yeast Extract (Sigma 01497-500G-F)
85.6 mM	NaCl
%0.5*	Tryptone
100 mL	dH ₂ O

*% = w/v

LB Agar Hazırlanması:

%1.5AGAR

1. Tablo 3-1'e göre hazırlanan 500 ml LB içerisine %1.5 (w/v) agar eklenerek LB-AGAR hazırlandı ve iyice karıştırıldı.
2. Erlenmayer alüminyum folyo ile kapatılıp 20 dakika otoklavlandıktan sonra çıkartılıp 55°C'de soğumaya bırakıldı.
3. LB-AGAR ateşin yanında açılarak içerisine Alpha Gold Competent Cell için 20µg/ml Kanamycin seleksiyon antibiyotiği eklendi ve nazikçe karıştırıldı.
4. LB-AGAR 100 mm'lik petrilere 15-20 ml olacak şekilde döküldü ve kapakları kapatıldıktan sonra agarın donması için gece boyu bırakıldı.

3.2.2. Bakteriyel Transformasyon Protokolü

Liyofilize halde gelen SNCA plazmidi (OriGene RC210606) üzerine 10 µl dH₂O eklenerek 10 µM olacak şekilde çözündürüldü.

1. -80°C'den çıkartılan Alpha Gold Competent Cell (OriGene CC100001) buz üzerine alındı ve tüp yavaşça alt üst edilerek hücreler karıştırıldı.
2. 50 µl Alpha Gold Competent Cell'e 2 µl SNCA plazmidi eklendi ve birkaç saniye nazikçe karıştırıldı.

3. 30 dakika süren buz üzerindeki inkübasyondan sonra 30-45 saniye 42 °C'de su banyosunda bekletildi ve tekrar buza alınıp 2 dakika buz üzerinde bekletildi.
4. Transformasyon reaksiyonu 1 ml olacak şekilde katabolit içermeyen süper optimal medyum (SOC, Invitrogen 15544-034) ile sulandırıldı. (50 µl hücre + plazmide, 950 µl SOC medyumunu eklendi).
5. 37°C'de 200 RPM'de 60 dakika çalkalanan tüplerden 200 µl alınarak antibiyotik içeren LB-agar petrilere ekim yapıldı ve 37°C'de gece boyu inkübe edildi.
6. Petriler inkübatörden çıkarıldı ve oluşan kolonilerden birkaçı pipet ucu ile toplandı.
7. Bu pipet ucu daha önce ısıtılıp 37°C'ye getirilen ve içerisinde Kanamycin (25µg/ml) bulunan 5 ml LB'nin içerisine bırakıldı. Ağzı yarım kapatılıp kısmi şekilde bantlandı.
8. Yaklaşık olarak 6-7 saat 37°C'de 200 RPM' de inkübe edildi.
9. İnkübasyon sırasında kontaminasyon olup olmadığını kontrol etmek üzere içerisinde hücre bulunmayan ve LB içeren bir tüp de eş zamanlı olarak inkübe edildi.
10. İnkübasyon sonrasında 5 ml LB'nin içerisinde üreme meydana geldi.
11. Tüp içerisinde hücreleri içeren 5ml LB daha önce ısıtılıp 37°C'ye getirilen ve içerisinde Kanamycin bulunan 50 ml LB içeren bir erlenmayerin içerisine döküldü ve 37°C 200 RPM' de gece boyu inkübe edildi.
12. Erlenmayer içerisinde üremenin olduğu bulanıklıktan ve kokudan teyit edildi.
13. Plazmid izolasyonuna başlandı.

Tablo 3-2: SOC Medyumunun Hazırlanması

Bacto Trytone	20g
Bacto Yeast Extract	5g
5M NaCl ₂	2 ml
1M KCL	2.5 ml
1M MgCl ₂	10 ml
1M MgSO ₄	10 ml
1M Glukoz	20 ml
dH ₂ O	1 L'ye tamamlandı.

SOC Medyumunu Tablo 3-2'de verilen bilgilere göre hazırlanıp otoklavlandı.

3.2.3. Plazmid İzolasyonu

PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit (K2100-10 Invitrogen Inc., New York, USA) protokolüne uygun olarak Plazmid izolasyonu gerçekleştirildi.

1. 50 ml'lik erlenmayerde bulunan plazmid 15ml'lik polipropilen tüplere 5 ml olacak şekilde alındı. Tüpler 3900xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Hücreler çöktürüldü ve üst sıvı yavaşça atıldı.
2. Çökelti üzerine 250 µl R3 solüsyonu eklendi ve pipet yardımıyla homojen hale getirildi.
3. Tüplere 250µl L7 solüsyonu eklendi. Tüpler 10 kere alt üst edilerek homojen hale getirildi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
4. Tüplere 350 µl N4 solüsyonu eklendi. Tüpler hızlıca çalkalandı ve 14.000xg'de santrifüj edildi.
5. Üst sıvı alınıp kit ile verilen 2 ml toplama tüpü içerisindeki spin kolona kenarlar ıslatılmadan konuldu ve 12.000xg'de 1 dakika santrifüjlendi.
6. Toplama tüpü sıvıyla birlikte atılıp spin kolon yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne aktarıldı.

7. Her bir tüpe 700 µl W9 solüsyonu konuldu ve 12.000xg'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Toplama tüpü sıvıyla birlikte atılıp spin kolon yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne aktarıldı.
9. Tüpler boş olarak 12.000x g'de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpü sıvıyla birlikte atıldı. Spin kolon yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne aktarıldı.
10. Daha önce 65°C'de ısıtılan TE solüsyonundan 75 µl konuldu ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
11. 12.000xg'de 2 dakika santrifüj edildi ve spin kolon atıldı.
12. Plazmid DNA'sı elde edildi.

3.2.4. DNA Saflığı ve Miktarının Tespiti

İzolasyon sonucu elde edilen DNA'ların saflık ve miktar tayini Picodrop (Astranet Systems Ltd Picodrop Limited, Hinxton, United Kingdom) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.5. SNCA Geni Plazmidi veya Boş Plazmid (Mock plazmid) Varlığını Göstermek Üzere Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Yapılması

İleri (Forward) 5' GGACTTTCCTCAAATGTCG 3' ve geri (Reverse) 5' ATTAGGACAAGGCTGGTGGG 3' olmak üzere primerleri (OriGene RC210606) içeren tüpler açılmadan önce kısa bir süre santrifüjlenerek çökelti elde edildi. Tüplerin içerisine 10 µl dH₂O eklendi. Kısa bir süre vorteks yapıldıktan sonra santrifüjlenerek tüm sıvı tüpün dibinde toplandı.

1. Tüm solüsyonlar, içeriklerinin tamamı karışımaya kadar çözündürüldü. Kısa bir süre santrifüjlendikten sonra mikropipet yardımıyla karıştırılıp buz üzerine alındı.
2. Primerler yukarıda açıklandığı gibi hazırlandı.
3. Buz üzerindeki 0.5 ml tüpe reaksiyon karışımları Tablo 3-3'de gösterildiği gibi konuldu.

4. Karışım mikropipet yardımıyla karıştırıldıktan sonra kısa bir süre santrifüjlenerek tüm sıvı tüpün dibinde toplandı.

Tablo 3-3: PZR Reaksiyonu Karışımı

Reaksiyonun bileşenleri	Hacim
dH ₂ O	12.5 µl
10 X PZR Tamponu	2.5 µl
MgCl ₂ (25mM)	1.5µl
dNTP (2mM)	1.6 µl
İleri Primer	0.6 µl
Geri Primer	0.6 µl
Taq DNA Polimeraz 5U/ µl	0.2 µl
DNA	0.5 µl

20 µl'lik PZR karışımı hazırlandıktan sonra termal döngü cihazına konuldu.

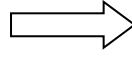
3.2.6. PZR Programı

- Denatürasyon: 95°C'de 1 dakika
- Evre 1: 95°C'de 10 saniye
62°C'de 20 saniye → 2 döngü
72°C'de 4 dakika
- Evre 2: 95°C'de 10 saniye
60°C'de 20 saniye → 2 döngü
72°C'de 4 dakika
- Evre 3: 95°C'de 10saniye
58 °C' de 20 saniye → 2 döngü
72 °C' de 4 dakika

5. Evre 4: 95 °C' de 10 saniye

56 °C' de 20 saniye

72 °C' de 4 dakika



15 döngü

6. 72 °C' de 10 dakika olarak düzenlendi.

3.2.7. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde İncelenmesi

Bu çalışmada PZR ürünlerinin büyüklüğü göz önüne alınarak agaroz jel elektroforezi kullanıldı. PZR ürünlerinin analizleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek yapıldı. 100ml'lik kasette %1'lik jel için 100 ml 1xTBE içerisinde 1 gr agaroz çözündürüldü. Isıtıcı ve manyetik karıştırıcı üzerinde şeffaf hale gelinceye kadar kaynatılan ve karıştırılan jel daha sonra soğuması için bekletildi. Tam olarak soğumasına izin verilmeden üzerine 0.8 µl etidyum bromid (EB) eklendi. EB'nin dağılması sağlandıktan sonra jelin polimerize olması için tarağı yerleştirilmiş kaset içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek dökülüp çeker ocak altında 1 saat bekletildi. Jel polimerize olduktan sonra tarak çıkartılıp kaset ile birlikte elektroforez tankı (Biometra horizontal jel electrophoresis apparatus) içerisine yerleştirildi. Jelin üzerini kaplayacak şekilde tankı dolduran 1xTBE tamponu eklendi. 5 µl'lik PZR ürünü 1-2 µl yükleme tamponu (bromo fenol mavis) ile karıştırılarak jele yüklendi. 80 volt 24 miliamper'de 40 dakika yürütüldü. Daha sonra PZR ürünlerinin büyüklükleri ultraviyole ışık altında birinci kuyuya yüklenmiş olan 100 bp DNA Ladder moleküler ağırlık belirleme standardı ile birlikte incelenerek yorumlandı.

3.3. İnsan SH-SY5Y Kültürü Uygulamaları

İnsan SNCA genini taşıyan plazmid, lipid bazlı bir transfeksiyon ajanı kullanılarak aşağıda verilen protokole göre hücrelere aktarıldı. Nörona farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerine geçici (transient) transfeksiyon yapıldı ve transfeksiyonu takip eden 24, 48 ve 72. saatlerde transfeksiyon başarısı kontrol edildi ve transfeksiyon verimliliğinin yüksek olduğu zaman aralığı 48 saat olarak belirlendi. Bu zaman aralığında kültür medyumuna salınan üst sıvılar toplandı.

A β 1-42 peptit stok solüsyonu, aşağıda verilen protokole göre hücrelere aktarıldı. A β 1-42 peptit stok solüsyonu, her uygulamadan önce, PBS içerisinde çözündürülerek hazırlandı.

SH-SY5Y hücre kültürü grupları

1. Kontrol grubu: Herhangi bir uygulama yapılmayan grup. 48 ve 72 saat sonra aşağıda belirtilen incelemeler yapıldı.

2. Myc-DDK-tag içeren boş plazmid (MOCK plazmid) ve A β 'nın çözündürüldüğü PBS uygulanan grup: ORF içermeyen sadece ilgili promoter ve kuyruğu (Myc-DDK) içeren plazmid ve amiloid betanın çözündürüldüğü PBS içeren grup. 48-72 saat sonra aşağıda belirtilen incelemeler yapıldı.

3. A β uygulanan grup: Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerine 6 μ M A β 1-42 uygulaması yapılır. 48-72 saat sonra aşağıda belirtilen incelemeler yapıldı.

4. α -sinükleinin overekspresyonu yapılan grup: Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerine insan SNCA (Myc-DDK-tagged ORF) plazmid uygulandıktan sonra 48-72 saat sonra aşağıda belirtilen incelemeler yapıldı.

5. α -sinükleinin overekspresyonu yapılan SH-SY5Y hücrelerine A β uygulaması yapılan grup: SH-SY5Y hücrelerine insan SNCA (Myc-DDK-tagged ORF) plazmidi uygulandıktan 24 saat sonra 6 μ M A β 1-42 uygulaması yapılarak 48-72 saat sonra aşağıda belirtilen incelemeler yapıldı.

Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerine A β 1-42 uygulanması:

1. 6 kuyulu kültür tabağına 0.5×10^6 hücre ekildi.
2. Hücrelerin yoğunluğu %75-80 olana kadar herhangi bir uygulama yapılmadı ve 2-3 günde bir medyum değişimi yapıldı.
3. AH'da plak oluşumunu taklit etmek için tamamen farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri 24 saat serum içermeyen medyumda bırakıldıktan sonra hücrelere 6 μ M A β 1-42 uygulaması yapıldı.

3.3.1. Plazmid ile Transfeksiyon Aşamaları

1. Hücrelerin hazırlanması: Kültürdeki hücrelerin petrilerin %60-70'ni kaplaması beklendi.

2. Lipofectamine(LTX and Plus Reagent)/DNA kompleksinin hazırlanması

- a) 2,3 µg DNA 125µl Opti-MEM içerisinde çözündürüldü. Nazıkçe vortekslendi.
- b) Opti-MEM ile dilüe edilmiş 6µl Lipofectamine üzerine dilüe edilmiş DNA eklendi. Nazıkçe pipetleyerek karıştırıldı.
- c) Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.

3. 2. basamakta hazırlanan Lipofectamine/DNA karışımı içerisinde kültür medyumunu bulunan her bir kuyuya nazıkçe, damla damla eklendi. Plaka nazıkçe ileri geri ve sağa sola hareket ettirilerek karıştırıldı. 37°C’de 24 saat inkübe edildi.

4. Daha sonra transfeksiyon medyumunu, serum ve büyüme faktörü içermeyen medyum ile değiştirilerek hücreler 24 saat daha inkübe edildi ve toplam inkübasyon süresi 48 saat olarak uygulandı.

5. Hücrelerde plazmidin ekspresyon yapıp yapmadığını kontrol etmek üzere, plazmide SNCA dışında eklenmiş olan işaret proteini (Myc-DDK) uygun antikor kullanılarak immünfloresan yöntemi ile gösterildi.

6. Transfeksiyonun sağlıklı bir şekilde saptandığı saat aralığında üst sıvılar toplanıp, görüntüleme deneyleri yapılarak hedef parametreler araştırıldı.

3.3.2. SNCA Genini İçeren Plazmid Transfeksiyonunun İmmün Floresan İşaretlemeye Gösterilmesi

İmmünfloresan boyama protokolü

1.Gün

1. Kültürdeki hücreler %3,7’lik paraformaldehit (Sigma 15,812-7. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, GE) içerisinde 20 dakika oda sıcaklığında fikse edildi.
2. Hücreler 3 defa 10’ar dakika 2 ml PBS ile yıkandı.
3. Hücreler % 0,02 triton X-100 (Sigma X-100. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, GE) içeren T-PBS içerisinde hazırlanan %30’luk normal keçi serumunda (Chemicon S26. Millipore Corp. California, USA) 1 saat oda sıcaklığında bekletildi.

4. Hücreler 1:200 oranında primer antikor α -syn-211 (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc. Illinois, USA Lot:SC244203) ile işaretlendi. Primer antikor % 0,02 T-PBS içinde hazırlanan % 1,5 keçi serumu ile sulandırıldı ve +4°C derecede boyu bekletildi. Bu aşamada negatif kontrole primer antikor içermeyen % 0,02 T-PBS içinde hazırlanan %1,5 keçi serumu uygulandı.

2.Gün

1. Hücreler 3 kere 10'ar dakika oda sıcaklığındaki 2 ml PBS ile yıkandı.
2. Bu aşamadan sonraki tüm işlemler karanlıkta gerçekleşti. Hücreler % 1,5 keçi serumu % 0,02 T-PBS içerisinde 1:200 oranında sulandırılan keçi anti fare IgG FITC (Fluorescein isothiocyanate) (Millipore AP181F. Millipore Corp. California, USA) sekonder antikoruna ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
3. Hücreler 3 kere 10'ar dakika oda sıcaklığındaki 2 ml PBS ile yıkandı.
4. Hücreler 1:15.000 oranında dH₂O ile sulandırılmış DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) solüsyonu içinde 15 saniye bekletildi.
5. Kapama medyumunu ile kapatıldı.

3.3.3. Retinoik Asit ile Nörona Farklılaştırılan SH-SY5Y Hücrelerinin İmmün Floresan İşaretlemeyle Karakterlerinin Gösterilmesi

İmmünfloresan boyama protokolü

1.Gün

1. Kültürdeki hücreler %3,7'lik paraformaldehit (Sigma 15,812-7. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, GE) içerisinde oda sıcaklığında 20 dakika fikse edildi.
2. Hücreler 3 defa 10'ar dakika 2 ml PBS ile yıkandı.
3. Hücreler % 0,02 triton X-100 (Sigma X-100. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, GE) içeren T-PBS içerisinde hazırlanan %30'luk normal keçi serumunda (Chemicon S26. Millipore Corp. California, USA) 1 saat oda sıcaklığında bekletildi.
4. Hücreler 1:75 oranında primer antikor Tirozin Hidroksilaz ile işaretlendi. Primer antikor % 0,02 T-PBS içinde hazırlanan % 1,5 keçi serumu ile

sulandırıldı ve +4°C’de gece boyu bekletildi. Bu aşamada negatif kontrole primer antikor içermeyen % 0,02 T-PBS içinde hazırlanan %1,5 keçi serumu uygulandı.

2.Gün

6. Hücreler 3 kere 10’ar dakika oda sıcaklığındaki 2 ml PBS ile yıkandı.
7. Bu aşamadan sonraki tüm işlemler karanlıkta gerçekleşti. Hücreler % 1,5 keçi serumu % 0,02 T-PBS içerisinde 1:200 oranında sulandırılan keçi anti tavşanIgG(Alexa fluor 488) sekonder antikoruna ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
8. Hücreler 3 kere 10’ar dakika oda sıcaklığındaki 2 ml PBS ile yıkandı.
9. Hücreler 1:15.000 oranında dH₂O ile sulandırılmış DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) solüsyonu içinde 15 saniye bekletildi.
10. Kapama medyumunu ile kapatıldı.

3.3.4. SH-SY5Y Hücrelerinde Amiloid Beta Varlığının Kongo Kırmızı Boyaması İle Gösterilmesi

Aβ uygulanmış SH-SY5Y hücre kültürü Kongo kırmızısı ile boyandı ve kültürdeki beta amiloid dağılımı gösterildi.

Kongo kırmızısı ile boyama protokolü

- Paraformaldehit ile fikse edilmiş hücreler PBS ile bir kere yıkandı.
- Petrilere, %0,1 oranında dH₂O içinde çözündürülen Kongo kırmızısından 1 ml konulup 20 saniye bekletildi.
- Petriler PBS ile 2 kez yıkandı.
- Kapama ortamı ile kapatıldı.
- Hücreler invert ışık ve floresan mikroskopunda TR ve I3 filtreleri kullanılarak incelendi.

3.4. Ray Biotech C-Series Human Inflammation Antibody Array C3

Human inflammation antibody array kullanılarak kemilüminisans tabanlı western/dot blot yöntemi ile üst sıvılarında şu parametreler araştırıldı: C-C motif

kemokin 11 (Eotaksin-1), Eosinofil kemotaktik protein 2 (Eotaksin-2 , Miyeloid öncü inhibitör faktör 2 (MPIF-2) / C-C motif kemokin 24 (CCL24)), Granülosit koloni uyarıcı faktör (GCSF), Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), İnterselüler adezyon molekülü 1 (ICAM-1)/ Majör grup Rhinovirus reseptörü (CD54)), İnterferon gama (IFN-gamma), C-Cmotif kemokin /T lenfosit salgılayan protein I-309 (TCA-3/CCL1), İnterlökin-1 alfa (IL-1 alpha), İnterlökin-1beta (IL-1 beta), İnterlökin-2 (IL-2) , İnterlökin-3(IL-3), İnterlökin 4 (IL-4), İnterlökin-6 (IL-6), İnterlökin- 6 reseptörü alfa alt ünitesi (IL-6 R), İnterlökin-7 (IL-7), İnterlökin -8 (IL-8) / C-X-C motif ligand 8 (CXCL8)), İnterlökin-10 (IL-10), İnterlökin-11 (IL-11), İnterlökin-12 p40 alt ünitesi (IL-12 p40), İnterlökin-12 p70 alt ünitesi (IL-12 p70), İnterlökin-13 (IL-13), İnterlökin-15 (IL-15), İnterlökin-16 (IL-16), İnterlökin-17alfa (IL-17A), İnterferon gama indüklenen protein (IP-10/CXCL10), Monosit kemoatraktant protein-1(MCP-1), Monosit kemoatraktant protein 2 (MCP-2)/(CCL8), Makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF), İnterferon-gama ile indüklenen monokin (MIG /CXCL9)), Makrofaj inflamatuvar protein-1 alfa (MIP-1 alfa/CCL3),Makrofaj inflamatuvar protein-1-beta (MIP-1beta/ CCL4), Makrofaj inflamatuvar protein-1delta (MIP-1 delta/ CCL15), C-C motif kemokine 5 (RANTES/CCL5), Transforming büyüme faktörü 1 beta (TGF beta 1), Tümör nekroz faktör alfa (TNF alfa), Tümör nekroz faktör beta (TNF beta/TNFSF1B), Tümör nekroz faktörü reseptörü 1 (TNF RI/TNFRSF1A), Tümör nekroz faktörü reseptörü 2 (TNF RII(TNFRSF1B), Trombosit kökenli büyüme faktörü B alt birim (PDGF-BB), Metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP-2).

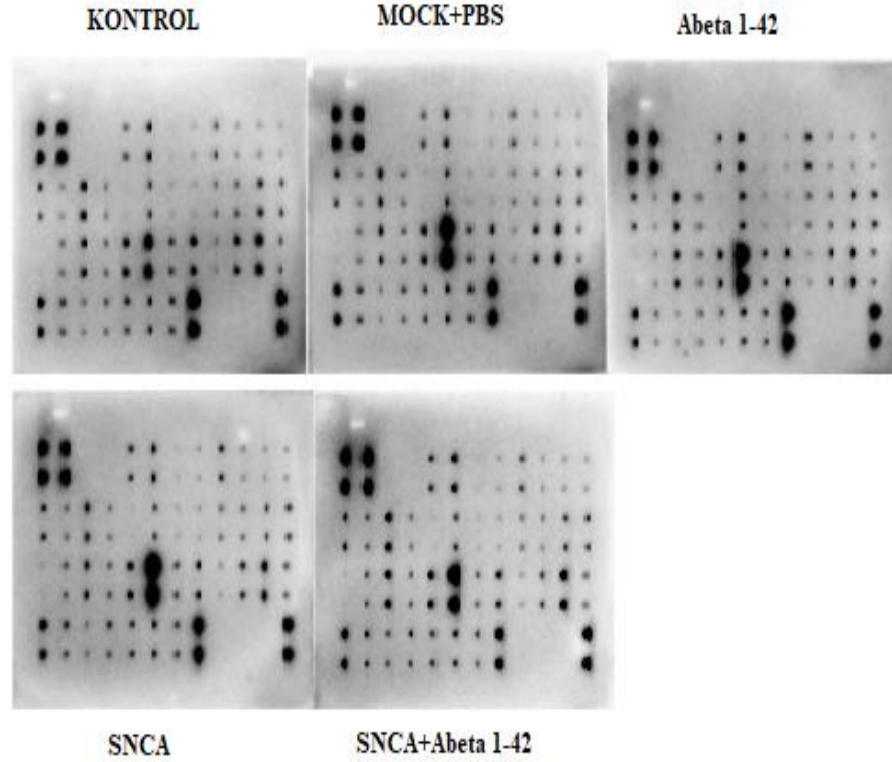
*Gruplara ait membranlar Şekil 3-1’de görülmektedir

Deney Protokolü

1. İnkübasyon kasetinin her bir kuyusuna bir membran yerleştirildi.
2. Her bir kuyuya 2 ml bloklama solüsyonundan konuldu ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
3. Pipet yardımı ile her bir kuyudan bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı.
4. Protein örneklerinden kuyulara 230 µg kondu ve 1.5-5 saat oda sıcaklığında veya gece boyu 4°C inkübe edildi.

5. Pipet yardımı ile örnekler kuyudan uzaklaştırıldı.
6. I ve II yıkama solüsyonları kullanmadan önce gerekli miktarlarda sulandırıldı.
7. Yıkama solüsyonu I ile yıkama: Her bir kuyuya 2 mL 1x yıkama solüsyonu konuldu ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.
8. Yıkama solüsyonu II ile yıkama: Her bir kuyuya 2 mL 1x yıkama solüsyonu konuldu ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandı. .
9. Biotinlenmiş antikor solüsyonu hazırlandı.
10. Her bir kuyuya 1 ml hazırlanmış biyotinlenmiş antikor solüsyonu ve gece boyu 4°C inkübe edildi.
11. Her bir kuyudan antikor solüsyonu uzaklaştırıldı.
12. Yıkama solüsyonu I ile yıkama: Her bir kuyuya 2 mL 1x yıkama solüsyonu konuldu ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.
13. Yıkama solüsyonu II ile yıkama: Her bir kuyuya 2 mL 1x yıkama solüsyonu konuldu ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandı.
14. HRP-Streptavidin solüsyonu hazırlandı.
15. Her bir kuyuya 2 mL 1X HRP-Streptavidin solüsyonu konuldu ve 2 saat oda sıcaklığında veya gece boyu 4°C inkübe edildi.
16. Her bir kuyudan HRP-Streptavidin solüsyonu uzaklaştırıldı.
17. Yıkama solüsyonu I ile yıkama: Her bir kuyuya 2 mL 1x yıkama solüsyonu konuldu ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.
18. Yıkama solüsyonu II ile yıkama: Her bir kuyuya 2 mL 1x yıkama solüsyonu konuldu ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandı.
19. Membranlar kromotografi kağıdı ya da kağıt mendile düz bir yüzeyde boyalı tarafı üstte olacak şekilde transfer edildi.
20. Membranların üzerinden yıkama solüsyonları kurutma kağıdı ile uzaklaştırıldı.
21. Membranlar plastik tabaka arasına alındı ve üzerlerine belirleme solüsyonundan konuldu ve CCD kamera gibi kemilüminesans görüntüleme sisteminde membranların bant yoğunlukları belirlendi.

22. Bu bant yoğunlukları önce ImageJ programı ile ölçülüp ham veriler RayBio Analysis Tool-S02-AAH-INF-3 ile değerlendirildi ve sonuçlar pozitif kontrol bant yoğunluğuna göre normalize edilerek istatistiksel değerlendirmeye alındı.



Şekil 3-1: 72.saate ait gruplara ait membranlar görülmektedir.

3.5. Sitotoksite Ölçümü

Sitotoksisite ölçümü, kültürdeki membranı hasarlanmış veya ölü hücrelerden medyuma salınan laktat dehidrogenaz (LDH) miktarının belirlenmesiyle gerçekleştirildi. LDH salınımı analizinde kullanılacak olan negatif kontrol, düşük konsantrasyonlu kontrol ve yüksek konsantrasyonlu kontrol grupları diğer deney grupları ile birlikte hazırlandı. DMEM+'dan oluşan negatif kontrol, kültür medyumundaki LDH aktivitesini belirlemek üzere hazırlandı. Hiçbir madde uygulanmayan kontrol grupları, normal koşullar altındaki hücrelerden LDH salınımı belirlemek üzere düşük konsantrasyonlu kontrol grubu olarak kullanıldı. Kültür medyumuna %2 Triton X-100 verip 24 saatlik inkübasyon ile oluşturulan yüksek konsantrasyonlu kontrol grubu, hücrelerden salınabilecek en yüksek LDH miktarını

belirlemek için hazırlandı. Uygulama süreleri sonunda kontrol gruplarına ve deney gruplarına ait kültür medyumlarından 500'er µl örnek ELISA çalışmaları için alındı ve -80°C'de saklandı.

LDH salınımı Cytotoxicity Detection (LDH) kiti (Roche 11 644 793 001. Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science Mannheim, GE) kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapıldı.

1. Her bir örnekten 100 µl 96 kuyulu mikropalakalara yüklendi.
2. Üzerlerine taze hazırlanmış 100 µl reaksiyon karışımı eklendi, 30 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi.
3. İnkübasyon sonrası örneklerin absorbsansları 492 nm'lik filtre ile Thermo MultiSkan EX (Thermo Fisher Scientific™ Delaware, USA) ELISA okuyucuda okundu. Her bir örneğe ait ölçümler 3 kere tekrarlandı.

