

**EPİGENETİK MEKANİZMALAR ÜZERİNE ETKİLİ
İLAÇLARIN NÖROİNFLAMASYON HÜCRE
MODELİNDE NÖROPROTEKTİF ROLLERİNİN
ARAŞTIRILMASI
Doktora Tezi**

**Elif KAYA TİLKİ
Eskişehir 2020**

**EPİGENETİK MEKANİZMALAR ÜZERİNE ETKİLİ İLAÇLARIN
NÖROİNFLAMASYON HÜCRE MODELİNDE NÖROPROTEKTİF ROLLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Elif KAYA TİLKİ

DOKTORA TEZİ

Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ağustos 2020

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu 117S826 ve Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca kabul edilen 1704S097 no.lu projeler kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Elif KAYA TİLKİ'nin “Epigenetik Mekanizmalar Üzerine Etkili İlaçların Nöroinflamasyon Hücre Modelinde Nöroprotektif Rollerinin Araştırılması” başlıklı tezi 13/08/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakoloji Anabilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Miriş DİKMEN	
Üye	: Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK	
Üye	: Prof. Dr. İlknur DAĞ	
Üye	: Doç. Dr. Emel ERGENE	
Üye	: Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK	

.....

Enstitü Müdürü

ÖZET

EPİGENETİK MEKANİZMALAR ÜZERİNE ETKİLİ İLAÇLARIN NÖROİNFLAMASYON HÜCRE MODELİNDE NÖROPROTEKTİF ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Elif KAYA TILKI

Farmakoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2020

Danışman: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Chlamydia pneumoniae (Cpn), genellikle hafif ve atipik karakterde çok çeşitli pulmoner hastalıklara neden olan zorunlu hücre içi gram-negatif bir patojendir. Kalıcı enfeksiyonlara neden olduğu ve Alzheimer hastalığı (AH) patolojisinde de rol oynadığı yönündeki bulgular gün geçtikçe artmaktadır.

Bu tez çalışmasında Cpn enfeksiyonunun ve epigenetik mekanizmalar üzerine etkili ilaçlar olan Trikostatin A (TSA), givinostat ve RG108'in ve antibiyotik rifampinin nöronal mikroçevredeki inflamatuvar ve epigenetik kromatin düzenlemesi ile ilişkili genler üzerindeki etkileri gen panelleriyle araştırılmıştır. Buna ek olarak, amiloid beta (A β) (1-42) tarafından indüklenen nörotoksisite modelinde ilaçların nöroprotektif etkileri, gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde hücre canlılıkları incelenerek ve akış sitometride A β ₁₋₄₂ antikor seviyesi, toplam ROS miktarı ve apoptotik etki seviyeleri belirlenmiştir.

Sonuç olarak, özellikle TSA ve RG108'in, hem nöroinflamasyon hem de nörotoksisite modellerinde önemli nöroprotektif etkileri bulunmuştur. Ayrıca literatüre kazandırılan Cpn ile oluşturulmuş nöroinflamasyon modeli üzerinde, TSA, RG108, givinostat ve rifampin'in AH ile ilişkisi, epigenetik ve inflamatuvar etkileri bağlamında incelenmiştir ve SETD7, DPEP2, HDAC10, HDAC4, SETD8, RAGE ve RELA genlerinde önemli ekspresyon değişimleri belirlenmiştir. Sonuçlarımızın, AH nöropatolojisinde yer alan epigenetik düzensizlikler ve A β nörotoksisitesine karşı nöroprotektif etki mekanizmaları hakkında, terapötik seçeneklerin sınırlı olduğu AH tedavisine alternatif bir basamak oluşturabilecek ön veriler olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Nörotoksisite, Nöroproteksiyon, Nörodejenerasyon, Epigenetik, *Chlamydia pneumoniae*.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE NEUROPROTECTIVE ROLES OF DRUGS EFFECTIVE ON EPIGENETIC MECHANISMS ON NEUROINFLAMMATION CELL MODEL

Elif KAYA TILKI

Department of Pharmacology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, August 2020

Supervisor: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Chlamydia pneumoniae (Cpn) is a mandatory intracellular gram-negative pathogen that causes a wide variety of pulmonary diseases, usually mild and atypical. Cpn can cause permanent infections, and there is growing evidence about the role in the pathology of Alzheimer's disease (AD).

In this thesis, the effects of Cpn infection and drugs, that are effective on epigenetic mechanisms, Trichostatin A (TSA), givinostat, and RG108 and an antibiotic rifampin, on the neuronal microenvironment related genes related to inflammatory and epigenetic chromatin regulation were investigated with gene panels. In addition, the neuroprotective effects of the drugs on amyloid beta (A β) (1-42)-induced neurotoxicity model were investigated by evaluating the cell viability with the real-time cell analysis system and determining the A β ₁₋₄₂ antibody, total ROS and apoptotic effect levels using flow cytometer.

As a result, especially TSA and RG108 have been found neuroprotective on both neuroinflammation and neurotoxicity models. In addition, on the newly introduced Cpn-induced neuroinflammation model, the relationship between TSA, RG108, givinostat and rifampin with AD was investigated in the context of epigenetic and inflammatory effects, and significant expression changes were determined in SETD7, DPEP2, HDAC10, HDAC4, SETD8, RAGE and RELA genes. It is believed that the results provide preliminary data on epigenetic disorders in AD neuropathology and neuroprotective action mechanisms against A β neurotoxicity, which may constitute an alternative step to AD treatment that has limited therapeutic options.

Keywords: Neurotoxicity, Neuroprotection, Neurodegeneration, Epigenetics, *Chlamydia pneumoniae*.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesi için tüm bilgi birikimi ve deneyimiyle bana yol gösteren, anlayışıyla her zaman yanımda olup bana cesaret veren, her fikrime değer verip hep daha iyiye yönlendiren her zaman örnek aldığım değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Miriş DİKMEN'e,

Hem bilgi birikimi hem de tecrübelerinden her zaman yararlandığım sevgili hocam sayın Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK'e,

Bana farmakolojiyi öğretilip sevdiren başta sayın hocam Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK olmak üzere Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim dalının tüm saygıdeğer üyelerine,

Hem yüksek lisans hem de doktora sürecimizi beraber tamamladığımız, tüm tecrübelerini benimle paylaşan, hiçbir yardımı esirgemeyen ve desteğini her zaman hissettiğim canım arkadaşım Öğr. Gör. Selin ENGÜR ÖZTÜRK'e,

Zorlu doktora sürecinde pozitif enerjileriyle bana her zaman destek olan başta lisans arkadaşım Arař. Gör. Merve BAYSAL olmak üzere, Arař. Gör. Mustafa Güçlü ÖZARDA ve Arař. Gör. Sakine ATİLA KARACA'ya,

Beni kendi evlatları gibi benimseyen ve hiçbir desteğı esirgemeyen çok sevgili Necibe ve Halil İbrahim TİLKİ'ye,

Sonsuz ve koşulsuz sabır, sevgi ve desteklerini her saniye hissettiğim canım ailem Fatma ve Selçuk KAYA'ya,

Anlayışıyla, sevgisiyle ve ilgisiyle bu zorlu sürecin her anında yanımda olan sevgili eşim Tuğrul TİLKİ'ye, ve hayatının ilk yıllarını tez sürecimle paylaşan en büyük güç ve motivasyon kaynağım canım kızım Lena TİLKİ'ye,

Sonsuz ve içten teşekkürlerimi sunarım.

13/08/2020

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığımı ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Elif KAYA TILKI

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Alzheimer Hastalığı.....	3
2.1.1. Alzheimer hastalığının patolojisi.....	4
2.1.1.1. <i>Amiloid plaklar</i>	5
2.1.1.2. <i>Serebral amiloid anjiyopati</i>	6
2.1.1.3. <i>Nörofibriler yumaklar ve nöropil iplikler</i>	6
2.1.1.4. <i>Granülovakuolar dejenerasyon ve Hirano cisimleri</i>	7
2.1.1.5. <i>Nöronal ve sinaptik kayıp</i>	8
2.1.2. Alzheimer hastalığı ve nöroinflamasyon.....	9
2.1.2.1. <i>Mikroglia ve nöroinflamasyon</i>	10
2.1.3. Patojen ve antimikrobiyal korunma hipotezi.....	13
2.1.4. Alzheimer hastalığı ve epigenetik.....	15
2.1.4.1. <i>Epigenetik mekanizmalar</i>	15
2.1.4.2. <i>Alzheimer hastalığı patogeneziyle ilişkili epigenetik mekanizmalar</i>	18
2.2. <i>Chlamydia pneumoniae</i>	20
2.2.1. <i>Chlamydia pneumoniae</i> 'nin yaşam döngüsü.....	20

2.2.2. <i>Chlamydia pneumoniae</i> enfeksiyonunun patolojik etkileri....	21
2.2.3. <i>Chlamydia pneumoniae</i> enfeksiyonunun epigenetik faktörler ile ilişkisi.....	22
2.3. Epigenetik Mekanizmalar Üzerine Etkili İlaçlar.....	23
2.3.1. HDAC inhibitörleri.....	23
2.3.1.1. <i>Trikostatin A (TSA)</i>	25
2.3.1.2. <i>Givinostat (ITF2357)</i>	27
2.3.2. DNA metiltransferaz (DNMT) inhibitörleri.....	28
2.3.2.1. <i>RG108</i>	30
2.4. Rifampin ve Alzheimer Hastalığı.....	31
3. GEREÇLER.....	33
3.1. Hücre Hatları.....	33
3.1.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı.....	33
3.1.2. HMC3 insan mikroglia hücre hattı.....	33
3.1.3. HEP-2 insan epitelyal karsinoma hücre hattı.....	33
3.1.4. THP-1 insan akut monositik lösemi hücre hattı.....	33
3.2. Kullanılan Hücre Hatları, Kimyasal Maddeler, Gereçler ve Cihazlar	34
3.2.1. Hücre hatları.....	34
3.2.2. Kimyasal maddeler ve gereçler.....	34
3.2.3. Cihazlar.....	36
3.3. Kullanılan Kimyasal Madde ve İlaçların Hazırlanması.....	37
3.3.1. <i>Trikostatin A</i> , <i>Givinostat</i> , <i>RG108</i> ve <i>Rifampin</i>	37
3.3.2. Retinoik asit (RA).....	37
3.3.3. Amiloid beta (A β) 1-42.....	37
3.3.4. Rekombinant insan interferon-gamma (IFN- γ).....	37
3.3.5. Forbol 12-miristat 13-asetat (PMA).....	38
3.3.6. Lipopolisakkarit (LPS).....	38
4. YÖNTEMLER.....	39
4.1. Hücre ve <i>Chlamydia pneumoniae</i> Kültürü Çalışmaları.....	40
4.1.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattının büyütülmesi.....	40

4.1.2. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattının nöronal fenotipe farklılaştırılması.....	40
4.1.3. HMC3 insan mikroglia hücre hattının büyütülmesi.....	41
4.1.4. THP-1 insan akut monositik lösemi hücre hattının büyütülmesi	41
4.1.5. HEp-2 hücrelerinin kültürü ve <i>Chlamydiophila pneumoniae</i> inklüzyon cisimciklerinin oluşturulması.....	42
4.2. <i>Chlamydiophila pneumoniae</i> ile Nöroinflamasyon Modeli Oluşturulması için Optimizasyon Çalışmaları.....	42
4.2.1. <i>Chlamydiophila pneumoniae</i> lizatlarının hazırlanması.....	42
4.2.2. Monositik THP-1 hücrelerinin makrofaja farklılaştırılması ve sitokin seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi.....	43
4.2.3. Mikroglia hücrelerini aktive eden <i>Chlamydiophila pneumoniae</i> konsantrasyonunun LPS ile karşılaştırılması.....	45
4.2.3.1. Çeşitli <i>Chlamydiophila pneumoniae</i> ve LPS konsantrasyonlarının <i>IL-1β</i> , <i>TNF-α</i> ve <i>IL-8</i> gen ekspresyonları üzerine etkilerinin araştırılması.....	45
4.2.3.2. Akış sitometride çeşitli <i>Chlamydiophila pneumoniae</i> ve LPS konsantrasyonlarının aktif mikroglia belirteci (<i>CD11b</i> antikoru) üzerine etkilerinin belirlenmesi.....	46
4.3. WST-1 Yöntemiyle Sitotoksik Olmayan Konsantrasyonların Belirlenmesi.....	47
4.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence RTCA-DP) Kullanılarak SH-SY5Y ve HMC3 Hücre Canlılığının Belirlenmesi Çalışmaları.....	48
4.5. <i>Chlamydiophila pneumoniae</i> ve Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücreleri ile Nöroinflamasyon Ko-kültür Modelinin Oluşturulması.....	48
4.5.1. <i>Chlamydiophila pneumoniae</i> ve farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri ile oluşturulan nöroinflamasyon ko-kültür modelinde hücre canlılığının gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile izlenmesi çalışmaları.....	51

4.6. <i>Chlamydiophila pneumoniae</i> Enfeksiyonunun Etkilerinin Gen Düzeyinde Araştırılması Çalışmaları.....	53
4.7. Amiloid Beta ile Oluşturulmuş Nörotoksisite Hücre Modelinde Epigenetik Mekanizmalar Üzerine Etkili İlaçların Nöroprotektif Etkilerinin Araştırılması.....	60
4.7.1. Amiloid beta ile indüklenen nörotoksisite modelinin oluşturulması.....	60
4.7.2. Akış sitometride immüno Floresans boyama yöntemi ile A β agregatlarının belirlenmesi.....	60
4.7.3. Akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi.....	61
4.7.4. Toplam ROS miktarının belirlenmesi.....	62
4.8. İstatistiksel Analiz.....	63
5. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	64
5.1. SH-SY5Y Kültürü ve Farklılaştırma Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	64
5.2. <i>Chlamydiophila pneumoniae</i> Kültürü ve Lizatların Hazırlanması Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	65
5.3. Mikroglia Hücrelerini Aktive Eden <i>Chlamydiophila pneumoniae</i> Konsantrasyonunun LPS ile Karşılaştırılarak Belirlenmesi Çalışmaları.....	72
5.3.1. <i>Chlamydiophila pneumoniae</i> ve LPS'nin farklı konsantrasyonlarının IL-1 β , TNF- α ve IL-8 gen ekspresyonları üzerine etkileri.....	72
5.3.2. <i>Chlamydiophila pneumoniae</i> ve LPS'nin farklı konsantrasyonlarının akış sitometride aktif mikroglia belirteci üzerine etkilerinin karşılaştırılması.....	77
5.4. WST-1 Yöntemiyle Sitotoksik Olmayan Konsantrasyonların Değerlendirilmesi.....	82

5.4.1. WST-1 yöntemiyle HMC3 hücreleri üzerinde sitotoksik olmayan konsantrasyonların belirlenmesi.....	82
5.4.2. WST-1 yöntemiyle SH-SY5Y hücreleri üzerinde sitotoksik olmayan konsantrasyonların belirlenmesi.....	86
5.5. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence RTCA-DP) Kullanılarak SH-SY5Y ve HMC3 Hücre Canlılığı Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	91
5.5.1. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemiyle HMC3 hücre canlılığının belirlenmesi.....	92
5.5.2. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemiyle SH-SY5Y hücre canlılığının belirlenmesi.....	98
5.5.3. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemiyle farklılaşmış SH-SY5Y hücre canlılığının belirlenmesi.....	105
5.6. <i>Chlamydiophila pneumonia</i> ve Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücreleriyle Oluşturulan Nöroinflamasyon Ko-Kültür Modeli Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	112
5.6.1. Nöroinflamasyon ko-kültür modelinde hücre canlılığının gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenmesi.....	112
5.6.2. <i>Chlamydiophila pneumoniae</i> enfeksiyonunun gen düzeyindeki etkilerinin değerlendirilmesi.....	116
5.7. Amiloid Beta ile Oluşturulmuş Nörotoksisite Modelinde Epigenetik Mekanizmalar Üzerine Etkili İlaçların Nöroprotektif Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	129
5.7.1. Amiloid beta ile indüklenen nörotoksisite modelinin oluşturulması.....	129
5.7.2. Toplam ROS miktarının belirlenmesinin değerlendirilmesi.....	133
5.7.3. Akış sitometride immüno Floresans boyama yöntemi ile A β agregatlarının belirlenmesinin değerlendirilmesi.....	137
5.7.4. Akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesinin değerlendirilmesi.....	141

6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	147
KAYNAKÇA.....	157
ÖZGEÇMİŞ	

TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.1. Yapılan çalışmaların şematik gösterimi.....	39
Tablo 4.2. IL-1 β , TNF- α , IL-8 ve ACTB dizilimleri.....	46
Tablo 4.3. Nöroinflamasyon ko-kültür modeli oluşturulan konsantrasyon grupları.....	50
Tablo 4.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile nöroinflamasyon ko-kültür modeli oluşturulan ve hücre canlılığı izlenen konsantrasyon grupları.....	52
Tablo 4.5. İnflamazom ile ilişkili genler ve primer dizilimleri.....	54
Tablo 4.6. Epigenetik kromatin modifikasyonundan sorumlu enzimleri düzenleyen genler ve primer dizilimleri.....	56
Tablo 5.1. Yalnızca LPS ve Cpn konsantrasyonları ile inkübe edilmiş HMC3 mikrogli hücrelerinde RT-PCR sonucunda hesaplanan TNF- α genine ait hedef/referans oranları ve normalize değerleri.....	72
Tablo 5.2. Yalnızca LPS ve Cpn konsantrasyonları ile inkübe edilmiş HMC3 mikrogli hücrelerinde RT-PCR sonucunda hesaplanan IL-1 β genine ait hedef/referans oranları ve normalize değerleri.....	73
Tablo 5.3. Yalnızca LPS ve Cpn konsantrasyonları ile inkübe edilmiş HMC3 mikrogli hücrelerinde RT-PCR sonucunda hesaplanan IL-8 genine ait hedef/referans oranları ve normalize değerleri.....	73
Tablo 5.4. HMC3 mikrogli hücrelerinde, LPS ve Cpn'nin farklı konsantrasyonlarının IFN- γ (10 ng/ml) ile kombine olarak inkübasyonu (24 saat) sonrasında TNF- α genine ait hedef/referans oranları ve normalize değerleri.....	74
Tablo 5.5. HMC3 mikrogli hücrelerinde, LPS ve Cpn'nin farklı konsantrasyonlarının IFN- γ (10 ng/ml) ile kombine olarak inkübasyonu (24 saat) sonrasında IL-1 β genine ait hedef/referans oranları ve normalize değerleri.....	74

Tablo 5.6.	HMC3 mikrogliya hücrelerinde, LPS ve Cpn'nin farklı konsantrasyonlarının IFN- γ (10 ng/ml) ile kombine olarak inkübasyonu (24 saat) sonrasında IL-8 genine ait hedef/referans oranları ve normalize değerleri.....	75
Tablo 5.7.	LPS ve Cpn + IFN- γ kombine konsantrasyonlarının 24 ve 48 saat sonunda aktif mikrogliya belirteci CD11b antikor seviyeleri üzerine etkilerinin karşılaştırılması.....	80
Tablo 5.8.	TSA, Rifampin, Givinostat ve RG108 konsantrasyonlarının HMC3 hücreleri üzerindeki 24. ve 48. saatteki IC ₅₀ değerleri.....	98
Tablo 5.9.	TSA, Rifampin, Givinostat ve RG108 konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücreleri üzerindeki 24. ve 48. saatteki IC ₅₀ değerleri.....	105
Tablo 5.10.	TSA, Rifampin, Givinostat ve RG108 konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücreleri üzerindeki 24. ve 48. saatteki IC ₅₀ değerleri.....	111
Tablo 5.11.	Konsantrasyon gruplarının epigenetik kromatin modifikasyonundan sorumlu enzimlerin yer aldığı gen panelindeki ekspresyonlarının kontrol grubuna göre kat değişimleri.....	117
Tablo 5.12.	Konsantrasyon gruplarının inflamazom ile ilişkili gen panelindeki ekspresyonlarının kontrol grubuna göre kat değişimleri.....	124
Tablo 5.13.	Nörotoksisite modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde konsantrasyon gruplarının gerçek zamanlı hücre analizinde A β uygulaması sonrası 24. saatteki hücre indeksi (CI) değerlerine göre koruyucu etkileri.....	131
Tablo 5.14.	Nörotoksisite modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde konsantrasyon gruplarının amiloid beta aktivasyonu sonuçları.....	139
Tablo 5.15.	Nörotoksisite modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde konsantrasyon gruplarının apoptotik etki sonuçları.....	144