3.6. İstatiksel Analiz

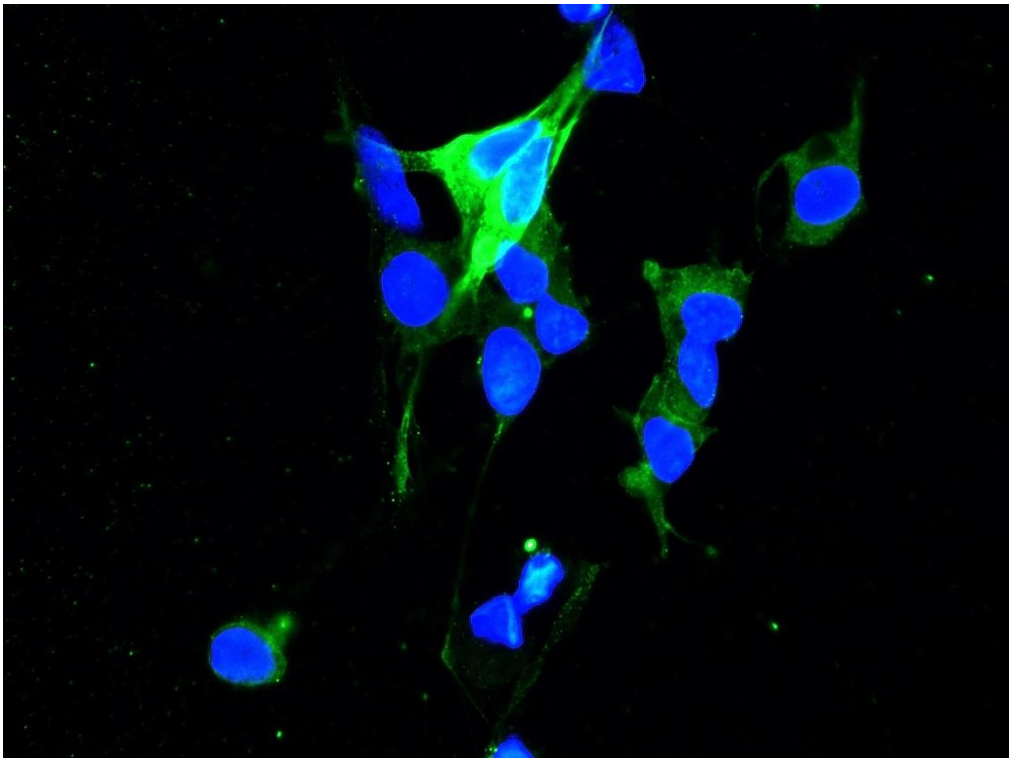
Transfeksiyonun kontrolü için kullanılan immün işaretleme deneylerine ait ve Image J programı ile ölçümü alınan immün yoğunluk ham verileri kullanılarak, düzeltilmiş total hücre ışıması (CTCF-corrected total cell fluorescence) hesaplandı (Gezen-Ak, Atasoy ve ark. 2017). İstatistiksel analizler bu değerler üzerinden yapıldı. RayBio Analysis Tool-S02-AAH-INF-3 ile ön analizleri yapılan inflamatuvar proteinlerin ham verileri, sitotoksosite deneylerine ait ham veriler ve CTCF değerlerinin karşılaştırılması, GraphPad InStat DTCG 3.06 (GraphPad Software, Inc. San Diego USA) veya SPSS 24.0 yazılımı kullanılarak datanın normal dağılıp dağılmamasına ve elde edilen SD'lerin arasındaki farkın anlamlı olup olmamasına göre, önce one-way ANOVA, takibinde çoklu karşılaştırma için Tukey-Kramer Multiple Comparision testleri ile veya önce Kruskal Wallis, sonrasında çoklu karşılaştırma için Dunn's Multiple Comparision testleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı fark olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Nörona farklılaştırılmış insan SH-SY5Y hücre kültürüne A β 1-42 uygulaması ile amiloid beta patolojisi, SNCA geni içeren plazmidler ile α -sinüklein proteinin aşırı ekspresyonu sağlanarak α -sinüklein patolojisi ve α -sinüklein ile birlikte A β 1-42 uygulanarak sırasıyla AH, PH ve DLB hastalık modelleri hücre kültürü ortamında oluşturuldu ve bu modellerde inflamatuvar düzenleyicilerin seviyelerindeki değişiklikler Dot Blot yöntemi olan Ray Biotech C-Series Human Inflammation Antibody Array C-3 ile belirlendi. Kültür ortamındaki sitotoksik değişiklikler, kültür ortamına salınan LDH miktarı ölçülerek saptandı. SH-SY5Y hücrelerinin dopaminerjik karaktere sahip oldukları tirozin hidroksilaz antikoru ile immünfloresan işaretleme yapılarak gösterildi. Kültür hücrelerinde amiloid-beta varlığı Kongo Kırmızısı boyaması ile SNCA plazmid transformasyonunun başarılı olup olmadığı PZR ve agaroz jel elektroforezi ve immünfloresan işaretleme yöntemi ile kontrol edildi.

4.1. SH-SY5Y Hücrelerinin Morfolojik ve Mikroskopik Değerlendirmesi

Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinin kültür koşullarındaki dopaminerjik karakterleri, Tirozin Hidroksilaz (TH) antikoru kullanılarak belirlendi. Hücrelerin TH'yi farklı seviyelerde eksprese ettiği saptandı (Şekil 4-1).



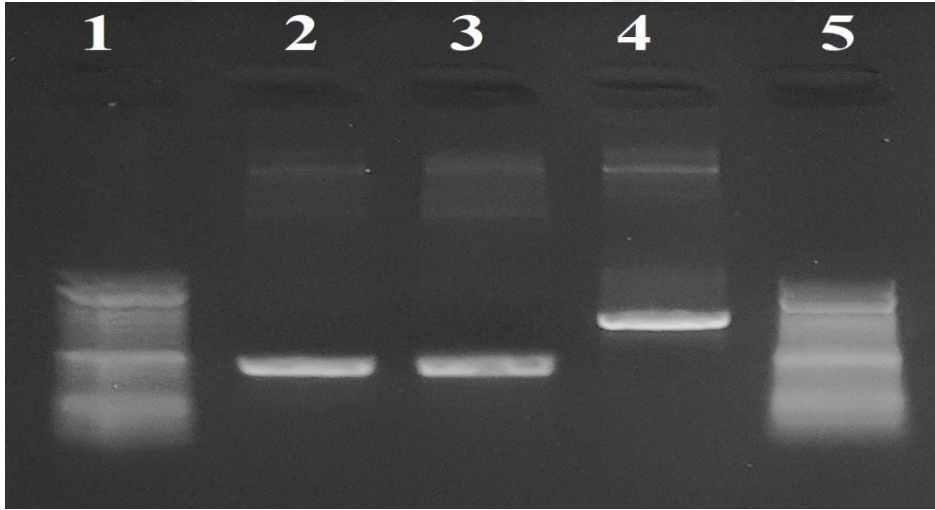
Şekil 4-1: İnsan SH-SY5Y hücrelerinin kültür koşullarındaki dopaminerjik karakterlerinin TH immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi

İnsan SH-SY5Y hücrelerinin dopaminerjik nöron belirteci olan Tirozin Hidroksilaz(yeşil) ile immün işaretlemesi ve bir nükleus boyası olan DAPI (mavi) ile boyaması yapılmıştır. Büyütme 100X.

SNCA Aşırı Ekspresyonu Sonuçları

4.1.1. Alpha Gold Competent Hücrelerinin SNCA Genini İçeren Plazmid ile Transformasyonu

SNCA plazmidini çoğaltmak üzere Alpha Gold hücrelerinin SNCA genini içeren plazmid ile transformasyonu gerçekleştirildikten sonra plazmid DNA'sı izole edilmiştir. PZR yöntemi ile plazmid transformasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği doğrulanmıştır. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi sonucu SNCA genine ait elde edilen bantlar Şekil 4-2'de gösterilmiştir.

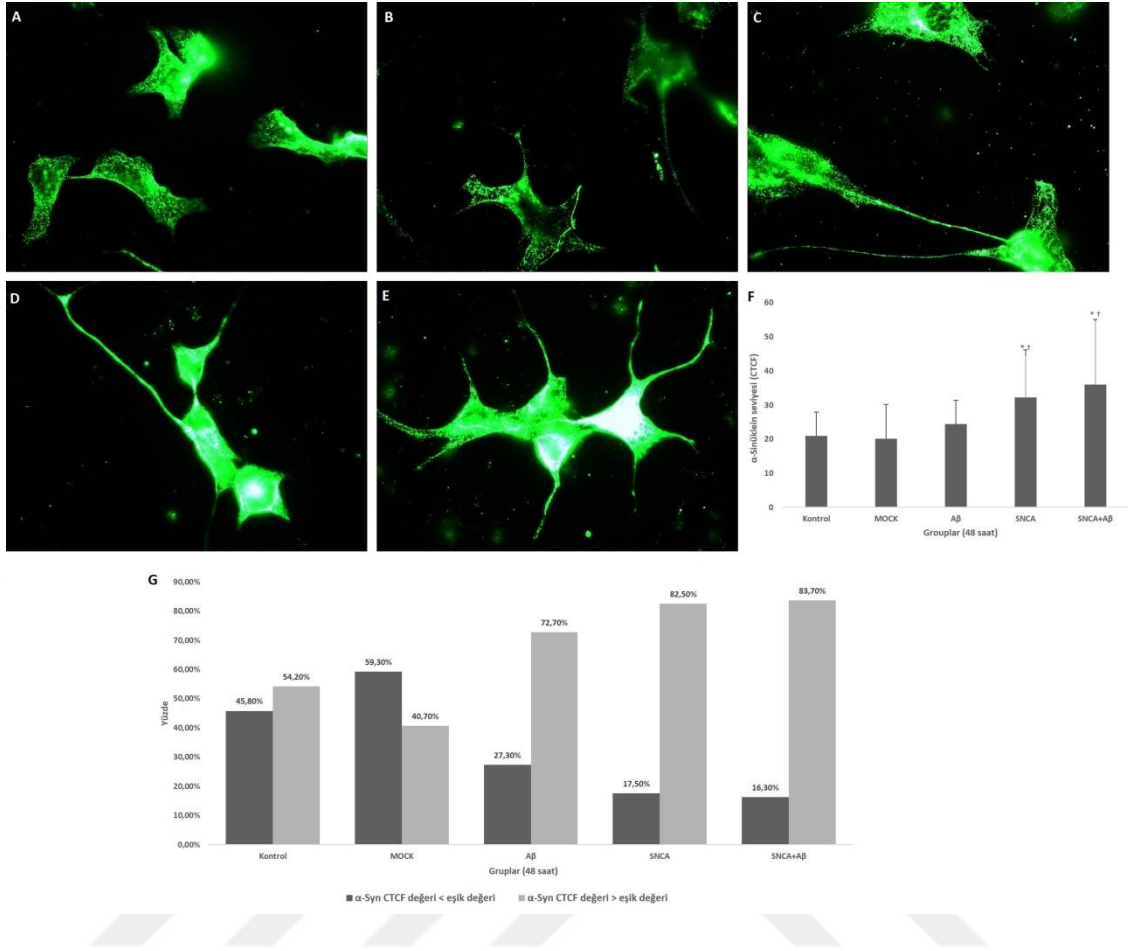


Şekil 4-2: Plazmid DNA'sının agaroz jel elektroforezinde gösterilmesi.

1ve 5. 100 baz çiftlik DNA belirteci. 2 ve 3. MOCK plazmid DNA'ları 4.SNCA plazmid DNA'sı(420 bp)

4.1.2. İnsan SH-SY5Y Hücrelerinin SNCA Genini İçeren Plazmid ile Transfeksiyonu

Kültüre edilmiş insan SH-SY5Y Hücrelerinin SNCA genini içeren plazmid ile transfeksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği, α -syn antikoruyla immünfloresan işaretleme yöntemi kullanılarak gösterildi. İmmünfloresan işaretleme sonuçlarına göre plazmid transfeksiyonunun 48. saatte başarılı bir şekilde gerçekleştiği saptandı (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: İnsan SH-SY5Y hücre kültüründe SNCA plazmid transfeksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğinin gösterilmesi.

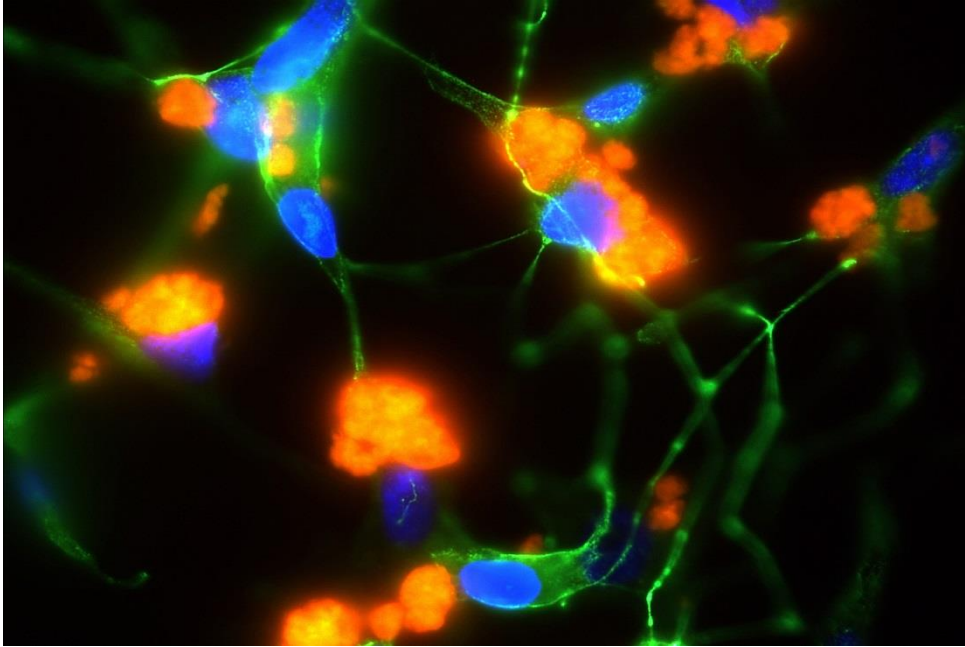
İnsan SH-SY5Y hücrelerinde SNCA plazmid transfeksiyonun 48.saatte başarılı bir şekilde gerçekleştiği immün işaretleme yapılarak gösterilmiştir. A:Kontrol grubu, B:MOCK+PBS grubu, C: Aβ 1-42 grubu, D:SNCA, E: SNCA+Aβ. DAPI (mavi) ve α-syn (yeşil) boyaması. Büyütme 100x. F:Gruplar arasında α-sinükleinin immün sinyal yoğunluğunun değerlendirilmesi. SNCA grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır($p<0.01$). SNCA+Aβ grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). SNCA grubunda MOCK+PBS grubuna göre anlamlı derecede artmıştır($p<0.001$). SNCA+Aβ grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.001$). *SNCA grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede değişmiştir. † SNCA grubunda MOCK+PBS grubuna göre anlamlı derecede değişmiştir. G:Gruplar arasındaki transfeksiyon yüzdesinin değerlendirilmesi. SNCA grubunda α-sinükleini aşırı eksprese eden hücrelerin yüzdesi % 82.5 SNCA+Aβ grubunda ise % 83.7 olarak belirlendi.

α-sinüklein ekspresyonunun ne oranda arttığını belirlemek üzere anti-α-sinüklein antikoru ile işaretlenmiş grupların CTCF değerleri kullanılmıştır. MOCK+PBS grubunun anti-α-sinüklein işaretlemesine ait CTCF değerlerinin % 95 güven aralığının (CI) üst değeri eşik değeri olarak dikkate alınmıştır. MOCK grubunun üst eşik değerinden daha yüksek seviyede CTCF değerine sahip olan SNCA grubuna ait hücrelerin yüzdesi 82.5'dur. Dolayısıyla SNCA grubunda α-sinükleini aşırı eksprese

eden hücrelerin yüzdesi %82.5; SNCA+A β grubunda ise bu hücrelerin yüzdesi % 83.7 olarak belirlendi.

4.1.3. İnsan SH-SY5Y Hücrelerinde A β Varlığının Gösterilmesi

Nörona farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinde α -sinüklein aşırı ekspresyonu takiben amiloid betanın uygulandığı SNCA+A β grubunda α -sinüklein ve A β 1-42, sırasıyla immün işaretleme ve Kongo kırmızısı boyaması ile gösterilmiştir (Şekil 4-4).

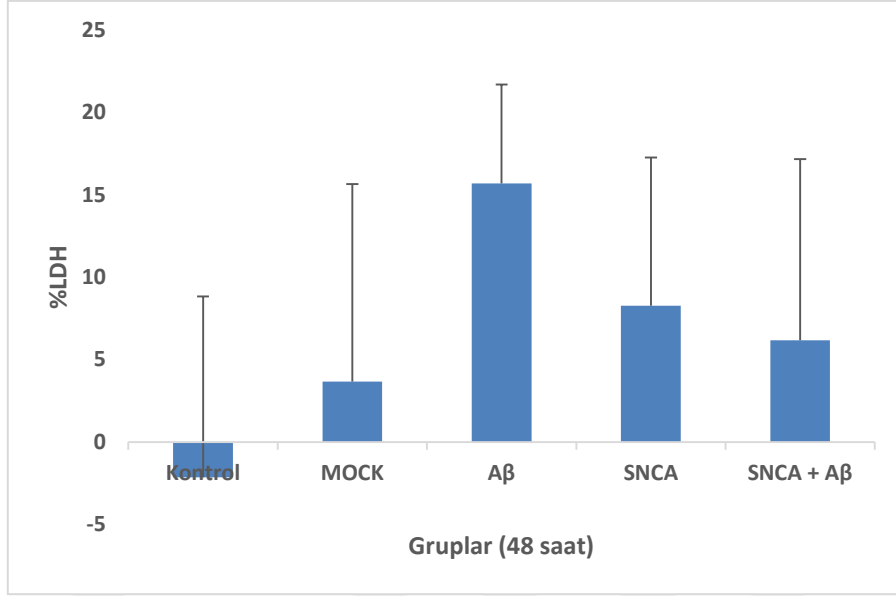


Şekil 4-4: İnsan SH-SY5Y hücrelerinde A β plakların gösterilmesi

Nörona farklılaştırılmış insan SH-SY5Y hücrelerinde α -sinüklein'in anti- α -sinüklein antikoru ile immunfloresan işaretleme ve amiloid beta 1-42'nin Kongo kırmızısı ile boyanması görülmektedir. α -sinüklein (yeşil), amiloid beta 1-42 (turuncu), nükleus (DAPI-mavi). Büyütme 100X.

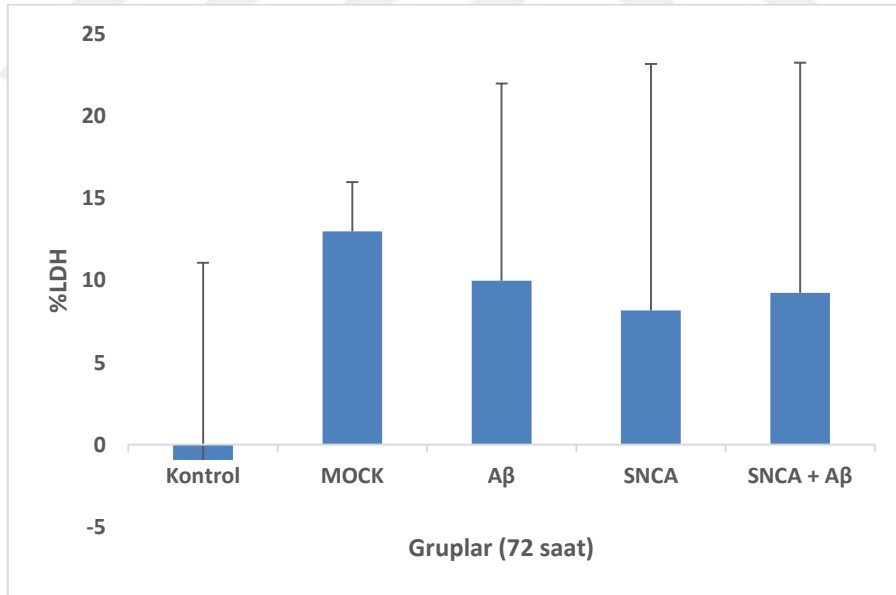
4.2. Sitotoksikite Ölçüm Sonuçları

İnsan SH-SY5Y kültürüne 48 ve 72 saat süreyle yapılan α -sinüklein aşırı ekspresyonu ve A β uygulaması sonucu ortaya çıkan sitotoksik etki, kültür ortamına salınan LDH miktarı ölçülerek saptandı. Grupların LDH salınım miktarlarındaki değişiklikler, gruplara ait ortalama LDH salınım değerleri ve gruplar arasındaki farkların istatistiksel karşılaştırmaları aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 4-5: 24 saat SNCA plazmid uygulanmış farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültürüne ait tüm grupların 48. saatteki LDH miktarları.

Kontrol grubu LDH salınımı % 0 olarak kabul edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel açıdan yakın anlamlılık bulunmaktadır($p=0.09$).



Şekil 4-6: 24 saat süreyle plazmid uygulanmış farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre kültürüne ait tüm grupların 72. saatteki LDH miktarları.

Kontrol grubu LDH salınımı % 0 olarak kabul edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamaktadır($p>0.05$).

4.3. Ray Biotech C-Series Human InflammationAntibody Array C3 Analizleri

Nörona farklılaştırılmış insan SH-SY5Y kültüründe Aβ1-42 uygulaması, SNCA transfeksiyonundan 48 saat ve 72 saat sonra tüm gruplardan elde edilen üst sıvı

örneklerinde, Ray Biotech C-Series Human Inflammation Antibody Array C-3 analizleri gerçekleştirildi.

Gruplar:

1-Kontrol grubu: Herhangi bir uygulama yapılmamış, diğer gruplar ile aynı anda medyumunu serum içermeyen medyum ile değiştirilmiş insan SH-SY5Y hücre kültürü

2- MOCK+PBS grubu: Plazmidin hücreye girişinin sebep olabileceği mimikri ve inhibitör/aktivatör etkiler ile gerçek etki arasındaki ayrımı yapmak üzere kullanılan, herhangi bir gen içermeyen DDK kuyruklu plazmid ile transfekte edilmiş ve amiloid betanın çözündürüldüğü PBS içeren insan SH-SY5Y kültürü, negatif kontrol grubu

3- SNCA grubu: Parkinson hastalığı benzeri model oluşturmak üzere SNCA genini taşıyan DDK kuyruklu plazmid ile transfekte edilmiş insan SH-SY5Y hücre kültürü

4- A β grubu: Alzheimer hastalığı benzeri model oluşturmak üzere 6 μ M A β 1-42 uygulaması yapılmış insan SH-SY5Y hücre kültürü

5- α -sinüklein aşırı üretimi yapılan SH-SY5Y hücrelerine A β uygulaması yapılan grup: İnsan SNCA plazmidi uygulandıktan 24 saat sonra 6 μ M A β 1-42 uygulaması yapılarak DLB benzeri hastalık modeli oluşturulan insan SH-SY5Y hücre kültürü

Tüm grupların medyumları transfeksiyondan 24 saat önce serum içermeyen medyum ile değiştirilmiştir. Hücreler A β 1-42, SNCA plazmidi ve MOCK plazmidi ile 24 saat boyunca transfekte edilmiştir. 24 saat sonra tüm medyum taze, serum içermeyen medyum ile değiştirilmiş ve 48. ve 72.saatte üst sıvılar toplanmıştır. Gruplara ait sonuçlar aşağıda gösterilmektedir.

Gruplara ait genel inflamatuvar protein profilinin belirlenmesi

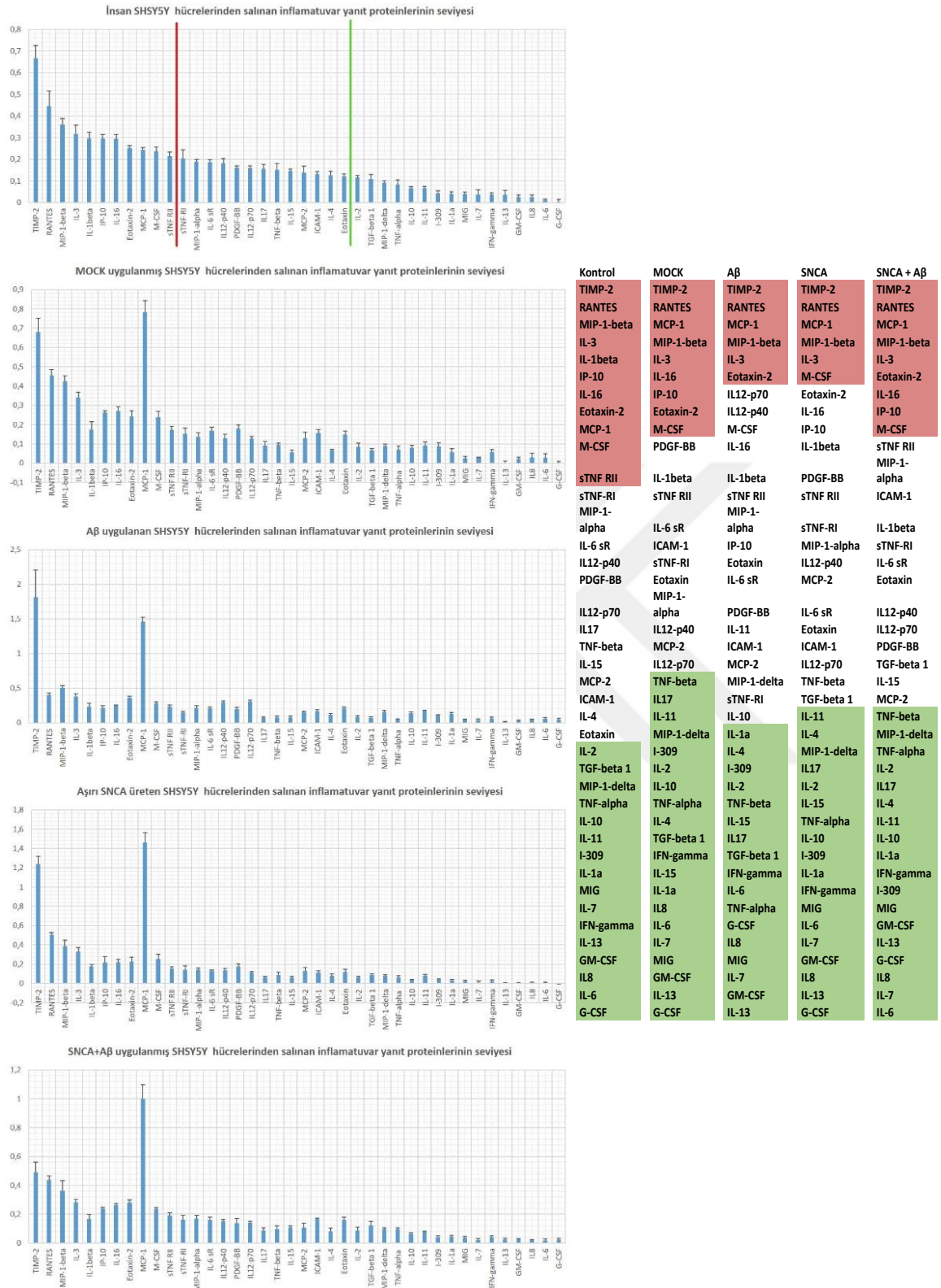
Herhangi bir uygulama yapılmayan nörona farklılaştırılmış insan SH-SY5Y hücrelerinde kültür üst sıvısına salınan inflamatuvar protein seviyeleri arasında en yüksek seviyenin 48.saatte RANTES'e 72.saatte ise TIMP-2'ye ait olduğu, en düşük seviyenin ise 48.saatte G-CSF'ye 72.saatte ise IL-6 ya ait olduğu görülmüştür. MOCK plazmid+PBS uygulaması yapılan nörona farklılaştırılmış insan SH-SY5Y hücrelerinde kültür üst sıvısına salınan inflamatuvar protein seviyeleri arasında en yüksek seviyenin 48.saatte TIMP2'ye 72.saatte MCP-1'e en düşük seviyenin ise 48.saatte ve 72.saatte G-

CSF'ye ait olduğu görülmüştür. Amiloid beta 1-42 uygulaması yapılan nörona farklılaştırılmış insan SH-SY5Y hücrelerinde kültür üst sıvısına salınan inflamatuvar protein seviyeleri arasında en yüksek seviyenin 48.saatte TIMP-2'ye 72.saatte ise MCP-1'e ait olduğu, en düşük seviyenin ise 48.saatte IL-13'e 72.saatte G-CSF'ye ait olduğu görülmüştür.

α -sinükleini aşırı üreten nörona farklılaştırılmış insan SH-SY5Y hücrelerinde inflamatuvar protein seviyeleri arasında en yüksek seviyenin 48. ve 72.saatte MCP-1'e ait olduğu, en düşük seviyenin ise 48.saatte G-CSF'ye 72.saatte ise IL-6'ya ait olduğu görülmüştür.

SNCA+A β 1-42 uygulanan nörona farklılaştırılmış insan SH-SY5Y hücrelerinde inflamatuvar protein seviyeleri arasında en yüksek seviyenin 48.saatte TIMP-2'ye 72.saatte MCP-1'e ait olduğu, en düşük seviyenin ise 48.saatte IL-7'ye, 72.saatte IL-6'ya ait olduğu görülmüştür.

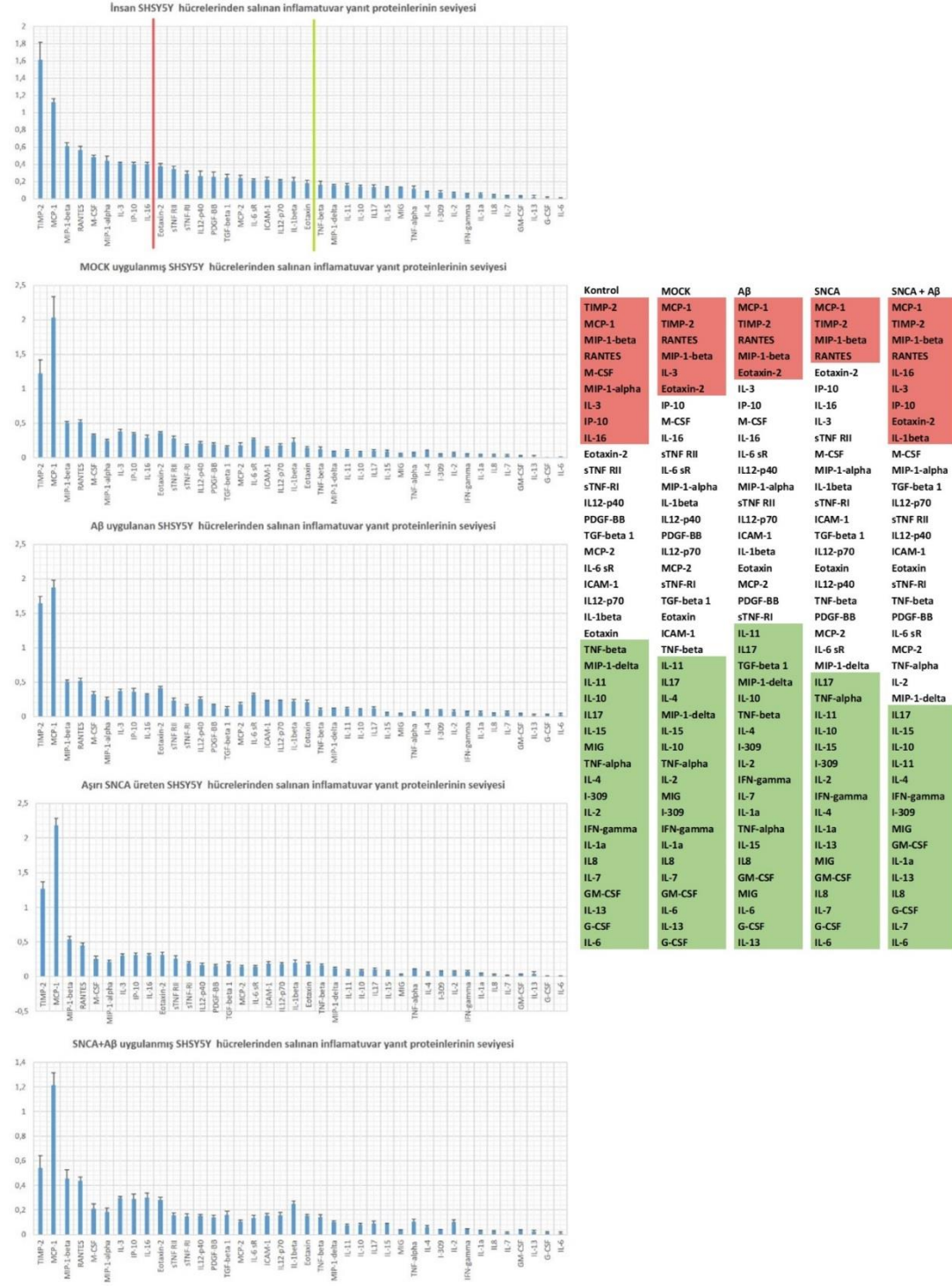
Herhangi bir uygulama yapılmayan SH-SY5Y hücrelerinden salınan inflamatuvar protein profili ve bu profilin A β uygulaması, SNCA aşırı ekspresyonu, SNCA+ A β uygulaması ile nasıl değiştirdiği Şekil 4-7 ve Şekil 4-8 de gösterilmiştir.



Şekil 4-7: SH-SY5Y hücrelerinden 48.saatte salınan inflamatuvar protein profili ve Aβ uygulaması, SNCA aşırı ekspresyonu, SNCA+ Aβ uygulamasının bu profil üzerine etkisi

Herhangi bir uygulama yapılmayan SH-SY5Y hücrelerinden salınan inflamatuvar protein profili ve bu profilin Aβ uygulaması, SNCA aşırı ekspresyonu, SNCA+ Aβ uygulaması ile nasıl değiştirdiği gösterilmiştir. 5 grupta da

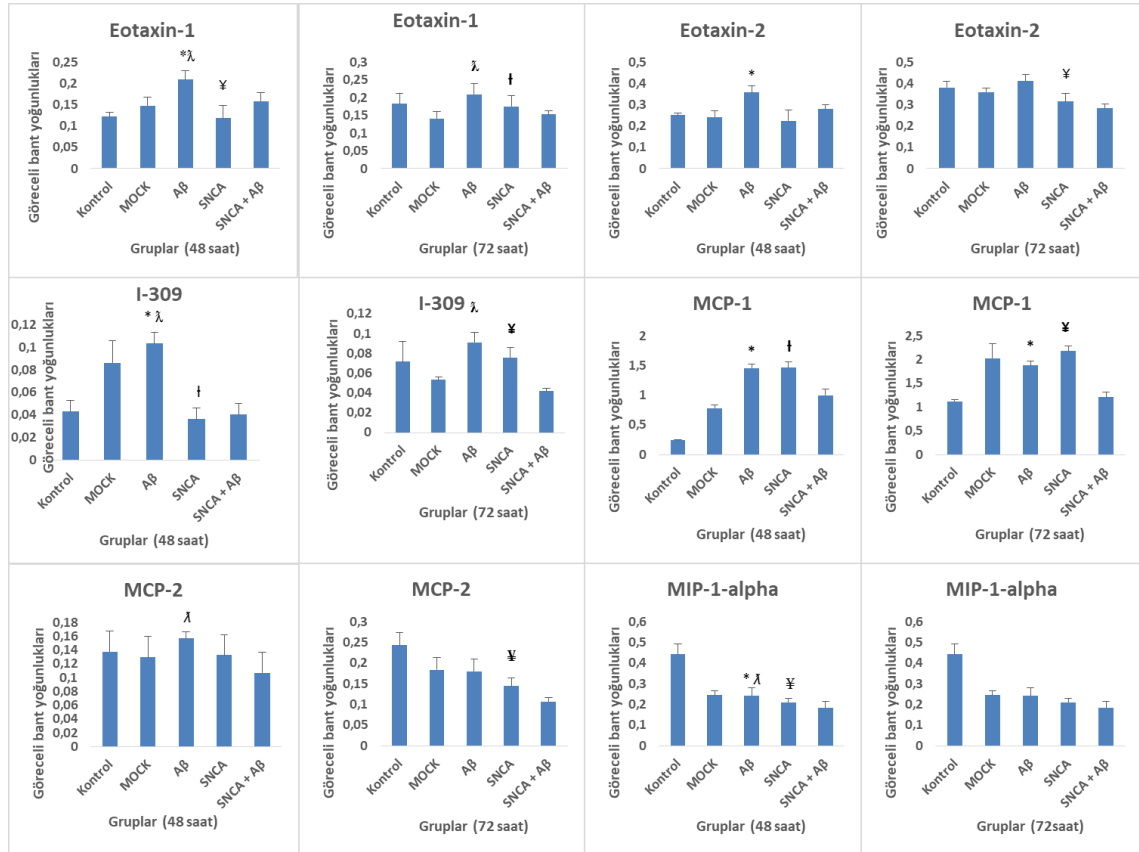
belirlenen %95 CI değerleri dikkate alınarak salınan inflamatuvar proteinler için bir eşik değeri belirlenmiştir. Kırmızı renk yüksek eşik değerinin üstünde salınan proteinleri, beyaz renk ortalama değerlerde salınan proteinleri, yeşil renk ise düşük eşik değerinin altında salınan proteinleri göstermektedir. (Kontrol grubu, Mean: 0.1627 ± 0.3462 %95 CI 0.1200-0.2054; MOCK+PBS grubu, Mean: 0.1626 ± 0.3462 %95 CI 0.1085-0.2168; A β grubu, Mean: 0.2401 ± 0.3462 %95 CI 0.1294- 0.3509; SNCA grubu, Mean: 0.1807 ± 0.2942 %95 CI 0.08659-0.2748; SNCA+A β grubu Mean: 0.1630 ± 0.1760 %95 CI 0.1068- 0.2193).



Şekil 4-8: SH-SY5Y hücrelerinden 72. saatte salınan inflamatuvar protein profili ve A β uygulaması, SNCA aşırı ekspresyonu, SNCA+ A β uygulamasının bu profil üzerine etkisi

Herhangi bir uygulama yapılmayan SH-SY5Y hücrelerinden salınan inflamatuvar protein profili ve bu profilin A β uygulaması, SNCA aşırı ekspresyonu, SNCA+ A β uygulaması ile nasıl değiştirdiği gösterilmiştir. 5 grupta da belirlenen %95 CI değerleri dikkate alınarak salınan inflamatuvar proteinler için bir eşik değeri belirlenmiştir. Kırmızı renk yüksek eşik değerinin üstünde salınan proteinleri, beyaz renk ortalama değerlerde salınan proteinleri, yeşil renk ise düşük eşik değerinin altında salınan proteinleri göstermektedir. (Kontrol grubu, Mean: 0.2682 ± 0.3045 %95 CI 0.1708-0.3656; MOCK+PBS grubu, Mean: 0.2392 ± 0.3597 %95 CI 0.1241 -0.3543; A β grubu, Mean: 0.2570 ± 0.3736 %95 CI 0.1375 -0.3765; SNCA grubu, Mean: 0.2332 ± 0.3806 %95 CI 0.1114 -0.3549; SNCA+A β grubu Mean: 0.1674 ± 0.2039 %95 CI 0.1013- 0.2335).

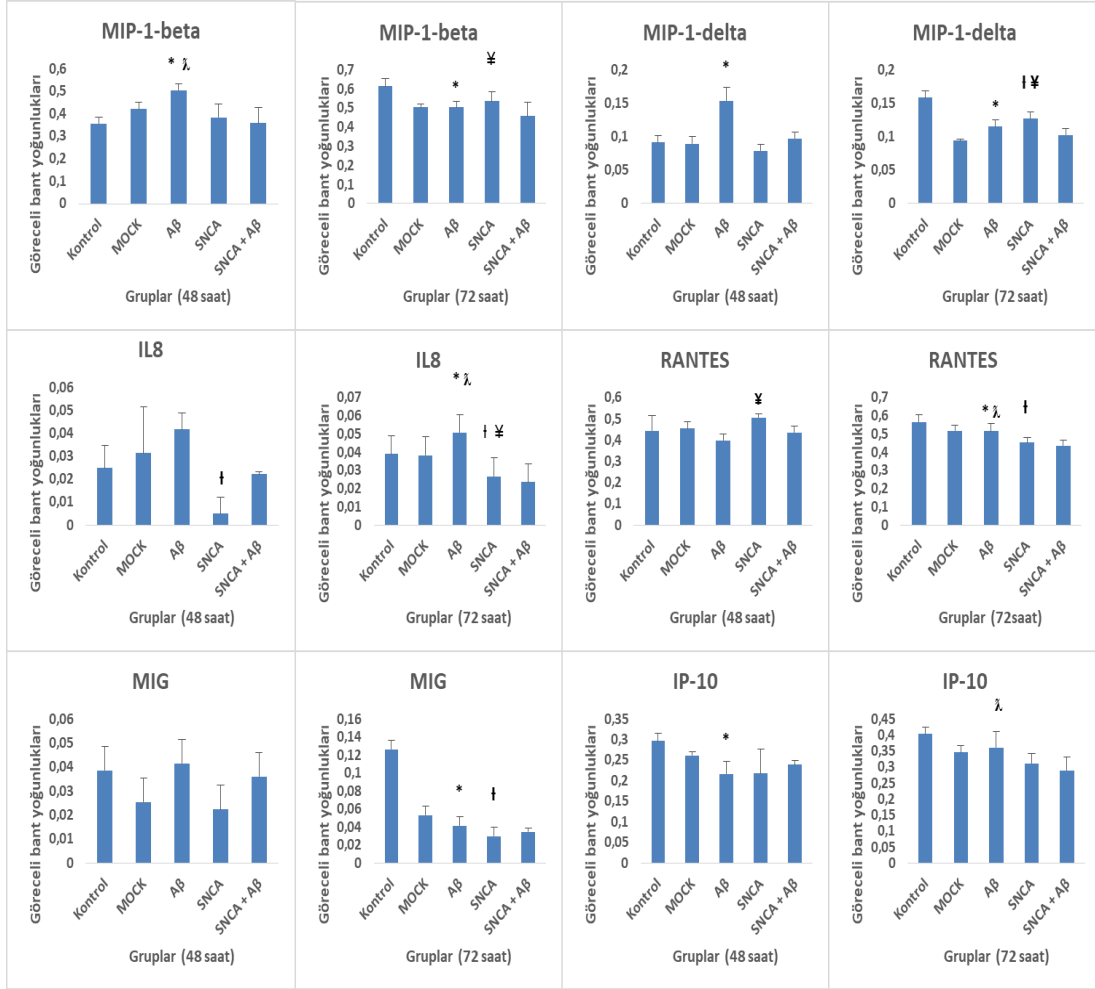
A β ve/veya SNCA plazmidi uygulaması sonucu salınan inflamatuvar proteinlerinin seviyelerinin 48 ve 72. saatte gruplar arasındaki değişimleri



Şekil 4-9: Kemokinler-1

Herhangi bir uygulama yapılmamış (Kontrol), α -sinüklein aşırı ekspresyonu sağlanmış (SNCA), sadece boş plazmid ile transfecte edilmiş (MOCK+PBS), Amiloid beta uygulanmış(A β), α -sinüklein aşırı ekspresyonu ve A β uygulanmış(SNCA+ A β) insan SH-SY5Y hücre kültürlerindeki değişimleri görülmektedir. **Eotaxin-1: 48 saat;** Eotaxin-1 seviyesi A β grubunda ve SNCA+ A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p < 0.001$, $p < 0.01$, sırasıyla). A β grubunda SNCA ve SNCA+A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p < 0.001$, $p < 0.001$, sırasıyla). SNCA+ A β grubunda SNCA grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p < 0.01$). **Eotaxin-1: 72 saat;** Eotaxin-1 seviyesi Kontrol grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p < 0.01$). A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p < 0.001$). SNCA grubunda

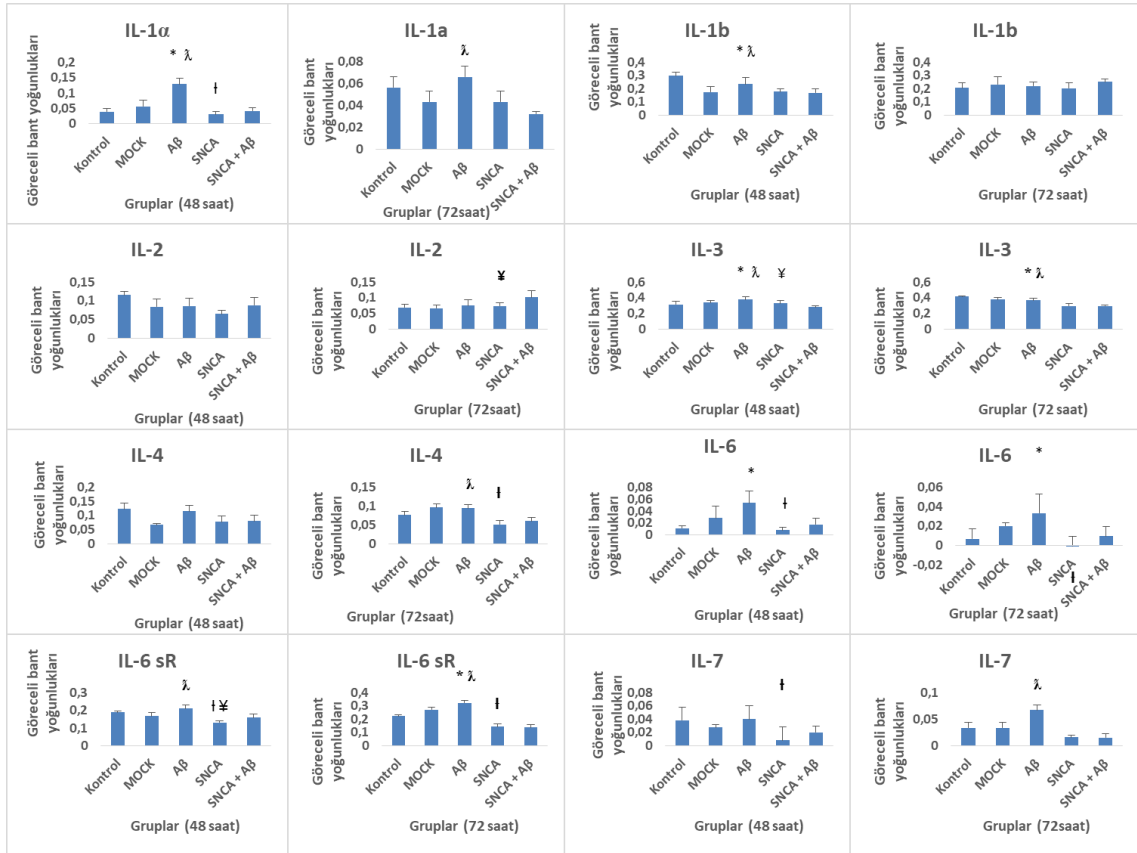
MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.05$). A β grubunda SNCA grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.05$). A β grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.001$). **Eotaxin-2: 48 saat;** Eotaxin-2 seviyesi A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.01$). A β grubunda SNCA grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.001$). **Eotaxin-2: 72 saat;** Eotaxin-2 seviyesi SNCA+ A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.01$). SNCA+ A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). A β grubunda SNCA grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.01$). SNCA grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). **I-309: 48 saat;** I-309 seviyesi Kontrol grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). SNCA grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.01$). A β grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). **I-309: 72 saat;** I-309 seviyesi 72.saatte A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.01$). I-309 seviyesi A β grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.001$). I-309 seviyesi SNCA grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.01$). **MCP-1: 48.saatte** A β ve SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.001$, ($p<0.001$,sırasıyla). SNCA+ A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.05$). SNCA grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.01$). **MCP-1: 72.saatte** MOCK+PBS grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.01$). A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.05$). SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). SNCA grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). **MCP-2: 48.saatte** A β grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.01$). **MCP-2: 72.saatte** SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.01$). SNCA+A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.001$). A β grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.01$). **MIP-1 α : 48.saat;** MOCK+PBS ve SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.001$). A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). SNCA+ A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.05$). A β grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.001$).SNCA grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.05$). **MIP-1 alfa 72.saatte** SNCA ve SNCA+ A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.001$, $p<0.001$). SNCA+ A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.05$).* A β grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede değişmiştir. † α -sinüklein grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede değişmiştir. ‡ A β grubunda α -sinüklein+A β grubuna göre anlamlı derecede değişmiştir. § α -sinüklein grubunda α -sinüklein+A β grubuna göre anlamlı derecede değişmiştir.



Şekil 4-10: Kemokinler-2

Herhangi bir uygulama yapılmamış (Kontrol), α -sinüklein aşırı ekspresyonu sağlanmış (SNCA), sadece boş plazmid ile transfekte edilmiş (MOCK+PBS), Amiloid beta uygulanmış(Aβ), α -sinüklein aşırı ekspresyonu ve Aβ uygulanmış(SNCA+ Aβ) insan SH-SY5Y hücre kültürlerindeki değişimleri görülmektedir. **MIP-1 beta: 48 saat;** MIP-1 beta seviyesi Aβ grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). MIP-1 beta seviyesi Aβ grubunda SNCA+ Aβ grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). **MIP-1 beta: 72 saat;** MOCK ve Aβ grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.001$, $p<0.001$). SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.01$). SNCA+ Aβ grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.001$). SNCA grubunda SNCA+ Aβ grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). **MIP-1 delta: 48 saat;** MIP-1 delta seviyesi Aβ grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). **MIP-1 delta: 72 saat;** MIP-1 delta seviyesi MOCK+PBS, Aβ, SNCA ve SNCA+Aβ gruplarında Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, sırasıyla). MOCK+PBS grubunda Aβ grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). SNCA grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). SNCA grubunda SNCA+Aβ grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). **IL-8: 48 saat;** IL-8 seviyesi SNCA grubunda Mock grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.01$). IL-8 seviyesi SNCA grubunda Aβ grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$). **IL-8: 72 saat;** IL-8 seviyesi Aβ grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). IL-8 seviyesi SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.05$). IL-8 seviyesi SNCA+Aβ grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede anlamlı derecede azalmıştır($P<0.01$). IL-8 seviyesi Aβ grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). IL-8 seviyesi SNCA grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.05$). IL-8 seviyesi SNCA+ Aβ grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.01$). IL-8 seviyesi SNCA ve Aβ grubunda SNCA+ Aβ grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). **RANTES: 48 saat;** RANTES seviyesi SNCA grubunda Aβ grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). RANTES seviyesi SNCA grubunda SNCA+ Aβ grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.05$). **RANTES: 72 saat;** RANTES seviyesi MOCK+PBS ve Aβ grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$, $p<0.05$). SNCA ve SNCA +Aβ gruplarında Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.001$, $p<0.001$). SNCA grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.01$). SNCA+ Aβ grubunda MOCK+PBS grubuna

kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$). A β grubunda SNCA grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). **MIG: 48 saat;** MIG seviyesi Kontrol grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). MIG seviyesi SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). **MIG 72 saat;** MIG seviyesi A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). MIG seviyesi SNCA ve SNCA+ A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$, $p<0.001$). MIG seviyesi SNCA grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.01$). **IP-10: 48 saat;** IP-10 seviyesi A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$). IP-10 seviyesi SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). IP-10 seviyesi SNCA+A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.01$). **IP-10: 72 saat;** IP-10 seviyesi SNCA ve SNCA+ A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$, $p<0.001$, sırasıyla). IP-10 seviyesi SNCA+A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). IP-10 seviyesi A β grubunda SNCA grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). IP-10 seviyesi A β grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$).).* A β grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede değişmiştir. † a-sinüklein grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede değişmiştir. ‡ A β grubunda a-sinüklein+A β grubuna göre anlamlı derecede değişmiştir. § a-sinüklein grubunda a-sinüklein+A β grubuna göre anlamlı derecede değişmiştir.



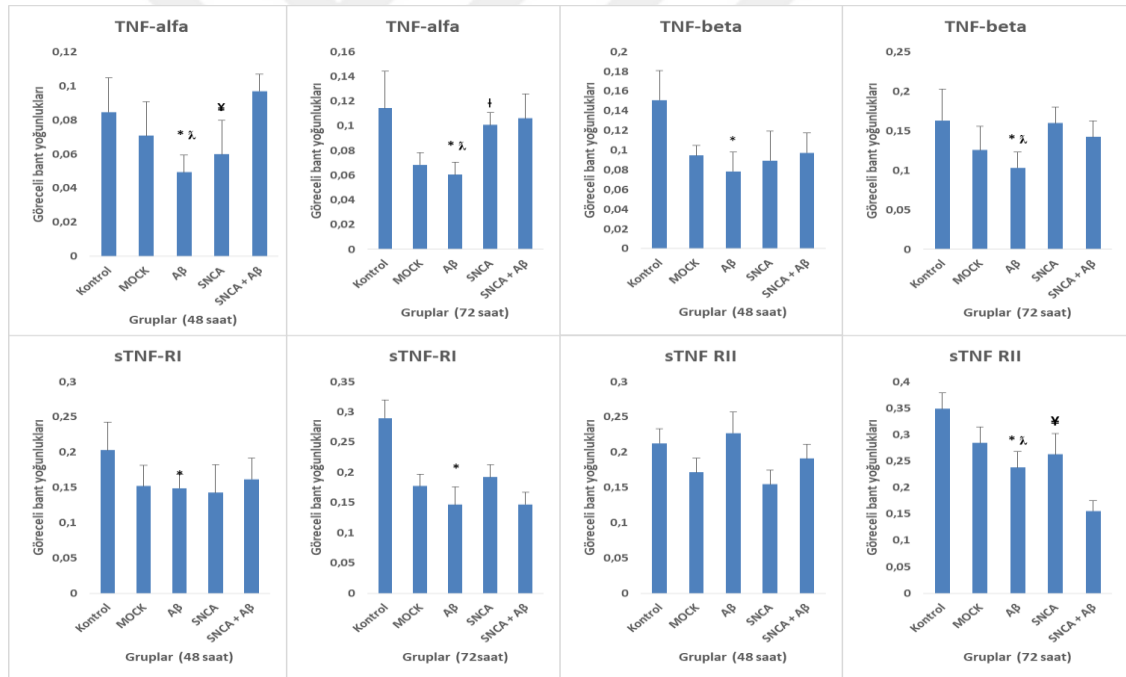
Şekil 4-11: İnterlökinler-1

Herhangi bir uygulama yapılmamış (Kontrol), α -sinüklein aşırı ekspresyonu sağlanmış (SNCA), sadece boş plazmid ile transfekte edilmiş (MOCK+PBS), Amiloid beta uygulanmış(A β), α -sinüklein aşırı ekspresyonu ve A β uygulanmış(SNCA+ A β) insan SH-SY5Y hücre kültürlerindeki değişimleri görülmektedir. **IL-1a: 48 saat;** IL-1a seviyesi A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). IL-1a seviyesi SNCA grubunda MOCK grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). IL-1a seviyesi A β grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). **IL-1a: 72 saat** IL-1a seviyesi SNCA+A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$). IL-1a seviyesi A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). IL-1a seviyesi A β grubunda SNCA grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). IL-1a seviyesi A β grubunda SNCA+A β grubunda anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). **IL-1b: 48 saat;** IL-1b seviyesi Kontrol grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). IL-1b seviyesi A β ve SNCA+ A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$, $p<0.001$). IL-1b seviyesi Kontrol grubunda SNCA grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). IL-1b seviyesi A β grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). **IL-1b: 72 saat;** Gruplar arasında anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır ($p>0.05$). **IL-2: 48 saat;** Salınan IL-2 seviyesi SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$). **IL-2: 72 saat;** IL-2 seviyesi SNCA+ A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı

derecede artmıştır($p<0.05$). IL-2 seviyesi SNCA+ A β grubunda MOCK grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.01$). IL-2 seviyesi SNCA grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.05$).

IL-3: 48 saat; IL-3 seviyesi A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.01$). IL-3 seviyesi A β grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.001$). IL-3 seviyesi SNCA grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). **IL-3: 72 saat** IL-3 seviyesi A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.05$). IL-3 seviyesi SNCA ve SNCA+ A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.001$, $p<0.001$,sırasıyla). IL-3 seviyesi SNCA ve SNCA+ A β grubunda MOCK +PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.001$, $p<0.001$,sırasıyla). IL-3 seviyesi A β grubunda SNCA ve SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.001$, $p<0.001$). **IL-4: 48 saat;** IL-4 seviyesi MOCK+PBS grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.001$). IL-4 seviyesi SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.01$). IL-4 seviyesi SNCA+ A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). **IL-4: 72 saat;** IL-4 seviyesi MOCK+PBS ve A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.05$, $p<0.05$, sırasıyla). IL-4 seviyesi SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.01$). IL-4 seviyesi SNCA ve SNCA+ A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$, $p<0.001$,sırasıyla). IL-4seviyesi A β grubunda SNCA ve SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$, $p<0.001$,sırasıyla). **IL-6: 48 saat;** seviyesi A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). IL-6 seviyesi SNCA grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$).IL-6 seviyesi A β grubunda SNCA grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). **IL-6: 72 saat;** IL-6 seviyesi A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.05$). IL-6 seviyesi SNCA grubunda MOCK+PBS grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır($p<0.05$). IL-6 seviyesi A β grubunda SNCA grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). **IL-6R: 48 saat;** IL-6R seviyesi SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.001$). IL-6R seviyesi SNCA+ A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.01$). IL-6R seviyesi SNCA grubunda MOCK grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$). IL-6R seviyesi A β grubundaSNCA grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). IL-6R seviyesi A β grubunda SNCA+A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.001$). Salınan IL-6R seviyesi SNCA grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.05$). **IL-6R: 72 saat;** IL-6R seviyesi MOCK+PBS ve A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$, $p<0.001$,sırasıyla). IL-6R seviyesi SNCA ve SNCA+A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.001$, $p<0.001$,sırasıyla). IL-6R seviyesi A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). IL-6R seviyesi SNCA grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$). IL-6R seviyesi SNCA+A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$). IL-6R seviyesi A β grubunda SNCA ve SNCA+A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.001$, $p<0.001$,sırasıyla). **IL-7: 48 saat;** IL-7 seviyesi SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.01$). IL-7 seviyesi SNCA grubunda Mock grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). **IL-7: 72 saat** IL-7 seviyesi A β grubunda SNCA ve SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$, $p<0.001$,sırasıyla).*A β grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede değişmiştir. † a-sinüklein grubu MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede değişmiştir. ‡ A β grubunda a-sinüklein+A β grubuna göre anlamlı derecede değişmiştir. § a-sinüklein grubunda a-sinüklein+A β grubuna göre anlamlı derecede değişmiştir.