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. AH patolojisinin şematik gösterimi.....	4
Şekil 2.2. Mikroglia aktivasyonu ve nöronal hücre ölümü.....	11
Şekil 2.3. APP'nin amiloidojenik işlenişi.....	12
Şekil 2.4. A β ve β -amiloid fibrillerin antimikrobiyal aktivitelerinin şematik gösterimi.....	14
Şekil 2.5. Epigenetik gen regülasyonunun üç temel mekanizması.....	17
Şekil 2.6. <i>Chlamydia</i> türlerinin yaşam döngüsü.....	21
Şekil 2.7. HDAC inhibitörlerinin kromatin yeniden şekillenmesi ve transkripsiyon üzerindeki etkisi.....	23
Şekil 2.8. AH fare modellerinde ve post-mortem hipokampal analizlerde şimdiye kadar gözlemlenen HDAC inhibitörleri ile elde edilmiş nöropatolojileri iyileştirebilecek umut verici tedavi sonuçları.....	24
Şekil 2.9. TSA'nın moleküler yapısı.....	25
Şekil 2.10. Givinostat'ın moleküler yapısı.....	27
Şekil 2.11. DNA metilasyonu, gen transkripsiyonu ve kromatin yapısı arasındaki etkileşim.....	29
Şekil 2.12. RG108'in moleküler yapısı.....	30
Şekil 2.13. Rifampin'in moleküler yapısı.....	31
Şekil 4.1. Nöroinflamasyon modeli için kullanılan 6 kuyucuklu plaka ve 0.4 μ m por açıklığına sahip üst odacık.....	49
Şekil 4.2. Cpn ile oluşturulmuş nöroinflamasyon modelinin şematik gösterimi..	49
Şekil 4.3. Gerçek zamanlı hücre analizi çalışmalarında kullanılan xCELLigence cihazı, E-plate ve E-plate Insert ve xCELLigence ile oluşturulan ko-kültür modelinin şematik gösterimi.....	51
Şekil 5.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattının 5 gün süreyle nöronal fenotipe farklılaştırılması.....	64
Şekil 5.2. HEP-2 hücrelerinin görüntüsü.....	66
Şekil 5.3. Cpn ile muamele edilen HEP-2 hücrelerinin görüntüsü.....	66

Şekil 5.4.	Cpn inklüzyon cisimciklerinin görüntüsü.....	67
Şekil 5.5.	Akış sitometri yöntemiyle belirlenen IL-1 β ve CD218a sitokin miktarları.....	70
Şekil 5.6.	LPS ve Cpn (10, 100 ng/ml veya 1 μ g/ml) + IFN- γ (10 ng/ml) kombine konsantrasyonlarının 24 saat sonunda aktif mikrogliya belirteci CD11b antikor seviyeleri üzerine etkileri.....	78
Şekil 5.7.	LPS ve Cpn (10, 100 ng/ml veya 1 μ g/ml) + IFN- γ (10 ng/ml) kombine konsantrasyonlarının 48 saat sonunda aktif mikrogliya belirteci CD11b antikor seviyeleri üzerine etkileri.....	79
Şekil 5.8.	Cpn konsantrasyonlarının, HMC3 mikrogliya hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	82
Şekil 5.9.	LPS konsantrasyonlarının, HMC3 mikrogliya hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	83
Şekil 5.10.	TSA konsantrasyonlarının, HMC3 mikrogliya hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	83
Şekil 5.11.	Rifampin konsantrasyonlarının, HMC3 mikrogliya hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	84
Şekil 5.12.	Givinostat konsantrasyonlarının, HMC3 mikrogliya hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	85
Şekil 5.13.	RG108 konsantrasyonlarının, HMC3 mikrogliya hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	85
Şekil 5.14.	Cpn konsantrasyonlarının, SH-SY5Y hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	86

Şekil 5.15.	LPS konsantrasyonlarının, SH-SY5Y hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	87
Şekil 5.16.	TSA konsantrasyonlarının, SH-SY5Y hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	88
Şekil 5.17.	Rifampin konsantrasyonlarının, SH-SY5Y hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	88
Şekil 5.18.	Givinostat konsantrasyonlarının, SH-SY5Y hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	89
Şekil 5.19	RG108 konsantrasyonlarının, SH-SY5Y hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	90
Şekil 5.20.	HMC3 Hücrelerinde 1, 10 ve 100 μ M TSA konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.....	92
Şekil 5.21.	RTCA DP sisteminde TSA konsantrasyonlarının HMC3 hücrelerinde 24. ve 48.zz saat hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği.....	93
Şekil 5.22.	RTCA DP sisteminde HMC3 hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 μ M TSA konsantrasyonlarının HMC3 hücreleri üzerinde proliferasyon slope grafiğine göre hesaplanan 24. saat ve 48. saatteki IC ₅₀ değerleri.....	93
Şekil 5.23.	HMC3 Hücrelerinde 1, 10 ve 100 μ M Rifampin konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.....	94
Şekil 5.24.	RTCA DP sisteminde 1, 10 ve 100 μ M Rifampin konsantrasyonlarının HMC3 hücrelerinde 24. ve 48. saat hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği.....	94
Şekil 5.25.	RTCA DP sisteminde HMC3 hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 μ M Rifampin konsantrasyonlarının HMC3 hücreleri üzerinde	

	proliferasyon slope grafiğine göre hesaplanan 24. saat ve 48. saatteki IC ₅₀ değerleri.....	95
Şekil 5.26.	HMC3 Hücrelerinde 1, 10 ve 100 µM Givinostat konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.....	95
Şekil 5.27.	RTCA DP sisteminde 1, 10 ve 100 µM Givinostat konsantrasyonlarının HMC3 hücrelerinde 24. ve 48. saatlik hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği.....	96
Şekil 5.28.	RTCA DP sisteminde HMC3 hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 µM Givinostat konsantrasyonlarının HMC3 hücreleri üzerinde proliferasyon slope grafiğine göre hesaplanan 24. saat ve 48. saatteki IC ₅₀ değerleri.....	96
Şekil 5.29.	HMC3 Hücrelerinde 1, 10 ve 100 µM RG108 konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri....	97
Şekil 5.30.	RTCA DP sisteminde RG108 konsantrasyonlarının HMC3 hücrelerinde 24. ve 48. saatlik hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği.....	97
Şekil 5.31.	RTCA DP sisteminde HMC3 hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 µM RG108 konsantrasyonlarının HMC3 hücreleri üzerinde proliferasyon slope grafiği'ne göre hesaplanan 24. saat ve 48. saatteki IC ₅₀ değerleri	98
Şekil 5.32.	SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10 ve 100 µM TSA konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.....	99
Şekil 5.33.	RTCA DP Sisteminde 1, 10 ve 100 µM TSA konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücrelerinde 24. ve 48 saatlik hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği.....	99
Şekil 5.34.	RTCA DP sisteminde SH-SY5Y hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 µM TSA konsantrasyonlarının proliferasyon slope grafiği'ne göre hesaplanan 24. saat ve 48. saatteki IC ₅₀ değerleri.....	100

Şekil 5.35.	SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10 ve 100 μ M Rifampin konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.....	100
Şekil 5.36.	RTCA DP Sisteminde 1, 10 ve 100 μ M Rifampin konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücrelerinde 24. ve 48. saatlik hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği.....	101
Şekil 5.37.	RTCA DP sisteminde SH-SY5Y hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 μ M Rifampin konsantrasyonlarının proliferasyon slope grafiği'ne göre hesaplanan 24. saat ve 48. saatteki IC ₅₀ değerleri.....	101
Şekil 5.38.	SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10 ve 100 μ M Givinostat konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.....	101
Şekil 5.39.	RTCA DP Sisteminde 1, 10 ve 100 μ M Givinostat konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücrelerinde 24. ve 48. saatlik hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği.....	102
Şekil 5.40.	RTCA DP sisteminde SH-SY5Y hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 μ M Givinostat konsantrasyonlarının proliferasyon slope grafiği'ne göre hesaplanan 24. saat ve 48. saatteki IC ₅₀ değerleri.....	103
Şekil 5.41.	SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10 ve 100 μ M RG108 konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.....	103
Şekil 5.42.	RTCA DP Sisteminde 1, 10 ve 100 μ M RG108 konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücrelerinde 24. ve 48. saatlik hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği.....	104
Şekil 5.43.	RTCA DP sisteminde SH-SY5Y hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 μ M RG108 konsantrasyonlarının proliferasyon slope grafiği'ne göre hesaplanan 24. saat ve 48. saatteki IC ₅₀ değerleri.....	104
Şekil 5.44.	Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10 ve 100 μ M TSA ve 10 μ M RA konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.....	105

Şekil 5.45.	RTCA DP sisteminde 1, 10 ve 100 μ M TSA ve 10 μ M RA konsantrasyonlarının farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde 24. ve 48. saatlik hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği.....	106
Şekil 5.46.	RTCA DP sisteminde farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 μ M TSA ve 10 μ M RA konsantrasyonlarının proliferasyon slope grafiği'ne göre hesaplanan 24. saat ve 48. saatteki IC ₅₀ değerleri	106
Şekil 5.47.	Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10 ve 100 μ M Rifampin ve 10 μ M RA konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.....	107
Şekil 5.48.	RTCA DP sisteminde 1, 10 ve 100 μ M Rifampin ve 10 μ M RA konsantrasyonlarının farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde 24. ve 48. saatlik hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği.....	107
Şekil 5.49.	RTCA DP sisteminde farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 μ M Rifampin ve 10 μ M RA konsantrasyonlarının proliferasyon slope grafiği'ne göre hesaplanan 24. saat ve 48. saatteki IC ₅₀ değerleri.....	108
Şekil 5.50.	Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10 ve 100 μ M Givinostat ve 10 μ M RA konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.....	108
Şekil 5.51.	RTCA DP sisteminde 1, 10 ve 100 μ M Givinostat ve 10 μ M RA konsantrasyonlarının farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde 24.ve 48. saatlik hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği.....	109
Şekil 5.52.	RTCA DP sisteminde farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 μ M Givinostat ve 10 μ M RA konsantrasyonlarının proliferasyon slope grafiği'ne göre hesaplanan 24. saat ve 48. saatteki IC ₅₀ değerleri.....	109

Şekil 5.53.	Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10 ve 100 μ M RG108 ve 10 μ M RA konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.....	110
Şekil 5.54.	RTCA DP sisteminde 1, 10 ve 100 μ M RG108 ve 10 μ M RA konsantrasyonlarının farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde 24. ve 48. saatlik hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği.....	110
Şekil 5.55.	RTCA DP sisteminde farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 μ M RG108 ve 10 μ M RA konsantrasyonlarının proliferasyon slope grafiği'ne göre hesaplanan 24. saat ve 48. saatteki IC ₅₀ değerleri	111
Şekil 5.56.	Nöroinflamasyon ko-kültür modelinde farklılaşmış SH-SY5Y hücre canlılığının RTCA-DP sisteminde izlenmesi sırasında 7 gün boyunca ölçülen hücre indeks değerlerinin grafiği.....	113
Şekil 5.57.	RTCA-DP analiz sisteminde, tekli veya kombine halde Cpn, LPS ve TSA konsantrasyon gruplarının nöroinflamasyon ko-kültür modelinde farklılaşmış SH-SY5Y hücre canlılığı üzerine etkilerinin 48 saat boyunca kaydedilen hücre indeksi verilerine göre hücre proliferasyon eğrileri.....	113
Şekil 5.58.	RTCA-DP analiz sisteminde, tekli veya kombine halde Cpn, LPS ve RG108 konsantrasyon gruplarının nöroinflamasyon ko-kültür modelinde farklılaşmış SH-SY5Y hücre canlılığı üzerine etkilerinin 48 saat boyunca kaydedilen hücre indeksi verilerine göre hücre proliferasyon eğrileri.....	114
Şekil 5.59.	RTCA-DP analiz sisteminde, tekli veya kombine halde Cpn, LPS ve Givinostat konsantrasyon gruplarının nöroinflamasyon ko-kültür modelinde farklılaşmış SH-SY5Y hücre canlılığı üzerine etkilerinin 48 saat boyunca kaydedilen hücre indeksi verilerine göre hücre proliferasyon eğrileri.....	114
Şekil 5.60.	RTCA-DP analiz sisteminde, tekli veya kombine halde Cpn, LPS ve Rifampin konsantrasyon gruplarının nöroinflamasyon ko-kültür	

	modelinde farklılaşmış SH-SY5Y hücre canlılığı üzerine etkilerinin 48 saat boyunca kaydedilen hücre indeksi verilerine göre hücre proliferasyon eğrileri.....	115
Şekil 5.61.	RTCA DP sisteminde nöroinflamasyon ko-kültür modelinde uygulanan konsantrasyonların 5. ve 7. günlerde hücre indeksi verileri grafiği.....	115
Şekil 5.62.	xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile amiloid beta ile indüklenen nörotoksisite modelinin oluşturulması.....	130
Şekil 5.63.	Nörotoksisite modeli uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin konsantrasyon grupları ile 24 saat inkübe edildikten sonra 5 µm Aβ toksisitesine karşı koruyucu etkilerinin gerçek zamanlı grafiği.....	131
Şekil 5.64.	Nörotoksisite modeli uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin Aβ uygulaması sonrası 24. saat CI verileri ile çizilen slope grafiği.....	132
Şekil 5.65.	ELISA yöntemiyle belirlenen toplam ROS miktarının gruplara göre yüzde değer grafiği (ROS inhibitörü 5 mM N-asetil sistein (NAC) uygulaması yapılmamıştır).....	134
Şekil 5.66.	ELISA yöntemiyle belirlenen toplam ROS miktarının gruplara göre yüzde değer grafiği (ROS inhibitörü 5 mM N-asetil sistein (NAC) uygulaması yapılmıştır).....	135
Şekil 5.67.	Nörotoksisite modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde konsantrasyon gruplarının Aβ aktivasyonuna etkisi.....	139
Şekil 5.68.	Nörotoksisite modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde konsantrasyon gruplarının kontrol grubuna göre Aβ yüzde değişim grafiği.....	140
Şekil 5.69.	Nörotoksisite modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde konsantrasyon gruplarında apoptotik etkinin akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile belirlenmesi.....	143
Şekil 5.70.	Nörotoksisite modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde konsantrasyon gruplarının Aβ uygulaması sonrasında kontrol grubuna göre apoptotik/nekrotik etki grafiği.....	145

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

4-PBA	: Sodyum fenilbütirat
5mC	: 5-metilsitozin
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Ac	: Asetilasyon
ACTB	: Aktin-beta
ADP	: Adenozin difosfat
AH	: Alzheimer hastalığı
AML	: Akut miyeloid lösemi
APOE	: Apolipoprotein E
APP	: Amiloid prekürsör protein
ATCC	: <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	: Adenozin trifosfat
A β	: Amiloid beta
BACE1	: β -alanı APP parçalayıcı enzimi 1
BDNF	: Beyin-türevli nörotrofik faktör
BSA	: Sığır serum albumin
CBP	: CREB bağlayıcı protein
CI	: Hücre indeksi
CMML	: Kronik miyelomonositik lösemi
COX	: Siklooksijenaz
CpG	: Sitozin fosfat guanine
Cpn	: <i>Chlamydia (Chlamydophila) pneumonia</i>
CTCL	: Kutanöz T hücreli lenfoma
DAMP	: Tehlikeye bağlı moleküler patern
DEAE	: Dietilaminoetil
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit

DNMT	: DNA metiltransferaz
DNMTi	: DNA metiltransferaz inhibitörleri
DPEP	: Dipeptidaz
EBV	: Eppstein Barr virüsü
EMA	: European Medicines Agency
EMEM	: <i>Eagle minimum essential medium</i>
ERK	: Hücre dışı sinyallerle düzenlenen kinaz
FBS	: Fötal sığır serumu
FDA	: U.S. Food and Drug Administration
FITC	: Floresan izotiyosiyanat
GABA	: Gama aminobütirik asit
GAP-43	: Büyüme ile ilişkili protein-43
GSK3	: Glikojen sentaz kinaz 3
GVD	: Granülovakuolar dejenerasyon
HAT	: Histon asetiltransferaz
HDAC	: Histon deasetilaz
HDACi	: Histon deasetilaz inhibitörleri
HHV	: Herpesvirus
HIV	: İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
HSV	: <i>Herpes simplex virus</i>
IC ₅₀	: Medyan inhibitör konsantrasyon
IFN- γ	: İnterferon- γ
IFU	: <i>Inclusion forming unit</i>
IKK	: I- κ B kinazlar
IL-1 β	: İnterlökin-1 β
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
JNK	: c-Jun N-terminal kinaz
K	: Lizin

LDH	: Laktat dehidrogenaz
lncRNA	: Uzun kodlayıcı olmayan RNA
LOAD	: Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı
LPS	: Lipopolisakkarit
LRP-1	: Lipoprotein ile ilişkili reseptör-1
LTP	: Uzun vadeli potansiyalizasyon
MAPK	: Mitojenle aktifleşen protein kinaz
MDS	: Miyelodisplastik sendrom
MEF2C	: Miyosit artırıcı faktör 2C
MHC	: Majör doku uygunluk kompleksi
MIP	: Makrofaj inflamatuvar protein
miRNA	: mikro-RNA
MOI	: <i>Multiplicity of infection</i>
MPP	: 1-metil-4-fenilpiridinyum
mTOR	: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
n	: Tekrar sayısı
n.s.	: Anlamlı değil
NAC	: N-asetil sistein
NAD	: Nsaikotinamid adenin dinükleotid
NEAT1	: <i>Nükleer paraspeckle assembly transcript 1</i>
NFT	: Nörofibriler yumaklar
NF-κB	: Nükleer faktör-kappa B
NGF	: Sinir büyüme faktörü
NK	: Doğal öldürücü hücreler
NLR	: Nod benzeri reseptörler
NLR	: NOD-benzeri reseptörler
NMDA	: N-metil D-aspartat

NO	: Nitrik oksit
NSD	: Nükleer reseptör bağlayıcı SET alan proteini
<i>p</i>	: Anlamlılık
P/CAF	: P300 / CREB bağlayıcı protein ile ilişkili faktör
PAMP	: Patojene bağlı moleküler patern
PBS	: Fosfat tamponlu salin solüsyonu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
P-gp	: P-glikoprotein
PI3K / AKT	: Fosfoinositid 3-kinaz / protein kinaz B
PMA	: Forbol 12-miristat 13-asetat
PRR	: Patern tanıma reseptörleri
PSEN	: Presenilin
PTK2	: Protein tirozin kinaz 2
PTPN22	: Protein tirozin fosfataz, reseptör olmayan tip 22
RA	: Retinoik asit
RAGE	: Gelişmiş glikasyon son ürünü reseptörü
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türevleri
rpm	: <i>Rounds per minute</i>
RTCA DP	: Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi
RT-PCR	: Gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu
SAF	: <i>Scaffold attachment factor</i>
SAHA	: Suberoilanilid hidroksamik asit
SCARA1	: Makrofaj temizleyici resept�r1
SUV	: <i>Supressor of variegation</i> (renklilik baskılayıcı)
TAK1	: Aktifleştirilmiş kinaz 1
TGF-�	: Dönüştürücü büyüme faktörü-�
Th	: Yardımcı tip T hücreleri

TLR	: Toll-benzeri reseptör
TNF- α	: Tümör nekroz faktör- α
TREM2	: <i>Triggering receptor expressed on myeloid cells-2</i>
Trk	: Tirozin reseptör kinaz
TSA	: Trikostatin A
TUBB3	: Beta-3 tubulin
UTR	: Kodlanmayan alan
UV	: Ultraviyole
β -CTF	: β -C terminal fragmanı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sinir ve bağışıklık sistemlerinin karşılıklı etkileşimleri uzun zamandır bilinmektedir ve son zamanlarda bu sistemlerin gelişim, homeostaz, patogeneze ve yaşlanma gibi birçok fizyolojik süreç üzerinde birbiriyle etkileşim halinde olması nedeniyle daha fazla dikkat çekmeye başlamıştır (McAllister ve van de Water, 2009; Trakhtenberg ve Goldberg, 2011). Bağışıklık sisteminin sinir sistemi üzerinde hem faydalı hem de hasar verici etkileri vardır. Buna karşılık olarak santral sinir sistemi de nöro-endokrin ağ aracılığıyla immünolojik değişiklikleri indüklemektedir (Procaccini vd., 2014). Sinir sistemi ve immün sistem arasındaki bu etkileşim ve bağlantı özellikle yaşlanma sürecinde her iki sistem üzerinde de çift taraflı etkilere sebep olmakta, ancak nörodejenerasyon sırasında hangi sistemin öncül olduğu halen bilinmemektedir (Gui vd., 2012).

Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae (Cpn), yaygın insan solunum yolu enfeksiyonuna neden olan zorunlu hücre içi gram-negatif patojendir. İlginç olarak, *Chlamydia* enfeksiyonlarının kronikleşmeye meyilli olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir ve bu veriler enfeksiyonların sadece kalıcı solunum yolu hastalıkları açısından değil, aynı zamanda kan damarı inflamasyonundan kaynaklanan ateroskleroz gibi hastalıklar ile ilişkili olması açısından da klinik olarak önemlidir (Uruma vd., 2005). Günümüze kadar yapılan pek çok çalışmada Cpn enfeksiyonunun astım ve ateroskleroz gibi inflamatuvar hastalıklar ile ilişkisi kesin olarak kanıtlanmıştır ve bu enfeksiyon türünün Alzheimer hastalığı (AH) başta olmak üzere nörodejeneratif santral sinir sistemi hastalıkları ile ilişkisi olduğu yönündeki kanıtlar giderek artmaktadır (Shima vd., 2010). AH, nöronal sinapslarda önemli bozukluklar ve hafızadaki eksiklikler ile karakterize olan nörodejeneratif hastalıklardan biridir. Genel olarak, en yaygın belirtisi kısa süreli hafıza kaybı olmak üzere kademeli olarak başlayan bir hastalıktır. AH semptomları zaman geçtikçe yoğunlaşarak giderek kötüleşmektedir. Bu semptomlar genellikle yaygın hafıza kaybı, kafa karışıklığı, konuşma bozukluğu, ruh hali değişimleri ve davranışsal sorunları içerir (Burns ve Iliffe, 2009). Çoğu durumda, AH demansa ilerler ve nihayetinde sıklıkla bronkopnömoni veya akut serebrovasküler olay nedeniyle ölüme yol açar (Mölsä vd., 1986).

Epigenetik modifikasyonlar, nörodejeneratif bozuklukların patogeneğinde ve akut beyin hasarına yatkınlıkta önemli oyuncular olarak ortaya çıkmaktadır. DNA ve histon modifikasyonları, beyin çevresel stres faktörlerine ve yaralanma tepkisine adaptasyonunu sağlayan karmaşık bir gen ekspresyon makinesi oluşturmak için kodlayıcı olmayan ribonükleik asitlerle (RNA) birlikte hareket etmektedir. Bu modifikasyonlar beyin oluşumu, hafıza oluşumu, motor fonksiyon ve biliş gibi büyük ve karmaşık süreçleri, nöroenez ve DNA onarımı gibi hücre düzeyindeki işlemler aracılığıyla etkiler. Bu nedenle, epigenetik mekanizmalardaki dengesizliğin genetik koddaki anormalliklerden bağımsız olarak birçok nörolojik bozukluğun ilerlemesini etkilediği gösterilmiştir (Bertoglia vd., 2019). Epigenetik, beyin hasarına katkıda bulunan moleküler mekanizmalar hakkındaki anlayışımızı önemli ölçüde artırmaya yardımcı olmakla birlikte nöronal hayatta kalımı teşvik etmek için etkili terapötik hedefleri de belirleyebilir (Esposito ve Sherr, 2019).

Bütün bu bilgiler ışığında, bu tez kapsamında Cpn enfeksiyonunun özellikle nöroinflamasyon ve epigenetik faktörlerle ilişkisini nöronal mikroçevrede araştırmak amacıyla öncelikle Cpn ile indüklenmiş mikrogliya ve SH-SY5Y hücreleri ile nöroinflamasyon modeli oluşturulmuştur. Bu model üzerinde epigenetik mekanizmalar üzerine etkili ilaçlar olan histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi) Trikostatin A (TSA) ve givinostat, DNA metiltransferaz inhibitörü (DNMTi) RG108, ve Cpn enfeksiyonu üzerinde etkili bir antibiyotik olan rifampinin inflamazom ve epigenetik kromatin modifikasyonu ile ilişkili genler üzerine etkileri araştırılmıştır. Nöroinflamasyon modeline ek olarak, nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri üzerinde amiloid beta (A β) ile indüklenen bir nörotoksisite modeli oluşturulmuş ve bu ilaçların nöroprotektif etkileri, gerçek zamanlı hücre analiz sistemiyle hücre canlılıkları izlenerek, toplam reaktif oksijen türevleri seviyeleri (ROS) ve apoptotik/nekrotik etkileri belirlenerek araştırılmıştır.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında TSA, RG108, givinostat ve rifampinin nöroinflamasyon ve nörotoksisite modelleri üzerindeki nöroprotektif etkilerini aydınlatmak ve aynı zamanda Cpn enfeksiyonunun AH patolojisindeki rolüne epigenetik yollar açısından farklı bir yaklaşım sağlamak hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

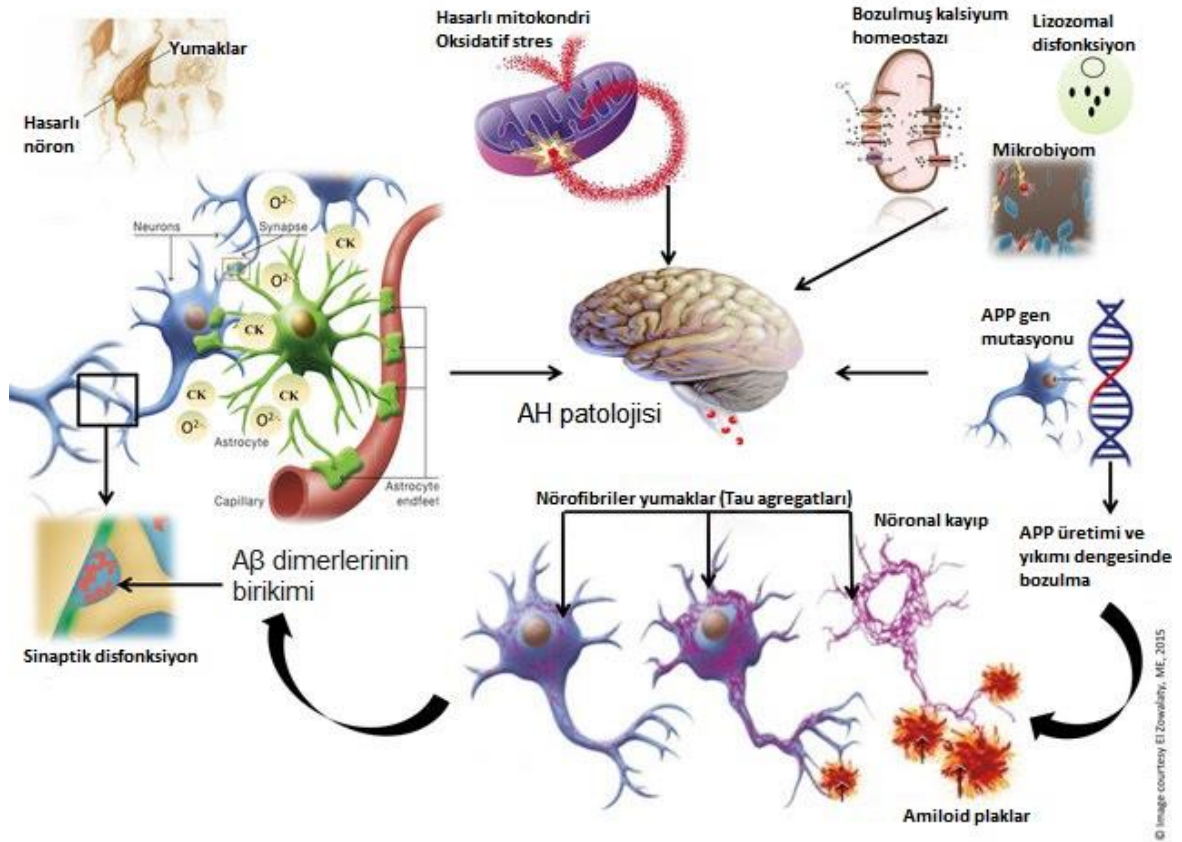
2.1. Alzheimer Hastalığı

Demansın en önde gelen nedenlerinden biri olan Alzheimer Hastalığı (AH), nöron ölümü ve dolayısıyla ilerleyici biliş bozukluğu ile sonuçlanan yaşa bağlı en yaygın nörodejeneratif hastalıklardan biridir. AH'nin tipik klinik belirtileri, hafızadaki ilerleyici gerileme, bilişsel ve entelektüel yeteneklerin azalması ve çeşitli davranışsal ve nöropsikiyatrik bozukluklardır (Liang vd., 2017).

AH, çoğunlukla sporadik olarak meydana gelirken, üç gendeki mutasyonları (amiloid öncü protein (APP), presenilin-1 (PSEN1) ve presenilin-2 (PSEN2)) nadir görülen (<% 0.5) ailesel AH neden olmaktadır. Mutasyon sebebiyle oluşan ailesel AH semptomları, sporadik AH'den tipik olarak 30 ila 50 yaşları arasında daha erken gelişmektedir (Bateman vd., 2011). Sporadik, geç başlangıçlı AH, genetik ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık bir etkileşimle ortaya çıkmaktadır. AH riskinin çoğunlukla genetik faktörlerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ olmak üzere üç varyantı olan apolipoprotein E (APOE) geni, sporadik AH için en büyük risk faktörüdür. $\epsilon 4$ -taşıyıcı olmayan bireylere kıyasla, heterozigot $\epsilon 4$ taşıyıcıları yaklaşık 3 kat, homozigot $\epsilon 4$ taşıyıcılarıysa yaklaşık 12 kat AH riski taşımaktadırlar (Verghese vd., 2011). Buna ek olarak, binlerce örnek taranarak yapılan genom çapında ilişki çalışmaları sonucunda, inflamasyon, kolesterol metabolizması ve endozomal vezikül geri dönüşüm yollarını etkileyen 20'den fazla genetik risk faktörü tanımlanmıştır (Karch ve Goate, 2015). Özellikle, amiloid birikimine yanıt olarak meydana gelen mikrogliyal aktivasyonun artık AH patogenezinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Yeni nesil sekanslama kullanılarak yapılan ve genetik yaklaşımlara odaklanan çalışmalar ışığında, AH için nispeten yüksek riske neden olan protein tirozin kinaz 2 (PTK2), miyosit artırıcı faktör 2C (MEF2C) ile CD33 gibi düşük frekanslı başka genler de ortaya çıkarılmıştır ve bunlar da hastalık patogenezinin ilişkin görüşler sunmaktadır (Escott-Price vd., 2015). Genetik faktörlere ek olarak epidemiyolojik kanıtlar, eğitim ve fiziksel egzersizin AH'ye karşı koruyucu olabileceğini, ancak orta yaş hipertansiyonu ve diyabetin AH için risk oluşturduğunu göstermektedir (Xu vd., 2015).

2.1.1. Alzheimer hastalığının patolojisi

AH'de beyindeki nöropatolojik değişiklikler, hem pozitif hem de negatif bulgular içermektedir (Şekil 2.1.). Klasik pozitif lezyonlar, yoğun miktarda amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklar, nöropil iplikler ile birlikte hiperfosforillenmiş tau içeren distrofik nöritlere eşlik eden astroglioz ve mikrogliyal hücre aktivasyonundan oluşmaktadır (Crews vd., 2010). Serebral amiloid anjiyopati sık rastlanan bir bulgudur. Esas olarak hipokampal formasyonda bulunan benzersiz lezyonlar arasında Hirano cisimleri ve granülovakuolar dejenerasyon bulunur. Bu pozitif lezyonlara ek olarak, nöronlar, nöropil ve sinaptik elementlerin karakteristik kayıpları AH'nin temel negatif bulgularıdır (Serrano-Pozo vd., 2011).



Şekil 2.1. AH patolojisinin şematik gösterimi (Marei vd., 2016).

Bu lezyonların her birinin karakteristik bir dağılımı vardır. Amiloid plaklar kortikal zar boyunca bulunurken, nörofibriler yumaklar öncelikle limbik ve ilişkili kortekslerde bulunmaktadır (Braak ve Braak, 1991). Beyindeki nörofibriler dejenerasyon, entorhinal/peririnal kortekste erken lezyonlar, daha sonra hipokampal Ammon alt alanları, sonrasında ilişkilendirme korteksi ve son olarak birincil neokortekste görülmesi sebebiyle hiyerarşik bir paterne sahiptir. Nörofibriler yumak oluşumu çoğunlukla nöronal kayıp ve sinaps kaybıyla paralel görülse de, yumakların bu kayıpların nedeni olup olmadığı kesin değildir (De Calignon vd., 2009; 2010).

2.1.1.1. Amiloid plaklar

Amiloid plaklar, AH korteksinde bol miktarda bulunan, APP'nin β ve γ sekretazlar tarafından anormal işlenmesinden ve üretim ve temizleme yollarındaki dengesizlikten kaynaklanan A β 40 ve A β 42 peptitlerinin vasküler olmayan hücre dışı birikintileridir (Kumar vd., 2015). Bu 4 kDa büyüklüğündeki küçük peptitler, yüksek derecede fibrilojenik olan beta-kıvrımlı tabaka yapılarına katlanarak A β peptitlerini oluşturmaktadır. A β filamentleri, kongofilik boyaları bağlar ve amiloidin karakteristiği olan polarize ışığa maruz kaldıklarında çift kırılma üretir (Sipe ve Cohen, 2000). 38 ila 43 arası aminoasit içeren A β peptitleri de bulunmuştur, ancak A β 42 bu peptitler arasında en fibrilojenik olanıdır ve AH'da amiloid plakların en baskın bileşenidir (Masters vd., 2015). Amiloid plaklar, genel olarak yaygın veya yoğun çekirdekli şeklinde morfolojilerine bağlı olarak ve Thioflavin-S veya Kongo Kırmızısı ile pozitif veya negatif boyamaya bağlı olarak sınıflandırılmaktadır (Thal vd., 2006). Yoğun çekirdekli plaklar, Thioflavin-S ve Kongo Kırmızısı ile lekelenen kompakt çekirdekli fibril amiloid birikintileridir. Tipik olarak distrofik nöritler (nöritik plaklar), reaktif astrositler ve aktif mikrogial hücrelerle çevrilidir ve sinaptik kayıp ile ilişkilidir. AH'nin patolojik tanısı için varlığının genellikle bilişsel bozukluğun varlığı ile ilişkili olması nedeniyle nöritik plakların yarı-kantitatif skoru kullanılmaktadır. Buna karşılık olarak, yaygın çekirdekli plaklar Kongo Kırmızısı ve Thioflavin S ile boyanmayan, dış hatları belli olmayan şekilsiz amiloid birikintileridir. Yaygın plaklar genellikle nöritik değildir ve glial yanıtlar veya sinaptik kayıp ile ilişkili değildir. Bu plak tipi AH'nin patolojik tanısı için göz önünde

bulundurulan bir bulgu değildir, çünkü bilişsel olarak sağlam yaşlı insanların beyinde de nispeten yaygın olarak bulunmaktadır (Serrano-Pozo vd., 2011).

2.1.1.2. Serebral amiloid anjiyopati

A β peptidleri sadece beyin parankiminde amiloid plakları olarak değil aynı zamanda serebral kan damarlarında da birikmektedir. AH vakalarının %85-95'inde en azından bir dereceye kadar serebral amiloid anjiyopati olduğu tahmin edilmektedir (Charidimou vd., 2017). Parankimal amiloid birikintileri daha az çözünebilir ve agregasyona eğilimli A β 42 açısından zenginken, serebral amiloid anjiyopatide saptanan amiloid birikintileri daha çözünebilir form olan A β 40 açısından zengindir ve serebral kortekslerin ve leptomeningeal damarlardaki gri maddenin küçük arterlerini, arteriollerini ve hatta kılcal damarlarını etkileyebilir (Perl, 2010).

İki tip serebral amiloid anjiyopati tanımlanmıştır. Tip 1 serebral amiloid anjiyopati, kılcal damarları, arteriyolları ve küçük arterleri etkiler ve APOE4 ile ilişkili olma olasılığı 4 kat daha fazladır. Tip 2 serebral amiloid anjiyopati, arteriyolları ve küçük arterleri etkiler, ancak kılcal damarları etkilemez ve APOE2 ile ilişkili olma olasılığı 2 kat daha fazladır (Thal vd., 2002; Attems vd., 2010). Tipik olarak frontal ve oksipital lobları etkileyen kanamalara yol açarken, şiddetli hale geldiğinde kan akışını bozabilir ve iskemik lezyonlar veya küçük enfarktılara neden olabilir (Perl, 2010). AH'de serebral amiloid anjiyopatinin yaygınlığı, hastalığın daha erken yaşta başlaması ile ilişkili bulunmuştur (Vidoni vd., 2016). Hayvan modellerinden elde edilen bulgular, kılcal serebral amiloid anjiyopatinin, bozulmuş perivasküler klerens, peri-kapiler A β birikintileri ve sonrasında serebral amiloid anjiyopatiye yol açan nöronal A β kaynaklı olduğunu öne sürmektedir (Calhoun vd., 1999).

2.1.1.3. Nörofibriler yumaklar ve nöropil iplikler

Nörofibriler yumaklar (NFT'ler) ilk olarak Alois Alzheimer tarafından orijinal otopsi olgu raporunda piramidal nöronların perikaryal bölgesi içindeki etkilenen nöronların hücre yüzeyine yakın kalın demetler oluşturan intranöronal filamentöz inklüzyonlar olarak tanımlanmıştır (Ryan vd., 2015). AH'nin nöropatolojik tanısı hem amiloid plakları, özellikle

de yoğun nöritik plakları, hem de filamentöz tau proteinlerinden oluşan NFT bulgusunu gerektirir. Amiloid birikintilerinden daha çok NFT'nin, bilişsel bozukluk ile paralellik gösterdiğini gösteren kanıtlar vardır (Dickson vd., 1992). NFT'lerin ana bileşeninin, anormal olarak hiperfosforile ve yanlış katlanmış, aynı zamanda aksondaki mikrotübülleri bağlamak ve stabilize etmek şeklindeki normal yeteneklerini kaybetmiş mikrotübül ile ilişkili tau proteini olduğu bulunmuştur. AH'deki tau filamentleri elektron mikroskobu ile incelendiğinde, belirgin periyodik tekrarlar sergileyen, yaklaşık 10 nm çapında biri diğerinin üzerine kıvrılarak bükülen iki küçük filamentten oluşan 65-80 nm uzunluğundaki şekilleri nedeniyle "eşleştirilmiş sarmal filamentler" olarak adlandırılmıştır (Fitzpatrick vd., 2017). Her zaman NFT'lere eşlik eden nöropil ipliklerin, yumak içeren nöronların filamentöz tau içeren dendrit ve aksonlarının parçalanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nöropil ipliklerin, NFT içeren nöronlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Normal tau'nun bozulmasının, AH'de tau patolojisinin beyin boyunca yayılmasında potansiyel olarak rol oynadığı düşünülmektedir (Braak vd., 1986; Perry vd., 1991; Mitchell vd., 2000).

2.1.1.4. *Granülovakuolar dejenerasyon ve Hirano cisimleri*

Granülovakuolar dejenerasyon (GVD) ve Hirano cisimleri, AH hastalarının hipokampal piramidal nöronlarının sitoplazmasında bulunan, varlık nedenleri henüz iyi anlaşılamamış iki lezyondur. Bu iki lezyon, bilişsel olarak sağlam yaşlı insanlarda da yaşlanma ile giderek daha fazla gözlense de, yaşlı AH hastalarında daha şiddetli ve sık görülür (Xu vd., 1992).