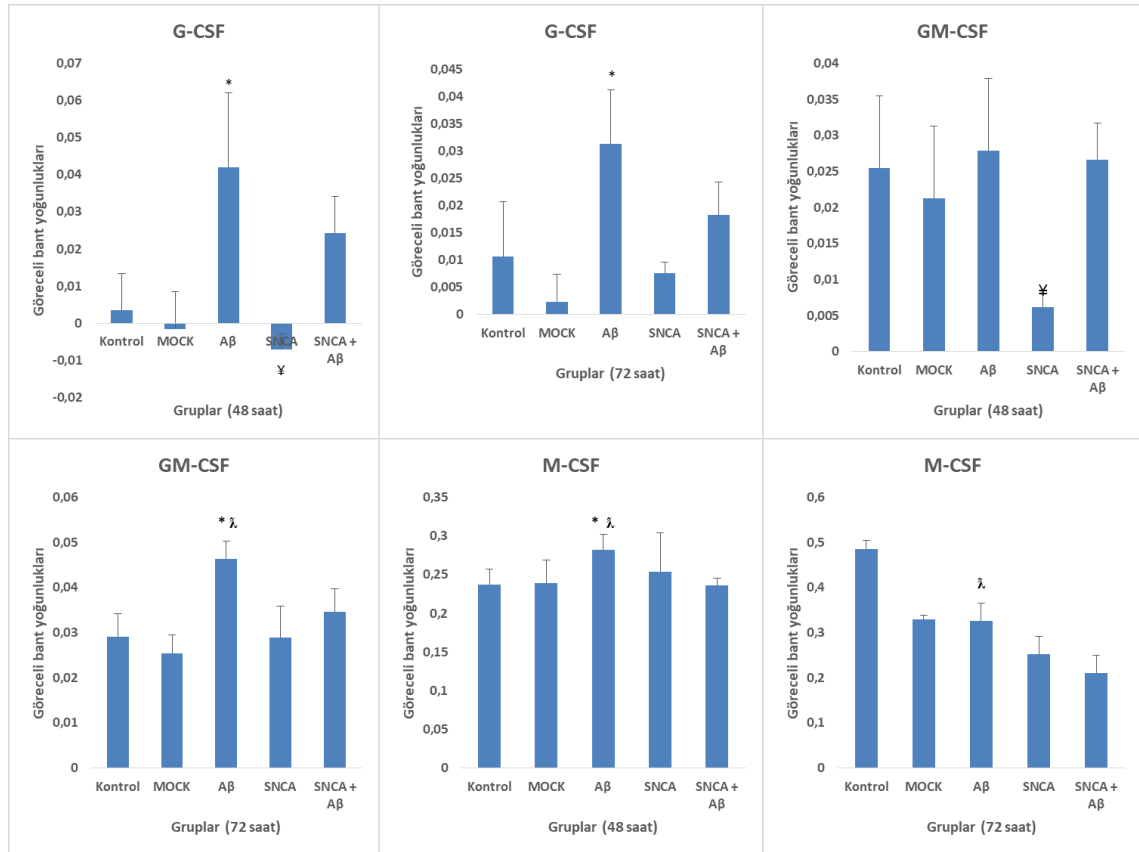
anlamli derecede azalmiştir (p<0.01). IL-13 seviyesi SNCA grubunda SNCA+ Aβ grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir(p<0.01). **IL-13: 72 saat;** IL-13 seviyesi SNCA grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamli derecede artmiştir(p<0.05). **IL-15: 48 saat;** IL-15 seviyesi MOCK+PBS, Aβ, SNCA ve SNCA+ Aβ grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir (p<0.001, p<0.001, p<0.001, p<0.001 sırasıyla). IL-15 seviyesi SNCA+Aβ grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamli derecede artmiştir (p<0.001). IL-15 seviyesi Aβ grubunda SNCA+Aβ grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir (p<0.001). IL-15 seviyesi SNCA grubunda SNCA+Aβ grubunda kıyasla anlamli derecede azalmiştir (p<0.001). **IL-15: 72 saat;** IL-15 seviyesi SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir (p<0.05). IL-15 seviyesi Aβ grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir (p<0.001). IL-15 seviyesi Aβ grubunda SNCA+ Aβ grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir(p<0.05). **IL-16: 48 saat;** IL-16 seviyesi Aβ grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir(p<0.01). IL-16 seviyesi SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir(p<0.001). IL-16 seviyesi SNCA grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir (p<0.01). *Aβ grubunda Kontrol grubuna göre anlamli derecede değişmiştir **IL-16: 72 saat;** IL-16 seviyesi SNCA+PBS grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir (p<0.001). IL-16 seviyesi Aβ grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir (p<0.05). SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir (p<0.01). IL-16 seviyesi SNCA+ Aβ grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir(p<0.01). **IL-17: 48 saat;** IL-17 seviyesi MOCK+PBS, Aβ, SNCA, SNCA+ Aβ grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir (p<0.001). IL-17 seviyesi SNCA grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir (p<0.05). **IL-17: 72 saat;** IL-17seviyesi MOCK+PBS grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir (p<0.05). IL-17 seviyesi SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir (p<0.05). SNCA+ Aβ grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir (p<0.001). IL-17 seviyesi Aβ grubunda SNCA+ Aβ grubuna kıyasla anlamli derecede artmiştir (p<0.05).*Aβ grubunda Kontrol grubuna göre anlamli derecede değişmiştir. † α-sinüklein grubu MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamli derecede değişmiştir. ‡ Aβ grubunda α-sinüklein+Aβ grubuna göre anlamli derecede değişmiştir. § α-sinüklein grubunda α-sinüklein+Aβ grubuna göre anlamli derecede değişmiştir



şekil 4-13: Tümr Nekroz Ailesi ve Reseptörleri

Herhangi bir uygulama yapılmamış (Kontrol), α-sinüklein aşırı ekspresyonu sağlanmış (SNCA), sadece boş plazmid ile transfekte edilmiş (MOCK+PBS), Amiloid beta uygulanmış(Aβ), α-sinüklein aşırı ekspresyonu ve Aβ uygulanmış (SNCA+Aβ) insan SH-SY5Y hücre kültürlerindeki değişimleri görölmektedir. **TNF alfa: 48 saat;** TNF alfa seviyesi Aβ grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir (p<0.05). Aβ grubunda SNCA+ Aβ grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir(p<0.001). TNF alfa seviyesi SNCA grubunda SNCA+Aβ grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir(p<0.05). **TNF alfa: 72 saat;** TNF-alfa seviyesi MOCK+PBS grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir(p<0.01). Aβ grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir(p<0.001). SNCA grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamli derecede artmiştir (p<0.05). SNCA+Aβ grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamli derecede artmiştir(p<0.05). Aβ grubunda SNCA grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir (p<0.01). Aβ grubunda SNCA+ Aβ grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir (p<0.01). **TNF beta: 48 saat;** TNF-beta seviyesi MOCK, Aβ, SNCA ve SNCA+ Aβ gruplarında Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir (p<0.001). **TNF beta: 72 saat;** TNF-beta MOCK+PBS grubunda Kontrol grubuna kıyasla

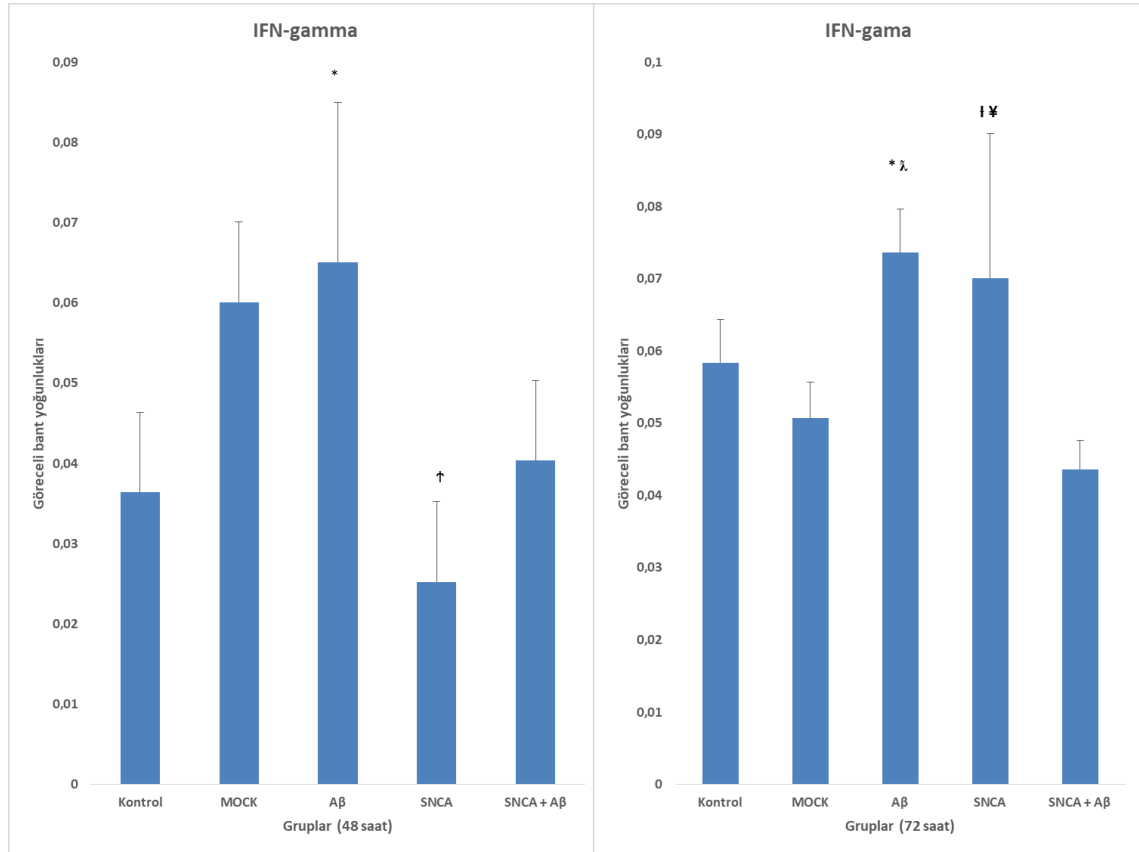
anlamli derecede azalmiştir ($p<0.05$). A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir ($p<0.001$). A β grubunda SNCA grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir ($p<0.001$). A β grubunda SNCA+A β grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir ($p<0.05$). **sTNF-RI:48 saat;** sTNF-RI seviyesi MOCK+PBS, A β ve SNCA gruplarında Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir ($p<0.05$). **sTNF-RI:72 saat;** MOCK+PBS grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir ($p<0.05$). A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir ($p<0.001$). SNCA+A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir ($p<0.001$). **sTNF-RII: 48 saat;** sTNF-RII seviyesi SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir ($p<0.01$). **sTNF-RII: 72 saat;** MOCK+PBS, A β , SNCA, SNCA+A β gruplarında Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir ($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, sırasıyla). MOCK+PBS grubunda A β grubuna kıyasla anlamli derecede artmıştır($p<0.05$). SNCA+A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamli derecede azalmiştir ($p<0.001$). A β grubunda SNCA+A β grubuna kıyasla artmıştır($p<0.001$). **A β grubunda Kontrol grubuna göre anlamli derecede değişmiştir. İa-sinüklein grubu MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamli derecede değişmiştir. İ A β grubunda a-sinüklein +A β grubuna göre anlamli derecede değişmiştir. İ a-sinüklein grubunda a-sinüklein+A β grubuna göre anlamli derecede değişmiştir.*



Şekil 4-14: Koloni Uyarıcı Faktör Ailesi

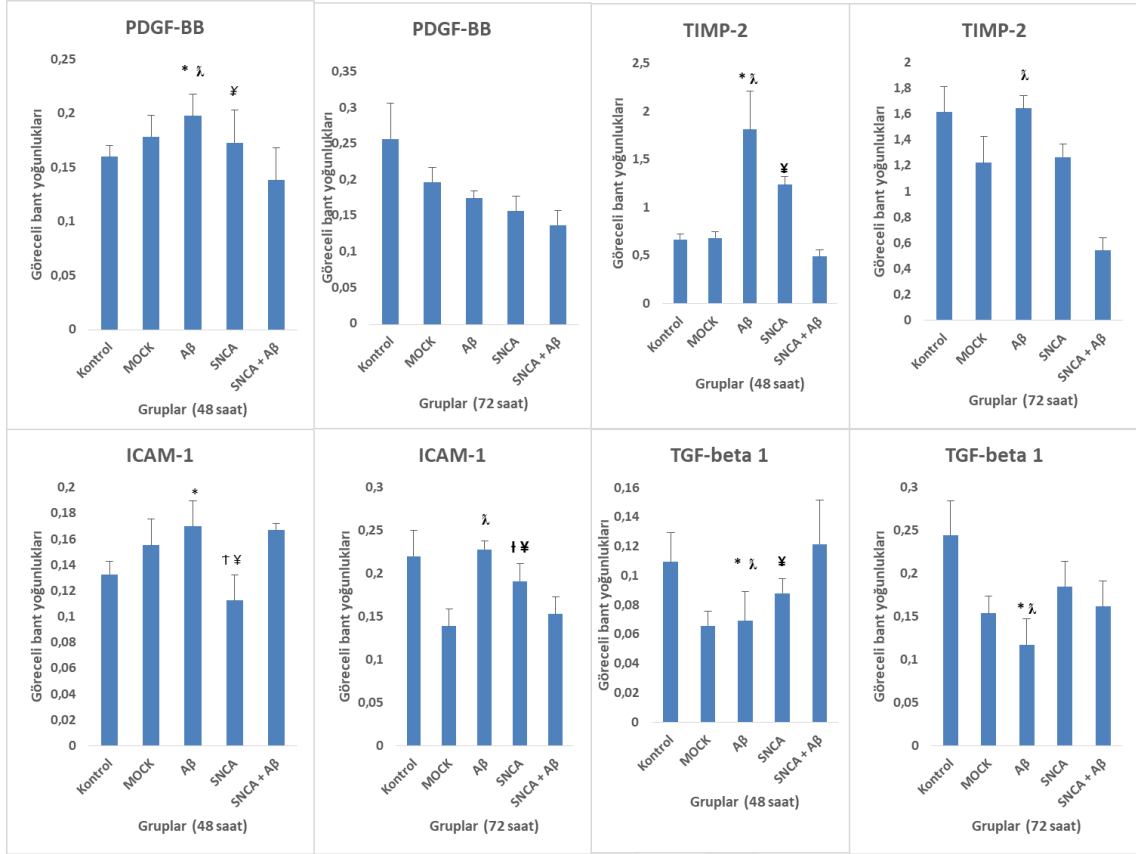
Herhangi bir uygulama yapılmamış (Kontrol), α -sinüklein aşırı ekspresyonu sağlanmış (SNCA), sadece boş plazmid ile transfekte edilmiş (MOCK+PBS), Amiloid beta uygulanmış(A β), α -sinüklein aşırı ekspresyonu ve A β uygulanmış (SNCA+A β) insan SH-SY5Y hücre kültürlerindeki değişimleri görölmektedir. **G-CSF: 48 saat;** G-CSF seviyesi A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede artmıştır ($p<0.05$). G-CSF seviyesi A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamli derecede artmıştır ($p<0.001$). Salınan G-CSF seviyesi SNCA+ A β grubunda grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamli derecede artmıştır ($p<0.05$).G-CSF seviyesi A β grubunda SNCA grubuna kıyasla anlamli derecede artmıştır ($p<0.001$). G-CSF seviyesi SNCA+A β grubunda SNCA grubuna kıyasla anlamli derecede artmıştır ($p<0.001$). **G-CSF: 72 saat;** G-CSF seviyesi A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede artmıştır ($p<0.05$). G-CSF seviyesi A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamli derecede artmıştır ($p<0.001$). G-CSF seviyesi SNCA+A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamli derecede artmıştır ($p<0.05$). G-CSF seviyesi A β grubunda SNCA grubuna kıyasla anlamli derecede artmıştır ($p<0.01$). **GM-CSF: 48 saat;** GM-CSF seviyesi SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede azalmıştır ($p<0.05$). Salınan GM-CSF seviyesi A β grubunda SNCA grubuna kıyasla anlamli derecede artmıştır ($p<0.01$) GM-CSF seviyesi SNCA grubunda SNCA+A β grubuna kıyasla anlamli derecede azalmıştır ($p<0.01$). **GM-CSF: 72 saat;** GM-CSF seviyesi A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamli derecede artmıştır ($p<0.001$). GM-CSF seviyesi A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamli derecede artmıştır ($p<0.001$). GM-CSF seviyesi SNCA+ A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamli derecede artmıştır ($p<0.01$). GM-CSF seviyesi A β grubunda SNCA ve

SNCA+A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$, $p<0.001$). **M-CSF: 48 saat;** M-CSF seviyesi A β grubunda Kontrol grubuna ve SNCA+ A β kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). Salınan M-CSF seviyesi A β grubunda SNCA+A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$, $p<0.05$ sırasıyla). **M-CSF: 72 saat;** M-CSF seviyesi SNCA ve SNCA+ A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$, $p<0.001$, sırasıyla). M-CSF seviyesi SNCA+A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.01$). M-CSF seviyesi A β grubunda SNCA+A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). *A β grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede değişmiştir. † α -sinüklein grubu MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede değişmiştir. ‡ A β grubunda α -sinüklein+A β grubuna göre anlamlı derecede değişmiştir. § α -sinüklein grubunda α -sinüklein+A β grubuna göre anlamlı derecede değişmiştir.



Şekil 4-15: İnterferon gamma

Herhangi bir uygulama yapılmamış (Kontrol), α -sinüklein aşırı ekspresyonu sağlanmış (SNCA), sadece boş plazmid ile transfekte edilmiş (MOCK+PBS), Amiloid beta uygulanmış(A β), α -sinüklein aşırı ekspresyonu ve A β 1-42 uygulanmış (SNCA+A β) insan SH-SY5Y hücre kültürlerindeki değişimleri görülmektedir. **IFN gamma: 48 saat** seviyesi Mock ve A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$, $p<0.05$,sırasıyla). SNCA grubunda Mock grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$). **IFN gamma: 72 saat** seviyesi A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). SNCA+A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). IFN gama seviyesi A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). IFN gama seviyesi SNCA grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). SNCA+A β grubunda SNCA ve A β grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$, $p<0.001$, sırasıyla). *A β grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede değişmiştir. † α -sinüklein grubu MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede değişmiştir. ‡ A β grubunda α -sinüklein+A β grubuna göre anlamlı derecede değişmiştir. § α -sinüklein grubunda α -sinüklein+A β grubuna göre anlamlı derecede değişmiştir.



Şekil 4-16: Sınıflandırma Dışı Kalanlar

Herhangi bir uygulama yapılmamış (Kontrol), α -sinüklein aşırı ekspresyonu sağlanmış (SNCA), sadece boş plazmid ile transfekte edilmiş (MOCK+PBS), Amiloid beta uygulanmış (A β), α -sinüklein aşırı ekspresyonu ve A β uygulanmış (SNCA+ A β) insan SH-SY5Y hücre kültürlerindeki değişimleri görülmektedir. **PDGF-BB: 48 saat;** PDGF-BB seviyesi A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). SNCA+A β grubunda MOCK grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). PDGF-BB seviyesi A β grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). SNCA grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). **PDGF-BB: 72 saat;** PDGF-BB seviyesi SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). SNCA + A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$). SNCA + A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.01$). **TIMP-2: 48 saat;** TIMP-2 seviyesi A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). TIMP-2 seviyesi A β grubunda SNCA+A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). TIMP-2 seviyesi SNCA grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). **TIMP-2: 72 saat** SNCA+ A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$). A β grubunda SNCA grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır ($p<0.05$). A β grubunda SNCA+A β grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$). **ICAM-1: 48 saat;** ICAM-1 seviyesi MOCK grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$). ICAM-1 seviyesi SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p>0.05$). SNCA+ A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p>0.001$). A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). ICAM-1 seviyesi SNCA grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). A β grubunda SNCA grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). A β grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). SNCA grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). **ICAM-1: 72 saat;** seviyesi MOCK+PBS grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$). SNCA grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p>0.05$). SNCA+ A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p>0.001$). A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). SNCA grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). A β grubunda SNCA grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). A β grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). SNCA grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). **TGF-beta 1: 48 saat;** TGF-beta 1 seviyesi MOCK+PBS ve A β gruplarında Kontrol gruplarına kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.01$). SNCA+ A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). TGF-beta 1 seviyesi A β grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.01$). SNCA grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). **TGF-beta 1: 72 saat;** MOCK+PBS ve A β gruplarında Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$, $p<0.001$, sırasıyla). SNCA grubunda

Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır($p<0.01$).SNCA+ A β grubunda Kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$). SNCA grubunda A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır($p<0.001$). A β grubunda A β grubunda SNCA+ A β grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$) *A β grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede değişmiştir. I α -sinüklein grubu MOCK+PBS grubuna kıyasla anlamlı derecede değişmiştir. λ A β grubunda α -sinüklein+A β grubuna göre anlamlı derecede değişmiştir. $\forall$ α -sinüklein grubunda α -sinüklein+A β grubuna göre anlamlı derecede değişmiştir.



5. TARTIŞMA

Bu çalışma nörona farklılaştırılmış insan SH-SY5Y hücrelerinde belirli inflamatuvar proteinlerin sentezlenmesi ve salınması açısından genel profillerini ve bu profillerin A β uygulaması ve/veya α -sinüklein aşırı üretimi ile birlikte seviyelerinin nasıl değiştiğini saptamak üzere dizayn edilmiştir. Böylece belirli inflamatuvar düzenleyicilerin seviyeleri saptanarak sağlıklı bir nöron popülasyonuna ait genel inflamatuvar cevap profilinin belirlenmesi sağlanmıştır. Aynı zamanda A β 1-42 uygulaması ile oluşturulan AH benzeri modelde; α -sinüklein aşırı üretimi ile birlikte oluşturulan PH benzeri modelde ve α -sinüklein aşırı üretimi ve A β 1-42 uygulaması ile oluşturulmuş DLB hastalığı benzeri modelde inflamatuvar proteinler olan sitokin ve kemokinlerin oluşturulan patolojik koşullar altında seviyelerinin nasıl değiştiği ve hangi inflamatuvar düzenleyicileri daha fazla ve hangilerini daha az saldıgı saptanmıştır.

Nöroinflamasyon, bakteriyal veya viral enfeksiyonlar, toksinler, otoimmün reaksiyonlar ve mekanik hasarın neden olduğu doku hasarından kaynaklanan hem doğal hem de adaptif immün sistemi içeren ve MSS'de meydana gelen karmaşık bir süreçtir (Gualtierotti, Guarnaccia ve ark. 2017). Zarar verici uyaranlar ya doğrudan MSS'den kaynaklanmaktadır ya da sistemik dolaşım ile taşınmaktadır. Doku hasarından hemen sonra, doğal bağışıklık tepkisi glial hücrelerin çoğalmasına ve aktivasyonuna yol açan, sitokinler ve kemokinler gibi, moleküler ve hücrelerel araçların ifadesi ve salgılanması ile tetiklenir (Gualtierotti, Guarnaccia ve ark. 2017). Nöroinflamasyon, sinaptik bozukluk ve nöron ölümüne neden olarak nörodejenerasyona aracılık etmektedir (Pasqualetti, Brooks ve ark. 2015). Nörodejenerasyon sırasında, sitokinler dahil olmak üzere çeşitli immünolojik hücre tipleri, beyinde eksprese edilir ve aktif olarak bulunur (Fakhoury 2015). Nöronlar, astrositler, mikroglia ve oligodendrositler, inflamatuvar düzenleyicileri üretebilir ve sitokin reseptörleri, düşük seviyelerde de olsa, MSS boyunca yapısal olarak ifade edilebilir (Lucas, Rothwell ve ark. 2006).

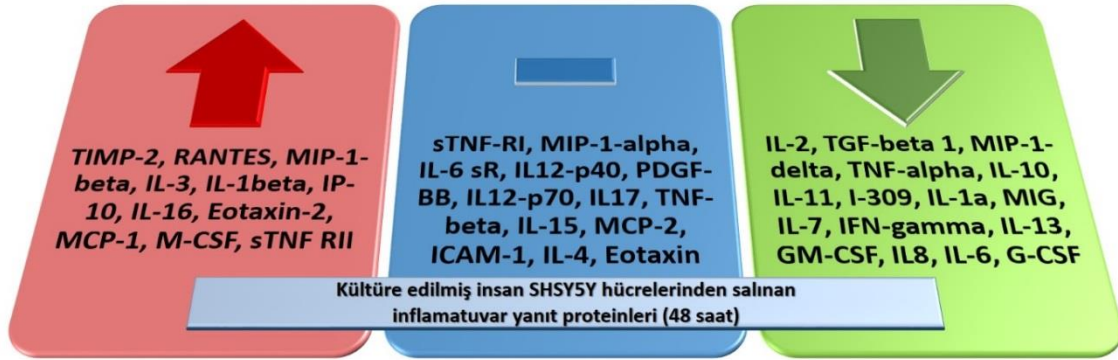
SH-SY5Y, nörodejeneratif ve nörogelişimsel hastalıklarda in vitro nöron modeli olarak kullanılmaya potansiyeline sahip bir insan nöroblastoma hücre hattıdır. İncelenen yanıtları arasında toksisite, nörit farklılaşması, sitokin üretimi ve biyolojik aktivitenin ölçülmesi için morfolojik değişiklikler yer almaktadır (Janssens, Wynendaele ve ark. 2018). SH-SY5Y hücreleri, 47 kromozomdan oluşan stabil bir karyotipe sahiptir ve

RA, forbol esterleri ve beyin kökenli büyüme faktörü gibi spesifik nörotrofinler dahil olmak üzere farklı mekanizmalarla nöroblast benzeri bir durumdan olgun insan nöronlarına farklılaştırılabilirler (Shipley, Mangold ve ark. 2016). SH-SY5Y hücreleri, ortam koşullarına bağlı olarak kolinerjik, adrenerjik veya dopaminerjik dahil olmak üzere çeşitli yetişkin nöronal fenotiplerine yönlendirilebilirler (Kovalevich ve Langford 2013). Literatürde RA, SH-SY5Y hücrelerini in-vitroda nöronlara farklılaştırmak için en sık uygulanan ve en iyi karakterize edilen ajandır (Yang, Wang ve ark. 2016). Bu hücre hattı, düşük serum ve RA uygulamasına yanıt olarak dopaminerjik nöron benzeri hücrelere farklılaştırılabilir (Lopes, Schroder ve ark. 2010). SH-SY5Y hücre hattı belirgin derecede yüksek miktarda MCP-1, HGF ve M-CSF büyüme faktörleri, IP-10 pro-inflamatuvar kemokin, TNF- α , IL-12p40, IL-16 ve IFN-2 α sitokinleri ve IL-2 reseptör antagonisti salmaktadır (Laycock ve Ball 1990).

Sitokinler, hücre-hücre iletişimi ve hücrel aktivasyonda önemli rol oynayan çok fonksiyonlu pleiotropik proteinlerdir. Fonksiyonel olarak sitokinler, bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerinin final dengesine bağlı olarak ya pro-inflamatuvar (Th1-tipi, uyarıcı) ya da anti-inflamatuvar (Th2-tipi, inhibitör) olarak sınıflandırılmıştır. Sitokinler hem immun yanıtta hem de MSS'deki çeşitli olayların kontrolünde yer alırlar ve eşit ölçüde nöral fonksiyonların ve nöronal sağkalımın modülatörleri ve immun düzenleyicileridir. Sitokinler ve bunların reseptörleri, hem normal hem de patolojik koşullar altında MSS'de nöronlar tarafından yapısal olarak ifade edilirler, fakat beyindeki aşırı sitokin ifadesi nörotoksik ve nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde önemli bir faktör olarak rol almaktadır (Szelenyi 2001).

Sunmuş olduğumuz çalışmanın, nörona farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerinde Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve Lewy cisimcikli demans olmak üzere en sık rastlanan 3 farklı nörodejeneratif hastalık modeline benzer koşullar oluşturularak yapılması, nörodejenerasyon ve nörodejeneratif hastalıkların karşılaştırılması açısından literatürde bir ilktir. Bu 3 hastalık modelini hücrel düzeyde inflamatuvar protein profilleri açısından karşılaştıran bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Çalışmamız sonucunda hiçbir uygulama yapılmamış SH-SY5Y hücrelerinde 48.ve 72.saatte salınan inflamatuvar protein seviyeleri sırasıyla (Şekil 5-1, Şekil 5-2)'de gösterilmiştir.



Şekil 5-1: Kültüre edilmiş insan SH-SY5Y hücrelerinden 48. saatte salınan inflamatuvar yanıt proteinlerinin seviyeleri

%95 CI değerinin alt ve üst limitleri dikkate alınarak belirlenmiştir (bkz.Bulgular) (↑)üst eşik değerinin üstünde üretilenler; (−) üst ve alt eşik değeri arasında üretilenler; (↓)alt eşik değerinin altında üretilenler.



Şekil 5-2: Kültüre edilmiş insan SH-SY5Y hücrelerinden 72. saatte salınan inflamatuvar yanıt proteinlerinin seviyeleri

%95 CI değerinin alt ve üst limitleri dikkate alınarak belirlenmiştir (bkz.Bulgular) (↑)üst eşik değerinin üstünde üretilenler; (−) üst ve alt eşik değeri arasında üretilenler; (↓)alt eşik değerinin altında üretilenler.

Amiloid beta ve alfa sinüklein patolojilerinin salınan inflamatuvar proteinler üzerine etkisi

Monomerik, oligomerik ve senil plak formunda bulunabilen A β , APP'nin β - ve γ -sekretazlar tarafından sıralı olarak kesilmesinin bir ürünüdür (Lardenoije, Iatrou ve ark. 2015). Aşırı çözünabilir A β fibrilinin yanı sıra küme oluşturan A β ve hiperfosforillenmiş tau proteinleri nöron fonksiyonunu etkileyerek AH patolojisini başlatan inflamatuvar aktiviteyi tetiklemektedir. Nöronlar, sitokinler/kemokinler, kompleman proteinleri, pentraxinler, c-reaktif proteinler A β ekspresyonu aracılığıyla

nöroinflamasyonda önemli rol oynamaktadır. Bu inflamatuvar aktivasyon, hem AH'de, hem de bu hastalığın hayvan modellerinde bildirilmiş ve spesifik kemokin ve sitokin seviyelerinin artışı gösterilmiştir (Bolos, Perea ve ark. 2017). AH ve nöroinflamasyon ile ilgili devam eden iki hipotez bulunmaktadır. İlk hipoteze göre doğal bağışıklık sistemi tarafından başlatılan bir pro-inflamatuvar yanıt A β birikimini artırabilir ve sonuç olarak AH'de patolojik kaskadlara neden olur veya hızlandırır. Anti-inflamatuvar bir yaklaşım olan ikinci hipotez ise A β birikimini azaltabilir ve bu nedenle nöroprotektif olabilir. Bununla birlikte, bazı çalışmalarda, pro-inflamatuvar durumlar sırasında, A β birikiminde azalma olduğu gösterilmiştir. Bu belirsizliğe ek olarak, anti-inflamatuvar düzenleyicilerin artmış olduğu çalışmalar, A β birikiminin azalması ve AH ile ilişkili semptomların iyileşmesi veya A β birikiminin artması ve AH semptomlarının kötüleştiğini göstermektedir (Sackmann, Ansell ve ark. 2017).

α -sinükleinopatiler ise nöron ve / veya gliada α -sinüklein içeren inklüzyonların oluşumu ile karakterize edilen bir grup nörodejeneratif hastalığı tanımlamaktadır. Bu hastalıklar, PH, DLB ve MSA'dan oluşmaktadır (Yang ve Yu 2017). PH ve DLB'de nöronlar Lewy cisimleri ve Lewy nöritleri olarak adlandırılan sitoplazmik α -sinüklein pozitif birikimleri göstermektedir (Bruck, Wenning ve ark. 2016). SH-SY5Y hücre hattı çalışmaları, intraselüler alanda biriken yada salgılanan α -sinükleinin aşırı ifadesinin patojenik etkilerinin çalışılması için güncel hücresel bir model olarak görülmektedir (Gouarne, Tracz ve ark. 2015). α -sinüklein konsantrasyonundaki artış veya mutasyona uğramış α -sinüklein, yanlış katlanmış bir protein üretmekte ve bu yanlış katlanmış protein kümesi, glial hücreleri ve diğer immun/inflamatuvar hücreleri harekete geçirip substantia nigra'da nörodejenerasyonu indükleyerek inflamatuvar sitokinler ve kemokinleri salmaktadır. Ayrıca, α -sinüklein proteini PH'de doğrudan pro-inflamatuvar aktiviteye sahiptir (Kempuraj, Thangavel ve ark. 2016).

α -sinüklein ve A β patolojisinin inflamasyon üzerine etkisinin insan hücreleri ile ilgili araştırmaları oldukça kısıtlı olmakla birlikte nörodejeneratif hastalık koşullarında nöronlardan salınan sitokin-kemokinler hakkında çok az sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu çalışma ile nöron popülasyonuna ait genel inflamatuvar cevap profili belirlenmiştir. Çalışma bu özelliği ile literatürde bir ilktir. Çalışma sonucu elde edilen bulgular aşağıdaki bölümlerde tartışılmıştır.

Eotaksinler etkili eozinofil kemoatraktanlar olarak tanımlanmış ilk C-C motifi kemokinlerdir. Eotaksin ailesi ; Eotaksin-1 (CCL11), Eotaksin-2 (CCL24) ve Eotaksin-3 (CCL26) olmak üzere üç üyeden oluşmaktadır. Üç eotaksin molekülü de in-vivo olarak farklı işlevlerde rol oynamakla birlikte örtüşen fonksiyonları da bulunmaktadır. CCL11, CCL24 ve CCL26 eozinofil kemotaksisini uyarır, ancak bu moleküller diğer doğal bağışıklık hücreleri üzerinde de etki gösterirler. CCL11 ve CCL24 bazofillerin, T yardımcı (Th)2 CD4⁺ lenfositlerin ve mast hücrelerinin inflamasyon bölgesinde toplanmasında önemli rol oynarlar. Doğal bağışıklıktaki rolünün yanında, son çalışmalar Eotaksin-1 ve ilgili moleküllerin MSS'de dejeneratif süreçlere doğrudan katkıda bulunabileceğini göstermiştir. Beyindeki eotaksin yanıt verme potansiyeli göz önüne alındığında, mikrogliya, oligodendrositler, astrositler ve nöronlar dahil olmak üzere MSS'ne yerleşik hücrelerin Eotaksin-1, Eotaksin-2 ve Eotaksin-3 reseptörlerini değişen derecelerde ifade ettiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda Eotaksin-1 seviyelerinin normal yaşlanmanın bir parçası olarak hem farelerin hem de insanların plazma ve beyin omurilik sıvısında arttığı tespit edilmiştir. Farelerde, bu artışların azalan nörogenez, bozulmuş bilişsel fonksiyon ve hafıza ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. İnsanlarda AH, ALS, HH ve ikincil ilerleyen MS'de yaşları eşleştirilmiş sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, Eotaksin-1 plazma seviyelerinin arttığı gözlenmiştir. AH'lerin serum ve BOS'larında yapılan çalışmalar ; CCL11 ve CCL26 inflamatuvar düzenleyicilerin seviyelerinin düzensiz olduğunu göstermiştir. Bir diğer çalışmada ise yaşları eşleştirilmiş sağlıklı kontrollere kıyasla AH'de CCL11 ve CCL26 serum seviyeleri artmıştır. O'Bryant ve arkadaşları, üç inflamatuvar düzenleyici olan trombopoietin, MIP-1 α ve CCL26 serum seviyelerinin, kombinasyon halinde, AH'nin değerli bir biyobelirtecini oluşturduğunu ortaya koymuştur (Huber, Giles ve ark. 2018). Çalışma sonuçlarımız 48.saatte, AH benzeri modelde Eotaksin-1 ve Eotaksin-2 seviyelerinin arttığını göstermektedir. Bu sonuçlar A β 'nın Eotaksin-1 ve Eotaksin-2'nin hücre dışına salınmasını tetikleyen yollarda yer aldığını gösterebilmektedir. Bununla birlikte DLB hastalığı benzeri modelde Eotaksin-1 seviyesi, PH benzeri modele kıyasla anlamlı derecede artmıştır. AH benzeri modelde ise Eotaksin-1 proteinin salınımı DLB hastalığı benzeri modele kıyasla yüksek seviyededir.72.saatte SNCA+A β grubunda MOCK+PBS grubuna kıyasla Eotaksin-2 seviyesi azalmaktadır.

Granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF), 19 kDa moleküler ağırlığa sahip bir glikoproteindir ve etkilerini özel bir reseptör (G-CSFR) aracılığıyla gösterir. G-CSF,

hematopoietik kök hücrelerin proliferasyonunu uyaran ve aynı zamanda kemik iliğinden kana salınımını teşvik eden hematopoietik bir büyüme faktörüdür. Bununla birlikte, G-CSF'nin aynı zamanda MSS'de hematopoietik olmayan önemli fonksiyonlara sahip olduğunu gösteren giderek artan deneysel çalışmalar bulunmaktadır. G-CSF'nin, hasar sonrasında beyindeki nöronal dokunun rejenerasyonunu uyardığı rapor edilmiştir. Tsai ve meslektaşları, subkutan olarak enjekte edilen G-CSF'nin bilişsel işlevleri iyileştirdiğini ve iki AH fare modelinde nöroenez üzerinde olumlu etkiler gösterdiğini bulmuşlardır (Tsai, Tsai ve ark. 2007). Ek olarak, yeni bir çalışma G-CSF uygulamasının hipokampal amiloid yükünü azalttığını ve AH fare modelinde davranışsal performansı geliştirdiğini, muhtemelen kemik iliği kökenli mikroglianın beyine mobilize olması ve penetrasyonu nedeniyle olduğunu göstermiştir. Erken başlangıçlı AH'ları, yaşları uyumlu sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında G-CSF plazma konsantrasyonlarının anlamlı düzeyde azaldığı bulunmuştur. AH'lerde G-CSF düzeyleri, A β 1-42 BOS seviyeleri ile ters bir korelasyon göstermekle birlikte; tau protein BOS seviyeleri ve MMSE skorları ile korelasyon göstermemektedir. Ayrıca, AH ve sağlıklı kontrollerde yaş ve G-CSF plazma seviyeleri arasında anlamlı bir ters korelasyon bulunmuştur (Laske, Stellos ve ark. 2009). G-CSF'nin trofik ve anti-inflamatuvar etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Çok yönlü sağkalım yollarını aktive etmek ve nöroenez arttırmak için ALS veya AH gibi nörodejeneratif hastalık hayvan modellerine G-CSF uygulanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda G-CSF'nin, dopaminerjik nöronları ekstraselüler alanda düzenlenmiş kinaz yolağı üzerinden 6 hidroksidopamin (6-OHDA) ile indüklenen toksisiteden koruduğu gösterilmiştir. G-CSF ayrıca, aşağı yönde anti-apoptotik yolak ve G-CSF reseptörü yoluyla PH'nin in vivo modellerinde nöronlar üzerinde koruyucu rol oynamaktadır. Ayrıca hematopoietik faktör olan G-CSF'nin aslında nöronlarda eksprese edilen endojen bir protein olduğu ve programlanmış hücre ölümüne karşı nöronlarda koruma sağladığı akut felç modellerinde gösterilmiştir (Tsai, Chu ve ark. 2017). Elde ettiğimiz veriler G-CSF seviyelerinin AH benzeri modelde arttığını göstermektedir. Bu sonuçlar G-CSF'nin A β proteininin hedefleri arasında olduğunu ifade edebilir. DLB hastalığı benzeri modelde ise 48.saatte G-CSF seviyesinin PH benzeri modele kıyasla arttığı saptanmıştır. Bu artış SNCA+A β grubundaki A β 'dan kaynaklanabilmektedir.

Makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) mikroglia proliferasyonunu ve aktivasyonunu teşvik eden bir sitokindir (Giulian ve Ingeman, 1988) ve migroglianın

makrofaj benzeri hücrelere farklılaşmasını sağlar. İlginç bir şekilde presemptomatik AH ya da hafif bilişsel bozukluğu (MCI) olan hastalarda M-CSF seviyeleri düşük olmakla birlikte düşük seviyedeki diğer hematopoietik sitokinler ile birlikte hastalığın 2-6 yıl sonra hızlı bir şekilde demansa evrimleşeceği öngörülmektedir. Araştırmacılar M-CSF uygulamasının AH fare modelinde bilişsel bozukluk ve amiloid birikimi üzerinde yararlı etkileri olup olmadığını araştırmak için; hastalık patolojisi ilerledikçe APPSwe / PS1 fareleri M-CSF ile muamele etmiş ve M-CSF'nin kognitif bozukluğu ve MSS'deki A β birikimini etkili bir şekilde önlediğini görmüşlerdir (Boissonneault, Filali ve ark. 2009). Deney sonuçlarına göre 48.saatte ve 72.saatte AH benzeri model DLB benzeri model göre karşılaştırıldığında M-CSF seviyesinin AH'de belirgin şekilde yüksek seyrettiği saptanmıştır. M-CSF'nin AH modelimizde yüksek seyreden miktarları, M-CSF'nin kognitif fonksiyonlar üzerinde rapor edilen koruyucu etkileri ve A β 'nın sinaptik plastisitedeki görevleri ile birlikte düşünüldüğünde muhtemel bir koruyucu cevap olarak görülebilmektedir.

Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) astroglia ve T hücreleri tarafından üretilir ve hem immun hem de nöral hücrelerde reseptörleri bağladığı kan-beyin bariyerini ve kan-omurilik bariyerini geçebilir. GM-CSF, nöronal plastisiteyi, öğrenmeyi ve hafızayı etkiler ve fotoreseptörler için nörotrofik ve anti-apoptotik aktivitelere sahiptir. GM-CSF, AH'nin hayvan modellerinde hastalığın önlenmesinde rol oynar ve şu anda demansı azaltma potansiyeli nedeniyle klinik denemede onaylanmıştır (Kosloski, Kosmacek ve ark. 2013). GM-CSF'nin, MPTP, 6-OHDA ve parakuat dahil olmak üzere PH modellerinde, nöronal apoptoz, Bcl-2 ve Bax ile ilişkili proteinlerin azaltılması ve beyin kaynaklı nörotrofik faktörün uyarılması ile nöronlar üzerinde koruyucu olduğu gösterilmiştir. Çalışmalarımızın verilerine göre; 48. saatte SNCA grubunda GM-CSF seviyesi belirgin şekilde artmıştır. DLB benzeri modelde de GM-CSF seviyesi PH benzeri modele kıyasla anlamlı derecede artmıştır. 72. saatte ise A β uygulaması yapılan grupta kontrol grubuna göre GM-CSF seviyesi yüksektir. Bu sonuçlar AH ve DLB benzeri modelde, GM-CSF seviyesinin M-CSF'de olduğu gibi artabileceğini ve bu artışın muhtemel bir A β mekanizması olabileceğine işaret etmektedir.

Kemokinler ve reseptörleri, bağışıklık hücrelerinde ve sinir sisteminde yaygın olarak ifade edilir. I-309 (TCA-3 (timüs türevi kemotaktik ajan 3/CCL1)) iyi karakterize

edilmiş kemokinlerden biridir ve MCP-1 ile aynı CC motif kemokin grubunda sınıflandırılır. I-309, aktive edilmiş T hücresi, mast hücreleri ve endotel hücreleri tarafından salgılanır. Nötrofiller ve monositler için kemoatraktan olarak önemli role sahiptir. Bağışıklık hücreleri üzerindeki etkileri iyi karakterize edilmesine rağmen, MSS'de ve özellikle nöropatik ağrının gelişiminde belirsizliğini korumaktadır (Akimoto, Honda ve ark. 2013). Bulgularımız 48.saat sonunda kültüre salınan I-309 seviyesinde A β uygulamasına bağlı olarak artış göstermektedir. 48. ve 72.saatte A β patolojisi ile SNCA+A β patolojisi karşılaştırıldığında her iki zaman aralığında da A β grubunda I-309 seviyesinin yüksek olduğu gösterilmektedir. 72.saatte ise α -sinüklein patolojisi ile α -sinüklein+A β karşılaştırıldığında I-309 seviyesinin SNCA grubunda arttığı gösterilmektedir. Bu sonuçlar A β ve SNCA gruplarında inflamatuvar yanıtı cevap olarak I-309 pro-inflamatuvar kemokin ifadesinin artmış olabileceğini göstermektedir.

İnsan monosit kemoatraktan proteinleri MCP1, MCP2, MCP3 ve MCP4 olmak üzere; CC-kemokin alt ailesinin önemli bir grubunu oluşturmaktadır (O'Boyle, Brain et al. 2007). MCP-1(Monosit Kemoatraktan protein-1), ilk kez makrofajların tümörlere infiltrasyonunu desteklemedeki rolü ile tanımlanan CC kemokin ailesinin bir üyesidir. MSS'de onarım süreçlerinin ve hücrelerel etkileşimlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar ve astrosit, mikrogliya ve aksotomize nöronlar dahil birçok hücre tipinde ifade edilebilirler (Sokolova, Hill ve ark. 2009). MCP-1; A β miyelin yıkımı ve nöronal hasarların temizlenmesinde rol oynamaktadır (Lee, Liao ve ark. 2018). MCP-1'nin ekspresyonundaki değişiklik, AH ve PH gibi MSS hastalıklarının patogeneğinde yer almaktadır. MCP-1, IL-6 ve IL-8 AH'li beyinlerde artmasına rağmen, çoklu lineer regresyon analizi, AH'nin majör prediktörü olarak sadece MCP-1'i tanımlamış ve bu sitokinin inflamatuvar süreçlerde baskın bir rol oynadığı belirlenmiştir. Üçlü transgenik AH fare modelleri (APP / tau / PS1) ile ilgili yeni çalışmalarda MCP-1'in 10,8 kat arttığı gösterilmektedir. Artan MCP-1 seviyeleri, AH'lerinin serum ve beyin omurilik sıvısında ve ayrıca AH geliştiren MCI hastalarında bulunmaktadır. Birçok inflamatuvar molekül gibi, MCP-1 beyinde büyük ihtimalle pleiotropik rol oynamaktadır. Optimal düzenleme iyileşme ve onarım ile sonuçlanırken; aşırı koşullar kronik artışı ve nörodejenerasyonu uyarır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen çoklu veriler MCP-1'deki anlamlı artışların AH'yi öngördüğünü, bu kemokinin hastalık sürecinde çok önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Sokolova, Hill ve ark. 2009). MCP-1 aynı zamanda PH

patogenezi ile de yakından ilişkilidir. Yapılan bir çalışmada SH-SY5Y hücreleri nöropatolojik lezyonları ve PH patogenezi için α -sinüklein ile inkübe edilmiş ve bu hücrelerden salınan CCL2 seviyesinin arttığı ortaya koyulmuştur. Başka bir çalışmada ELISA analizleri, CCL2 seviyelerinin, PH'larının serum ve BOS'larında anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermiştir (Liu, Gao ve ark. 2017). Elde ettiğimiz veriler literatür ile uyumlu olarak A β ve α -sinüklein patolojilerinin MCP-1 seviyesini arttırdığını ve en yüksek MCP-1 seviyesinin 48.saatte SNCA grubunda salındığını göstermektedir. Literatürde α -sinüklein+A β patolojisi ve MCP-1 ilişkisine dair herhangi bir veri bulunmamaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlar MCP-1 seviyesinin 72.saatte SNCA grubunda SNCA+A β grubuna kıyasla arttığını göstermektedir.

MCP-2 (Monosit kemoatraktan protein-2); bazofiller, monositler, aktive T hücreleri, NK hücreleri ve olgunlaşmamış dendritik hücreler için potansiyel bir kemoatraktandır (Akkila, Chambers ve ark. 1997). MCP-1 ve MCP-2'nin amino asit benzerliği %62'dir (Villa, Venturelli ve ark. 2009) Bulgularımız, 48.saatte ve 72.saatte A β uygulaması ve α -sinüklein+A β uygulaması ile karşılaştırıldığında A β 'nin inflamatuvar yanıtı başlatarak MCP-2 seviyesini arttırdığını göstermiştir. Bu sonuçlar A β patolojisinin α -sinüklein+A β patolojisine göre MCP-2 seviyesinin arttığını gösterebilir.

IL-1 ailesi, pro-inflamatuvar IL-1 α ve IL-1 β 'yi ve bunların inhibitör IL-1 reseptör antagonisti IL-1R α 'yı içerir. IL1A, IL-1B ve IL-1RN genleri tarafından kodlanmışlardır (Qin, Peng ve ark. 2012). IL-1 ailesinin üyeleri, sağlıklı beyinde düşük veya tespit edilemez seviyelerde ifade edilir, ancak ekspresyonları iskemi, travma, hipoksi ve nörotoksik veya inflamatuvar uyaranlar dahil olmak üzere çeşitli deneysel beyin hasarları tarafından hızla yukarı yönde regüle edilir (Simi, Tsakiri ve ark. 2007). Bu ailenin üyeleri olan IL-1 α , membrana bağlı otokrin bir sinyal molekülü olmakla birlikte; IL-1 beta, parakrin veya sistemik olarak salgılanan bir moleküldür. Grubumuz tarafından daha önce gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda erken ve geç başlangıçlı Alzheimer hastalarının ve Parkinson hastalarının serum IL-1 α seviyesinin yaş bakımından paralellik gösteren ve nörodejeneratif hastalık bakımından sağlıklı bireylere kıyasla azalmış olduğunu gösterdik (Dursun, Gezen-Ak ve ark. 2015). IL-1 ekspresyonu baskın olarak beyin parankiması ve perivasküler makrofajların aktive edilmiş mikrogliasında ortaya çıkmakta, daha sonra astrositlerde gerçekleşmektedir,

ancak nöronlar ve vasküler endotel hücreleri içeren tüm yerleşik beyin hücreleri de IL-1'i ifade edebilmektedir (Simi, Tsakiri et al. 2007). IL-1, Alzheimer beyinde aşırı ifade edilir ve bu aşırı üretim, doğrudan plak oluşumu ve ilerlemesi, distrofik nöritlerin nevrozlu büyümesi ve asetilkolinesterazın nöronal aşırı anlatımı ile ilgilidir (Mrak ve Griffin 2001).

IL-1β'nın, bazı çalışmalarda AH'de yukarı regüle edildiği ancak diğer çalışmalarda aşağı regüle edildiği veya değiştirilmediği bildirilmiştir (Mohd Hasni, Lim ve ark. 2017). Bizim sonuçlarımız Aβ patolojisinin 48.saatte kontrol grubuna kıyasla IL-1 beta seviyesini azalttığını; alfa sinüklein+Aβ patolojisi ile kıyaslandığında ise salınan IL-1 beta seviyesinin arttığını göstermektedir. Bu durum AH'de DLB hastalığına göre salınan IL-1 beta seviyesinin arttığını göstermektedir. Yapılan bir çalışmada 22 de novo PH'sında diğer nörolojik rahatsızlıkları olan 12 hasta ile karşılaştırıldığında BOS'ta IL-1β düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir (Lindqvist, Hall ve ark. 2013). Grubumuz tarafından daha önce gerçekleştirilen çalışmalar ile Parkinson hastalarının serumlarında IL-1β seviyelerinin yaş bakımından paralellik gösteren ve nörodejeneratif hastalık bakımından sağlıklı bireylere, geç başlangıçlı Alzheimer hastalarına ve MCI hastalarına kıyasla anlamlı derecede arttığı; erken başlangıçlı Alzheimer hastalarında ise azaldığını gösterdik (Dursun, Gezen-Ak ve ark. 2015).Deney sonuçlarımız Aβ patolojisinin 48.saatte IL-1 β seviyesini azalttığını göstermektedir. IL-1-α seviyesini ise arttırdığını göstermektedir. Aβ patolojisi; α-sinüklein+Aβ patolojisi ile kıyaslandığında ise salınan IL-1 β ve IL-1-α seviyesi artmaktadır.Bu durum Aβ patolojisinde α-sinüklein+Aβ patolojisine göre salınan IL-1 β ve IL-1α seviyesinin arttığını göstermektedir.

T-hücre büyüme faktörü olarak da bilinen IL-2, sadece T-hücreleri ile ilgili olmayan birçok immün düzenleyici fonksiyonlara ve biyolojik özelliklere sahiptir. Hücre büyümesi ve sağ kalımı, taşınma ve hormon salgılama ve biyoelektrik aktivitelerin modülasyonu ile ilgili işlevler dahil olmak üzere, IL-2'nin nöral hücreler üzerindeki son derece güçlü etkileri keşfedilmiştir (Hanisch ve Quirion 1995). Ayrıca, IL-2 nöron ve gliaya trofik destek sağlayabilir, nörit dallanmasını, dendritik gelişmeyi ve nöronal gelişmede rol oynayan spinogenezi arttırabilir. IL-2'nin MSS ve immün sistemdeki rolü vurgulanmasına rağmen nörodejeneratif hastalıklarda çok fazla araştırılmamıştır. Son zamanlarda, IL-2 nakavt farelerinde öğrenme ve bellek üzerindeki

etkinin, dolaylı olarak bağışıklıkla ilgili etkilere bağlı olduğu öne sürülmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda AH'de hem yaşlı hem de orta yaşlı bireylerle karşılaştırıldığında IL-2 serum seviyelerinin düştüğü gösterilmiştir (Alves, Churlaud ve ark. 2017). Yapılan bir diğer çalışma sonucunda IL-2 seviyesinin PH'larının ventriküler ve lomber beyin omurilik sıvısında ve serumlarında kontrollere kıyasla anlamlı derecede yükseldiği bulunmuştur (Brodacki, Staszewski ve ark. 2008). Literatürde α -sinüklein+A β patolojisi ile IL-2 seviyesi arasında bir ilişkiye rastlanmamakla birlikte bizim sonuçlarımız 72.saatte SNCA+A β grubunda; IL-2 seviyesinin SNCA grubuna göre arttığını göstermektedir. Sonuçlarımıza göre A β patolojisi ile IL-2 seviyesi arasında bir ilişkiye rastlanılmamıştır.

IL-3, hematopoietik kök hücrelerden ve kemik iliğinden kökenlenen çeşitli hücre tiplerinin büyümesini ve farklılaşmasını uyaran bir sitokindir (Luo, Li ve ark. 2012). Bu sitokinin aynı zamanda hematopoietik olmayan hücreler üzerinde etki gösterebileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır (Lopez, Zamorano ve ark. 2017). Birkaç çalışma, MSS'de IL-3 varlığını göstermiştir. Bazı nöronal popülasyonlarda IL-3'ün ifade edildiğini gösteren kanıtlar olsa da, bu hücrelerdeki fizyolojik rolü bilinmemektedir (Zambrano, Otth ve ark. 2007). IL-3, A β uygulaması ile uyarılan nöronal ölümün etkili bir inhibitörüdür. Yapılan çalışmalar sonucunda IL-3'ün, A β uygulanmış nöronal hücre kültürlerinde nöronal dejenerasyon ve toksisiteyi azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca, IL-3'ün Parkinson hastalığının bir hayvan modeli olan 6-hidroksidopamin lezyonlu sıçanlarda dopaminerjik nörodejenerasyonu önemli ölçüde baskıladığı gösterilmiştir (Lopez, Zamorano ve ark. 2017). Elde ettiğimiz sonuçlar; 48.saatte A β uygulamasınının literatür ile uyumlu olarak IL-3 artışına neden olduğunu gösterirken 72.saatte IL-3 seviyesi azalmıştır. α -sinüklein ve α -sinüklein+A β patolojisi IL-3 inflamatuvar proteininin azalmasına neden olmaktadır. Bu durum nöronlar üzerinde koruyucu etkiler gösterebilen IL-3'ün α -sinüklein patolojisi varlığında ifadesinin azaldığını göstermektedir

IL-13 ve IL-4 sitokinleri, Th2 lenfosit aracılı alerjik inflamasyonu ve Th1 lenfosit pro-inflamatuvar sitokinlerinin sentezini düzenleyen salınan iki proteindir. Bu nedenle normal olarak anti-inflamatuvar interlökinler olarak sınıflandırılırlar. IL-13 ve IL-4 sıklıkla birlikte araştırılır, çünkü IL-13 reseptörü alfa1 zincirini (IL-13R α 1) kısmen ortak olarak paylaşırlar IL-13 ve / veya IL-4'ün ya doğrudan inflamasyonu azalttığı ya

da nöronal hasarın hücrel aracıları olduğu düşünölen mikroglia hücrelerinin ölümünü başlatarak nöroprotektif olabileceğini göstermiştir (Mori, Maher ve ark. 2016). Deneysel çalışmalar; 15 kDa aralığında moleküler ağırlığa sahip olan bu iki proteinin, iskemik hasar deneysel modellerinde hipokampus ve korteksteki nöronlar tarafından üretilebildiğini göstermektedir (Yu, Lee ve ark. 2010, Zhao, Wang ve ark.2015). Yapılan çalışmalar sonucunda IL-4'den yoksun farelerde bilişsel bozukluğun ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Bulgularımız bir anti-inflamatuvar protein olan IL-4'ün 72.saatte α -sinüklein ve α -sinüklein+A β patolojisi varlığında seviyesinin azaldığını; A β patolojisi varlığında ise salınan seviyesinin arttığını göstermektedir. Çalışmalarımızdan elde ettiğimiz veriler 48.saatte anti-inflamatuvar bir sitokin olan IL-13 seviyesinin A β patolojisi varlığında azaldığını göstermektedir. α -sinüklein patolojisinde ise α -sinüklein+A β patolojisine kıyasla salınan IL-13 seviyesi azalmaktadır. Bu durum DLB hastalık modelinde IL-13 inflamatuvar protein seviyesinin arttığını ifade etmektedir. α -sinüklein patolojisi; 72.saatte IL-13 salınımını arttırmıştır.

IL-6, bir enfeksiyonun erken seyri sırasında tetiklenen ve akut faz yanıtını uyarabilen çok işlevli bir sitokindir (Dursun, Gezen-Ak ve ark. 2015). IL-6; T hücreleri gibi diğer bağışıklık hücrelerini kontrol etmenin yanı sıra hepatositlerin, hematopoietik progenitör hücrelerin, hücre iskeletinin, kardiyovasküler sistemin, plasentanın, sinir ve endokrin sistemlerinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Erta, Quintana ve ark. 2012) Normal fizyolojik koşullar altında, beyinde IL-6 ekspresyonu düşüktür, fakat çok sayıda MSS hastalıklarında seviyeleri yükselmektedir (Lucas, Rothwell ve ark. 2006). IL-6R, inflamasyon dahil olmak üzere bir dizi hücrel yanıtı tetikleyebilen IL-6'nın reseptörüdür. IL-6R, esas olarak, hem transmembran hem de çözünebilir (sIL-6R)olarak miyeloid hücre soylarında ifade edilmektedir. Grubumuz tarafından daha önce gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda erken başlangıçlı Alzheimer hastalarının serum IL-6 seviyelerinin yaş bakımından paralellik gösteren ve nörodejeneratif hastalıklar bakımından sağlıklı olan bireylere göre arttığı; Parkinson hastalarının serum IL-6 seviyelerinin ise sağlıklı bireylere, geç başlangıçlı Alzheimer hastalarına ya da MCI hastalarına göre azaldığını gösterdik (Dursun, Gezen-Ak ve ark. 2015). Başka bir çalışmada PH ile başka bir nörolojik hastalığı olan hastalar karşılaştırıldığında BOS'ta IL-6 düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir (Lindqvist, Hall ve ark.2013). Yapılan az sayıdaki araştırmalarda periferik IL-6 seviyelerinin DLB'li hastalarda azaldığı bazı çalışmalarda ise değişmediği gözlenmiştir (King, O'Brien et al.

2018). Elde ettiğimiz bulgular; A β patolojisinin 48.saatte ve 72.saatte IL-6 seviyesini arttırdığını; α -sinüklein patolojisinin ise IL-6 seviyesini azalttığını göstermektedir. Bu sonuçlar AH ve PH benzeri modelde IL-6 salınımı açısından farklılık olduğunu ortaya koymaktadır. IL-6R salınımı ise 48.saatte ve 72.saatte A β patolojisinde; α -sinüklein+A β patolojisine kıyasla artmaktadır. α -sinüklein patolojisi ise salınan IL-6R seviyesinin azalmasına neden olmaktadır.

İnterlökin-11 (IL-11), kardiyotofin 1, siliyer nörotrofik faktör, lösemi inhibitör faktör (LIF) ve onkostatın-M'yi de içeren IL-6 tip sitokin ailesine aittir. İlk olarak IL-6'ya bağımlı hücre soylarının çoğalmasını uyaran bir kemik iliği fibroblast türevli sitokin olarak izole edilmiştir. IL-11'in embriyonik hipokampal hücre soylarında nöronal farklılaşmayı uyardığı gösterilmiştir (Galimberti, Venturelli ve ark. 2008). IL-11, sempatik ve duyuşal nöronlar üzerinde sadece minimal bir etkiye sahiptir ve son veriler, IL-11'in çözünür IL-11R'nin kültüre edilmiş sıçan dorsal kök gangliyon nöronlarının hayatta kalmasını önemli ölçüde artırabildiğini göstermektedir (Mehler, Rozental ve ark. 1993, Thier, Hall ve ark. 1999). IL-11, in-vitro modellerde doza bağımlı bir şekilde A β -42 kaynaklı nörotoksiteyi inhibe ederek AH için potansiyel koruyucu bir faktör olarak önerilmiştir. Ayrıca IL-11, A β -42 ile uyarılma üzerine nöronal hücrelerde indüklenen L-fosfoerin fosfatazi inhibe etmektedir (Heese, Nagai ve ark. 2000). Elde ettiğimiz bulgular literatür ile uyumlu olarak 72.saatte anlamlı bir değişiklik göstermese de 48.saatte A β patolojisinin IL-11 sitokin salınımını arttırdığını göstermiştir. Elde ettiğimiz bulgular 48.saatte ve 72.saatte A β patolojisinin IL-11 anti-inflamatuvar sitokin salınımını arttırdığını göstermiştir. Literatürde PH ve DLB hastalığı ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

IL-7, ilk olarak, uzun süreli kemik iliği kültüründe mürin B hücresi öncüllerinin proliferasyonunu teşvik etmekten sorumlu yeni bir büyüme faktörü olarak keşfedilen ve lenfosit gelişimi ve sağkalımı için gerekli olan 20.2 kDa sitokindir (Cramer, Aplan ve ark. 2016). Literatüre bakıldığında AH, PH ve DLB hastalıklarında IL-7 seviyesi hakkında herhangi bir çalışma yapılmadığı görülmüştür. Çalışmalarımızdan elde ettiğimiz veriler 48.saatte α -sinüklein patolojisinin IL-7 salınımını azalttığını göstermektedir. 72.saatte ise A β patolojisinin α -sinüklein+A β patolojisine kıyasla salınan IL-7 seviyesini arttırdığı gösterilmektedir.

IL-10 (İnterlökin-10), dolaşımdaki kanda düşük seviyelerde bulunan genel bir anti-inflamatuvar sitokindir. IL-10, iki membran reseptör zinciri, IL-10R1 ve IL-10R2 ile sinyal vermektedir. IL-10R2 beyinde yaygın olarak ifade edilmektedir (Perez-Asensio, Perpina ve ark. 2013). İnterlökin-10, pro-inflamatuvar sitokinlerin eylemlerine engel olmaktadır ve beyinde hem immünoproliferatif hem de inflamatuvar yanıtların bir baskılayıcısı olduğu, pro-inflamatuvar sitokinlerin sentezini azalttığı, sitokin reseptör ekspresyonunu baskıladığı ve reseptör aktivasyonunu inhibe ettiği görülmektedir (Magalhaes, Carvalho ve ark. 2017). Periferik kan çalışmalarında, PH'larının sitokin düzeylerinde genel bir artış bulunmaktadır ve IL-1 β , TNF- α , IL-6 ve IL-10 en yüksek artışı göstermektedir. Bununla birlikte, neredeyse eşit sayıdaki çalışmalarda gruplar arasında bir fark saptanamamıştır (King, O'Brien ve ark.). Grubumuz tarafından daha önce gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda erken başlangıçlı Alzheimer hastalarının ve geç başlangıçlı Alzheimer hastalarının serum IL-10 seviyesinin yaş bakımından paralellik gösteren ve nörodejeneratif hastalıklar bakımından sağlıklı olan bireylere göre sayısal olarak arttığı ancak istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmadığını gösterdik. (Gezen-Ak, Dursun ve ark. 2013).

Elde ettiğimiz veriler 48. saatte α -sinüklein patolojisinin IL-10 seviyesini azalttığını göstermektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda AH'larının serumlarında IL-10 seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir. Bulgularımız literatür ile uyumlu olarak 48. saatte A β 'nın IL-10 seviyesini arttırdığını ve hücre dışına salınmasını tetikleyen yollarda yer alabileceğini göstermektedir. Literatüre bakıldığında DLB hastalığı ve IL-10 seviyesi arasında herhangi bir veriye rastlanmamıştır.