GVD, merkezi 0.5-1.5 µm olan yoğun granüllü olan 3-5 µm vakuollerdir. Lizozomal markerlarla etiketlenebilmeleri nedeniyle otofajik granüller olarak sınıflandırılmışlardır. Ayrıca tubulin, nörofilamentler ve tau da olmak üzere, hücre iskeleti bileşenleri için immünoreaktiviteye sahiptirler. Bazı tau kinazlara karşı da pozitif olmaları nedeniyle, nörofibriler yumak oluşumunda rolleri olduğu öne sürülmüştür. En sık hipokampustaki piramidal nöronların sitoplazmasında görülürler. Apoptoz ve stres granülleri ile ilgili epitoplara içerdikleri için önemleri ve kökenleri hakkında çeşitli tartışmalar vardır. Aktive kaspaz-3'e karşı immünoreaktif oldukları için apoptotik hücre ölümüyle ilişkili oldukları düşünülmektedir (Funk vd., 2011). Daha yakın tarihli çalışmalar, bu cisimlerin endoplazmik

retikulum kaynaklı olabileceğini ve birkaç stres kinaz için pozitif olmaları sebebiyle katlanmamış proteinlere cevap olarak görülen stres granülleri olabileceğini öne sürmüştür (Thakur vd., 2007; Hoozemans vd., 2009). Son olarak, ubiquitin ve otofajik belirteçler için pozitifliklerine dayanarak, bu granüllerin geç evre otofajik vakuoller olduğu öne sürülmüştür (Yamazaki vd., 2010; Funk vd., 2011).

Hirano cisimleri, yaşlılarda hipokampal CA1 bölgesinin stratum lacunosum’unda nispeten yaygın olan eozinofilik çubuk benzeri sitoplazmik inklüzyonlardır. AH’de Hirano cisimlerinin sayısı anormal olarak yüksektir ve stratum pyramidale nöronlarına taşınmışlardır (Gibson ve Tomlison, 1977). Hirano cisimlerinin AH’deki önemi tam olarak anlaşılamamış olsa da; tau, nörofilament proteinleri, aktin ve diğer hücre iskelet proteinlerine karşı antikorlar tarafından tanınırlar. Hirano cisimleri ile ilişkili diğer immünoreaktiviteler, uyarılabilir nitrik oksit sentaz, ileri glikasyon son ürünleri ve APP’nin karboksi terminal parçalarıdır (Serrano-Pozo vd., 2011).

2.1.1.5. Nöronal ve sinaptik kayıp

Nöron kaybı, AH’de kortikal atrofiyle sonuçlanan patolojik sürecin temel olayıdır. Nöronal kaybın dağılımı NFT oluşumuyla paralellik göstermektedir, ancak bundan daha önemlisi aynı bölgede nöronal kaybın NFT oluşumundan daha fazla olması, bilişsel bozuklukla NFT sayısından daha fazla orantılıdır. Bunun nedeni NFT içeren nöronların uzun ömürlü olabilmesi, hatta hayalet yumak olarak da yıllarca yaşayabilmeleridir (Gomez-Isla vd., 1996; 1997). Buna ek olarak, sinaptik kaybın nöron kaybından önce geldiği ve bu etkilerin muhtemelen amiloid ve tau patolojisinden kaynaklandığı görülmektedir (Overk ve Masliah, 2014; Forner vd., 2017). Ancak sinaptik kayıp sadece nöron kaybından kaynaklanmamaktadır, belirli bir kortikal alanda mevcut nöronal kayıptan daha fazla olabilmektedir. Bu durum, belirli bir devrede hayatta kalan diğer nöronların sinaptik partnerleriyle daha az bağlantı yaptığını göstermektedir. Bu nedenle sinaptik kaybın, AH’de bilişsel azalmayla, nöron kaybı ve tau yükünden daha güçlü korelasyon gösterdiği düşünülmektedir (Terry vd., 1991). Sözel akıcılıkta ve bilişsel işleyişte yaşanan bozulmaların sinaptik yoğunluktaki azalmaya bağlı olduğu, ve bunun da presinaptik terminali etkileyen aksonal disfonksiyonun sonucu olduğu gösterilmiştir (Masliah vd., 1991; Scheff vd., 2006;

2011). Bu patojenik değişikliklerin AH patolojisi ile doğrudan ilişkili olduğu görölmektedir ve sinaptik fonksiyon üzerindeki etkileri klinik semptomlarla ilişkilidir. Bozulmuş aksonal taşımanın tau disfonksiyonu ile sonuçlanması sonucunda hiperfosforile taunun dendritik uçlara gelişiyile eş zamanlı olarak sinaptik iletimin bozulması sebebiyle, sinaptik hasara neden olan süreç birden fazla odaklı olabilmektedir (Hoover vd., 2010).

2.1.2. Alzheimer hastalığı ve nöroinflamasyon

İnflamasyon, hücre veya dokuların yaralanma, enfeksiyon ve travmaya cevabı olarak başlayan biyolojik süreçtir. Başarılı bir inflamatuvar cevap mekanizması istilacı patojenleri ortadan kaldırır, sonrasında da yara iyileşmesini ve anjiyogenezi başlatır (Carson vd., 2009). AH'da nöroinflamasyon, ortaya çıkan senil plaklar ve NFT tarafından aktive edilen pasif bir sistem değildir, bunun yerine plaklar ve yumaklar kadar, veya daha fazla, patogeneze katkıda bulunur (Zhang vd., 2013). Beyindeki nöronlar, hücresel artıkları temizleyerek ve nörotrofik faktörler, sitokinler ve proteazlar salgılayarak inflamasyonun negatif etkilerine karşı nöroprotektif yönde mücadele ederler. Nöroinflamasyon, yaralanmayı takiben iyileşme üzerinde olumsuz etkilere sahip olsa da, diğer eylemlerin yararlı ve gerekli olduğu görölmektedir. Bu bağlamda, nöroinflamasyon, nöronal mikro çevre için bir tehditle başa çıkmaya aracılık eden karmaşık bir dizi yerel bağışıklık tepkisi olarak tanımlanabilir (Harry ve Kraft, 2009). Nöroinflamasyonun AH'daki önemli rolü, *triggering receptor expressed on myeloid cells-2* (TREM2) (Guerreiro vd., 2013) ve CD33 (Bradshaw vd., 2013; Griciuc vd., 2013) dahil olmak üzere bağışıklık sistemi reseptörleri için genlerin AH ile ilişkili olduğu bulguları ile desteklenmektedir.

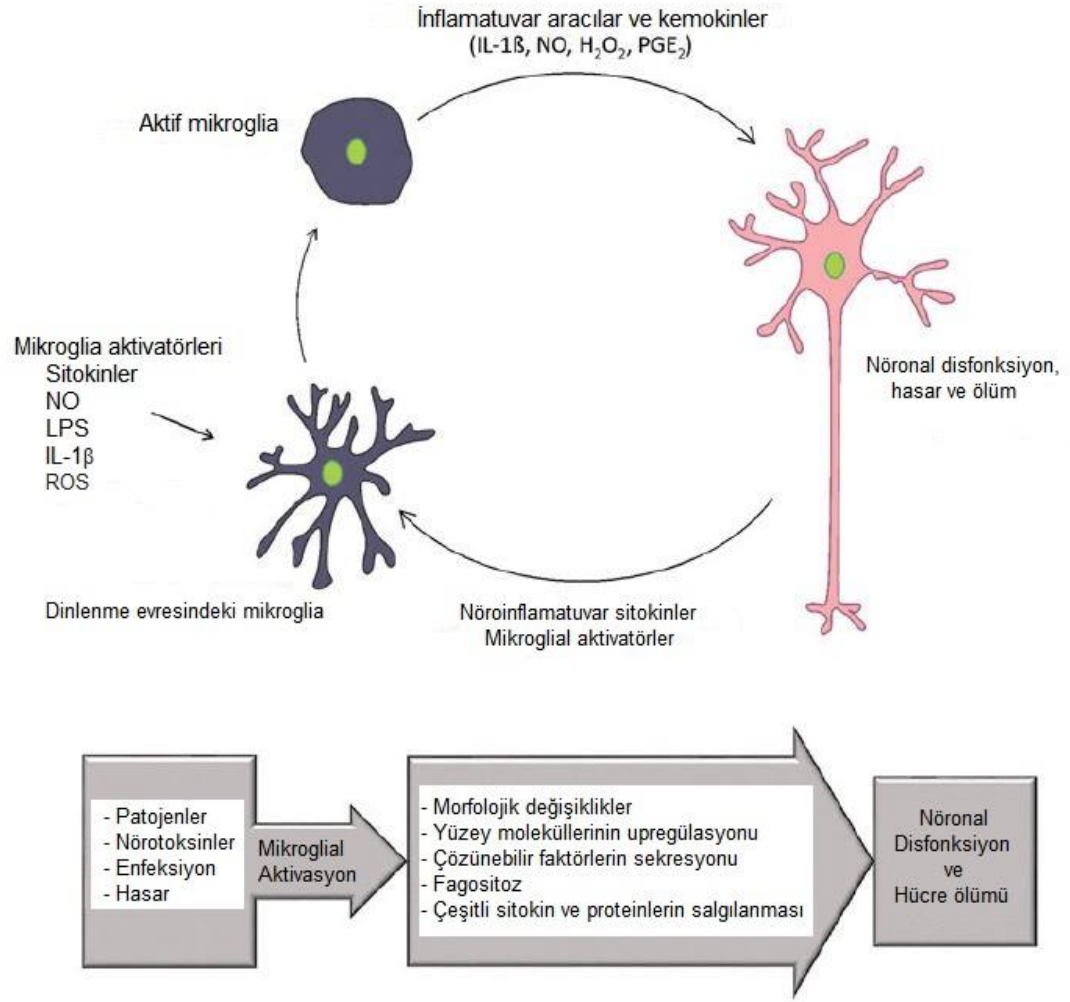
Nöroinflamasyon, santral sinir sistemi içerisindeki nöronlar, makroglia ve mikroglialar dahil olmak üzere varolan bütün hücreleri içeren bir cevaptır. Mikroglia ve karmaşık nöroinflamatuvar yolları aktive eden genetik arka plan, travma, çevresel faktörler ve yaş gibi faktörler bulunmaktadır. Bu faktörlere bir örnek olarak, Gram-negatif bakterilerin dış zarında bulunan bir endotoksin olan ve TLR sinyali yoluyla sistemik inflamatuvar cevabı indükleyen LPS gösterilebilir (Lyman vd., 2013). LPS'nin mikroglia yüzeyinde TLR4 reseptörüne bağlanması, fosfoinositid 3-kinaz / protein kinaz B (PI3K / AKT), mitojenle aktifleşen protein kinaz (MAPK) ve rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR)

dahil olmak üzere birkaç sinyal iletim yolunu da aktive ederek nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) aktivasyonuna neden olur. NF- κ B aktivasyonu sonrasında nöroinflamasyon ile sonuçlanan, proinflamatuvar sitokinler, kemokinler ve indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) gibi indüklenbilir enzimlerin üretimine aracılık eder (Glass vd., 2010; Park vd., 2011). Bu nedenle, bağışıklık sisteminin bilgiyi nasıl işlediğini ve NF- κ B aktivasyonu yoluyla patojenleri nasıl algıladığını anlamak önemlidir.

2.1.2.1. Mikroglia ve nöroinflamasyon

Mikroglialar, organizmanın savunmasında ve doku onarımında kritik bir rol oynayan yerleşik beyin makrofajlarıdır. Beyindeki inflamatuvar süreçler ve nörodejeneratif hastalıklarda anahtar hücrelerdir (Harry ve Kraft, 2012). Normalde, patojenlerin ve hücre kalıntıların varlığını araştırmak için son derece hareketli bir şekilde sinaptik izlemeden sorumludurlar ve aynı anda doku sürekliliğini destekleyen faktörler salgırlar (Kettenmann vd., 2011). Aynı zamanda, nöronal devrelerin bakımı ve plastisitesinde görev alırlar ve sinapsların korunmasına ve yeniden şekillenmesine katkıda bulunurlar (Ji vd., 2013).

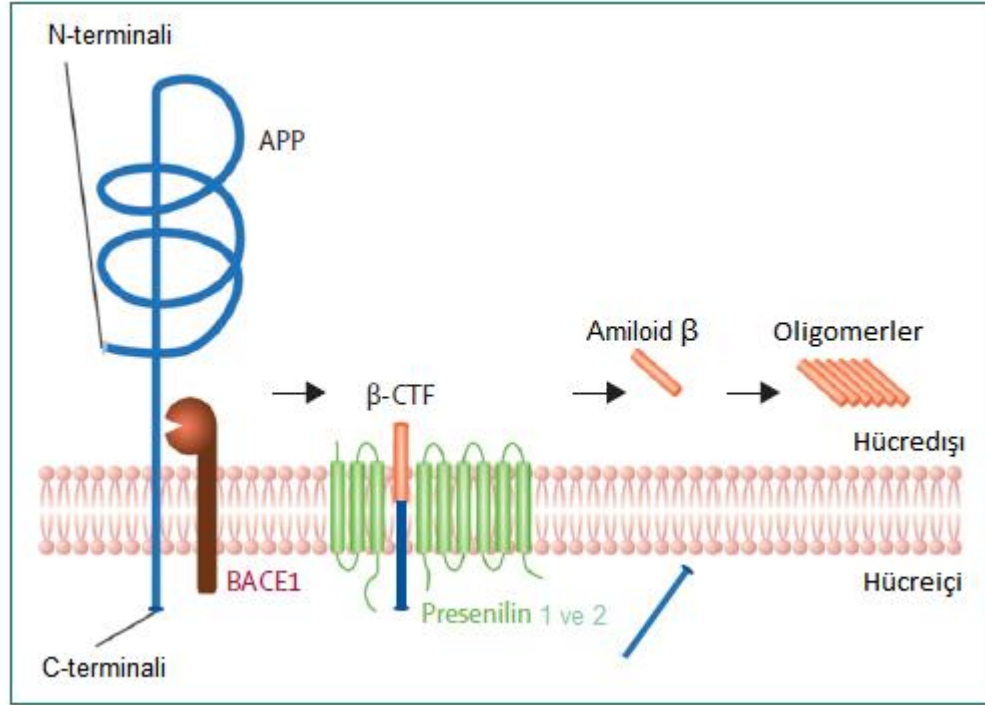
Nöroinflamasyonun ilk göstergesi mikroglia aktivasyonudur (Carson vd., 2009). Stres veya A β fibrilleri ve tau çiftli sarmal filamentleri gibi protein agregatları nedeniyle bozulma koşullarında aktive olurlar ve senil plaklar etrafında gözlemlenirler. Nöropil iplikler ve NFT ile ilişkili nöronal hasarla karşılaştıklarında sayıları artmaktadır (Wake vd., 2009; Serrano-Pozo vd., 2011). Aktive edildikten sonra mikroglialar çoğalırlar, göç ederler, T-hücrelerine antijen sunarlar, çeşitli oksidanları salgırlar ve iNOS, interlökin-1 β (IL-1 β), tümör nekroz faktör- α (TNF- α), COX-1, COX-2, reaktif oksijen türleri (ROS) ve nöronal disfonksiyon ve hücre ölümüne neden olan potansiyel nörotoksik bileşikler de dahil olmak üzere çeşitli protein ve genler aktive olur (**Şekil 2.2.**) (Park vd., 2011). Patolojik tetikleyicilerin saptanmasına, tehlikeye bağlı moleküler paternleri (DAMP) veya patojene bağlı moleküler paternleri (PAMP) tanıyan reseptörler aracılık eder. Kronik nöroinflamasyon açısından, bu hücreler uzun süreli nörodejenerasyona katkıda bulunan bu sitokinleri ve nörotoksik molekülleri serbest bırakarak uzun süre aktif kalabilir (Lyman vd., 2013).



Şekil 2.2. Mikrogia aktivasyonu ve nöronal hücre ölümü. (Shabab vd., 2017).

AH'da mikrogia, makrofaj temizleyici reseptör1 (SCARA1), CD36, CD14, α 6 β 1 integrin, CD47, TLR2, TLR4, TLR6 ve TLR9 da dahil olmak üzere hücre yüzeyi reseptörleri aracılığıyla çözünabilir A β oligomerlerine ve A β fibrillerine bağlanabilmektedir ve bu sürecin AH'daki inflamatuvar reaksiyonun bir parçası olduğu düşünülmektedir (Paresce vd., 1996; Bamberger vd., 2003; Liu vd., 2005; Stewart vd., 2010). A β peptidi, iki membran bağımlı proteaz tarafından ardışık bölünmeler yoluyla APP'den türetilir. β -alanı APP parçalayıcı enzimi 1 (β -sekretaz BACE1), bir C-terminal fragmanı (β -CTF) ve salgılanan çözünür peptit APP β verecek şekilde proteini ayırır. β -CTF daha sonra A β peptidi serbest bırakmak için presenilin 1 ve 2 (γ -sekretaz kompleksinin bir parçası) ile işlenir (Querfurth ve

LaFerla, 2010; Kummer ve Heneka, 2014). Bu işlem, aminoasit sayısı 37 ila 42 arasında değişen, farklı şekilde kesilmiş C-uçları ile sonuçlanır (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. APP'nin amiloidojenik işlenişi. (Heneka vd., 2015).

Bu peptitler arasından özellikle 42-amino asit formu ($A\beta_{42}$), çözünür oligomerler ve fibriller oluşturmak için güçlü bir eğilime sahiptir. $A\beta_{42}$ agregatları, mikrogliya üzerindeki hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanırlar ve $TNF-\alpha$ ve $IL-1\beta$ 'nin de dahil proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasına neden olan bir inflamatuvar aktivasyonu indüklerler. Bu bağlamda, $IL-1\beta$ 'nin APP ekspresyonunun modülasyonu ile plak oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir. Ek olarak, BACE1'in ekspresyonu bazı sitokinler tarafından upregüle edilir, bu olay da $A\beta$ türevlerinin üretiminin artmasına neden olur (Heneka vd., 2015). $A\beta$ 'nin CD36, TLR4 ve TLR6 ile bağlanması, mikrogliyanın aktivasyonu ile proinflamatuvar sitokinler ve kemokinler üretmeye başlamasıyla sonuçlanır (El Khoury vd., 2003; Stewart vd., 2010). Buna karşılık olarak, CD36, TLR4 veya TLR6'nın *in vitro* koşullarda genetik olarak silinmesi, $A\beta$ kaynaklı sitokin üretimini azaltır, hücre içi amiloid birikimini ve inflamazom olarak bilinen multiprotein komplekslerinin aktivasyonunu önler (Sheedy vd.,

2013). Bu nedenle, mikroglia aktivasyonunun neden olduğu proinflamatuvar aracılardan inhibe edilmesinin, nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesini azaltmak için etkili bir terapötik yaklaşım olacağı düşünülmektedir (Jeong vd., 2013).

Aktif mikroglia nöronları öldürebilir (nörodejeneratif rol), bununla birlikte, patojenleri öldürebilir ve/veya ortadan kaldırabilir (nöroprotektif rol) (Carson vd., 2009). Ölü veya ölmekte olan nöronların mikrogliyal fagositozu ile zarar verici ve/veya proinflamatuvar hücre içi bileşenlerin salınımı önlenir (Neher vd., 2012). Beyindeki protein yükünün homeostatik dengesini korumak ve nörodejenerasyon gelişimini önlemek için anormal veya aşırı proteinlerin fagositozu ve klerensinin etkili ve aktif bir şekilde gerçekleşmesi gerekmektedir. Birçok pro-apoptotik yola, nöroinflamasyon sırasında fazlaca üretilen sinyal molekülleri aracılık etmektedir, bu da nöroinflamasyonun nöronal apoptozu doğrudan etkileyebileceğini ve mikrogliayı aktive edebileceğini göstermektedir (Harry ve Kraft, 2009).

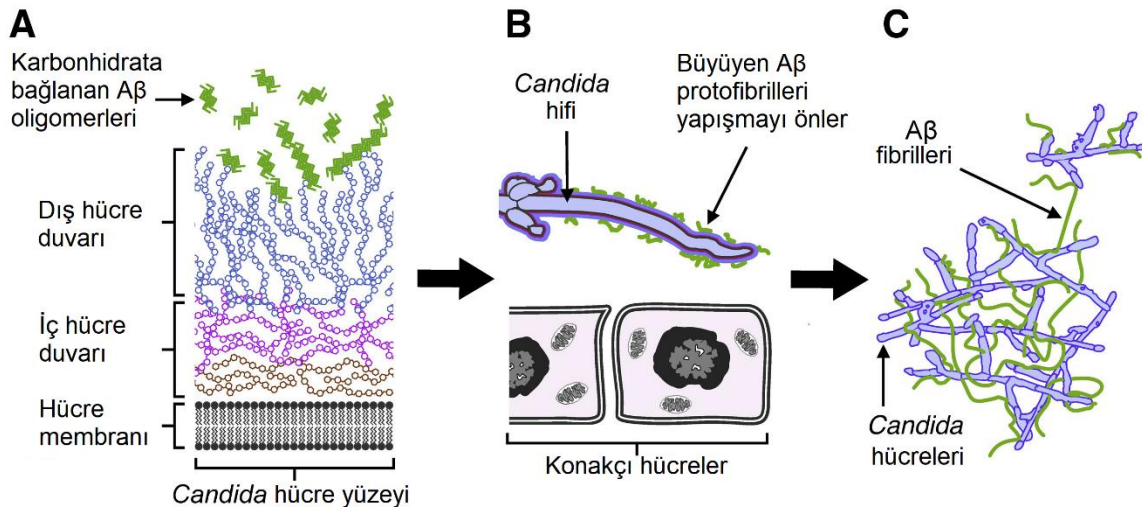
2.1.3. Patojen ve antimikrobiyal korunma hipotezi

“Patojen hipotezi” veya diğer adıyla “enfeksiyon hipotezi” viral, bakteriyel ve / veya mantar patojenleri ile kronik enfeksiyonun yaşlanma sırasında sporadik AH başlangıcı için bir tetikleyici olabileceğini öne sürmektedir. Literatürde aday patojenler, oral herpes hastalıklarına neden olan herpes simplex virüs tip 1 (HSV-1), genital herpes hastalıklarına neden olan HSV-2, insan herpesvirus 6A (HHV-6A) ve HHV-7, Epstein Barr virüsü (EBV), sitomegalovirüs, insan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV), bağırsak bakterileri, karaciğer bakterileri, *Helicobacter pylori*, periodontal patojenler (diş eti iltihabına bağlı bakteriler), pnömoniye neden olan bakteri *Chlamydomphila pneumoniae* ve diğerleri şeklinde özetlenebilir (Li vd., 2018).

Bu patojenler santral sinir sistemini doğrudan kan-beyin bariyeri ve / veya beyin-serebrospinal sıvı bariyeri boyunca, trigeminal sinir sistemi ve oral-nazal yoldan geçerek veya gastrointestinal sisteme nüfuz ederek istila edebilirler (Kristensson vd., 2013; Dando vd., 2014; Dahm vd., 2016; Doran vd., 2016; Miner ve Diamond, 2016; Solomos ve Rall, 2016; Doulberis vd., 2018). Ayrıca bu patojenler, AH ile ilişkili olarak nörolojik fonksiyonları düzensizleştiren toksinler de salgılayabilmektedirler (Itzhaki vd., 2016;

Harding vd., 2017). Bu hipotezde HSV1, Cpn ve spiroketler dahil olmak üzere bulaşıcı ajanların santral sinir sistemine ulaşarak orada latent formda kaldıkları ve yaşlanma sırasında, bağışıklık sistemi bozukluklarında ve farklı stres türleri sırasında (benzer şekilde periferdeki HSV1 de benzer şekilde yeniden etkinleşmektedir) beyinde tekrar reaktif oldukları öne sürülmektedir. Doğrudan viral etki ve virüs kaynaklı inflamasyonun neden olduğu nöron hasarı tekrar tekrar ortaya çıkarak ilerleyici sinaptik disfonksiyona, nöron kaybına ve nihayetinde AH'ye yol açmaktadır (veya kofaktör olarak işlev görür). Bu tür hasar başlangıçta aslında sadece bir savunma mekanizması gibi görünen A β 'nin indüksiyonunu içermektedir (Itzhaki vd., 2016).

A β 'nin antimikrobiyal etkisine, heparin bağlanma alanı aracılık eder. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalardan elde edilen sonuçlar, A β peptitlerinin, istilacı patojenleri yakalayarak beynin enfeksiyondan korunmasından sorumlu doğal bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynadığı hipotezini güçlü bir şekilde desteklemektedir (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. A β ve β -amiloid fibrillerin antimikrobiyal aktivitelerinin şematik gösterimi (Moir vd., 2018). (A) A β 'nin heparin bağlanma alanı, çözünür oligomerlerin hücre duvarı şekerlerine bağlanmasına aracılık eder. (B) Yüzeye bağlı A β oligomerleri ve protofibriller konakçı hücreye mikrobiyal yapışmayı bloke eder. (C) Uzun A β fibrilleri, bağlanmamış mikrobiyal hücreleri yapıştırır ve son olarak proteaz dirençli bir amiloid matrisi içinde yakalar.

İnflamasyon aracılı nörodejenerasyon ve A β 'nın bağışıklıktaki rolü üzerine son bulgular, AH'nın “Antimikrobiyal Korunma Hipotezi” nin ortaya çıkmasına neden olmuştur (Moir vd., 2018). A β birikimi, nöroinflamasyon tarafından yönlendirilmektedir, bu da doğuştan gelen bağışıklık sistemi ile AH patolojisi arasındaki ilişkinin çift yönlü olduğunu göstermektedir. Deneysel modellerde, bağışıklık yollarındaki bozulmanın A β birikimini zayıflattığı gösterilmiştir (Reed-Geaghan vd., 2010). Son çalışmalardan elde edilen bulgular, A β 'nın doğuştan gelen bağışıklık sisteminde bir antimikrobiyal peptit olarak rol oynadığını kuvvetle desteklemektedir. Bir arketipik insan antimikrobiyal peptidi olan katelisin antimikrobiyal peptidinin (LL-37), A β ile karşılaştırılması sonucunda, iki peptit arasında geniş ve çarpıcı paralellikler ortaya çıkartılmıştır. Dahası, sentetik A β 'nın, yaygın patojenlerin büyümesini *in vitro* olarak 200 kata kadar azaltabildiği gösterilmiştir (Soscia vd., 2010). A β açısından zengin bölgelerden alınan AH beyin homojenatları, AH olmayan kontrol numunelerine kıyasla yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Başka antiviral çalışmalarda da, influenza A (White vd., 2014) ve HSV-1 (Bourgade vd., 2015; 2016) enfeksiyonuna karşı A β için paralel bulgular bağımsız olarak bildirilmiştir. A β aracılı antimikrobiyal aktivitenin ve A β agregasyonunun indüklenmesinde patojene bağlı etkilerin keşfedilmesi, bu iki faktörün AH patogenezinde nöroinflamasyon ile ilişkilendirilmesine neden olmuştur (Li vd., 2018).

2.1.4. Alzheimer hastalığı ve epigenetik

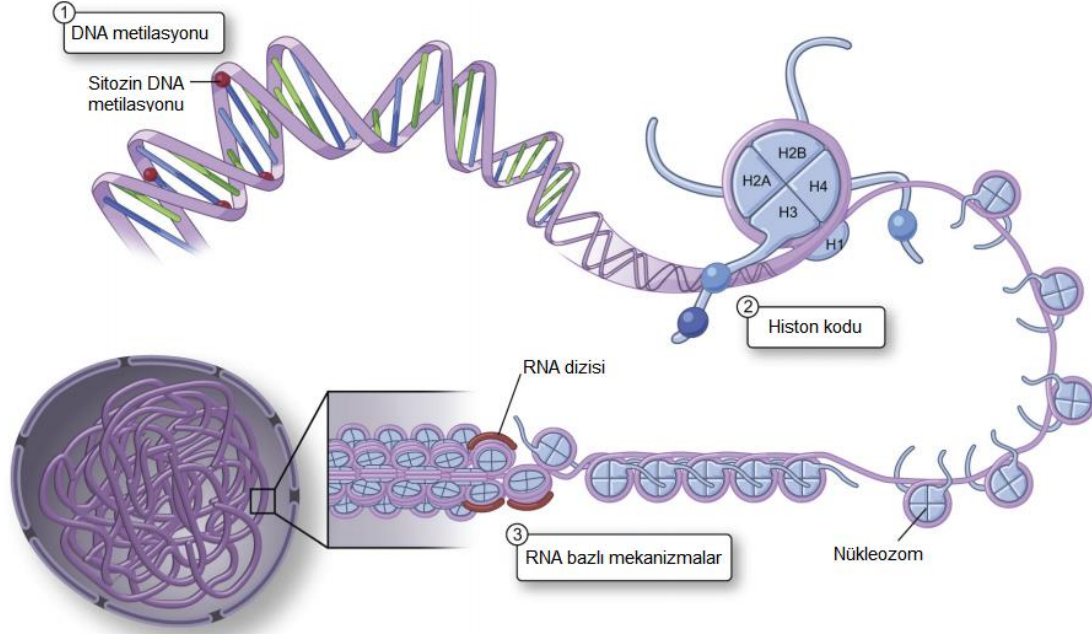
2.1.4.1. Epigenetik mekanizmalar

Epigenetik kavramı ilk olarak 1940'larda DNA metilasyonu ile Conrad Waddington tarafından tanımlanmıştır ve o zamandan beri histon modifikasyonları ve uzun kodlayıcı olmayan RNA'lar (lncRNA'lar) ve ayrıca mikro-RNA'lar (miRNA'lar) tarafından transkripsiyonel düzenlemeyi de kapsadığı gösterilmiştir (Waddington, 2012; Harrison ve Dexter, 2013; Roberts vd., 2014; Szulwach ve Jin, 2014). Epigenetik terimi, genetik kodu değiştirmeden gen ekspresyonunu modüle eden düzenleyici mekanizmaları ifade etmektedir. Epigenetik, beslenme, toksinler, ilaçlar, stres ve hücresel fizyoloji arasında ilişki kurarak genler ve çevre arasındaki etkileşimleri açıklar (Haggarty, 2015; Barouki vd., 2018). Epigenetik değişiklikler beyin paterni oluşumu, nöral kök hücre devamlılığı ve nörogenez

gibi nörogelişimsel süreçlerde ve aynı zamanda beyinle ilgili hastalıklarda rol oynar (Mehler, 2008). Bununla birlikte, son bulgular, epigenetik modifikasyonların, gen ifadesinin düzenlenmesi sürecinde, özellikle de hafıza düzenlenmesinde temel olduğunu göstermektedir (Kosik vd., 2012). Ayrıca AH'nin, post-transtranslasyonel histon modifikasyonlarından etkilendiği düşünülen epigenetik bir blokaj veya gen ekspresyonunda yaygın bir düşüş sergilediği gösterilmiştir (Gräff vd., 2012).

Daha önce de bahsedildiği gibi, epigenetik, mevcut DNA sekansında değişiklik yapılmadan kromatin modifikasyonları sonucunda ortaya çıkan fenotipik değişiklikler olarak tanımlanır (Dupont vd., 2019). Epigenetik mekanizmaların nasıl çalıştığını anlayabilmek için DNA'nın nasıl pakletlendiğini anlamak önemlidir. Ökaryotik bir organizmanın genomu, her hücrenin çekirdeğinde saklanması gereken çok miktarda genetik bilgi içerir (Peterson ve Laniel, 2004). Bu uzun DNA molekülleri boyut olarak oldukça büyük olduğundan, nispeten küçük boyutlu çekirdeğe sığabilmeleri için grift bir şekilde düzenli yapılara paketlenmeleri gerekir. Bunu gerçekleştirebilmek için DNA, elektrostatik ve hidrojen etkileşimleri yoluyla birbirleriyle ilişkili olan ve böylece nükleozom olarak adlandırılan yapısal birimi oluşturan histon proteinlerinin etrafına sarılır (Cairns, 2009). Bir nükleozom, her biri bir çift olarak bulunan sekiz çekirdek histon proteininden (H2A, H2B, H3 ve H4) ve etraflarını saran DNA'dan oluşur (Rando ve Winston, 2012). Bol miktarda pozitif yüklü kalıntı içeren aminoasitlerden oluşan bir histon kuyruğu, histon çekirdeğinden dışa doğru uzanır. Ayrıca, bağlayıcı DNA ile ilişkili olan ve bağlayıcı histon adı verilen bir H1 histon proteini de vardır. Bağlayıcı DNA, kromatine paklendikten sonra nükleozomlar arasında kalan DNA bölgeleridir (Happel ve Doenecke, 2009, Harshman vd., 2013). Gen ekspresyonu üç farklı, ancak birbiriyle son derece ilişkili epigenetik mekanizma tarafından gerçekleştirilir: 1) DNA metilasyonu, CpG (C;sitozin-P;fosfat-G;Guanin) adalarındaki sitozin bazının 5. bölgesine DNA metiltransferaz enzimi ile bir metil grubunun bağlanması şeklinde gerçekleşir. 2) Kromatinin temel tekrar eden birimi, çekirdek histon proteinlerinin bir oktamerinden oluşan nükleozomdur. Histon proteinlerinin (açık ve koyu mavi topolar) amino terminal kuyruklarının transkripsiyon sonrası modifikasyonları ve bu proteinlerin birim DNA uzunluğu başına yoğunluğu önemli ölçüde kromatin yapısını etkileyebilir ve varsayılan bir "histon

kodu” oluşturabilir. 3) RNA bazlı mekanizmaların da yakın zamanda kromatinin üst düzey yapısı üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.5.) (Yan vd., 2010).



Şekil 2.5. Epigenetik gen regülasyonunun üç temel mekanizması (Yan vd., 2010).

Bu bölgeler, gen ekspresyonu ve düzenlenmesi açısından oldukça önemlidir (Clapier ve Cairns, 2009). Düzenlenmiş kromatin yapısı, DNA'nın sıkı bir şekilde paketlenmesine ve çekirdeğe sığmasına izin verirken, yoğunlaştırılmış DNA formu nedeniyle, transkripsiyonu başlatan promotör bölge, DNA şablonu gerektiren önemli hücresel süreçler için kolay erişilebilir değildir (Smith ve Peterson, 2005; Morrison ve Shen, 2009). Promotör bölgenin ulaşılabilir olmasını sağlamak için nükleozom yapısının değiştirilmesi veya bozulması gerekir. Bu amaçla spesifik olarak nükleozomu hedefleyen enzimler, asetilasyon, deasetilasyon ve metilasyonu gerçekleştirerek histon proteinlerini kovalent olarak modifiye edenler ve kromatinin yeniden modellenebilmesi için adenosin trifosfatı (ATP) hidrolize ederek nükleozomu yeniden konumlandırınlar olarak iki ana kategoriye ayrılmaktadır. Ek olarak, fosforilasyon, ubiquitinasyon, sumoylasyon ve adenosin difosfat (ADP) ribozilasyonu dahil olmak üzere başka histon modifikasyonları da vardır (Margueron vd, 2005; Smith ve Peterson, 2005).

2.1.4.2. Alzheimer hastalığı patogeneziyle ilişkili epigenetik mekanizmalar

APOE, A β 42 klerensini düzenler ve dolayısıyla geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı (LOAD) için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilir (Raber vd., 2004). APOE'nin klasik olmayan (az sayıda CpG-adası içeren) bir promotörü vardır ve dolayısıyla düzenlenmesi karmaşıktır. APOE haplotiplerinden ϵ 2-4'ün LOAD riski ile farklı şekilde korele olduğu gösterilmiştir (Wang vd., 2008). LOAD açısından APOE4, APOE3'ten daha fazla risk taşır, ancak tüm APOE4 taşıyıcıları LOAD geliştirmez ve birçok LOAD hastası APOE4 taşıyıcısı değildir. Ayrıca, otopsi çalışmalarında Lewy cisimcikli demans ve AH hastalarının frontal lobunda 2 APOE CpG alt bölgesinin önemli hipometilasyonu tespit edilmiştir (Tulloch vd., 2018a; 2018b). Bu çalışmalar, APOE promotörünün metilasyonunun LOAD'ın epigenetik bir regülatörü olarak rol oynadığını göstermektedir.

AH transgenik fare ve insan beyinlerinde, histon asetilasyon seviyelerinin belirgin derecede düşük olduğu bildirilmiştir (Francis vd., 2009; Zhang vd., 2012). AH transgenik farelerde HDAC2'nin indüklendiği ve HDAC2'ye spesifik inhibitör suberoilanilid hidroksamik asit (SAHA) ile tedavinin öğrenmeyi ve hafızayı geliştirdiği gösterilmiştir (Graff vd., 2012). Başka bir HDAC inhibitörü olan sodyum 4-fenilbutirat (4-PBA) ile tedavinin, transgenik AH farelerinde fosforile tau yumaklarının sayısını azalttığı ve bilişsel işlevi arttırdığı bildirilmiştir (Ricobaraza vd., 2009). Ayrıca, HDAC6 knockout farelerde, amiloid patolojisi ile ilişkili A β 42 ile indüklenen mitokondriyal bozukluklara karşı koruma ve artmış öğrenme ve bellek gösterilmiştir (Govindarajan vd., 2013).

AH ile ilişkili olarak tanımlanmış miRNA'ların çoğu APP'nin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Biyoinformatik analizlerle birkaç APP 3'kodlanmayan alan (3'UTR) miRNA bağlanma bölgesi ortaya çıkarılmıştır. miR-16 ve -101'in APP'yi hedeflediği ve hem PC12 hücrelerinde hem de hipokampal nöronlarda A β kaynaklı sitotoksiteyi azalttığı gösterilmiştir (Vilardo vd., 2010; Barbato vd., 2014; Zhang vd., 2015). Birkaç başka çalışmada da, miRNA'ların APP düzenlemesindeki rolü hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak tanımlanmıştır. Örneğin, miR-29 ailesinin (miR-29a, -29b, -29c) AH beyinlerinde downregüle olduğu ve insan ve fare hücre hatlarında APP işleyicisi BACE1'in 3'-UTR'sini hedeflediği gösterilmiştir (Hebert vd., 2008; Zong vd., 2011; Yang vd., 2015). APP / PS1

farelerde, hipokampusta miR-135, -200b ve -429'da azalma gözlenmiştir. miR-135'in BACE1'i hedefler ve azaltırken, miR-200b ve -429'un APP'yi hedeflediği ve APP ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Liu vd., 2014). Ayrıca miR-124 de BACE1'in negatif düzenleyicisidir ve APP / PS1 farelerinin dentat girusunda miR-124 lentiviral aşırı ekspresyonu apoptotik ve otofajik belirteçleri azaltmış ve bilişsel bozuklukları iyileştirmiştir (Du vd., 2017). MiR-132 downregülasyonu, en anlamlı olarak geç evre AH hastalarında tau hiperfosforilasyonunu gösteren nöronlarda gözlenmiştir (Lau vd., 2013; Zhu vd., 2016). Ayrıca miR-132 downregülasyonunun AH'li hastalarda bilişsel düşüş ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Smith vd., 2015).

Biyoinformatik çalışmalar, AH'de lncRNA'ların rollerini aydınlatmaya başlamıştır. Otopsi örneklerinde yüzlerce lncRNA ekspresyonu, AH hastalarında aynı yaştaki kontrollere göre hipokampus, orta temporal girus, entorhinal korteks ve korteks gibi beynin AH ile ilişkili bölgelerinde önemli ölçüde değişmiştir. Protein ubiquitinasyonu, amiloid-klirensi, sinirsel iletişim, elektron taşıma zinciri, metabolik süreçler ve kolesterol homeostazında yer alan mRNA'lar ile ilişkili lncRNA'ların önemli ölçüde değiştiği tespit edilmiştir (Wu vd., 2019).