Pro-inflamatuvar bir sitokin olan IL-15, sinir sisteminde inflamatuvar olayları düzenlemede önemli bir rol oynamaktadır. T-hücre proliferasyonunu, doğal öldürücü ve sitotoksik hücreleri içeren sitolitik efektör hücrelerin uyarılmasını destekler ve B hücre proliferasyonunu uyararak immünoglobülinleri salgılar (Rentzos ve Rombos 2012). IL-15, genel olarak makrofajlar tarafından ifade edilmekle birlikte deriden MSS'ye kadar değişen organlarda ifade edilmektedir (Doherty, Seder et al. 1996, Budagian, Bulanova ve ark. 2004). Nörolojik hastalıklarda IL-15'in kesin rolü hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. IL-15'in MS, Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi bazı yaygın MSS hastalıklarının inflamatuvar reaksiyonları ve mikrogial aktivasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışma da PH ve sağlıklı kontrol bireyleri

arasında serum IL-15 düzeylerinin farklı olmadığını bununla birlikte, başka bir çalışmada, ileri evre PH olan hastalar ve ciddi fonksiyonel bozukluklar içeren hastalar arasında dolaşımda IL-15'in arttığını ifade etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda AH ve inflamatuvar olmayan nörolojik hastalıkları olan hastalarla BOS seviyeleri karşılaştırıldığında artmış bir IL-15 konsantrasyonu ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, AH'larının BOS'ta sitokin düzeyleriyle ilgili diğer çalışmalar kesin değildir ve çelişkili sonuçlar göstermektedir (Rentzos ve Rombos 2012). Bulgularımız 48. ve 72.saatte A β patolojisinin IL-15 salınımını azalttığını göstermekte, α -sinüklein+A β grubu ile karşılaştırıldığında ise A β 'nın yine nispeten düşük IL-15 seviyesine sahip olduğu gözlenmektedir.

IL-16 (İnterlökin-16) diğer sitokinlere kıyasla henüz karakterize edilmemiş bir sitokindir ve öncü bir protein olarak, 631 amino asitten oluşarak pro-IL-16 olarak üretilmektedir (Mathy, Scheuer ve ark. 2000). IL-16'nın en önemli özelliği, immun ve sinir sistemleri arasında paylaşılan bir molekül olmasıdır. Sinir sisteminde, IL-16, nöronal ve sinaptik fonksiyonların homeostatik özelliklerini etkilemektedir ve insan ve fare dahil olmak üzere türler boyunca yüksek ölçüde korunmuştur. Post mitotik serebellar granül nöronlar (CGN) ve hipokampustaki nöronlar, nöronal IL-16'yı içermektedir (Skundric 2015). IL16'nın AH'de nöroinflamatuvar süreçleri kontrol edebildiğine dair kanıtlar bulunmaktadır (Khoshbakht, Soosanabadi ve ark. 2015). Çalışmalarımızdan elde ettiğimiz veriler 48.saatte α -sinüklein patolojisinin ve A β patolojisinin IL-16 seviyesini azalttığını göstermektedir. 72.saatte ise A β patolojilerinin salınan IL-16 seviyesini azalttığını göstermektedir.

IL-17/IL-17A (İnterlökin-17), 155 amino asit içeren ve 35 kDa moleküler ağırlığa sahip disülfid bağlı prototipik olarak IL-17 aile üyesine ait olan homodimerik bir glikoproteindir (Kolls ve Linden 2004). Bu sitokini eksprese eden T hücre alt kümesi, IL-17 üreten yardımcı T hücreleri (TH17 hücreleri) olarak sınıflandırılmıştır ve IL-17 bağışıklık sistemine özgün katkılar sağlayarak konak savunmasında önemli bir oyuncu olarak yer almaktadır (Veldhoen 2017). Son çalışmalar Th17 hücre aracılı nöroinflamasyonun ateroskleroz ve AH gibi çeşitli kronik inflamatuvar hastalıkların patogenezinde rol oynadığını göstermektedir. AH'larının serum konsantrasyonları kontroller ile karşılaştırıldığında IL-17 seviyesinin arttığı gösterilmiştir (Chen, Jiang ve ark.). Elde ettiğimiz veriler ise 48.saatte A β , α -sinüklein patolojilerinin IL-17

salınımını azalttığını göstermektedir. 72.saatte DLB patolojisi AH patolojisi ile karşılaştırıldığında ise DLB benzeri patolojinin IL-17 salınımını AH'ye göre daha düşük seviyede tuttuğunu göstermiştir.

MIP-1 α /CCL3 (Makrofaj inflamatuvar protein-1 α) klasik olarak bir nötrofil kemoatraktan olarak tanımlanmaktadır. Bu kemokinin MSS'de tespit edilmiş reseptörlerinin "CCR1 ve CCR5" astrositler, mikrogliya ve nöronlar tarafından ifade edildiği bildirilmiştir (Zhu, Wang ve ark. 2012 , Meucci, Fatatis ve ark. 1998). CCL3'ün nörodejeneratif hastalıklarda rol oynadığı düşünülmektedir. Özellikle temporal lob epilepsisi ve AH ile ilişkili olduğu bulunmuştur. AH serumunda CCL3 seviyeleri, kesitsel analizlerde duygudurum bozuklukları ile ilişkilendirilmiştir. AH'larının post-mortem beyinlerinde CCL3'ün nöronlar ve mikrogliyalardan ifade edildiği ve hem amiloid hem de tau birikimlerini taklit eden deney modellerinde yukarı regüle edildiği ifade edilmiştir. Ek olarak, bir CCL3 polimorfizmi AH ile ilişkili bulunmuştur ve CCL3 sekresyonunun sporadik AH için en büyük genetik risk faktörü olan apolipoprotein ϵ 4'e bağlı olduğu bulunmuştur (Marciniak, Faivre ve ark. 2015). Yapılan çalışmalar sonucunda primer glia ve mikrogliya hücre kültürüne yabancı tip α -sinüklein ve PH ile ilişkili α -sinüklein varyantlarının uygulamaları sonucunda salınan IP-10/CXCL10, RANTES/CCL5, MCP-1/CCL2 ve MIP-1 α /CCL3 kemokin seviyeleri ölçülmüştür. MIP-1 α 'nın A30P ve E46K gibi mutant α -sinüklein varyantları tarafından yukarı doğru düzenlenmesi ile sonuçlanmıştır (Roodveldt, Labrador-Garrido ve ark. 2010). 48.saatte A β patolojisinin kontrol grubuna ve SNCA+A β grubuna kıyasla MIP-1 α seviyesini arttırdığı gösterilmektedir. 72.saatte ise α -sinükleinin patolojisinin salınan MIP-1 α seviyesini azalttığı gösterilmektedir. Yapılan literatür taramasında DLB patolojisi ve MIP-1 α arasında bir çalışmaya rastlanmamakla birlikte bulgularımız 72.saatte seviyesini azaltmış olabileceğini göstermektedir.

MIP-1 α ve MIP-1 β , CC kemokin alt ailesinin yüksek oranda ilişkili üyeleridir. Yapısal benzerliklerine rağmen, MIP-1 α ve MIP-1 β farklı sinyalizasyon kapasiteleri göstermektedir. MIP-1 β 'nin hücresel kaynakları, MIP-1 α 'da olduğu kadar kapsamlı olarak incelenmemiştir. Yine de, monositlerin LPS veya IL-7 ile uyarıldığında yüksek miktarda MIP-1 ürettikleri gösterilmiştir (Menten, Wuyts ve ark.2002).

Beyinde normal fizyolojik koşullar altında, inflamatuvar veya nörodejeneratif hastalığa yanıt olarak salgılanan diğer birçok kemokinin aksine, MIP-1 β

saptanamayabilir veya sağlıklı beyinlerde sadece zayıf bir şekilde ifade edilmektedir. İn-vitro çalışmalar sonucunda A β 1-42 peptidinin, MIP-1 β dahil olmak üzere birkaç kemokini indüklediğini, böylece AH'larının beyinlerinde kronik inflamatuvar süreçlerinde A β ve CCL4 arasında olası bir ilişki sağladığı gösterilmiştir (Zhu, Allard ve ark.). Çalışmalarımızın sonucunda elde ettiğimiz veriler 48.saatte A β patolojisinin MIP-1 β seviyesinin artışına 72.saatte ise azalmasına neden olduğunu göstermektedir. Literatüre bakıldığında PH ve DLB hastalığı ile MIP-1 β arasında bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim sonuçlarımız ise 48.saatte A β patolojisinin α -sinüklein+A β patolojisine kıyasla; 72.saatte ise α -sinüklein patolojisinin α -sinüklein+A β patolojisine kıyasla MIP-1 β seviyesinin arttığını ve A β ve α -sinükleinin bu proteinin salınması ile ilişkili olan basamaklarının birinde yer alabileceğini gösterebilmektedir.

Makrofaj inflamatuvar protein-1 ailesinin bir üyesi olan MIP-1 δ 17q11.2 üzerinde haritalanmıştır. Genetik dizisi RANTES (CCL5) ve MIP-1 α ile benzerdir. MIP-1 δ geni dört ekson ve üç intron içermektedir ve CCR1 ve CCR3 olarak bilinen iki reseptöre bağlanmaktadır (Shimizu ve Dobashi 2012). Literatüre bakıldığında MIP-1 δ 'nın MSS hastalıkları ile ilişkili bir çalışmasına rastlanmamıştır. Elde ettiğimiz bulgular; 48.saatte A β patolojisinin MIP-1 δ seviyesinin artışına 72.saatte ise azalmasına neden olduğunu göstermektedir. 72.saatte; α -sinüklein patolojilerinin α -sinüklein+A β patolojisine göre salınan MIP-1 δ seviyesini arttırdığı gösterilmektedir.

Pro-inflamatuvar bir kemokin olan RANTES, immün hücrelerin çağrılmasında, immün reaksiyonların düzenlenmesinde ve dolayısıyla inflamatuvar süreçlerin devam etmesinde rol oynamaktadır. β -kemokin CCL5 ve G-protein-bağlı reseptörlerinin ifadesi endotel hücreler, glia ve nöronlarda gerçekleşmektedir. Çalışmalar, RANTES ve reseptörü CCR5'inin PH, AH gibi nörodejeneratif hastalıklarla birlikte geniş bir patolojik durumda rol oynadığını göstermektedir. AH'larının serebral mikrodolaşımında CCL5'in ifadesinin yükseldiği gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada hücre kültürü modelinde CCL5'in göreceli mRNA ekspresyon düzeylerinin, kontrol grubuna göre AH'larında düşük olduğu gösterilmiştir (Azizi, Khannazer ve ark. 2014). PH'larının serumlarındaki RANTES seviyeleri kontroller ile karşılaştırıldığında PH'larında seviyenin anlamlı olarak arttığı ortaya konulmuştur (Rentzos, Nikolaou ve ark. 2007). Elde ettiğimiz bulgular; 48.saatte α -sinüklein patolojisinin α -sinüklein+A β patolojisine göre RANTES seviyesini arttırdığını göstermiştir. 72.saatte ise A β 'nın ;

kontrol grubuna ve SNCA+A β grubuna kıyasla RANTES seviyesinin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir.

IFN- γ ; antiviral, antimikrobiyal, antitümör ve immün düzenleyici etkiler ortaya koyan inflamatuvar bir sitokindir. Bu sitokin, ağırlıklı olarak aktive edilmiş T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler tarafından üretilmektedir. Normal koşullar altında, bu hücreler kan beyin bariyerini geçemez ve bu nedenle MSS'de IFN- γ saptanamamaktadır. IFN- γ seviyesi MSS'de patolojik durumlar varlığında artmıştır ve MSS'deki varlığı aktif T hücrelerine infiltre olmasından kaynaklanmaktadır (Hashioka, Klegeris ve ark. 2010). IFN- γ , aynı zamanda, periferik kanda CXCL-10 gibi başka sitokinlerin üretimini indükleyebilen bir sitokindir (Mohd Hasni, Lim ve ark. 2017). IFN- γ polimorfizminin AH'nin hızlı bir şekilde ilerlemesine neden olduğu ve hastalığın şiddetinin artmasında rol oynayabileceğini göstermektedir. Sitokin polimorfizmleri, AH riskini tahmin etmede önemli ölçüde yardımcı olmayabilir, fakat hastalığa ve potansiyel ilaç hedeflerine dahil olan yolların belirlenmesinde önemli bir değere sahiptirler. Yapılan bir çalışmada PH periferik kan mononükleer hücrelerinde, IFN- γ , ekspresyon seviyelerinin arttığı ifade edilmiştir (Allan, Tyrrell ve ark. 2005). Çalışmalarımızdan elde ettiğimiz bulgular 48. ve 72.saatte; A β patolojisinin salınan IFN- γ seviyesinin artmasına neden olduğunu göstermektedir. Literatürde DLB hastalığı ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. 72.saatte α -sinüklein+A β patolojisi; SNCA ve A β grubu ile karşılaştırıldığında ise veriler DLB hastalık modelinde salınan IFN- γ seviyesinin azaldığını göstermektedir

İnterlökin 8 olarak bilinen CXCL8, pro-inflamatuvar sinyallere yanıt olarak üretilen bir inflamatuvar kemokindir. Çeşitli hücre tiplerinde farklı fonksiyonlar göstermesinin yanında ana işlevi, yaralanmaya veya enfeksiyona yanıt olarak inflamatuvar bölgelere nötrofillerin toplanmasıdır. CXCL8; hücre adezyonu, nötrofil ve lenfositlerin çağırılması, nöronal koruma ve beyin gelişimi gibi işlevlerde rol oynamaktadır. MSS'de monositler, mikroglialar, astrositler ve nöronlar, hasarlı beyin bölgelerine aktif mikroglialının girmesine katkıda bulunmak üzere, IL-1 β ve TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokinler ve A β gibi uyarılar ile CXCL8 seviyelerinin artışına aracılık etmektedir. Bütün yönleriyle ele alındığında bir parakrin veya otokrin nöroprotektif mekanizmalar olarak glial ve nöronal hücrelerde CXCL8 üretimi, AH patolojik sürecinde nöronal fonksiyonları düzenleyebilmektedir (Azizi, Khannazer ve

ark. 2014). Yapılan çalışmalar sonucunda AH ve MCI'da, indüklenbilir protein 10 (IP-10), CCL2 ve CXCL8 dahil olmak üzere birçok kemokinin hem beyin dokusunda hem de beyin omurilik sıvısında arttığı gösterilmiştir (Correa, Starling ve ark. 2011). Artan kanıtlar, CXCL8 ve reseptörlerinin (CXCR1 / CXCR2), MCI ve AH patogenezinde bu hastaların nöronları, plakları ve BOS'larında sürekli olarak yukarı regüle edildiğini göstermektedir (Galimberti, Schoonenboom ve ark. 2006 , Sokolova, Hill ve ark. 2009). PH ile CXCL8 seviyesi arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada PH'larının serumları sağlıklı bireyler ile karşılaştırılmış ve seviyelerinde anlamlı bir farklılık gösterilmemiştir (Scalzo, de Miranda ve ark. 2011). Yapılan başka bir çalışmada PH periferik kan mononükleer hücrelerinde sitokin ve kemokin ekspresyonun yukarı regüle edildiği ve CCL3, CCL5, IFN- γ , CXCL8 ve TNF- α ekspresyon seviyelerinin arttığı ifade edilmiştir (Allen Reish ve Standaert 2015). DLB hastalarından alınan kan örneklerinden çeşitli sitokin ve kemokin seviyelerinin analiz edildiği bir çalışma sonucunda CXCL8 seviyesinin tespit edilemediği gösterilmiştir (King, O'Brien ve ark. 2018). Çalışmalarımızdan elde ettiğimiz veriler; 48.saatte ve 72. saatte α -sinükleinin patolojisinin salınan IL-8 seviyesinin azalmasına neden olduğunu göstermektedir. 72. saatte A β patolojisinin salınan IL-8 seviyesinin artışına neden olduğunu göstermektedir. α -sinükleinin patolojilerinin; α -sinüklein+A β patolojilerine kıyasla IL-8 seviyesinin artışına neden olduğunu gösterilmiştir.

İnterferon-gama ile indüklenen monokin(MIG/CXCL9), IFN- γ ile uyarılmış monositler, makrofajlar ve endotel hücreler tarafından üretilmektedir. Th1 efektör hücrelerini çeker. Anjiyogenez inhibisyonu, tümör büyümesi ve hematopoetik progenitörlerin koloni oluşumunun inhibisyonu dahil olmak üzere başka aktivitelere de sahiptir (Dembic 2015). Elde ettiğimiz sonuçlar 72.saatte hem α -sinüklein patolojisinin hem de A β patolojisinin salınan MIG seviyesinin azalmasına neden olduğunu göstermiştir.

IP-10 (CXCL10), CXC kemokin alt familyasına aittir ve lökosit trafiğini kontrol ederek doğal ve adaptif bağışıklık yanıtı düzenlemektedir. Pro-inflamatuvar koşullar altında, IP-10 çeşitli tipte bağışıklık hücreleri ve yerleşik hücre tipleri tarafından üretilmektedir. Astrositler, nöronlar ve mikrogliya gibi beyindeki birçok hücre tipinin MS hastalarında IP-10 ürettiği ifade edilmiştir. CXCL10, inflamatuvar T hücrelerinin infiltrasyonunu ve üretimini ve CXCR3 reseptörünü eksprese eden diğer hücrelerin

inflamasyonlu bölgelerde uyarılmasını sağlayan IFN gamma ile indüklenen bir sitokindir (Roberts, Blachere ve ark. 2015). MSS'de IP-10'un rolü tam olarak anlaşılmamıştır. IP-10'un AH'nin patogenezindeki rolünü araştırmak için, insanda APP'yi aşırı ifade eden ve beyindeki kortikal bölgelerdeki A β plakları oluşturan Swedish Tg 2576 transgenik fare kullanılmış ve farklı yaşlardaki farelerde IP-10 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Duan, Yang ve ark. 2008). Yapılan başka bir çalışmada MCI ve orta derecedeki AH'de IP-10 seviyesinin arttığı ancak hastalığın şiddeti arttıkça değişmediği ifade edilmiştir (Galimberti, Schoonenboom ve ark. 2006). PH patogenezinin araştırmak üzere glia ve mikroglianin A30P ve E46K varyantları ile uyarılması sonucunda IP-10 seviyelerinin arttığı gösterilmektedir. PH'ları ve kontrol bireyleri arasında plazma kemokin düzeyleri açısından anlamlı bir fark olmamasına rağmen, yapılan bir çalışma da IP-10 düzeylerinin PH'de bilişsel durumla ilişkili olabileceğini göstermiştir (Roodveldt, Labrador-Garrido ve ark. 2010). Elde ettiğimiz bulgular literatür bulgularından farklı olarak 48.saatte A β patolojisinin IP-10 seviyesini azalttığını göstermiştir. 72.saatte ise α -sinüklein+A β patolojisinin IP-10 seviyesini azalttığını göstermiştir.

İlk olarak NK uyarıcı faktör olarak tanımlanan IL-12'nin (IL-12p70) biyoaktif formu 35-kDa hafif zincir (p35) ve 40-kDa ağır zincir (p40) olmak üzere iki alt birimden oluşan heterodimerik bir sitokindir. IL-12 p40 olarak tanımlanan ve antijen sunan hücreler tarafından monomer ya da homodimer olarak p35'in yokluğunda salgılanan alt biriminin IL-12 reseptörlerinin bir antagonisti olarak etki ettiği ve IL-12 bağımlı immün fonksiyonlarını inhibe ettiği gösterilmiştir (Akdis, Aab ve ark. 2016). IL-12, bağışıklık sinyallerine yanıt olarak dendritik hücreler monositler / makrofajlar ve mikroglialar gibi aktive edilmiş antijen sunan hücreler tarafından üretilmektedir ve T hücrelerinin farklılaşmasını ve proliferasyonunu, IFN γ ve TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini arttırmaktadır. PH'ları kontroller ile karşılaştırıldığında serumdaki IL-12 seviyeleri sayısal olarak daha yüksek olmakla birlikte, farklılık istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır (Rentzos ve Rombos 2012). Yapılan bir diğer çalışmada AH'larında BOS'ta p40 konsantrasyonlarının arttığı ve bilişsel performansın p40 değerleri ile anlamlı bir korelasyon gösterdiği belirtilmiştir. Plazma p40 seviyelerinin hafif bilişsel bozukluk veya AH tanısı ile potansiyel ilişkisi de yakın zamanda bir plazma multianalit profil çalışması ile vurgulanmıştır (Tan, Yu ve ark. 2014). Literatüre bakıldığında DLB patolojisi ve IL-12 arasında bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmalarımızdan elde ettiğimiz veriler 48. saatte A β patolojisinde IL-12 p40 ve IL-12 p70 seviyesinin arttığını göstermektedir. DLB patolojisi ile AH patolojisi karşılaştırıldığında ise 48. ve 72.saatte; A β 'nın salınan IL-12 p40 ve IL-12 p70 seviyesini arttırdığı gözlenmiştir.

Güçlü bir pro-inflamatuvar sitokin olan TNF- α , bir çok inflamatuvar sinyallemeyi destekleyen, TNF süper ailesinin bir üyesidir (McCoy and Tansey 2008). TNF- α , merkezi sinir sisteminde mikrogliya, astrositler ve bazı nöron popülasyonları tarafından sentezlenen hücre canlılığı, gen ekspresyonu, iyon homeostazisi ve sinaptik bütünlük gibi hücresel süreçleri kontrol eden pro-inflamatuvar bir sitokindir (Mohd Hasni, Lim ve ark. 2017, McCoy ve Tansey 2008). Bu sitokinin, nöronlarda hem zararlı hem de koruyucu etkilere sahip olduğu bildirilmiştir ve bu karşıt etkiler, p55 ve p75 olmak üzere iki reseptörün aracılık ettiği iki ayrı TNF-sinyal yolağının varlığı ile açıklanmaktadır (Lucas, Rothwell ve ark. 2006). TNF reseptörü 1 (TNFR1, Tnfrsf1a) ve TNF reseptörü 2 (TNFR2, Tnfrsf1b), TNF ve lenfotoksin A'nın homotrimerlerini spesifik olarak bağlayan membran glikoprotein reseptörleridir fakat iki reseptör, ekspresyon profillerinde, ligand afinitesinde, sitoplazmik kuyruk yapısında ve aşağı yönlü sinyal yolağı aktivasyonunda farklılık göstermektedir (McCoy ve Tansey 2008). TNF, apoptoz için TNFR1'e ve T hücre sağkalımı ile ilişkili işlevlerde TNFR2'ye büyük ölçüde bağımlıdır (Chang, Yee ve ark.2017). TNF- α 'nın, bazı çalışmalarda AH'de yukarı regüle edildiği bazılarında aşağı regüle edildiği veya değiştirilmediği bildirilmiştir (Mohd Hasni, Lim ve ark. 2017). Grubumuz tarafından daha önce gerçekleştirdiğimiz çalışmalar sonucunda serum TNF- α seviyesinin erken başlangıçlı Alzheimer hastalarının ve geç başlangıçlı Alzheimer hastalarının yaş bakımından paralellik gösteren ve nörodejeneratif hastalıklar bakımından sağlıklı olan bireylere kıyasla arttığını gösterdik (Gezen-Ak, Dursun ve ark. 2013). PH ve TNF- α ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada BOS'ta ve post-mortem dokuda PH ile kontroller karşılaştırıldığında yüksek TNF- α seviyeleri saptanmıştır (Lindqvist, Hall ve ark. 2013). Çalışmalarımızdan elde ettiğimiz verilerde; 48. ve 72.saatte TNF- α ve reseptörü olan TNFR1'in ve 72.saatte TNFR2'nin A β patolojisi varlığında seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. SNCA+ A β gruplarında salınan TNFR2 seviyesi azalmıştır. DLB patolojisi ile AH patolojisi karşılaştırıldığında A β salınan TNF- α seviyesini azaltmaktadır.

Bir immünbaskılayıcı sitokin olan transforme edici büyüme faktörü (TGF)- β 1, hücre büyümesi ve farklılaşması ve hasar sonrası doku onarımının önemli bir düzenleyicisidir. Aynı zamanda nöronları eksitotoksinler, hipoksi / iskemi ve trofik faktör eksikliği ile oluşan hasara karşı korur (Chen, Ke ve ark. 2015). Fizyolojik koşullar altında, TGF β 1 esas olarak nöronlar tarafından ve daha az ölçüde MSS boyunca glial fibriler asidik protein-pozitif (GFAP+) astrositleri tarafından ifade edilmektedir (Spittau 2015). TGF- β 1'in AH patogenezinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Örneğin AH'larının plazmasındaki ve dolaşımdaki periferik kan mononükleer hücrelerinden salgılanan TGF- β 1 seviyesi azalmıştır (Chen, Ke ve ark. 2015). TGF- β 1, anti-inflamatuvar özellikleriyle LPS ve MPTP aracılı PH modellerinde anlamlı derecede nöroprotektif etki göstermektedir (Yan, Fu ve ark. 2014). Bulgularımız literatür ile uyumlu olarak A β patolojisinin ve α -sinüklein patolojisinin TGF- β 1 seviyesinin azalmasına neden olduğunu göstermiştir. Literatürde DLB hastalığı ve TGF- β 1 ilişkisi arasında herhangi bir çalışmaya rastlanmamakla birlikte sonuçlarımız α -sinüklein+A β patolojisinin salınan TGF- β 1 seviyesini azalttığını göstermektedir.

Hücre ve ekstraselüler matriks arasındaki etkileşimler, hücre proliferasyonu, aktivasyonu, göçü ve sağkalımını kontrol eden işlemler için çok önemlidir. Bu etkileşimler, hücre adezyon molekülleri (CAM) olarak adlandırılan bir molekül grubu tarafından düzenlenen spesifik adezyon işlemlerine bağlı olmaktadır. CAM ailesi selektinler, integrinler, immünoglobulin benzeri CAM'ler (Ig-CAM'ler) ve kaderinler olmak üzere 4 ana sınıfa ayrılmaktadır. Genel olarak CAM'ler birçok hayati fizyolojik süreçte önemli işlevler yürütmekle birlikte, çeşitli nörolojik hastalıkların patofizyolojisinde yer almaktadır. Hem ICAM-1 hem de PECAM-1'in artan seviyeleri, MSS'deki inflamatuvar durumların göstergesi olarak önerilmiştir (Kalinowska and Losy 2006). İnsan beyinde endotel hücreleri üzerinde gerçekleştirilen deneysel çalışmalar, A β ile uyarılmış ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonunda zamana bağlı bir artış göstermiştir. BOS'ta artmış ICAM-1 seviyeleri ve hastalık şiddeti arasında da pozitif bir korelasyon göstermiştir. AH'larında çözünebilir ICAM-1, VCAM-1 ve PECAM-1 formlarının konsantrasyonları ve DLB gibi diğer nörodejeneratif hastalıkların konsantrasyonları çeşitli çalışmalarda değerlendirilmiştir. Çalışmalar sonucunda AH ve DLB hastalarının plazmasında çözülebilir VCAM-1 seviyesi olmamakla birlikte ICAM-1 ve PECAM-1 seviyelerinin yükseldiği ortaya konulmaktadır (Nielsen, Londres ve ark. 2007). ICAM-1 ve PH arasındaki ilişkinin incelendiği çalışmalarda ICAM-1

PH'de SN dejenerasyonu ile ilişkili ise, PH için anti-inflamatuvar tedavinin dejeneratif sürecini yavaşlatarak yararlı etkileri olabileceğini düşündürmektedir (Miklossy, Doudet ve ark. 2006). Çalışmalarımızdan elde ettiğimiz veriler 48. saatte α -sinüklein patolojisinin; α -sinüklein+A β patolojisine göre ICAM-1 seviyesinde azalmaya 72.saatte ise artışı neden olduğunu göstermektedir. 48.saatte A β patolojilerinin ICAM-1 seviyesinin artmasına neden olduğu gösterilmektedir. 72.saatte ise A β patolojisinin α -sinüklein+A β patolojisine göre salınan ICAM-1 seviyesinin azalmasına neden olduğu gösterilmektedir.

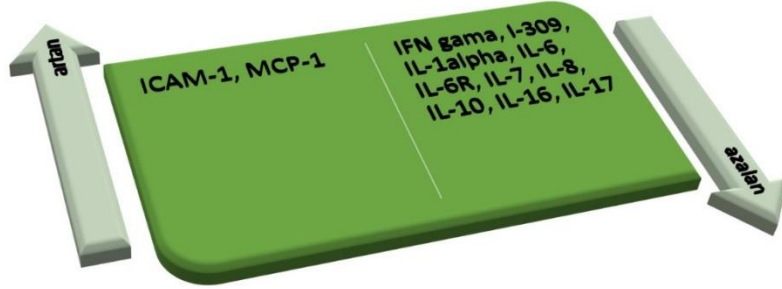
Matriks metaloproteinazlar (MMPler) olarak adlandırılan proteaz ailesi, ekstraselüler matriksi yeniden düzenleyebilir ve amiloid gibi patolojik olarak biriken ekstraselüler proteinleri parçalayabilmektedir (Lorenzl, Albers ve ark. 2003). MMPler MSS'de astrosit, nöron, oligodendrosit ve mikroglialardan salınmaktadırlar (Oh, Larsen ve ark. 1999, Harkness, Adamson ve ark. 2000). TIMP (Metalloproteinazların doku inhibitörleri) aktif hale getirilmiş MMP'lerin alternatif ve aktif bölgelerine bağlanır ve 1: 1 moleküler oranında kovalent olmayan bir kompleks oluşturarak MMP aktivitesini inhibe eder. TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4 olmak üzere dört farklı TIMP türü tanımlanmıştır. TIMP-2, vücutta yapısal olarak geniş ölçüde ifade edilirken, TIMP-1, TIMP-3 ve TIMP-4 ifadesi, uyarılabilir ve sıklıkla doku özgünlüğü sergilemektedir. TIMP-2, 194 amino asitten oluşan, çözünebilir, glikozile edilmemiş, salgılanan bir proteindir. MSS'de, TIMP-2'nin ifadesi, nöronal progenitör hücrelerin popülasyonları ile zenginleştirilir, bu da TIMP-2'nin nörogenezde bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. TIMP-2'nin çeşitli nöropatolojik durumlarla da ilişkili olduğu bilinmektedir (Lee ve Kim 2014). Yapılan bir çalışmada, BOS'daki verilere benzer şekilde, PH'nin postmortem beyin dokusunun substantia nigra'sında TIMP-1 seviyesinin yükseldiği ancak TIMP-2 seviyelerinin yükselmediği gösterilmiştir (Lorenzl, Albers ve ark. 2003). Yapılan başka bir çalışmada TIMP-2, MS, inme, AH ve HH'lerinin serum veya beyin-omurilik sıvısında belirgin olarak artmış olup, bu hastalıklarda TIMP-2'nin koruyucu bir rolü olduğunu düşünülmektedir (Lee ve Kim 2014). Çalışmalarımızın sonucunda elde ettiğimiz veriler literatür bulguları ile uyumlu olarak 48.saatte A β grubunda TIMP-2 seviyesinin en yüksek değere ulaştığını göstermiştir. α -sinüklein patolojisinin TIMP-2 protein salınımı üzerinde bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. 48.saatte DLB patolojisi PH patolojisi ile karşılaştırıldığında DLB patolojisinin TIMP-2 seviyesini azalttığı

gösterilmiştir. 72. saatte DLB patolojisi AH patolojisi ile karşılaştırıldığında ise A β 'nın salınan TIMP-2 seviyesini arttırdığı gösterilmiştir.