NFT örnekleri incelendiğinde, nöral tüp ve nöral krest gelişimi ve morfogenezi ile ilişkili lncRNA'ların önemli ölçüde değiştiği saptanmıştır (Wang vd., 2017). Bu biyoinformatik çalışmalarda, birkaç lncRNA'nın AH patolojisinde rol oynadığı öne sürülmüş olsa da, son çalışmalarda *nükleer paraspeckle assembly transcript 1* (NEAT1) AH ilerlemesinde anahtar bir lncRNA olarak tanımlanmıştır (Wu vd., 2019). APP^{swe} / PS1^{dE9} farelerinin hipokampal dokusunda NEAT1'in down regülasyonu, hastalığın ilerlemesinin erken evresinde gözlenmiştir. Düşük NEAT1 seviyelerinin, endositozla ilişkili genlerin ekspresyonunu inhibe ederek A β 'nin klerensini önlediği gösterilmiştir (Wang vd., 2019).

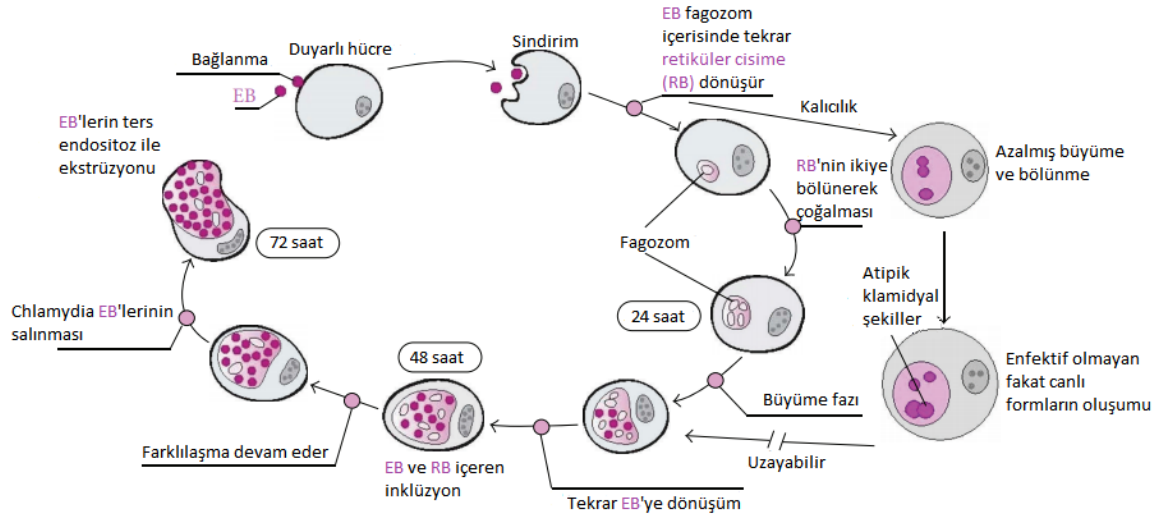
Alternatif olarak, fare beyin dokusu veya nöroblastoma hücreleri ile gerçekleştirilen AH'nin *in vitro* modellerinde NEAT1'in up regülasyonu bildirilmiştir. NEAT1'in yıkılmasının A β kaynaklı toksisiteyi, apoptozu ve fosforile tau'nun üretimini azalttığı, ayrıca NEAT1'in miR-107 ve miR-124'ü azalttığı, böylece BACE1'i arttırdığı gösterilmiştir (Ke vd., 2019).

2.2. *Chlamydia pneumoniae*

2.2.1. *Chlamydia pneumoniae*'nin yaşam döngüsü

Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae (Cpn), yaygın insan solunum yolu enfeksiyonuna neden olan zorunlu hücre içi gram-negatif patojendir. İlginç olarak, *Chlamydia* enfeksiyonlarının kronikleşmeye meyilli olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir ve bu veriler enfeksiyonların sadece kalıcı solunum yolu hastalıkları açısından değil, aynı zamanda kan damarı inflamasyonundan kaynaklanan ateroskleroz gibi hastalıklar ile ilişkili olması açısından da klinik olarak önemlidir (Uruma vd., 2005). Ateroskleroza ek olarak, koroner kalp hastalığı ve hiperlipidemi ile ilişkili bulunmuş (Zheng vd., 2015), ayrıca ağız boşluğunda saptanmış ve çürük, periodontit, endodontit ve tonsillite sebep olduğu gösterilmiştir (Wolf ve Fields, 2013).

Diğer *Chlamydia* türleri gibi, *C. pneumoniae* de işlevsel ve morfolojik açıdan düzenli bir değişime uğrayan iki biçime sahip, eşsiz bir bifazik yaşam döngüsüne sahiptir: hedef ana hücreye bağlanmayı ve bulaşmayı teşvik eden enfeksiyöz ve metabolik olarak etkisiz elementer cisim; ve bulaşıcı olmayan ve metabolik olarak aktif, ikiye bölünerek çoğalan ve daha sonra elementer cisim şeklinde yeniden organize edilerek hücre lizisi aracılığıyla salınan intrasellüler form olan retikülat. *Chlamydia*'nın hücreiçi yaşam döngüsü, ökaryotik konak hücreye bağlıdır ve elementer cisimlerin hücre yüzeyine bağlanmasıyla başlar. Elementer cisimler daha sonra, retikülatların farklılaşması ve replikasyonunun gerçekleştiği inklüzyon adı verilen membrana bağlı bir vezikül içine alınır. Inklüzyon membranı bakteri tarafından retikülatların replikasyonu ve besin alımı için hücreiçi bir cep oluşturacak şekilde modifiye edilir. Birkaç replikasyon döngüsünden sonra, retikülatlar eşzamansız olarak tekrar elementer cisimlere farklılaşırlar. Enfeksiyondan sonraki yaklaşık olarak 48 ve 72 saat arasında elementer cisimler yeni hücreleri istila etmek için lizis veya ekstrüzyon yoluyla konakçı hücreden çıkarlar. Genel olarak, bu anormal gelişme basamakları, uzun süreler boyunca enfekte hücreler içinde yaşayan ancak kültürü yapılamayan *Chlamydiae* varlığı ile sonuçlanır (Yucesan ve Sriram, 2001) (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. *Chlamydia* türlerinin yaşam döngüsü (Stephens vd., 2011).

2.2.2. *Chlamydia pneumoniae* enfeksiyonunun patolojik etkileri

Chlamydia pneumoniae, çok çeşitli pulmoner hastalıklara neden olmaktadır. Bu pulmoner hastalıklar genellikle hafif ve atipik karakterde olduğu için bakterinin bu hastalıklara olan katkısı genellikle görmezden gelinmektedir. Buna ek olarak, *C. pneumoniae* kalıcı enfeksiyonlara neden olabilir ve astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve akciğer kanseri dahil olmak üzere diğer ciddi solunum yolu hastalıklarında alt faktör olarak rol oynar ve ateroskleroz, Alzheimer hastalığı ve multipl skleroz gibi diğer patolojilerde de rol oynadığından şüphelenilmektedir (Uruma vd., 2005).

Chlamydia türleri, enfeksiyon sırasında hem doğal hem de adaptif bağışıklık cevabını uyarırlar. *Chlamydia*'nın ana yüzey antijeni olan LPS, hem TLR'leri hem de nod-benzeri reseptörleri (NLR) içeren patern tanıma reseptörleri (PRR) tarafından tanınır ve proinflamatuvar aracılardan ekspresyonunu upregüle ederler. Çalışmalar, MyD88 yoluyla TLR2 ve TLR4 sinyallerinin enfeksiyon sırasında aktive olduğunu ve IL-6 ve IL-1 β gibi erken sitokin ve kemokin üretimini indüklediğini göstermiştir (Quayle, 2002; Sellami vd., 2014). Bu kemokinler daha sonra nötrofiller, makrofajlar, dendritik hücreler ve doğal öldürücü hücreler gibi daha fazla bağışıklık hücresi toplarlar ve bu da bakteri temizliğine yardımcı olmak için daha fazla proinflamatuvar sitokin salgılanmasıyla sonuçlanır.

(Rasmussen vd., 1997). Bununla birlikte, bağışıklık sistemi bakterileri ortadan kaldıramadığında sitokinlerin salınımı, kronik inflamasyona veya doku hasarına neden olabilir. Bu nedenle, bakterileri temizlemek ve kronik inflamasyon nedeniyle oluşan hasarı en aza indirmek için doğal bağışıklık cevabını daha başarılı şekilde aktive edecek metotların geliştirilmesi önemlidir.

2.2.3. *Chlamydia pneumoniae* enfeksiyonunun epigenetik faktörler ile ilişkisi

Santral sinir sistemi hastalıklarının poligenik ve kompleks bozukluklar olduğu ve %80'den fazlasının patojenezine insan genomunda yer alan pek çok gendeki kusurların sebep olduğu bilinmektedir. Bu patojenik varyantların çeşitli çevresel faktörlerle ve epigenetik olaylarla etkileşimi, santral sinir sistemi hastalıklarının fenotipik ifadesiyle sonuçlanır (Cacabelos, 2016). Epigenetik, yapısal DNA'da belirgin değişiklikler olmadan fenotipik değişikliklerin bir nesilden diğerine iletildiği bir moleküler fenomendir. Epigenetik mekanizmalar olan DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve miRNA'ların düzenlenmesi, metabolik yolların moleküler seviyede kontrol edilmesinden sorumlu başlıca düzenleyici unsurlar arasındadır. Epigenetik modifikasyonlar transkripsiyonel olarak gen ifadesini düzenlerken, miRNA'lar çoğunlukla transkripsiyonel olarak gen ekspresyonunu baskılamaktadır (Szulwach ve Jin, 2014). DNA'nın hem hipermetilasyonu hem de hipometilasyonu, kromatin değişiklikleri ve miRNA düzensizlikleri, santral sinir sistemi bozukluklarında yaygındır ve bu bozukluklar nöronal mikroçevredeki epigenetik anormalliklerden kaynaklanmaktadır (Rodrigues vd., 2014; Zhao vd., 2013). SET alan proteinlerini kodlayan genlere *Chlamydiaceae* ailesini de içeren bazı ökaryotik olmayan organizmalarda rastlanmıştır. SET alan proteinlerinin işlevi, S-adenozil-L-metiyonin üzerindeki bir metil grubunu, histon üzerindeki ya da başka bir protein üzerindeki bir lizin ya da arjinin kalıntısına transfer ederek metillenmiş lizin veya arjinin rezidüsü ve yan ürün olan S-adenozil-L-homosistein kofaktörünü oluşturmaktır.

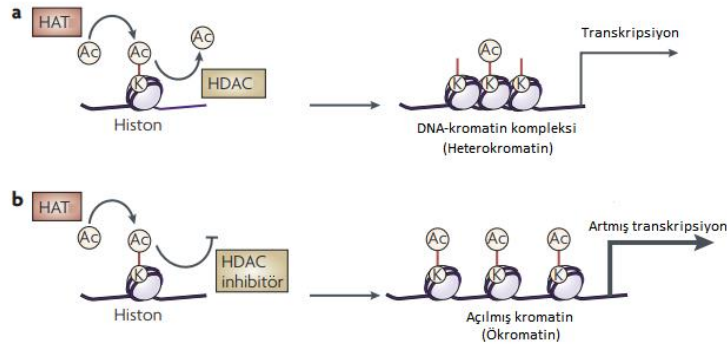
Spesifik histon lizin ve arjinin kalıntılarının metillenmesi, kromatin organizasyonunu yönlendiren belirli komplekslerin toplanması için "belirteçler" olarak görev yaparak genlerin sentezlenmesini kontrol eden bir post-translasyonel epigenetik modifikasyon olarak işlev görür (Dillon vd., 2005). Korunmuş *C. pneumoniae* katalitik SET alanları, beklenildiği üzere

murin histon H3'ü üzerine bir metil grubunu transfer ederek protein metiltransferaz olarak işlev görmektedir (Murata vd., 2007). Histon metilasyonu, kromatin yapısını değiştiren bir mekanizma olarak, uzun süreli anıların ve öğrenmenin oluşması için önemli olduğu bilinen nöronal yolların uyarılması ile ilişkilidir. Hayvan modelleri, metilasyon ve diğer epigenetik düzenleme mekanizmalarının yaşlanma, nörodejeneratif hastalıklar ve zihinsel engellilik koşullarıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (Kramer, 2013).

2.3. Epigenetik Mekanizmalar Üzerine Etkili İlaçlar

2.3.1. HDAC inhibitörleri

Öğrenme ve hafıza ile ilişkili olaylar, çeşitli faktörler ve yollardan oluşan bir ağ arasındaki karmaşık koordinasyonu içerir. Uzun süreli bellek ve sinaptik plastisite, gen ekspresyonunun erken indüksiyon fazlarının ötesindeki aktivasyonlara bağlıdır, bu da epigenetik etkileşim için geniş bir potansiyel sunar (Pittenger ve Kandel, 2003). **Şekil 2.7.**'de histon deasetilaz enzimleri (HDAC) ve HDAC inhibitörlerinin (HDACi) aracılık ettiği transkripsiyonel olaylar görülmektedir.

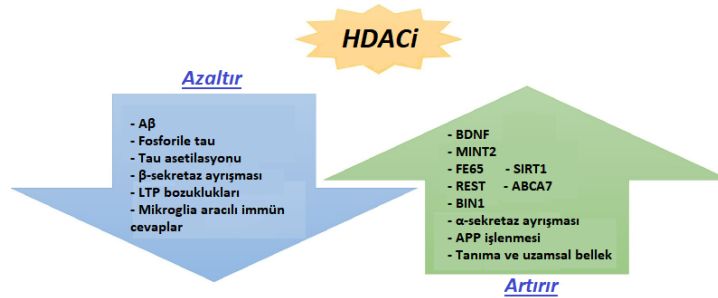


Şekil 2.7. HDAC inhibitörlerinin kromatin yeniden şekillenmesi ve transkripsiyon üzerindeki etkisi (Kazantsev ve Thompson, 2008). (a) Spesifik lizin (K) rezidülerindeki histon asetilasyon seviyeleri, HAT'ler ve HDAC'ler aracılığıyla gerçekleşen eş zamanlı asetilasyon (Ac) ve deasetilasyon reaksiyonları ile belirlenir. Bu histon asetilasyonu, DNA-kromatin komplekslerinin konformasyonel yapısının değiştirilmesi ve daha sonra transkripsiyonel gen ekspresyonunun gerçekleştirilmesi için oldukça önemlidir. (b) HDAC inhibitörleri, deasetilasyon reaksiyonunu bloke ederek, kromatini modifiye eder ve konformasyonunu değiştirerek histon asetilasyon seviyelerinin dengesini değiştirir, histon asetilasyonunun artması da transkripsiyon artışına yol açar.

Şekil 2.7.'de görülen histon asetil transferaz enzimleri (HAT) aracılığıyla gerçekleşen histon asetilasyonu ve histon deasetilaz enzimleri tarafından gerçekleştirilen (HDAC) tamamlayıcısı histon deasetilasyonu, korku koşullanması ve uzamsal hafıza egzersizleriyle gözlemlenebilen uzun vadeli potansiyalizasyon (LTP) ve hafıza oluşumunda önemli bir rol oynadığı belirlenen birçok epigenetik mekanizmadan biridir (Francis vd., 2009).

İnsan HDAC'leri dizi homolojilerine göre dört sınıfa ayrılmıştır. HDAC 1, 2, 3, ve 8 Sınıf I'de; HDAC 4, 5, 7 ve 9 Sınıf IIa'da; HDAC 6 ve 10 Sınıf IIb'de; SIRT 1—7 Sınıf III'te yer alır (Seto ve Yoshida, 2014). Sınıf I, II ve IV'te yer alan enzimler çinko-bağımlı HDAC enzimleridir. Sınıf III'te yer alan sirtuinler ise nikotinamid adenin dinükleotid (NAD)-bağımlı enzimlerdir ve yapıları diğer sınıflardan farklıdır (Li ve Sun, 2019). HDAC enzimleri, histonlar dışında histon-olmayan proteinleri de deasetile ederler (Glozak vd., 2005; Singh vd., 2010) ve başka deasetilasyon reaksiyonlarını da katalize edebilirler (Du vd., 2011; Madsen ve Olsen, 2012; Howitz, 2015). Buna ek olarak, enzimden bağımsız fonksiyonları da vardır (Ma ve D'Mello, 2011; Sun vd., 2013; Lewandowski vd., 2015; Fujino vd., 2018).

Nörodejenerasyon çalışmalarında kullanılan hayvan modellerinin beyinlerinde histon deasetilasyonunun sıklıkla değiştiği gösterilmiştir. HDAC proteinleri histon asetilasyon seviyesini düzenleyerek AH patolojisinde yer alan hafıza ve kavrama ile ilişkili bazı önemli genlerin ekspresyonunu değiştirebilmektedir (**Şekil 2.8.**) (Xu vd., 2011; Esposito ve Sherr, 2019).

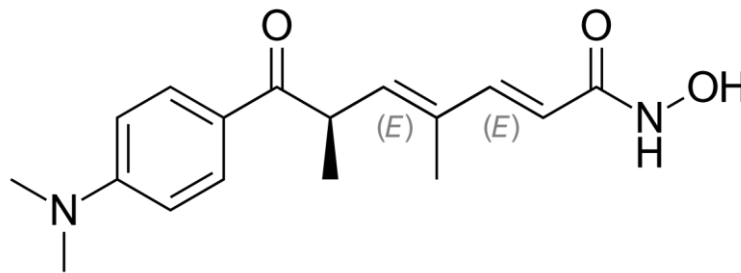


Şekil 2.8. AH fare modellerinde ve post-mortem hipokampal analizlerde şimdiye kadar gözlemlenen HDAC inhibitörleri ile elde edilmiş nöropatolojileri iyileştirebilecek umut verici tedavi sonuçları (Esposito ve Sherr, 2019).

HDACi, ilk olarak kanser tedavisinde potansiyel taşıyan küçük moleküllü terapötikler olarak keşfedilmiştir. Bozulmuş bir asetilasyon profili ve değişen HDAC ekspresyonu çeşitli kanser tipleriyle ilişkili olduğundan, HDACi ile HDAC'lerin hedeflenmesi kanserde etkili olabilecek bir tedavi yöntemi olarak tanımlanmıştır. HDACi'nin histonun ve bazı histon olmayan proteinlerin anormal asetilasyon profilini ve birkaç onkogen ve tümör baskılayıcı genin işlevini düzenleyebildiği ve ayrıca kanser hücrelerinin hücre döngüsünün durdurulmasına, apoptoza, bağışıklık tepkisinin modülasyonuna ve anjiyogenezin inhibisyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Li ve Seto, 2016; Eckschlager vd., 2017; Damaskos vd., 2017). Özellikle, HDAC'ler, genellikle normal hücrelerde görülmeyen kanser hücrelerinin büyümesi ve hayatta kalmasıyla ilişkili anahtar genlerin çalışması için gerekli olduğundan, HDAC'lerin HDACi ile hedeflenmesi, kanser hücrelerinde ek terapötik etkinlik sağlamaktadır. Kimyasal yapılarına dayanarak, HDACi'ler hidroksamatlar, kısa zincirli yağ asitleri, benzamidler, siklik tetrapeptitler ve sirtuin inhibitörleri olarak bilinen hidroksamik asitler olarak sınıflandırılabilir (Eckschlager vd., 2017; Damaskos vd., 2017).

2.3.1.1. *Trikostatin A (TSA)*

TSA, *Streptomyces hygroscopicus* tarafından üretilen bir hidroksamik asittir (Kudo vd., 2017) (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. TSA'nın moleküler yapısı (Seo vd., 2013).

Bu bileşik, antitümör ajanların gelişimi için en umut verici hedeflerden biri olduğu gösterilmiş olan histon deasetilazın (HDAC) geri dönüşümlü bir inhibitörüdür. TSA yapısal olarak ticari adı vorinostat olan kutanöz T hücreli lenfoma (CTCL) tedavisi için onaylanmış bir molekül olan suberoilanilid hidroksamik asit (SAHA) ile benzerlik taşımaktadır. TSA,

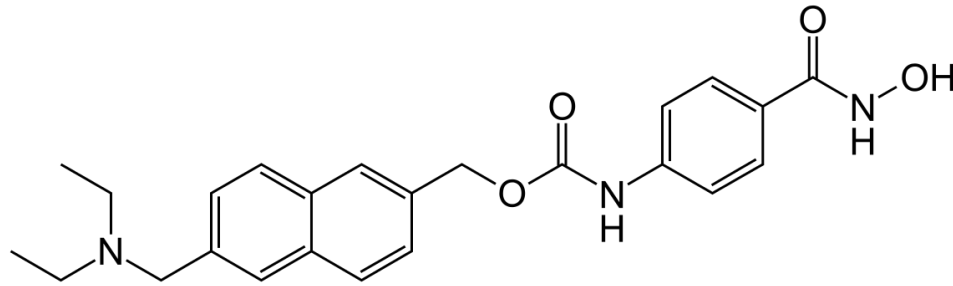
yapısındaki hidroksamik asit grubu ile HDAC'nin aktif bölgesindeki çinko ile şelat oluşturarak nanomolar konsantrasyonlarda sınıf I ve II HDAC'i geri dönüşümlü olarak inhibe ederek hücre döngüsünü G1 veya G2 fazında durdurur, farklılaşmayı tetikler ve kanser hücresine dönüşüm sırasında görülen morfolojik değişiklikleri tersine çevirir (Yeung, 2006). HDAC enzim inhibisyonu aracılığıyla histon asetilasyonu artar ve değişen kromatin konformasyonu sonucunda transkripsiyon faktörleriyle etkileşimi artıran promotör lokuslar açılarak pek çok genin ekspresyonunda artışa sebep olur (Hebbel vd., 2010). Yapılan çalışmalarda TSA'nın yetişkin fareler için toksik olmadığı ve farelerin embriyonik veya doğum sonrası gelişimini bozmadığı gösterilmiştir (Vanhaecke vd., 2004). *In vitro* çalışmalarda, TSA'nın özellikle hücre döngüsü, büyüme ve apoptozla ilgili genleri inhibe etmesi daha çok kanser tedavisi için düşünülmesine neden olmuştur. Ancak bu genlere ek olarak, inflamasyon modellerinde IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve mediyatörlerinin ekspresyonunu da inhibe etmektedir (Hebbel vd., 2010).

Kanser tedavisindeki olumlu etkilerinin yanı sıra, günümüze kadar TSA'nın nörit gelişimini indükleyici ve nöroprotektif etkilerini gösteren pek çok çalışma yapılmıştır (Hall vd., 2002; Jeonga vd., 2003; Hao vd., 2004; Saha ve Pahan, 2006; Yamauchi vd., 2007; Schwechter vd., 2007; Xu vd., 2007; Kim vd., 2007; Hasan vd., 2013) . HDAC'ler beyinde oldukça fazla miktarda ifade edilirken, beyin fonksiyonundaki rolleri hakkında çok az şey bilinmektedir. Kanıtlar, bu enzimlerin nöronal sağkalımı ve nörodejenerasyonu düzenlediğini göstermektedir (D'Mello, 2009). Nöronal sağkalımda HDAC1 ve HDAC2 önemli rollere sahiptir ve dahası HDAC2'nin nöronal hücre farklılaşması sürecine dahil olduğu bilinmektedir (Bai vd., 2005). Nöropatolojik süreçlerde histon asetilasyon homeostazisinin bozulduğu (Hahnen vd., 2008) ve nörodejeneratif süreçlerde HAT aktivitesindeki genel düşüş kaynaklı aşırı histon deasetilasyonu aktivitesinin rol oynadığı gösterilmiştir (Rouaux vd., 2003; Jin vd., 2011). TSA tedavisi ile indüklenen kortikal nöronal büyüme ve nörojenez, hücre dışı sinyallerle düzenlenen kinaz (ERK) yolağının (Hao vd., 2004) yanı sıra, c-Jun N-terminal kinaz (JNK) yolağı aktivasyonu (Yamauchi vd., 2007) ve glikojen sentaz kinaz 3'ün (GSK3) düzenlenmesi (Hall vd., 2002) aracılık etmektedir. Ayrıca nörit gelişimi markerlarından biri olan *growth associated protein-43* (GAP-43) geninin ekspresyonunu artırarak nörit gelişimini indüklediği ve ayrıca bu etkiye spesifik olarak bir

transkripsiyon ko-aktivatör ailesi olan *CREB bağlayıcı protein* (CBP)/P300 ve P300 / CBP ile ilişkili faktör (P/CAF) genlerinin asetilasyonunun aracılık ettiği gösterilmiştir (Gaub vd., 2010).

2.3.1.2. Givinostat (ITF2357)

Givinostat, aromatik halkaya bağlı bir hidroksamik asit grubu içeren ve yapıca SAHA ve TSA'ya benzeyen sentetik bir HDAC1 ve HDAC2 inhibitörüdür (Şekil 2.10.).



Şekil 2.10. Givinostat'ın moleküler yapısı (Leoni vd., 2005).

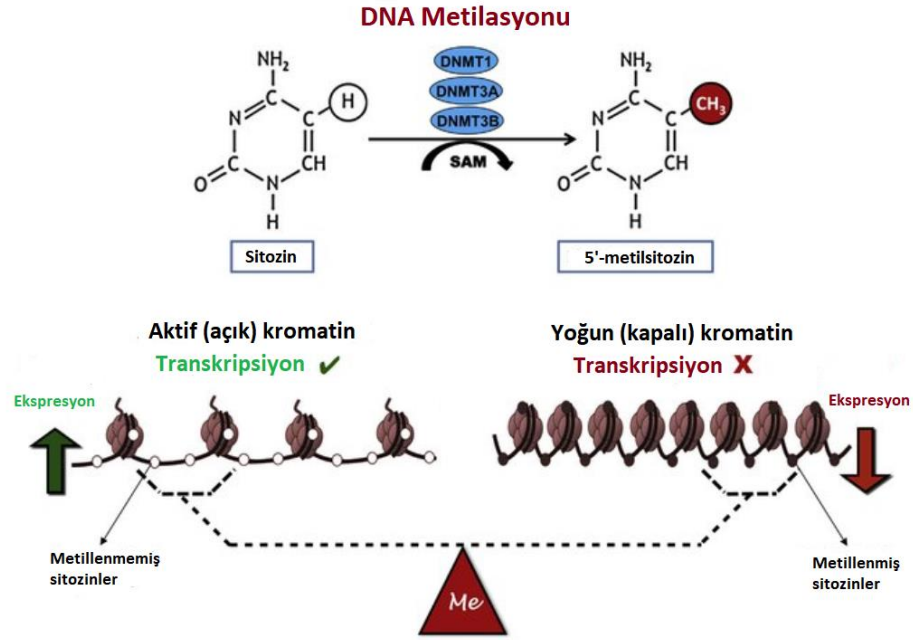
Givinostat oral olarak kullanılabilir ve güçlü antiinflamatuvar etkileri *in vivo* ve *in vitro* yöntemlerle gösterilmiştir (Shein vd., 2009). Givinostatın, LPS ile aktive edilmiş insan periferik kan mononükleer hücrelerinde, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β ve IFN- γ salınımını 10-25 nM konsantrasyon aralığında azalttığı gösterilmiştir. IL-12 ve IL-18 ile kombine halde kullanıldığında, azalmış IL-1 β veya TNF- α 'dan bağımsız olarak interferon- γ (IFN- γ) ve IL-6 üretimini 12.5-25 nM konsantrasyonda azaltmaktadır (Leoni vd., 2005). Sistemik başlangıçlı juvenil idiyopatik artriti olan çocuklarda faz II klinik çalışma safhasındadır ve ağrılı eklem sayısını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Bu ajan insanlarda güvenli olarak kullanılabilir, günlük 1.5 mg / kg oral dozu iyi tolere edilmektedir ve organ toksisitesi göstermemektedir (Vojinovic vd., 2008).

Givinostat antiinflamatuvar etkisinin yanı sıra, güçlü antineoplastik aktiviteye de sahiptir. Çeşitli multipl miyelom hücre hatlarında (RPMI8226, NCI-H929, JJN3, KMS 11, KMS 12, KMS 18 ve KMS 20) ve akut miyelojenöz lösemi hücre dizilerinde (HL-60, THP-1, U937, KASUMI, KG-1 ve TF-1), 200 nM IC₅₀ konsantrasyonunda sitotoksiktir. İçsel

apoptotik yolu aktive eder ve p21'i upregüle, Bcl-2 ve Mcl-1'i ise downregüle eder. Mezenkimal stromal hücrelerde, IL-6, VEGF ve IFN- γ üretimini %80-95 oranında inhibe eder (Golay vd., 2007). İnflamatuvar koşullarda pankreastaki β -hücresi sağkalımını destekler. 25 ve 250 nM konsantrasyonlarda pankreas adacık hücresi canlılığını ve insülin sekresyonunu artırır, makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-la ve MIP-2 salınımını inhibe eder, nitrik oksit (NO) üretimi ve apoptoz oranlarını azaltır (Lewis vd., 2011). Bunlara ek olarak, kapalı kafa travması fare modelinde, givinostatın 10 mg / kg konsantrasyonda nörodavranışsal iyileşmeyi artırdığı, nöronal dejenerasyonu ve lezyon hacmini azalttığı ve glial apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Shein vd., 2009).

2.3.2. DNA metiltransferaz (DNMT) inhibitörleri

HDACi'nin yanı sıra, epigenetik tedavide kullanılan en klasik iki ilaç sınıfından diğeri de DNMT inhibitörleridir (DNMTi). Memeli DNMT ailesi dört aktif enzim içerir: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L, ayrıca RNA metilasyonu yapan DNMT2 (Dan vd., 2019). DNMT1, replikasyon sırasında DNA metilasyon şablonlarının yeni sentezlenen DNA'ya kopyalanmasından sorumlu metiltransferazdır. DNMT3, *de novo* metiltransferaz olarak işlev gören ve erken gelişim sırasında DNA metilasyon düzenleri oluşturan DNMT3A ve DNMT3B olmak üzere iki proteinden oluşur. DNMT3L, DNMT3'lerle homologdur ancak katalitik aktiviteye sahip değildir (Subramaniam vd., 2014). DNMT enzimleri, DNA üzerindeki CpG adalarında yer alan sitozinlere bir metil grubunun sisteinden aktarılmasını sağlayarak 5-metilsitozin (5mC) oluşumunu katalize eder ve sonuçta gen ekspresyonunu baskırlar (**Şekil 2.11.**) (Da Costa vd., 2017).



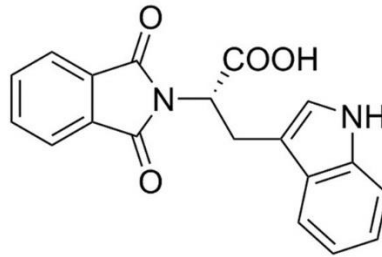
Şekil 2.11. DNA metilasyonu, gen transkripsiyonu ve kromatin yapısı arasındaki etkileşim (Agrawal vd., 2018).

DNMTi, nükleozid ve nükleozid olmayan şeklinde iki sınıfa ayrılan sitidin analoglarından oluşur. Nükleozid analogları, DNA'ya doğrudan bağlanır ve DNMT'nin bozulmasını indükleyen bir kovalent kompleks oluşturur (Dan vd., 2019). Nükleozid olmayan DNMTi ise, doğrudan DNMT'nin metillenmiş bölgesine bağlanarak etki gösterirler (Brueckner vd., 2005). CpG adalarındaki DNA hipermetilasyon olaylarına bağlı olarak epigenomun modifikasyonlarının sıklıkla hücre döngüsü regülasyonu, tümör hücresi istilası, DNA onarımı ve maligniteyi baskılayan diğer kritik büyüme düzenleyicileri ile ilişkili genlerin transkripsiyonel susturulmasını sağladığı göstermiştir (Subramaniam vd., 2014). Sonuç olarak, DNA metilasyonunun kanser etiolojisindeki önemli rolü nedeniyle, DNA metilasyonunun düzenlenmesinde yer alan başlıca enzimler olan DNMT'leri hedefleyen etkili terapötik seçeneklere ihtiyaç duyulması sonucunda çeşitli DNMTi'leri geliştirilmiştir. Nükleotid DNMTi'lerinin ilk jenerasyon üyeleri olan desitabin ve azasitidindi, *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) ve *European Medicines Agency* (EMA) tarafından akut miyeloid lösemi (AML), kronik miyelomonositik lösemi (CMML) ve miyelodisplastik sendromların (MDS) tedavisi için onaylanmıştır (Kaminskas vd., 2005; Steensma vd., 2009; Erdmann vd., 2015). Bu ilaçların neden olduğu ciddi sitotoksite nedeniyle, nükleozid-

olmayan bu nedenle sitotoksik etkisi daha düşük prokainamid, SGI-110 ve kinazolin, propiofenon, pirolpiridin türevleri ve diğer benzeri ilaçlar geliştirilmeye çalışılmaktadır (Dan vd., 2019).

2.3.2.1. RG108

Nükleozid olmayan DNMTi'lerinden biri olan RG108 (2-(1,3-dioksoizindolin-2-il)-3-(1H-indol-3-il) propanoik asit ya da N-fitalil-L-triptofan), DNMT1'in aktif bölgesini hedefleyerek *in silico* ortamda tasarlanmış küçük molekül, sentetik bir bileşiktir (Şekil 2.12.) (Brueckner vd., 2005).



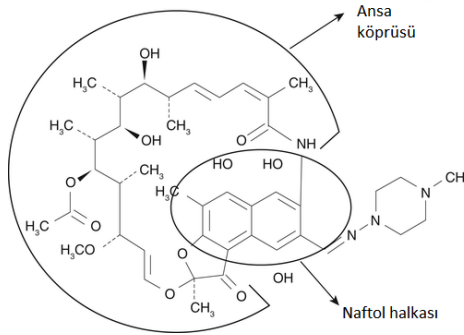
Şekil 2.12. RG108'in moleküler yapısı (Brueckner vd., 2005).

Birkaç tümör baskılayıcı geni yeniden aktive etme yeteneği, RG108'i epigenetik modülasyon terapileri için iyi bir aday yapmaktadır. Buna ek olarak, 5-azasitidin, 5-aza-2'-deoksisitidin, zebularin, prokain ve epigallokateşin-3-gallat gibi diğer DNMTi'nin aksine sitotoksik veya genotoksik etkiye sahip olmaması RG108'in potansiyelini artırmaktadır (Brueckner vd., 2005; Stresemann vd., 2006). Günümüze kadar yapılan bazı araştırmalar, RG108'in kolon kanseri, lösemi, prostat, oral skuamöz karsinom, meme ve endometriyal kanser hücreleri üzerinde iyi bir demetilasyon etkisine sahip olduğunu göstermiştir (Brueckner vd., 2005; Wang vd., 2013; Graça vd., 2014; Borges vd., 2014; Yang vd., 2017). Ayrıca çeşitli araştırmalar, RG108'i kanserin yanı sıra fizyolojik koşullarla ilgili mekanizmaları incelemek için kullanmıştır (Xu vd., 2013; Meadows vd., 2015; Oh vd., 2015;

Kaya-Tilki vd., 2016; Sales vd., 2016; Stenzig vd., 2016; Dikmen, 2017; Assis vd., 2018; Liu vd., 2020). Bu çalışmalar arasında en dikkat çekici olanı, 2015 yılında Oh ve arkadaşları tarafından insan kemik iliği mezenkimal stromal hücreler üzerinde yapılmış ve RG108'in, değişen metilasyon düzenini eski haline getirerek yaşlanma ile ilgili hastalıkların tedavisinde faydalı etkinlik sağlayabileceği bildirilmiştir (Oh vd., 2015). İzlem çalışmasında, nörodejeneratif bir hastalık olan amiotrofik lateral sklerozda bulunan aşırı DNMT ifadesinin getirdiği yaşlanma fenotipinin RG108 tarafından kontrol edilebildiği gösterilmiştir (Oh vd., 2016). Nöronal farklılaşma sırasında DNMT1 ve DNMT3a enzim seviyelerinin oldukça azaldığı (Bai vd., 2005) ve RG108'in nörit gelişimini indükleyici etkisi olduğu (Kaya-Tilki vd., 2016; Dikmen, 2017) bilinmektedir. Bütün bu bilgiler ışığında, RG108'in AH'da terapötik potansiyele sahip olabileceği düşünülmektedir.

2.4. Rifampin ve Alzheimer Hastalığı

Rifampin (veya rifampisin), rifamisin grubunda yer alan ve bir dizi bakteriyel enfeksiyonu tedavi etmek için kullanılan DNA-bağımlı RNA polimeraz inhibitörü bir antibiyotiktir. 1971 yılında, tüberküloz ve *Neisseria meningitides*'in asemptomatik taşıyıcısı olan hastaların tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır (Forrest ve Tamura, 2010). Geniş spektrumlu bir antibiyotiktir ve *Nocardia mediterranei*'nin fermantasyon ürünlerine aittir. Rifampin, ilacın kan beyin bariyerinden beyin parankimine taşınmasından sorumlu olan lipofilik alifatik ansa zincirinden uzanan bir nafto-hidrokinon kromoforundan oluşur (Şekil 2.13.) (Yulug vd. 2018).



Şekil 2.13. Rifampin'in moleküler yapısı (Yulug vd., 2018).

Hızlı çoğalan veya dormant durumda, hem hücre içinde hem de hücre dışındaki mikobakteriler üzerinde etkilidir. *Mycobacterium tuberculosis* başta olmak üzere, *Mycobacterium leprae*, gram pozitif ve gram negatif kokuslara, koliform basillere ve klamidya grubu mikroorganizmalara karşı da etkilidir (Lee vd., 2017). Geleneksel anti-infeksiyöz etkisinin ötesinde, rifampinin önemli nöroprotektif etkileri Parkinson hastalığı ve çok sistemli atrofi dahil olmak üzere çeşitli nörodejeneratif hastalıklar üzerine yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Nöroprotektif etki mekanizması, çeşitli sitoprotektif şaperon ve anti-apoptotik protein (Bcl-2 gibi) aracılı mitokondriyal ve endoplazmik retiküler stresle ilişkili olan artmış dopaminerjik hücre sağkalımını, azalmış alfa sinüklein toksisitesini ve dopaminerjik bir nörotoksin olan 1-metil-4-fenilpiridinyum (MPP+) ile indüklenen apoptozu içermektedir (Li vd., 2004; Xu vd., 2007; Ubhi vd., 2008; Bi vd., 2011; Low vd., 2014; Lin vd., 2017). Ayrıca, artan kanıtlar rifampinin serbest radikal hasarını hafifleterek ve nöroinflamasyonu azaltarak önemli nöroprotektif etkiye sebep olduğunu göstermektedir (Kilic vd., 2004). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, rifampinin, Parkinson hastalığındaki potansiyel anti-inflamatuvar rolünü destekleyen nükleer NFκB'yi baskılayarak TLR2 ve MAPK seviyelerini azaltabildiği bildirilmiştir (Bi vd., 2011; Kim vd., 2009; Bi vd., 2013). Bunlara ek olarak, rifampinin AH patogeneziyle ilişkili nöroprotektif etki mekanizmaları serbest oksijen radikalleri, tau ve Aβ protein birikimi, mikrogliya aktivasyonu ve apoptotik kaskadlar üzerinde inhibitör aktivite, ve ayrıca LRP1 ve P-glikoprotein yoluyla beyindeki Aβ klerensi üzerinde uyarıcı etki olarak tanımlanmıştır (Yulug vd., 2018).

3. GEREÇLER

3.1. Hücre Hatları

3.1.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı

SH-SY5Y hücreleri, genellikle dopaminerjik nöronlara farklılaşabilme benzerliğinden ötürü Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıklarla ilişkili çalışmalarda nöronal hücre modeli olarak kullanılan kemik iliği kökenli insan nöroblastoma hücre hattıdır. SH-SY5Y hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC, CRL-1721.1)'dan temin edilmiştir

3.1.2. HMC3 insan mikrogliya hücre hattı

HMC3 hücre hattı, sınırsız olarak bölünebilen ve mikrogliyal hücrelerin fonksiyonlarının biyokimyasal analizi için uygun bir sistemi temsil edebilecek homojen hücre popülasyonu niteliğindedir. HMC3 insan mikrogliya hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC, CRL-3304)'dan temin edilmiştir. Hücre hattına transforme edilmiş insan mikrogliya hücreleri, birincil mikrogliyal hücrelerin özelliklerini korumaktadır.