Platelet Kökenli Büyüme Faktörü Beta Polipeptit (PDGF-BB), tirozin kinaz PDGF reseptörlerine bağlanma yetenekleri farklı olan çeşitli izoformlarda bulunan PDGF / VEGF ailesine ait büyüme faktörüdür. Son yıllarda, PDGF-BB çalışmasında ve erişkin nörogenezinin primer bölgesi olan subventriküler bölgede (SVZ) nörogenez üzerindeki etkilerine ilgi artmıştır (Funa, Yamada ve ark. 1996). Yapılan bir çalışmada AH ile kontroller karşılaştırıldığında plazmada sadece 18 proteinden üç proteininin (EGF, PDG-BB ve MIP-1 δ) önemli ölçüde değiştiği bulunmuştur. AH grubu ile demansa sahip grup arasında ise proteinlerin hiçbirinin AH'den farklı olmadığı gösterilmiştir (Bjorkqvist, Ohlsson ve ark. 2012). Yapılan başka bir çalışmada orta şiddette PH olan 12 hasta, 2 haftalık bir süre boyunca plasebo tolere edilebilirliği ile karşılaştırıldığında serebral ventriküllere infüze edilen 3 farklı PDGF-BB dozunun tolere edilebilirliği açısından değerlendirilmiştir. Bu çalışma ilk insan çalışmasıdır ve takip süresi boyunca PDGF-BB uygulanan bireylerin serumlarında hiçbir anti-PDGF antikoru tespit edilmemiştir. 48. saatte çalışmalarımızdan elde ettiğimiz veriler A β patolojisi varlığında salınan PDGF-BB seviyesinin arttığını göstermektedir. SNCA+A β grubu A β grubu ile karşılaştırıldığında ise A β grubunda PDGF-BB seviyesinin arttığı tespit edilmiştir. Literatürde α -sinüklein+A β patolojisi ve PDGF-BB ilişkisine dair herhangi bir veri bulunmamaktadır. 48. saatte ve 72. saatte oluşturulan DLB benzeri patolojide PDGF-BB seviyesinin azaldığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda, salınan sitokin seviyelerinin A β , α -sinüklein ve α -sinüklein+A β kompleks patolojileri ile kendi kontrol gruplarına kıyasla nasıl bir değişim gösterdiği Şekil 5-3 ; 5-10 arasında özetlenmiştir.

SNCA uygulanmış SHSY5Y hücrelerinde
MOCK uygulanmış hücrelere kıyasla değişenler
(48 saat)



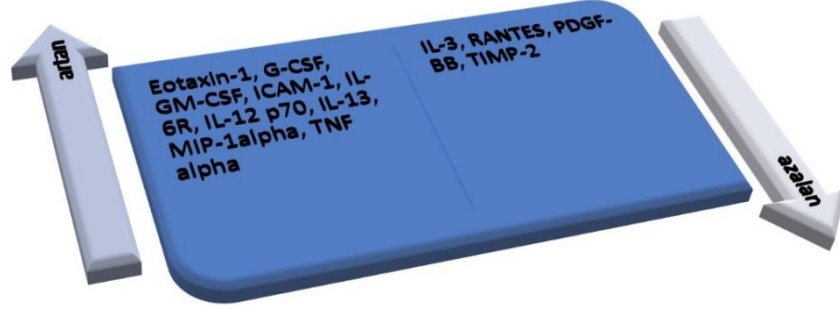
Şekil 5-3: α -sinüklein aşırı ekspresyonuna bağlı olarak araştırılan parametrelerdeki değişiklikler.

A β uygulanmış SHSY5Y hücrelerinde
uygulama yapılmamış kontrol hücrelere kıyasla değişenler
(48 saat)



Şekil 5-4: A β uygulamasına bağlı olarak hiçbir uygulama yapılmamış kontrol hücrelerinde araştırılan parametrelerdeki değişiklikler.

SNCA+A β uygulanmış SHSY5Y hücrelerinde
SNCA uygulanmış hücelere kıyasla değışenler
(48 saat)



Şekil 5-5: SNCA+A β uygulamasına bağılı olarak SNCA plazmidi uygulanmış hücelerde araştırılan parametrelerdeki değışiklikler.

SNCA+A β uygulanmış SHSY5Y hücelerinde
A β uygulanmış hücelere kıyasla değışenler
(48 saat)



Şekil 5-6: SNCA+A β uygulamasına bağılı olarak A β uygulanmış hücelerde araştırılan parametrelerdeki değışiklikler.

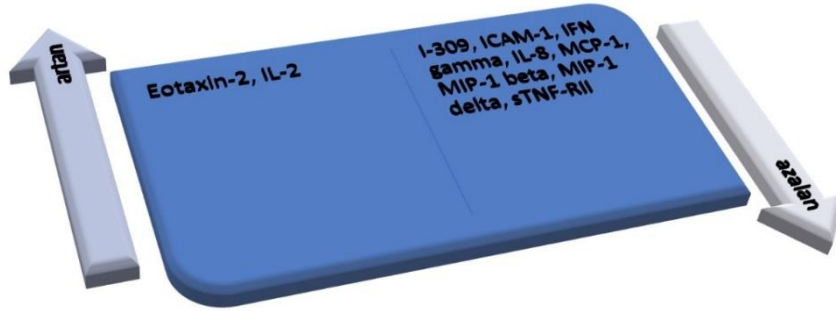


Şekil 5-7: α -sinüklein aşırı ekspresyonuna bağlı olarak araştırılan parametrelerdeki değişiklikler.



Şekil 5-8: A β uygulamasına bağlı olarak hiçbir uygulama yapılmamış kontrol hücrelerinde araştırılan parametrelerdeki değişiklikler.

SNCA+A β uygulanmış SHSY5Y hücrelerinde
SNCA uygulanmış hücrelere kıyasla değişenler
(72 saat)



Şekil 5-9: SNCA+A β uygulamasına bağlı olarak SNCA plazmidi uygulanmış hücrelerde araştırılan parametrelerdeki değişiklikler.

SNCA+A β uygulanmış SHSY5Y hücrelerinde
A β uygulanmış hücrelere kıyasla değişenler
(72 saat)



Şekil 5-10: SNCA+A β uygulamasına bağlı olarak A β uygulanmış hücrelerde araştırılan parametrelerdeki değişiklikler.

Sonuçlarımızı genel olarak yorumlayacak olursak: 48 saat uygulama sonrasında ölçülen membran hasarı; gruplar arasında istatistiksel olarak yakın anlamlılık göstermektedir. Bu durumda A β ve/veya α -sinüklein artışı ile tetiklenen inflamatuvar faktörler salınan proteinlerde A β ve/veya α -sinüklein patolojilerine cevap olarak değişebilmektedir. A β patolojisinde genel olarak salınan pro-inflamatuvar proteinlerin (Eotaxin-1; Eotaxin-2; MIP-1 α ; MIP-1 β ; MIP-1 δ ; ICAM-1; I-309) seviyesi artmakla birlikte bazı anti-inflamatuvar proteinlerin seviyesi de artmaktadır (IL-3; IL-10; IL-11). Anti-

inflamatuvar proteinlerden IP-10; TGF β -1; TNF- α ; TNF- β ; sTNF-RI seviyesi azalmaktadır. α -sinüklein patolojisinde ise yine pro-inflamatuvar sitokin olan ICAM-1 ve MCP-1 seviyesi artmış; büyük çoğunluğu pro-inflamatuvar olmak üzere bazı anti-inflamatuvar proteinlerin seviyesi azalmaktadır (IL-6; IL-10). α -sinüklein+A β patolojisi varlığında G-CSF; IL-15; MIP-1 α (pro-inflamatuvar sitokin) ve TGF β -1(anti-inflamatuvar bir sitokin) seviyesinin arttığı; I-309; IL-3; PDGF-BB seviyesinin ise azaldığı gösterilmiştir.

72 saat uygulama sonrası ölçülen membran hasarı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olmadığından A β ve/veya α -sinükleinin toksik etkileri ortaya çıkmamıştır. Bu durumda A β ve/veya α -sinüklein artışı ile tetiklenen faktörler, bu proteinlerin toksik etki olmasa dahi belirli koşullarda salınmasında etkili olabileceği proteinleri gösteriyor olabilir. A β patolojisinde pro-inflamatuvar sitokin seviyesinin (GM-CSF; IFN- γ ; IL-8; MCP-1) ve anti-inflamatuvar (G-CSF; IL-4; IL-6) sitokin seviyesinin arttığı gösterilmiştir. IL-3; IL-13; TNF- α ; sTNF-RI; TGF β -1 anti-inflamatuvar sitokin ve bazı pro-inflamatuvar sitokinlerin (IL-15; IL-16; MIG) azaldığı gösterilmiştir. α -sinüklein patolojisinde pro-inflamatuvar sitokin (Eotaxin-1; ICAM-1; IFN- γ); anti-inflamatuvar sitokin (TNF- α ; IL-13) seviyesinin arttığı gösterilmiştir. IL-3; IL-4; IL-6 anti-inflamatuvar sitokinlerin ve bazı pro-inflamtuvar sitokinlerin (IL-8; MIP1 δ ; RANTES) seviyesinin ise azaldığı gösterilmiştir. α -sinüklein+A β patolojisi varlığında G-CSF; GM-CSF; TNF- α seviyelerinin arttığı; IL-3; IL-4; IL6sR; IL-10; sTNF-R2; TNF- α anti-inflamatuvar sitokinlerin ve Eotaxin-2; IL-8; MCP-1; MCP-2; PDGF-BB pro-inflamatuvar sitokin seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızın bulguları A β patolojisinde inflamatuvar yanıtta 48 saatte belirgin ve genel bir artış olduğunu gösterirken, α -sinüklein patolojisinde ise bu cevabın çok sınırlı olduğu ve genellikle salınan proteillerinin seviyesindeki bir azalmayla seyrettiğini işaret etmektedir. 48.saatteki α -sinüklein+A β kompleks patolojisinde ise bu yanıtın hem A β patolojisine hem de α -sinüklein patolojine kıyasla belirgin bir değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Her üç modelin 72 saatteki sonuçlarına göre salınan protein seviyeleri ve çeşitleri bazı proteinler açısından korunsa bile farklılıklar göstermekte ve inflamatuvar yanıtın, patolojilerin süresiyle birlikte değişebilecek dinamik bir profil izleyebileceğine işaret etmektedir.

KAYNAKLAR

- Abeliovich, A. and A. D. Gitler (2016). "Defects in trafficking bridge Parkinson's disease pathology and genetics." *Nature* **539**(7628): 207-216.
- Akdis, M., A. Aab, C. Altunbulakli, K. Azkur, R. A. Costa, R. Cramer, S. Duan, T. Eiwegger, A. Eljaszewicz, R. Ferstl, R. Frei, M. Garbani, A. Globinska, L. Hess, C. Huitema, T. Kubo, Z. Komlosi, P. Konieczna, N. Kovacs, U. C. Kucuksezer, N. Meyer, H. Morita, J. Olzhausen, L. O'Mahony, M. Pezer, M. Prati, A. Rebane, C. Rhyner, A. Rinaldi, M. Sokolowska, B. Stanic, K. Sugita, A. Treis, W. van de Veen, K. Wanke, M. Wawrzyniak, P. Wawrzyniak, O. F. Wirz, J. S. Zakzuk and C. A. Akdis (2016). "Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor beta, and TNF-alpha: Receptors, functions, and roles in diseases." *J Allergy Clin Immunol* **138**(4): 984-1010.
- Akimoto, N., K. Honda, D. Uta, K. Beppu, Y. Ushijima, Y. Matsuzaki, S. Nakashima, M. A. Kido, K. Imoto, Y. Takano and M. Noda (2013). "CCL-1 in the spinal cord contributes to neuropathic pain induced by nerve injury." *Cell Death Dis* **4**: e679.
- Akkila, W. M., R. L. Chambers, O. I. Ornatsky and J. C. McDermott (1997). "Molecular cloning of up-regulated cytoskeletal genes from regenerating skeletal muscle: potential role of myocyte enhancer factor 2 proteins in the activation of muscle-regeneration-associated genes." *Biochem J* **325** (Pt 1): 87-93.
- Allan, S. M., P. J. Tyrrell and N. J. Rothwell (2005). "Interleukin-1 and neuronal injury." *Nat Rev Immunol* **5**(8): 629-640.
- Allen Reish, H. E. and D. G. Standaert (2015). "Role of alpha-synuclein in inducing innate and adaptive immunity in Parkinson disease." *J Parkinsons Dis* **5**(1): 1-19.
- Alves, S., G. Churlaud, M. Audrain, K. Michaelsen-Preusse, R. Fol, B. Souchet, J. Braudeau, M. Korte, D. Klatzmann and N. Cartier (2017). "Interleukin-2 improves amyloid pathology, synaptic failure and memory in Alzheimer's disease mice." *Brain* **140**(3): 826-842.
- Awad, F., E. Assrawi, C. Louvrier, C. Jumeau, S. Georgin-Lavialle, G. Grateau, S. Amselem, I. Giurgea and S. A. Karabina (2018). "Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications." *Pharmacol Ther*.
- Azizi, G., N. Khannazer and A. Mirshafiey (2014). "The Potential Role of Chemokines in Alzheimer's Disease Pathogenesis." *Am J Alzheimers Dis Other Dement* **29**(5): 415-425.
- Banchereau, J., V. Pascual and A. O'Garra (2012). "From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines." *Nat Immunol* **13**(10): 925-931.
- Bantug, G. R., L. Galluzzi, G. Kroemer and C. Hess (2018). "The spectrum of T cell metabolism in health and disease." *Nat Rev Immunol* **18**(1): 19-34.
- Becher, B., S. Spath and J. Goverman (2017). "Cytokine networks in neuroinflammation." *Nat Rev Immunol* **17**(1): 49-59.
- Bjorkqvist, M., M. Ohlsson, L. Minthon and O. Hansson (2012). "Evaluation of a previously suggested plasma biomarker panel to identify Alzheimer's disease." *PLoS One* **7**(1): e29868.
- Boissonneault, V., M. Filali, M. Lessard, J. Relton, G. Wong and S. Rivest (2009). "Powerful beneficial effects of macrophage colony-stimulating factor on beta-amyloid

- deposition and cognitive impairment in Alzheimer's disease." *Brain* **132**(Pt 4): 1078-1092.
- Bolos, M., J. R. Perea and J. Avila "Alzheimer's disease as an inflammatory disease." *Biomol Concepts* **8**(1): 37-43.
- Bolos, M., J. R. Perea and J. Avila (2017). "Alzheimer's disease as an inflammatory disease." *Biomol Concepts* **8**(1): 37-43.
- Bonifati, V., P. Rizzu, F. Squitieri, E. Krieger, N. Vanacore, J. C. van Swieten, A. Brice, C. M. van Duijn, B. Oostra, G. Meco and P. Heutink (2003). "DJ-1(PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism." *Neurol Sci* **24**(3): 159-160.
- Boothby, M. and R. C. Rickert (2017). "Metabolic Regulation of the Immune Humoral Response." *Immunity* **46**(5): 743-755.
- Bove, J. and C. Perier (2012). "Neurotoxin-based models of Parkinson's disease." *Neuroscience* **211**: 51-76.
- Brodacki, B., J. Staszewski, B. Toczyłowska, E. Kozłowska, N. Drela, M. Chalimoniuk and A. Stepien (2008). "Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNF α , and INF γ concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism." *Neurosci Lett* **441**(2): 158-162.
- Bruck, D., G. K. Wenning, N. Stefanova and L. Fellner "Glia and alpha-synuclein in neurodegeneration: A complex interaction." *Neurobiol Dis* **85**: 262-274.
- Bruck, D., G. K. Wenning, N. Stefanova and L. Fellner (2016). "Glia and alpha-synuclein in neurodegeneration: A complex interaction." *Neurobiol Dis* **85**: 262-274.
- Budagian, V., E. Bulanova, Z. Orinska, T. Pohl, E. C. Borden, R. Silverman and S. Bulfone-Paus (2004). "Reverse signaling through membrane-bound interleukin-15." *J Biol Chem* **279**(40): 42192-42201.
- Camara-Lemarroy, C. R., F. J. Guzman-de la Garza and N. E. Fernandez-Garza (2010). "Molecular inflammatory mediators in peripheral nerve degeneration and regeneration." *Neuroimmunomodulation* **17**(5): 314-324.
- Chang, R., K. L. Yee and R. K. Sumbria (2017). "Tumor necrosis factor alpha Inhibition for Alzheimer's Disease." *J Cent Nerv Syst Dis* **9**: 1179573517709278.
- Chen, G. F., T. H. Xu, Y. Yan, Y. R. Zhou, Y. Jiang, K. Melcher and H. E. Xu (2017). "Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development." *Acta Pharmacol Sin* **38**(9): 1205-1235.
- Chen, J. H., K. F. Ke, J. H. Lu, Y. H. Qiu and Y. P. Peng (2015). "Protection of TGF- β 1 against neuroinflammation and neurodegeneration in Abeta1-42-induced Alzheimer's disease model rats." *PLoS One* **10**(2): e0116549.
- Chen, J. M., G. X. Jiang, Q. W. Li, Z. M. Zhou and Q. Cheng (2014). "Increased serum levels of interleukin-18, -23 and -17 in Chinese patients with Alzheimer's disease." *Dement Geriatr Cogn Disord* **38**(5-6): 321-329.
- Coronel, R., A. Bernabeu-Zornoza, C. Palmer, M. Muniz-Moreno, A. Zambrano, E. Cano and I. Liste (2018). "Role of Amyloid Precursor Protein (APP) and Its Derivatives in the Biology and Cell Fate Specification of Neural Stem Cells." *Mol Neurobiol*.
- Correa, J. D., D. Starling, A. L. Teixeira, P. Caramelli and T. A. Silva (2011). "Chemokines in CSF of Alzheimer's disease patients." *Arq Neuropsiquiatr* **69**(3): 455-459.
- Cramer, S. D., P. D. Aplan and S. K. Durum (2016). "Therapeutic targeting of IL-7R α signaling pathways in ALL treatment." *Blood* **128**(4): 473-478.

- Culpan, D., J. Palmer, J. S. Miners, S. Love and P. G. Kehoe "The influence of tumour necrosis factor- α (TNF- α) on amyloid-beta (A β)-degrading enzymes in vitro." Int J Mol Epidemiol Genet **2**(4): 409-415.
- De Franceschi, G., C. Fecchio, R. Sharon, A. H. Schapira, C. Proukakis, V. Bellotti and P. Polverino de Laureto "alpha-Synuclein Structural Features Inhibit Harmful Polyunsaturated Fatty Acids Oxidation, Suggesting Roles in Neuroprotection." J Biol Chem.
- De Franceschi, G., C. Fecchio, R. Sharon, A. H. V. Schapira, C. Proukakis, V. Bellotti and P. P. de Laureto "alpha-Synuclein structural features inhibit harmful polyunsaturated fatty acid oxidation, suggesting roles in neuroprotection." J Biol Chem **292**(17): 6927-6937.
- Dembic, Z. (2015). "The Cytokines of the Immune System."
- Dendrou, C. A., G. McVean and L. Fugger (2016). "Neuroinflammation - using big data to inform clinical practice." Nat Rev Neurol **12**(12): 685-698.
- Doherty, T. M., R. A. Seder and A. Sher (1996). "Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages." J Immunol **156**(2): 735-741.
- Duan, R. S., X. Yang, Z. G. Chen, M. O. Lu, C. Morris, B. Winblad and J. Zhu (2008). "Decreased fractalkine and increased IP-10 expression in aged brain of APP(swe) transgenic mice." Neurochem Res **33**(6): 1085-1089.
- Dursun, E., D. Gezen-Ak, H. Hanagasi, B. Bilgic, E. Lohmann, S. Ertan, I. L. Atasoy, M. Alaylioglu, O. S. Araz, B. Onal, A. Gunduz, H. Apaydin, G. Kiziltan, T. Ulutin, H. Gurvit and S. Yilmazer (2015). "The interleukin 1 α , interleukin 1 β , interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease." J Neuroimmunol **283**: 50-57.
- Edwards, T. L., W. K. Scott, C. Almonte, A. Burt, E. H. Powell, G. W. Beecham, L. Wang, S. Zuchner, I. Konidari, G. Wang, C. Singer, F. Nahab, B. Scott, J. M. Stajich, M. Pericak-Vance, J. Haines, J. M. Vance and E. R. Martin "Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease." Ann Hum Genet **74**(2): 97-109.
- Erta, M., A. Quintana and J. Hidalgo (2012). "Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system." Int J Biol Sci **8**(9): 1254-1266.
- Fakhoury, M. (2015). "Role of Immunity and Inflammation in the Pathophysiology of Neurodegenerative Diseases." Neurodegener Dis **15**(2): 63-69.
- Frey, U., Y. Y. Huang and E. R. Kandel (1993). "Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons." Science **260**(5114): 1661-1664.
- Funa, K., N. Yamada, G. Brodin, K. Pietz, A. Ahgren, K. Wictorin, O. Lindvall and P. Odin (1996). "Enhanced synthesis of platelet-derived growth factor following injury induced by 6-hydroxydopamine in rat brain." Neuroscience **74**(3): 825-833.
- Galimberti, D., N. Schoonenboom, P. Scheltens, C. Fenoglio, F. Bouwman, E. Venturelli, I. Guidi, M. A. Blankenstein, N. Bresolin and E. Scarpini (2006). "Intrathecal chemokine synthesis in mild cognitive impairment and Alzheimer disease." Arch Neurol **63**(4): 538-543.
- Galimberti, D., E. Venturelli, C. Fenoglio, I. Guidi, C. Villa, L. Bergamaschini, F. Cortini, D. Scalabrini, P. Baron, C. Vergani, N. Bresolin and E. Scarpini (2008). "Intrathecal levels of IL-6, IL-11 and LIF in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration." J Neurol **255**(4): 539-544.

- Gezen-Ak, D., I. L. Atasoy, E. Candas, M. Alaylioglu, S. Yilmazer and E. Dursun (2017). "Vitamin D Receptor Regulates Amyloid Beta 1-42 Production with Protein Disulfide Isomerase A3." ACS Chem Neurosci **8**(10): 2335-2346.
- Gezen-Ak, D., E. Dursun, H. Hanagasi, B. Bilgiç, E. Lohman. Ö, Selin-Araz, I. L. Atasoy, M. Alaylioglu, B.Önal, H.Gurvit(2013)."BDNF,TNF- α , HSP-90, CFH, and IL-10 Serum Levels In Patient With Early Or Late Onset Alzheimer's Disease Or Mild Cognitive Impairment." J Alzheimers Dis **37**(2013) 185-195
- Goedert, M., R. Jakes and M. G. Spillantini "The Synucleinopathies: Twenty Years On." J Parkinsons Dis **7**(s1): S53-S71.
- Goedert, M., R. Jakes and M. G. Spillantini (2017). "The Synucleinopathies: Twenty Years On." J Parkinsons Dis **7**(s1): S53-S71.
- Gouarne, C., J. Tracz, M. G. Paoli, V. Deluca, M. Seimandi, G. Tardif, M. Xilouri, L. Stefanis, T. Bordet and R. M. Pruss "Protective role of olesoxime against wild-type alpha-synuclein-induced toxicity in human neuronally differentiated SHSY-5Y cells." Br J Pharmacol **172**(1): 235-245.
- Gouarne, C., J. Tracz, M. G. Paoli, V. Deluca, M. Seimandi, G. Tardif, M. Xilouri, L. Stefanis, T. Bordet and R. M. Pruss (2015). "Protective role of olesoxime against wild-type alpha-synuclein-induced toxicity in human neuronally differentiated SHSY-5Y cells." Br J Pharmacol **172**(1): 235-245.
- Gualtierotti, R., L. Guarnaccia, M. Beretta, S. E. Navone, R. Campanella, L. Riboni, P. Rampini and G. Marfia "Modulation of Neuroinflammation in the Central Nervous System: Role of Chemokines and Sphingolipids." Adv Ther **34**(2): 396-420.
- Gualtierotti, R., L. Guarnaccia, M. Beretta, S. E. Navone, R. Campanella, L. Riboni, P. Rampini and G. Marfia (2017). "Modulation of Neuroinflammation in the Central Nervous System: Role of Chemokines and Sphingolipids." Adv Ther **34**(2): 396-420.
- Hanisch, U. K. and R. Quirion (1995). "Interleukin-2 as a neuroregulatory cytokine." Brain Res Brain Res Rev **21**(3): 246-284.
- Harkness, K. A., P. Adamson, J. D. Sussman, G. A. Davies-Jones, J. Greenwood and M. N. Woodroffe (2000). "Dexamethasone regulation of matrix metalloproteinase expression in CNS vascular endothelium." Brain **123** (Pt 4): 698-709.
- Hashioka, S., A. Klegeris, C. Schwab, S. Yu and P. L. McGeer (2010). "Differential expression of interferon-gamma receptor on human glial cells in vivo and in vitro." J Neuroimmunol **225**(1-2): 91-99.
- Heese, K., Y. Nagai and T. Sawada (2000). "Induction of rat L-phosphoserine phosphatase by amyloid-beta (1-42) is inhibited by interleukin-11." Neurosci Lett **288**(1): 37-40.
- Heneka, M. T., M. K. O'Banion, D. Terwel and M. P. Kummer "Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease." J Neural Transm (Vienna) **117**(8): 919-947.
- Heppner, F. L., R. M. Ransohoff and B. Becher (2015). "Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease." Nat Rev Neurosci **16**(6): 358-372.
- Huber, A. K., D. A. Giles, B. M. Segal and D. N. Irani (2018). "An emerging role for eotaxins in neurodegenerative disease." Clin Immunol **189**: 29-33.
- Hunter, C. A. and S. A. Jones (2015). "IL-6 as a keystone cytokine in health and disease." Nat Immunol **16**(5): 448-457.
- Ivashkiv, L. B. and X. Hu (2004). "Signaling by STATs." Arthritis Res Ther **6**(4): 159-168.
- Janssens, R., S. Struyf and P. Proost (2017). "The unique structural and functional features of CXCL12." Cell Mol Immunol.

- Janssens, Y., E. Wynendaele, F. Verbeke, N. Debunne, B. Gevaert, K. Audenaert, C. Van DeWiele and B. De Spiegeleer (2018). "Screening of quorum sensing peptides for biological effects in neuronal cells." *Peptides* **101**: 150-156.
- Kalinowska, A. and J. Losy (2006). "PECAM-1, a key player in neuroinflammation." *Eur J Neurol* **13**(12): 1284-1290.
- Kang, W., W. Chen, Q. Yang, L. Zhang, L. Zhang, X. Wang, F. Dong, Y. Zhao, S. Chen, T. J. Quinn, J. Zhang, S. Chen and J. Liu (2016). "Salivary total alpha-synuclein, oligomeric alpha-synuclein and SNCA variants in Parkinson's disease patients." *Sci Rep* **6**: 28143.
- . "https://www.sciencedirect.com/science/book/9780124199989
<Kaplan 2016 Immunology and Microbiology.pdf>."
- T. L. Alley, Moscatello, K. New YORK, KAPLAN MEDICAL.
- Kempuraj, D., R. Thangavel, P. A. Natteru, G. P. Selvakumar, D. Saeed, H. Zahoor, S. Zaheer, S. S. Iyer and A. Zaheer "Neuroinflammation Induces Neurodegeneration." *J Neurol Neurosurg Spine* **1**(1).
- Kempuraj, D., R. Thangavel, P. A. Natteru, G. P. Selvakumar, D. Saeed, H. Zahoor, S. Zaheer, S. S. Iyer and A. Zaheer (2016). "Neuroinflammation Induces Neurodegeneration." *J Neurol Neurosurg Spine* **1**(1).
- Khoshbakht, T., M. Soosanabadi, M. Neishaboury, K. Kamali, M. Karimlou, N. Bazazzadegan and H. R. Khorram Khorshid (2015). "An Association Study on IL16 Gene Polymorphisms with the Risk of Sporadic Alzheimer's Disease." *Avicenna J Med Biotechnol* **7**(3): 128-132.
- King, E., J. T. O'Brien, P. Donaghy, C. Morris, N. Barnett, K. Olsen, C. Martin-Ruiz, J. P. Taylor and A. J. Thomas (2018). "Peripheral inflammation in prodromal Alzheimer's and Lewy body dementias." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **89**(4): 339-345.
- Klein, R. S., C. Garber and N. Howard (2017). "Infectious immunity in the central nervous system and brain function." *Nat Immunol* **18**(2): 132-141.
- Kolls, J. K. and A. Linden (2004). "Interleukin-17 family members and inflammation." *Immunity* **21**(4): 467-476.
- Korn, T. and A. Kallies (2017). "T cell responses in the central nervous system." *Nat Rev Immunol* **17**(3): 179-194.
- Kosloski, L. M., E. A. Kosmacek, K. E. Olson, R. L. Mosley and H. E. Gendelman (2013). "GM-CSF induces neuroprotective and anti-inflammatory responses in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxicated mice." *J Neuroimmunol* **265**(1-2): 1-10.
- Kovalevich, J. and D. Langford "Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology." *Methods Mol Biol* **1078**: 9-21.
- Kovalevich, J. and D. Langford (2013). "Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology." *Methods Mol Biol* **1078**: 9-21.
- Krishna, A., M. Biryukov, C. Trefois, P. M. Antony, R. Hussong, J. Lin, M. Heinaniemi, G. Glusman, S. Koglsberger, O. Boyd, B. H. van den Berg, D. Linke, D. Huang, K. Wang, L. Hood, A. Tholey, R. Schneider, D. J. Galas, R. Balling and P. May "Systems genomics evaluation of the SH-SY5Y neuroblastoma cell line as a model for Parkinson's disease." *BMC Genomics* **15**: 1154.
- Krismer, F. and G. K. Wenning (2017). "Multiple system atrophy: insights into a rare and debilitating movement disorder." *Nat Rev Neurol* **13**(4): 232-243.
- Lardenoije, R., A. Iatrou, G. Kenis, K. Kompotis, H. W. Steinbusch, D. Mastroeni, P. Coleman, C. A. Lemere, P. R. Hof, D. L. van den Hove and B. P. Rutten "The epigenetics of aging and neurodegeneration." *Prog Neurobiol* **131**: 21-64.

- Lardenoije, R., A. Iatrou, G. Kenis, K. Kompotis, H. W. Steinbusch, D. Mastroeni, P. Coleman, C. A. Lemere, P. R. Hof, D. L. van den Hove and B. P. Rutten (2015). "The epigenetics of aging and neurodegeneration." Prog Neurobiol **131**: 21-64.
- Laske, C., K. Stellos, E. Stransky, T. Leyhe and M. Gawaz (2009). "Decreased plasma levels of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) in patients with early Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **17**(1): 115-123.
- Laycock, S. R. and R. O. Ball (1990). "Alleviation of hysteria in laying hens with dietary tryptophan." Can J Vet Res **54**(2): 291-295.
- Lee, E. J. and H. S. Kim (2014). "The anti-inflammatory role of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in lipopolysaccharide-stimulated microglia." J Neuroinflammation **11**: 116.
- Lee, W. J., Y. C. Liao, Y. F. Wang, I. F. Lin, S. J. Wang and J. L. Fuh (2018). "Plasma MCP-1 and Cognitive Decline in Patients with Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: A Two-year Follow-up Study." Sci Rep **8**(1): 1280.
- Levin, J., A. Kurz, T. Arzberger, A. Giese and G. U. Hoglinger (2016). "The Differential Diagnosis and Treatment of Atypical Parkinsonism." Dtsch Arztebl Int **113**(5): 61-69.
- Lim, J. C., W. Lu, J. M. Beckel and C. H. Mitchell "Neuronal Release of Cytokine IL-3 Triggered by Mechanosensitive Autostimulation of the P2X7 Receptor Is Neuroprotective." Front Cell Neurosci **10**: 270.
- Lin, H. C., M. Y. Ho, C. M. Tsen, C. C. Huang, C. C. Wu, Y. J. Huang, I. L. Hsiao and C. Y. Chuang (2017). "From the Cover: Comparative Proteomics Reveals Silver Nanoparticles Alter Fatty Acid Metabolism and Amyloid Beta Clearance for Neuronal Apoptosis in a Triple Cell Coculture Model of the Blood-Brain Barrier." Toxicol Sci **158**(1): 151-163.
- Lindqvist, D., S. Hall, Y. Surova, H. M. Nielsen, S. Janelidze, L. Brundin and O. Hansson (2013). "Cerebrospinal fluid inflammatory markers in Parkinson's disease--associations with depression, fatigue, and cognitive impairment." Brain Behav Immun **33**: 183-189.
- Liu, C., G. Cui, M. Zhu, X. Kang and H. Guo (2014). "Neuroinflammation in Alzheimer's disease: chemokines produced by astrocytes and chemokine receptors." Int J Clin Exp Pathol **7**(12): 8342-8355.
- Liu, W., Y. Gao and N. Chang (2017). "Nurr1 overexpression exerts neuroprotective and anti-inflammatory roles via down-regulating CCL2 expression in both in vivo and in vitro Parkinson's disease models." Biochem Biophys Res Commun **482**(4): 1312-1319.
- Locati, M. and P. M. Murphy (1999). "Chemokines and chemokine receptors: biology and clinical relevance in inflammation and AIDS." Annu Rev Med **50**: 425-440.
- Lopes, F. M., R. Schroder, M. L. da Frota, Jr., A. Zanutto-Filho, C. B. Muller, A. S. Pires, R. T. Meurer, G. D. Colpo, D. P. Gelain, F. Kapczinski, J. C. Moreira, C. Fernandes Mda and F. Klamt (2010). "Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies." Brain Res **1337**: 85-94.
- Lopez, C., P. Zamorano, S. Teuber, M. Salas, C. Otth, M. A. Hidalgo, I. Concha and A. Zambrano (2017). "Interleukin-3 Prevents Cellular Death Induced by Oxidative Stress in HEK293 Cells." J Cell Biochem **118**(6): 1330-1340.
- Lorenzl, S., D. S. Albers, P. A. LeWitt, J. W. Chirichigno, S. L. Hilgenberg, M. E. Cudkowicz and M. F. Beal (2003). "Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases are

- elevated in cerebrospinal fluid of neurodegenerative diseases." J Neurol Sci **207**(1-2): 71-76.
- Lotan, R. (1996). "Retinoids in cancer chemoprevention." FASEB J **10**(9): 1031-1039.
- Lucas, S. M., N. J. Rothwell and R. M. Gibson (2006). "The role of inflammation in CNS injury and disease." Br J Pharmacol **147 Suppl 1**: S232-240.
- Luo, X. J., M. Li, L. Huang, K. Nho, M. Deng, Q. Chen, D. R. Weinberger, A. A. Vasquez, M. Rijpkema, V. S. Mattay, A. J. Saykin, L. Shen, G. Fernandez, B. Franke, J. C. Chen, X. N. Chen, J. K. Wang, X. Xiao, X. B. Qi, K. Xiang, Y. M. Peng, X. Y. Cao, Y. Li, X. D. Shi, I. Alzheimer's Disease Neuroimaging, L. Gan and B. Su (2012). "The interleukin 3 gene (IL3) contributes to human brain volume variation by regulating proliferation and survival of neural progenitors." PLoS One **7**(11): e50375.
- Luster, A. D. (1998). "Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation." N Engl J Med **338**(7): 436-445.
- Ma, Q. L., P. Chan, M. Yoshii and K. Ueda (2003). "Alpha-synuclein aggregation and neurodegenerative diseases." J Alzheimers Dis **5**(2): 139-148.
- Magalhaes, C. A., M. D. G. Carvalho, L. P. Sousa, P. Caramelli and K. B. Gomes (2017). "Alzheimer's disease and cytokine IL-10 gene polymorphisms: is there an association?" Arq Neuropsiquiatr **75**(9): 649-656.
- Marciniak, E., E. Faivre, P. Dutar, C. Alves Pires, D. Demeyer, R. Caillierez, C. Laloux, L. Buee, D. Blum and S. Humez (2015). "The Chemokine MIP-1alpha/CCL3 impairs mouse hippocampal synaptic transmission, plasticity and memory." Sci Rep **5**: 15862.
- Mathy, N. L., W. Scheuer, M. Lanzendorfer, K. Honold, D. Ambrosius, S. Norley and R. Kurth (2000). "Interleukin-16 stimulates the expression and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes." Immunology **100**(1): 63-69.
- McCann, H., C. H. Stevens, H. Cartwright and G. M. Halliday "alpha-Synucleinopathy phenotypes." Parkinsonism Relat Disord **20 Suppl 1**: S62-67.
- McCann, H., C. H. Stevens, H. Cartwright and G. M. Halliday (2014). "alpha-Synucleinopathy phenotypes." Parkinsonism Relat Disord **20 Suppl 1**: S62-67.
- McCoy, M. K. and M. G. Tansey (2008). "TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease." J Neuroinflammation **5**: 45.
- McFarland, N. R. "Diagnostic Approach to Atypical Parkinsonian Syndromes." Continuum (Minneap Minn) **22**(4 Movement Disorders): 1117-1142.
- McFarland, N. R. (2016). "Diagnostic Approach to Atypical Parkinsonian Syndromes." Continuum (Minneap Minn) **22**(4 Movement Disorders): 1117-1142.
- McManus, R. M. and M. T. Heneka (2017). "Role of neuroinflammation in neurodegeneration: new insights." Alzheimers Res Ther **9**(1): 14.
- Mehler, M. F., R. Rozental, M. Dougherty, D. C. Spray and J. A. Kessler (1993). "Cytokine regulation of neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells." Nature **362**(6415): 62-65.
- Melino, G., C. J. Thiele, R. A. Knight and M. Piacentini (1997). "Retinoids and the control of growth/death decisions in human neuroblastoma cell lines." J Neurooncol **31**(1-2): 65-83.
- Menten, P., A. Wuyts and J. Van Damme (2002). "Macrophage inflammatory protein-1." Cytokine Growth Factor Rev **13**(6): 455-481.
- Meucci, O., A. Fatatis, A. A. Simen, T. J. Bushell, P. W. Gray and R. J. Miller (1998). "Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14500-14505.

- Miklossy, J., D. D. Doudet, C. Schwab, S. Yu, E. G. McGeer and P. L. McGeer (2006). "Role of ICAM-1 in persisting inflammation in Parkinson disease and MPTP monkeys." Exp Neurol **197**(2): 275-283.
- Millan, O. and M. Brunet (2016). "Cytokine-based immune monitoring." Clin Biochem **49**(4-5): 338-346.
- Mohd Hasni, D. S., S. M. Lim, A. V. Chin, M. P. Tan, P. J. H. Poi, S. B. Kamaruzzaman, A. B. A. Majeed and K. Ramasamy (2017). "Peripheral cytokines, C-X-C motif ligand10 and interleukin-13, are associated with Malaysian Alzheimer's disease." Geriatr Gerontol Int **17**(5): 839-846.
- Mori, S., P. Maher and B. Conti (2016). "Neuroimmunology of the Interleukins 13 and 4." Brain Sci **6**(2).
- Mrak, R. E. and W. S. Griffin (2001). "Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **22**(6): 903-908.
- Murphy, N. P., S. G. Ball and P. F. Vaughan (1991). "Potassium- and carbachol-evoked release of [3H]noradrenaline from human neuroblastoma cells, SH-SY5Y." J Neurochem **56**(5): 1810-1815.
- Nielsen, H. M., E. Londos, L. Minthon and S. M. Janciauskiene (2007). "Soluble adhesion molecules and angiotensin-converting enzyme in dementia." Neurobiol Dis **26**(1): 27-35.
- O'Boyle, G., J. G. Brain, J. A. Kirby and S. Ali (2007). "Chemokine-mediated inflammation: Identification of a possible regulatory role for CCR2." Mol Immunol **44**(8): 1944-1953.
- Oh, L. Y., P. H. Larsen, C. A. Krekoski, D. R. Edwards, F. Donovan, Z. Werb and V. W. Yong (1999). "Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is required for process outgrowth by oligodendrocytes." J Neurosci **19**(19): 8464-8475.
- Okita, Y., A. N. Rcom-H'cheo-Gauthier, M. Goulding, R. S. Chung, P. Faller and D. L. Pountney "Metallothionein, Copper and Alpha-Synuclein in Alpha-Synucleinopathies." Front Neurosci **11**: 114.
- Pahlman, S., L. Odelstad, E. Larsson, G. Grotte and K. Nilsson (1981). "Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate." Int J Cancer **28**(5): 583-589.
- Pasqualetti, G., D. J. Brooks and P. Edison (2015). "The role of neuroinflammation in dementias." Curr Neurol Neurosci Rep **15**(4): 17.
- Perez-Asensio, F. J., U. Perpina, A. M. Planas and E. Pozas (2013). "Interleukin-10 regulates progenitor differentiation and modulates neurogenesis in adult brain." J Cell Sci **126**(Pt 18): 4208-4219.
- Presgraves, S. P., T. Ahmed, S. Borwege and J. N. Joyce (2004). "Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists." Neurotox Res **5**(8): 579-598.
- Prinz, M. and J. Priller (2017). "The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease." Nat Neurosci **20**(2): 136-144.
- Qin, X., Q. Peng, Z. Zeng, Z. Chen, L. Lin, Y. Deng, X. Huang, J. Xu, H. Wu, S. Huang, S. Li and J. Zhao (2012). "Interleukin-1A -889C/T polymorphism and risk of Alzheimer's disease: a meta-analysis based on 32 case-control studies." J Neurol **259**(8): 1519-1529.
- Ramesh, G., A. G. MacLean and M. T. Philipp (2013). "Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain." Mediators Inflamm **2013**: 480739.

- Ransohoff, R. M. "How neuroinflammation contributes to neurodegeneration." Science **353**(6301): 777-783.
- Ransohoff, R. M. (2016). "How neuroinflammation contributes to neurodegeneration." Science **353**(6301): 777-783.
- Reddy, P. H., M. Manczak, X. Yin, M. C. Grady, A. Mitchell, R. Kandimalla and C. S. Kuruva "Protective effects of a natural product, curcumin, against amyloid beta induced mitochondrial and synaptic toxicities in Alzheimer's disease." J Investig Med **64**(8): 1220-1234.
- Rentzos, M., C. Nikolaou, E. Andreadou, G. P. Paraskevas, A. Rombos, M. Zoga, A. Tsoutsou, F. Boufidou, E. Kapaki and D. Vassilopoulos (2007). "Circulating interleukin-15 and RANTES chemokine in Parkinson's disease." Acta Neurol Scand **116**(6): 374-379.
- Rentzos, M., G. P. Paraskevas, E. Kapaki, C. Nikolaou, M. Zoga, A. Rombos, A. Tsoutsou and D. D. Vassilopoulos (2006). "Interleukin-12 is reduced in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and frontotemporal dementia." J Neurol Sci **249**(2): 110-114.
- Rentzos, M. and A. Rombos (2012). "The role of IL-15 in central nervous system disorders." Acta Neurol Scand **125**(2): 77-82.
- Roberts, W. K., N. E. Blachere, M. O. Frank, A. Dousmanis, R. M. Ransohoff and R. B. Darnell (2015). "A destructive feedback loop mediated by CXCL10 in central nervous system inflammatory disease." Ann Neurol **78**(4): 619-629.
- Roodveldt, C., A. Labrador-Garrido, E. Gonzalez-Rey, R. Fernandez-Montesinos, M. Caro, C. C. Lachaud, C. A. Waudby, M. Delgado, C. M. Dobson and D. Pozo (2010). "Glial innate immunity generated by non-aggregated alpha-synuclein in mouse: differences between wild-type and Parkinson's disease-linked mutants." PLoS One **5**(10): e13481.
- Rubio-Perez, J. M. and J. M. Morillas-Ruiz "A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines." ScientificWorldJournal **2012**: 756357.
- Rubio-Perez, J. M. and J. M. Morillas-Ruiz (2012). "A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines." ScientificWorldJournal **2012**: 756357.
- Ryan, D. A., W. C. Narrow, H. J. Federoff and W. J. Bowers "An improved method for generating consistent soluble amyloid-beta oligomer preparations for in vitro neurotoxicity studies." J Neurosci Methods **190**(2): 171-179.
- Ryan, D. A., W. C. Narrow, H. J. Federoff and W. J. Bowers (2010). "An improved method for generating consistent soluble amyloid-beta oligomer preparations for in vitro neurotoxicity studies." J Neurosci Methods **190**(2): 171-179.
- Sackmann, V., A. Ansell, C. Sackmann, H. Lund, R. A. Harris, M. Hallbeck and C. Nilsberth (2017). "Anti-inflammatory (M2) macrophage media reduce transmission of oligomeric amyloid beta in differentiated SH-SY5Y cells." Neurobiol Aging **60**: 173-182.
- Sanchez, S., C. Jimenez, A. C. Carrera, J. Diaz-Nido, J. Avila and F. Wandosell (2004). "A cAMP-activated pathway, including PKA and PI3K, regulates neuronal differentiation." Neurochem Int **44**(4): 231-242.
- Scalzo, P., A. S. de Miranda, D. C. Guerra Amaral, M. de Carvalho Vilela, F. Cardoso and A. L. Teixeira (2011). "Serum levels of chemokines in Parkinson's disease." Neuroimmunomodulation **18**(4): 240-244.
- Schlachetzki, J. C., S. W. Saliba and A. C. Oliveira "Studying neurodegenerative diseases in culture models." Rev Bras Psiquiatr **35 Suppl 2**: S92-100.

- Schliebs, R., K. Heidel, J. Apelt, M. Gniezdzińska, L. Kirazov and A. Szutowicz (2006). "Interaction of interleukin-1 β with muscarinic acetylcholine receptor-mediated signaling cascade in cholinergically differentiated SH-SY5Y cells." Brain Res **1122**(1): 78-85.
- Schneider, H., F. Pitossi, D. Balschun, A. Wagner, A. del Rey and H. O. Besedovsky (1998). "A neuromodulatory role of interleukin-1 β in the hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(13): 7778-7783.
- Scott, I. G., K. E. Akerman, J. E. Heikkilä, K. Kaila and L. C. Andersson (1986). "Development of a neural phenotype in differentiating ganglion cell-derived human neuroblastoma cells." J Cell Physiol **128**(2): 285-292.
- Shabab, T., R. Khanabdali, S. Z. Moghadamtousi, H. A. Kadir and G. Mohan "Neuroinflammation pathways: a general review." Int J Neurosci: 1-10.
- Shabab, T., R. Khanabdali, S. Z. Moghadamtousi, H. A. Kadir and G. Mohan (2017). "Neuroinflammation pathways: a general review." Int J Neurosci **127**(7): 624-633.
- Shimizu, Y. and K. Dobashi (2012). "CC-chemokine CCL15 expression and possible implications for the pathogenesis of IgE-related severe asthma." Mediators Inflamm **2012**: 475253.
- Shipley, M. M., C. A. Mangold and M. L. Szpara (2016). "Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line." J Vis Exp(108): 53193.
- Simi, A., N. Tsakiri, P. Wang and N. J. Rothwell (2007). "Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 1122-1126.
- Skundric, D. S. (2015). "Chemotactic signaling and beyond: link between interleukin-16 and axonal degeneration in multiple sclerosis." Neural Regen Res **10**(11): 1761-1763.
- Sokolova, A., M. D. Hill, F. Rahimi, L. A. Warden, G. M. Halliday and C. E. Shepherd (2009). "Monocyte chemoattractant protein-1 plays a dominant role in the chronic inflammation observed in Alzheimer's disease." Brain Pathol **19**(3): 392-398.
- Spittau, B. (2015). "Transforming growth factor β 1-mediated anti-inflammation slows progression of midbrain dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's disease?" Neural Regen Res **10**(10): 1578-1580.
- Stamelou, M. and K. P. Bhatia (2016). "Atypical parkinsonism - new advances." Curr Opin Neurol **29**(4): 480-485.
- Sutinen, E. M., T. Pirttilä, G. Anderson, A. Salminen and J. O. Ojala "Pro-inflammatory interleukin-18 increases Alzheimer's disease-associated amyloid- β production in human neuron-like cells." J Neuroinflammation **9**: 199.
- Swirski, M., J. S. Miners, R. de Silva, T. Lashley, H. Ling, J. Holton, T. Revesz and S. Love "Evaluating the relationship between amyloid- β and alpha-synuclein phosphorylated at Ser129 in dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease." Alzheimers Res Ther **6**(5-8): 77.
- Szelényi, J. (2001). "Cytokines and the central nervous system." Brain Res Bull **54**(4): 329-338.
- Taher, T. E., J. Bystrom, V. H. Ong, D. A. Isenberg, Y. Renaudineau, D. J. Abraham and R. A. Mageed (2017). "Intracellular B Lymphocyte Signalling and the Regulation of Humoral Immunity and Autoimmunity." Clin Rev Allergy Immunol **53**(2): 237-264.
- Takahashi, R. H., T. Nagao and G. K. Gouras "Plaque formation and the intraneuronal accumulation of beta-amyloid in Alzheimer's disease." Pathol Int **67**(4): 185-193.
- Tan, M. S., J. T. Yu, T. Jiang, X. C. Zhu, H. S. Guan and L. Tan (2014). "IL12/23 p40 inhibition ameliorates Alzheimer's disease-associated neuropathology and spatial memory in SAMP8 mice." J Alzheimers Dis **38**(3): 633-646.

- Thier, M., M. Hall, J. K. Heath, D. Pennica and J. Weis (1999). "Trophic effects of cardiotrophin-1 and interleukin-11 on rat dorsal root ganglion neurons in vitro." Brain Res Mol Brain Res **64**(1): 80-84.
- Tiwari, P. C. and R. Pal (2017). "The potential role of neuroinflammation and transcription factors in Parkinson disease." Dialogues Clin Neurosci **19**(1): 71-80.
- Tong, H., X. Zhang, X. Meng, P. Xu, X. Zou and S. Qu (2017). "Amyloid-beta peptide decreases expression and function of glutamate transporters in nervous system cells." Int J Biochem Cell Biol **85**: 75-84.
- Tsai, S. T., S. C. Chu, S. H. Liu, C. Y. Pang, T. W. Hou, S. Z. Lin and S. Y. Chen (2017). "Neuroprotection of Granulocyte Colony-Stimulating Factor for Early Stage Parkinson's Disease." Cell Transplant **26**(3): 409-416.
- Tsai, K. J., Y. C. Tsai and C. K. Shen (2007). "G-CSF rescues the memory impairment of animal models of Alzheimer's disease." J. Exp. Med. **204**(6): 1273-1280.
- Tuppo, E. E. and H. R. Arias (2005). "The role of inflammation in Alzheimer's disease." Int J Biochem Cell Biol **37**(2): 289-305.
- Uchikado, H., W. L. Lin, M. W. DeLucia and D. W. Dickson (2006). "Alzheimer disease with amygdala Lewy bodies: a distinct form of alpha-synucleinopathy." J Neuropathol Exp Neurol **65**(7): 685-697.
- Veldhoen, M. (2017). "Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity." Nat Immunol **18**(6): 612-621.
- Vignali, D. A. and V. K. Kuchroo (2012). "IL-12 family cytokines: immunological playmakers." Nat Immunol **13**(8): 722-728.
- Villa, C., E. Venturelli, C. Fenoglio, F. Clerici, A. Marcone, L. Benussi, R. Ghidoni, S. Gallone, F. Cortini, D. Scalabrini, M. Serpente, G. Binetti, S. Cappa, C. Mariani, I. Rainero, N. Bresolin, E. Scarpini and D. Galimberti (2009). "CCL8/MCP-2 association analysis in patients with Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration." J Neurol **256**(8): 1379-1381.
- Wang, J., B. J. Gu, C. L. Masters and Y. J. Wang (2017). "A systemic view of Alzheimer disease - insights from amyloid-beta metabolism beyond the brain." Nat Rev Neurol **13**(10): 612-623.
- Wong, Y. C. and D. Krainc (2017). "alpha-synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies." Nat Med **23**(2): 1-13.
- Xanthos, D. N. and J. Sandkuhler (2014). "Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity." Nat Rev Neurosci **15**(1): 43-53.
- Yan, J., Q. Fu, L. Cheng, M. Zhai, W. Wu, L. Huang and G. Du (2014). "Inflammatory response in Parkinson's disease (Review)." Mol Med Rep **10**(5): 2223-2233.
- Yang, H., J. Wang, J. Sun, X. Liu, W. M. Duan and T. Qu (2016). "A new method to effectively and rapidly generate neurons from SH-SY5Y cells." Neurosci Lett **610**: 43-47.
- Yang, W. and S. Yu "Synucleinopathies: common features and hippocampal manifestations." Cell Mol Life Sci **74**(8): 1485-1501.
- Yang, W. and S. Yu (2017). "Synucleinopathies: common features and hippocampal manifestations." Cell Mol Life Sci **74**(8): 1485-1501.
- Yu, J. T., C. H. Lee, K. Y. Yoo, J. H. Choi, H. Li, O. K. Park, B. Yan, I. K. Hwang, Y. G. Kwon, Y. M. Kim and M. H. Won (2010). "Maintenance of anti-inflammatory cytokines and reduction of glial activation in the ischemic hippocampal CA1 region preconditioned with lipopolysaccharide." J Neurol Sci **296**(1-2): 69-78.

- Zambrano, A., C. Otth, L. Mujica, Concha, II and R. B. Maccioni (2007). "Interleukin-3 prevents neuronal death induced by amyloid peptide." BMC Neurosci **8**: 82.
- Zhang, J. M. and J. An (2007). "Cytokines, inflammation, and pain." Int Anesthesiol Clin **45**(2): 27-37.
- Zhao, X., H. Wang, G. Sun, J. Zhang, N. J. Edwards and J. Aronowski (2015). "Neuronal Interleukin-4 as a Modulator of Microglial Pathways and Ischemic Brain Damage." J Neurosci **35**(32): 11281-11291.
- Zheng, C., X. W. Zhou and J. Z. Wang "The dual roles of cytokines in Alzheimer's disease: update on interleukins, TNF-alpha, TGF-beta and IFN-gamma." Transl Neurodegener **5**: 7.
- Zhu, M., J. S. Allard, Y. Zhang, E. Perez, E. L. Spangler, K. G. Becker and P. R. Rapp (2014). "Age-related brain expression and regulation of the chemokine CCL4/MIP-1beta in APP/PS1 double-transgenic mice." J Neuropathol Exp Neurol **73**(4): 362-374.
- Zhu, X. B., Y. B. Wang, O. Chen, D. Q. Zhang, Z. H. Zhang, A. H. Cao, S. Y. Huang and R. P. Sun (2012). "Characterization of the expression of macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and C-C chemokine receptor 5 (CCR5) after kainic acid-induced status epilepticus (SE) in juvenile rats." Neuropathol Appl Neurobiol **38**(6): 602-616.

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

NÖRONA FARKLILAŞTIRILMIŞ SH SY5Y HÜCRELERİNDE AMİLOİD BETA VE ALFA SİNÜKLEİN PATOLOJİLERİNİN İNFLAMATUVAR YANIT ÜZERİNE ETKİSİ

Yazar Ebru Keskin

Gönderim Tarihi: 06-Haz-2018 11:51PM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 973104818

Dosya adı: A_S_N_KLE_N_PATOLOJ_LER_N_NFLAMATUVAR_YANIT_ZER_NE_ETK_S.docx (396.76K)

Kelime sayısı: 36848

Karakter sayısı: 259772

NÖRONA FARKLILAŞTIRILMIŞ SH SY5Y HÜCRELERİNDE
AMİLOİD BETA VE ALFA SİNÜKLEİN PATOLOJİLERİNİN
İNFLAMATUVAR YANIT ÜZERİNE ETKİSİ

ORJİNALLIK RAPORU

%15	%1	%2	%14
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİ KAYNAKLAR

	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%14
	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
	discovery.ucl.ac.uk İnternet Kaynağı	<%1
	Humar, Dea. "Die Auswirkungen einer konstitutiven Expression von TIMP-1 im ZNS transgener Mäuse", Universität Freiburg, 2009. Yayın	<%1
	www.wbc.poznan.pl İnternet Kaynağı	<%1
	idus.us.es İnternet Kaynağı	<%1
	Submitted to Dicle University Öğrenci Ödevi	<%1

8	www.nature.com İnternet Kaynağı	<% 1
9	Jellinger, Kurt A., and Gregor K. Wenning. "Multiple system atrophy: pathogenic mechanisms and biomarkers", Journal of Neural Transmission, 2016. Yayın	<% 1
10	bdtb.biblioteca.ufpb.br İnternet Kaynağı	<% 1
11	www.komorazus.org.rs İnternet Kaynağı	<% 1
12	tbgder.org İnternet Kaynağı	<% 1
13	www.tannlegetidende.no İnternet Kaynağı	<% 1
14	www.mmc.nl İnternet Kaynağı	<% 1
15	www.immunoloji2015.org İnternet Kaynağı	<% 1
16	biyogen.metu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
17	Tintori, Cristina, Giuseppina La Sala, Giulia Vignaroli et al. "Studies on the ATP binding site of Fyn kinase for the identification of new	<% 1

inhibitors and their evaluation as potential agents against tauopathies and tumors",
Journal of Medicinal Chemistry

Yayın

18	content.iospress.com İnternet Kaynağı	<%1
19	science.sciencemag.org İnternet Kaynağı	<%1
20	www.science.gov İnternet Kaynağı	<%1
21	Karaman, Dursun, Turker Turker, Koray Kara, İbrahim Durukan, and Muzaffer Fidancı. "Depression and anxiety levels of children and adolescents with ADHD", Gulhane Medical Journal, 2013. Yayın	<%1
22	KURNAZ, Özlem and YILMAZ AYDOĞAN, Hülya. "Okside LDL Reseptörü-1 (LOX-1) ve Kardiyovasküler Hastalıklarla İlişkisi", Tıp Araştırmaları Derneği, 2014. Yayın	<%1
23	www.mikrobiyolbul.org İnternet Kaynağı	<%1
24	Topics in Medicinal Chemistry, 2014. Yayın	<%1

25	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<%1
26	Shathiswaran N. Andy, Vijayapandi Pandey, Zazali Alias, Habsah Abdul Kadir. "Deoxyelephantopin ameliorates lipopolysaccharides (LPS)-induced memory impairments in rats: Evidence for its anti- neuroinflammatory properties", Life Sciences, 2018 Yayın	<%1
27	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<%1
28	"Neuroimmune Pharmacology", Springer Nature, 2017 Yayın	<%1

Adresleri çıkar

uzunlolu

Eşleşmeleri çıkar

< 5 words

Bölümleri yayın Çıkar

uzunlolu

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	EBRU	Soyadı	KESKİN
Doğ.Yeri	İSTANBUL/EMİNÖNÜ	Doğ.Tar.	17.03.1993
Uyruğu	T.C	TC Kim No	10992027954
Email	ksknebru@gmail.com	Tel	05395118875

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji	2015
Lise	Sefaköy Anadolu Lisesi	2011

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İNGİLİZCE	İYİ	İYİ	İYİ	YÖKDİL	75

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	67,9	69,4	65,2
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

1. Ebru Keskin, Büşra Şengül, Gencer Genç, Merve Alaylıoğlu, İrem L.Atasoy, Hülya Apaydın, Selma Yılmaz, Sibel Ertan, Erdiñ Dursun, Duygu Gezen-Ak. Parkinson hastalarında ve sağlıklı bireylerde OXPHOS altüniteleri ATP6 ve

- ATP8'in mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması, 15. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Fethiye, Ölüdeniz, 26-29 Ekim, 2017.
2. Merve Alaylıoğlu, Bedri Karaismailoğlu, Büşra Şengül, Ebru Keskin, Esin Candaş, Duygu Gezen-Ak, Erdinç Dursun, Selma Yılmaz, Nuri Aydın. İnsan primer meniskal fibrokondrosit kültüründe COL1A1 ve COMP1 mRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi, 15. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Fethiye, Ölüdeniz, 26-29 Ekim, 2017.