3.1.3. HEp-2 insan epitelyal karsinoma hücre hattı

Tez çalışmalarında kullanılan Cpn, hücre kültüründe izole edilmesi zor bir organizmadır bu nedenle insan HeLa kontaminant epitelyal karsinoma hücresi olan HEp-2 hücre hattı, American Type Culture Collection'dan temin edilerek (ATCC, CCL-23) konakçı olarak kullanılarak Cpn inokülasyonu sağlanmıştır.

3.1.4. THP-1 insan akut monositik lösemi hücre hattı

THP-1, çocukluk çağında bir akut monositik lösemi vakasının periferik kanından elde edilen ölümsüzleştirilmiş monosit benzeri bir hücre hattıdır. Gram-negatif bakterilerin hücre duvarında yer alan makromoleküler yapı olan lipopolisakkarit (LPS) ile karşılaştığında, dendritik hücreler olan makrofajlara farklılaşmaktadırlar. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda nöroinflamasyon modeli oluşturulurken THP-1 hücreleri LPS ile aktive edilmiştir (Lee vd., 2010; 2016; Madeira vd., 2014). Bu nedenle, mikrogliya hücrelerini indükleyecek doğru Cpn lizatını bulmak amacıyla halihazırda LPS ile indüklendiği bilinen THP-1 hücreleri, makrofaja farklılaştırılarak Cpn ve LPS ile indüklenmiş ve proinflamatuvar sitokin seviyeleri karşılaştırılmıştır (Lee vd., 2016). THP-1 hücre hattı, American Type Culture Collection'dan (ATCC, TIB-202) temin edilmiştir.

3.2. Kullanılan Hücre Hatları, Kimyasal Maddeler, Gereçler ve Cihazlar

3.2.1. Hücre hatları

SH-SY5Y İnsan Nöroblastoma Hücre Hattı	ATCC, CRL-2266	ABD
HMC3 İnsan Mikroglia Hücre Hattı	ATCC, CRL-3304	ABD
HEP-2 İnsan HeLa Kontaminant Karsinomu Hücre Hattı	ATCC, CCL-23	ABD
THP-1 İnsan Akut Monositik Lösemi Hücre Hattı	ATCC, TIB-202	ABD
<i>Chlamydomophila pneumoniae</i>	ATCC, 53592	ABD

3.2.2. Kimyasal maddeler ve gereçler

0.2 ml'lik PCR tüpü	Greiner Bio-One	ABD
10, 100, 1000 ve 5000 µl otomatik pipetör	Eppendorf	Kanada
10, 200, 1000 µl'lik mikropipet ucu	Greiner bio-one	ABD
12 kanallı otomatik pipet (Axygen, İngiltere),	Axygen	İngiltere
15 ve 50 ml'lik santrifüj tüpleri	Isolab	Almanya
Penisilin/Streptomisin	Gibco	ABD
Nunc cell culture treated easyflasks (75 cm ²)	Thermo Scientific	ABD
Nunc collagen I coated easyflasks (25 cm ²)	Thermo Scientific	ABD
2 ml santrifüj tüpü	Greiner bio-one	ABD
5-10 ve 25 ml'lik cam pipet	Isotherm	Türkiye
6 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakası	TPP	İsviçre
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma–Aldrich	Almanya
Fetal bovine serum (FBS)	Sigma–Aldrich	Almanya
Cedex smart slide	Roche	Almanya
Horse serum	Thermo Scientific	ABD
Filtre	Sartorius Stedim Biotech	Almanya
L-glutamin	Sigma–Aldrich	Almanya
Parafilm	Pechiney	Fransa

Eagle minimum essential medium (EMEM)	Sigma–Aldrich	Almanya
Şarjlı pipetör	Starlab	Almanya
Trypsin-EDTA 10X	Pan Biotech	Almanya
Trypan mavisi	Roche	Almanya
Kryotüp (2ml)	Greiner Bio-One	ABD
Hücre kazıyıcı	Greiner Bio-One	ABD
Phosphate buffer saline (PBS)	Invitrogen	Almanya
RG108, katalog no: S2821	Selleckchem	Almanya
Givinostat (ITF2357), katalog no: S2170	Selleckchem	Almanya
Rifampicin, katalog no: R3501	Selleckchem	Almanya
Trikostatin A, katalog no: S1045	Selleckchem	Almanya
Nerve growth factor-2.5S (NGF), katalog no: N6009	Sigma–Aldrich	Almanya
WST-1 solüsyonu	Roche	Almanya
96 kuyucuklu hücre kültür plakası	TPP	İsviçre
xCELLigence e-plate 16	Roche	Almanya
BD matrigel™	BD Biosciences	ABD
BD cytofix/cytoperm™	BD Biosciences	ABD
Kollajen tip IV, katalog no: C5533	Sigma–Aldrich	Almanya
Hoechst 33258	Sigma–Aldrich	Almanya
β-Amyloid (1-42 spesifik) rabbit mAb (D9A3A), katalog no: 14974S	Cell Signaling Technology	Hollanda
Anti-rabbit IgG (H+L), f(ab') ₂ fragment (Alexa Fluor 594 conjugate), katalog no: 8889	Cell Signaling Technology	Hollanda
Immunofluorescence application solutions kit, katalog no: 12727	Cell Signaling Technology	Hollanda
β-Amyloid (1-42), katalog no: ab9810	Sigma–Aldrich	Almanya
ROS-ID total ros detection kit, katalog no: ENZ-51011	Enzo Life Sciences	ABD

CF488A annexin V and PI apoptosis kit, katalog no: 30061	Biotium	ABD
Pathfinder chlamydia culture confirmation system, katalog no: 30701	Bio-Rad	Almanya
Corning HTS transwell-24 kuyucuklu 0.4 µM por açıklığına sahip ko-kültür plakası, katalog no: 30701	Corning	ABD

3.2.3. Cihazlar

HERAcell 150 steril CO ₂ inkübatörü	Thermo Scientific	ABD
Laminer flow kabini	Heal Force	Çin
Masaüstü soğutmalı santrifüj	Eppendorf	Almanya
Hücre sayımı için Cedex XS cihazı	Innovatis	ABD
Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader	Bio-Tek	ABD
xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP)	Roche	Almanya
Derin dondurucu buzdolabı	Altus	Türkiye
DNA-RNA çalışma kabini HEPA/UV PCR	UVP	Kanada
Hassas terazi	Ohaus	Avustralya
Inverted mikroskop	Leica	Almanya
MagNA Lyser	Roche	Almanya
MagNA Pure Compact	Roche	Almanya
Masaüstü soğutmalı santrifüj	Eppendorf	Almanya
Mikro santrifüj	Hettich	Almanya
NanoDrop 2000 Spektrofotometre	Thermo Scientific	ABD
Otoklav	Alp	Türkiye
Otomatik pipetler	Eppendorf	Almanya
PCR Thermal Cyclers (Gradient PCR)	Takara	Japonya
Sterilizatör	Nüve	Türkiye
Su banyosu	Nüve	Türkiye
C-DiGit Blot Scanner	LI-COR	ABD

Trans-blot Turbo Blotting System
Vorteks

Bio-Rad
Daihan

ABD
Güney Kore

3.3. Kullanılan Kimyasal Madde ve İlaçların Hazırlanması

3.3.1. Trikostatin A, givinostat, RG108 ve rifampin

Toz halinde satın alınan Trikostatin A, Givinostat, RG108 ve Rifampin, dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek 100 mM'lık ana stok hazırlanmış ve alikvatlanarak -85 °C'de saklanmıştır. Deney öncesinde ana stoktan gerekli seyreltme işlemleri taze besiyeri ile yapılarak kullanılmıştır.

3.3.2. Retinoik asit (RA)

100 mg'lık renkli ampul içerisinde toz halde satın alınan RA, %95'lik etanol çözeltisi içerisinde çözülmüş ve 5 mM'lık ana stok hazırlanmıştır. Ana stok renkli cam şişelerde -20 °C'de saklanmış ve deney öncesinde 10 µM'a taze besiyeri içerisinde seyreltilerek kullanılmıştır (Shipley vd., 2016).

3.3.3. Amiloid beta (Aβ) 1-42

0.1 mg'lık toz halinde satın alınan Aβ 1-42, Aβ'nın monomer halde kalmasını sağlayan 0.02 M NaOH tamponu içerisinde çözülmüş ve PBS ile 50 µM konsantrasyona seyreltilerek ana stok hazırlanıp, alikvatlanarak -85 °C'de saklanmıştır. Deneyden 5 gün önce taze besiyeri ile 50 µM'lık ana stoktan yeterli miktarda alınıp serum içermeyen taze besiyerinde 37 °C'lik inkübatörde 7 gün süreyle agregat oluşumu sağlanmıştır. Deney günü agregat oluşumu tamamlanan 50 µM'lık ana stok, kuyucuklarda besiyeri ile 5 µM'a seyreltilerek kullanılmıştır (Kucukkilinc vd., 2017).

3.3.4. Rekombinant insan interferon-gamma (IFN-γ)

Liyofilize halde bulunan IFN-γ (Peprotech, Katalog No:AF-300-02), daha uzun süre saklanabilmesi için içerisinde %0.1 konsantrasyonda sıgır serum albumin (BSA) bulunan PBS ile çözülerek 100 µg/mL konsantrasyonda ana stok hazırlanmış ve alikvatlanarak -85 °C'de saklanmıştır. Ana stok solüsyonundan, taze besiyeriyle çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak deneylerde kullanılmıştır.

3.3.5. Forbol 12-miristat 13-asetat (PMA)

Toz halinde satın alınan PMA, DMSO içinde çözülerek 50 mg/mL konsantrasyonda ana stok hazırlanmış ve aliquatlanarak -20 °C’de saklanmıştır. Ana stok solüsyonundan, taze besiyeriyle çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak deneylerde kullanılmıştır.

3.3.6. Lipopolisakkarit (LPS)

Liyofilize halde satın alınmış olan LPS, steril PCR grade su ile çözülerek 500 µg/mL konsantrasyonda ana stok hazırlanmış ve aliquatlanarak -20 °C’de saklanmıştır. Ana stok solüsyonundan, taze besiyeriyle çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak deneylerde kullanılmıştır.

4. YÖNTEMLER

Tablo 4.1. *Yapılan çalışmaların şematik gösterimi.*

Hücre Kültürü Çalışmaları
1. <i>Chlamydiophila pneumoniae</i> (Cpn) ile Nöroinflamasyon Modeli Oluşturulması Kapsamında Yapılan Çalışmalar
Amaç: <i>Cpn lizatı ile indüklenmiş HMC3 mikrogliya hücre hattı ve nöronal fenotipe farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattı ko-kültürü ile bir nöroinflamasyon modeli oluşturmak</i>
A. Cpn kültürü ve çeşitli lizatların hazırlanması
1. HEp-2 hücre kültüründe Cpn inklüzyon cisimciklerinin oluşturulması
2. Çeşitli Cpn lizatlarının elde edilmesi
- Süpernatanttan veya hücreler UV ışığına maruz bırakılarak/bırakılmayarak hücre pelleti cihazda parçalanarak elde edilen lizatlar
B. Cpn ile indüklenen ko-kültür nöroinflamasyon modeli oluşturulması için optimizasyon çalışmaları
1. Elde edilen Cpn lizatlarının makrofaja farklılaştırılmış THP-1 hücre hattında IL-1 β ve CD218a sitokin seviyelerinin akış sitometri ile araştırılarak etkinliklerinin karşılaştırılması
- Sitokin seviyeleri üzerine en etkili lizatın seçilmesi ve ileri deneylerde LPS ile etkinliğinin karşılaştırılması
C. Epigenetik faktörler üzerine etkili TSA, RG108, Givinostat ve Cpn enfeksiyonu üzerine etkili Rifampinin HMC3 ve SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksik olmayan dozlarının belirlenmesi
1. WST-1 yöntemiyle geniş konsantrasyon aralıklarında tarama yapılması
2. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence RTCA-DP) kullanılarak sitotoksik olmayan konsantrasyonların belirlenmesi
D. Cpn ile aktive edilmiş HMC3 mikrogliya ve farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri ile oluşturulan nöroinflamasyon ko-kültür modelinde yapılan çalışmalar
1. Sitotoksik olmayan TSA, RG108, Givinostat ve Rifampin konsantrasyonlarının ko-kültür modelinde hücre canlılığı üzerine etkilerinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile belirlenmesi
2. TSA, RG108, Givinostat ve Rifampinin etkilerinin inflamazom ve epigenetik kromatin düzenlenmesi üzerine etkili genleri içeren panellerle moleküler düzeyde araştırılması
2. Aβ ile Oluşturulmuş Nörotoksisite Hücre Modelinde Epigenetik Mekanizmalar Üzerine Etkili İlaçların Nöroprotektif Etkilerinin Araştırılması
Amaç: <i>Farklılaştırılmış SH-SY5Y hücre hattında Aβ ile oluşan hücre hasarı karşısında TSA, RG108, Givinostat ve Rifampin konsantrasyonlarının koruyucu etkinliklerini belirlemek</i>

Tablo 4.1. (Devam) *Yapılan çalışmaların şematik gösterimi*

A. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde SH-SY5Y hücrelerinin ekimi ve farklılaştırılması sonrasında sitotoksik olmadığı belirlenen TSA, RG108, Givinostat ve Rifampin konsantrasyonlarıyla inkübasyon ve inkübasyon sonrasında A β ile nörotoksisite oluşturarak koruyucu etkilerin gerçek zamanlı olarak izlenmesi

B. Konsantrasyon gruplarının A β agregat seviyesi üzerine etkilerinin akış sitometride immünofloresans boyama yöntemi ile belirlenmesi

C. Konsantrasyon gruplarının apoptotik etkilerinin akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile belirlenmesi

D. Konsantrasyon gruplarının toplam ROS miktarı üzerine etkilerinin belirlenmesi

3. İstatistiksel Analiz Çalışmaları

4.1. Hücre ve *Chlamydiophila pneumoniae* Kültürü Çalışmaları

4.1.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattının büyütülmesi

SH-SY5Y, insan kemik iliği kökenli nöroblastoma hücre hattıdır. Bu hücre hattı dopamin- β -hidroksilaz enzim aktivitesine sahiptir ve bir nörotransmitter olan gama aminobütirik asidi (GABA) glutamata çevirebilmektedir, bu nedenle sıklıkla insan nöronal hücre modeli olarak kullanılmaktadır (Dwane vd., 2013).

SH-SY5Y hücre hattı, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içeren Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) büyüme besiyerinde %70-80 yoğunluğa ulaşana kadar %5 oranında CO₂ içeren 37 °C'lik inkübatörde inkübe edilmiştir. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler, 1-2 mL tripsin yardımıyla pipetaj yapılarak taze besiyeriyle pasajlanmıştır. Stoklanmak istenen hücreler aynı şekilde pipetlenerek FBS ile birlikte yarım saat buzda bekletildikten sonra, %10 oranında DMSO eklenerek kryo tüplere aktarılmış ve -80 °C'deki dondurucuda stoklanmıştır.

4.1.2. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattının nöronal fenotipe farklılaştırılması

SH-SY5Y hücreleri, 47 kromozomdan oluşan stabil bir karyotipe sahiptir ve retinoik asit, forbol esterleri ve beyin-türevli nörotrofik faktör (BDNF) gibi spesifik nörotrofinler dahil olmak üzere çeşitli farklı mekanizmalarla nöroblast benzeri bir durumdan olgun insan nöronlarına farklılaşabilmektedirler. SH-SY5Y hücreleri retinoik asit ile muamele edildiğinde bölünme durur ve farklılaşma başlar (Pählman vd., 1984, Xie vd., 2010).

SH-SY5Y hücreleri öncelikle %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren EMEM büyüme besiyerinde %70-80 yoğunluğa ulaşana kadar büyütülmüş, sonrasında ise %1 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve 10 µM retinoik içeren farklılaşma besiyeri içerisinde 5 gün inkübasyona bırakılarak farklılaşmaları sağlanmıştır (Shipley vd., 2016).

4.1.3. HMC3 insan mikrogliya hücre hattının büyütülmesi

Mikroglialar, sağlıklı merkezi sinir sisteminin parankiminde bulunan beyin dokusuna özgü myeloid hücrelerdir. İmmünolojik sistemdeki görevlerine ek olarak, mikrogliyal hücreler sinaptik yapı ve nörojenezin düzenlenmesi de dahil olmak üzere diğer serebral süreçlerde önemli rol oynar (Russo vd., 2018).

HMC3 hücreleri, %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren EMEM büyüme besiyerinde %70-80 yoğunluğa ulaşana kadar %5 oranında CO₂ içeren 37 °C'lik inkübatörde büyütülmüştür. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler, 1-2 mL tripsin yardımıyla pipetaj yapılarak taze besiyeriyle pasajlanmıştır. Stoklanmak istenen hücreler aynı şekilde pipetlenerek FBS ile birlikte yarım saat buzda bekletildikten sonra, %10 oranında DMSO eklenerek kryo tüplere aktarılmış ve -85 °C'deki dondurucuda stoklanmıştır.

4.1.4. THP-1 insan akut monositik lösemi hücre hattının büyütülmesi

Memelilerde, dolaşımdaki monositler, Gram-negatif bakterilerle enfeksiyona karşı etkili koruma sağlamaktadırlar. Gram-negatif bakterilerin hücre duvarının bir makromoleküler yapısı olan lipopolisakarit (LPS) ile karşılaştığında, periferik monositler lenf düğümlerine göç eder, dendritik hücrelere farklılaşır ve antijeni CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerine sunarlar. Böylece Gram-negatif bakterilere karşı adaptif bağışıklık süreci başlatılmış olur (Sallusto ve Lanzavecchia, 2010). Ayrıca, dolaşımdaki monositler doku makrofajlarına farklılaşma potansiyeline sahiptir, böylece embriyonik olarak türetilmiş makrofajların havuzuna katkıda bulunur ve istilacı patojenlerin fagositozunda yardım sağlarlar (Epelman vd., 2014). Genetik olarak tasarlanmış türevleri de dahil olmak üzere THP-1 hücreleri, monosit yapısını ve fonksiyonunu araştırmak için bir model olarak kullanılmaktadır (Bosshart ve Heinzelmann, 2016).

Sitokin çalışmalarında kullanılan THP-1 monosit hücre hattı %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve 0.05 mM 2-merkaptöetanol içeren ATCC tarafından formüle

edilmiş RPMI-1640 (ATCC, 30-2001) besiyerinde %70-80 yoğunluğa ulaşana kadar %5 oranında CO₂ içeren 37 °C'lik inkübatörde inkübe edilmiştir.

4.1.5. HEp-2 hücrelerinin kültürü ve *Chlamydiophila pneumoniae* inklüzyon cisimciklerinin oluşturulması

Chlamydiophila pneumoniae (Cpn), insanda solunum sistemine yerleşen ve toplumsal kökenli pnömoni vakalarının neredeyse %10'undan sorumlu bir klamidyal patojendir. Cpn hücre kültüründe izole edilmesi zor bir organizmadır bu nedenle insan epitelyal karsinoma hücresi olan HEp-2 hücre hattı konakçı olarak kullanılarak inokülasyonu sağlanmıştır.

HEp-2 hücreleri %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren ATCC tarafından formüle edilmiş EMEM besiyerinde (ATCC, 30-2003) %70-80 yoğunluğa ulaşana kadar %5 oranında CO₂ içeren 37 °C'lik inkübatörde inkübe edilmiştir. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler, SH-SY5Y hücreleri ile aynı şekilde pasajlanmış veya stoklanmış.

Cpn inklüzyon cisimcikleri oluşturmak için HEp-2 hücreleri tripsin yardımıyla flasktan kaldırıldıktan sonra 6 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 1x10⁶ yoğunlukta hücre olacak şekilde ekilmiş ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda -85 °C'lik dondurucuda saklanan Cpn (ATCC, 53592) ana stoğundan 480 µl alınmış ve 2 dakika sonike edildikten sonra 5520 µl besiyeri ile dilüe edilerek her kuyucuğa 1 ml eklenmiş ve plaka 1500 g'de 1 saat santrifüj edildikten sonra 1 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında pis besiyeri atılmış ve hücreler 300 µL Hanks Balanced Salt Solution ile yıkandıktan sonra 1 ml temiz besiyeri eklenmiştir. 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda inklüzyon cisimciklerinin oluşumu cins spesifik antikor boyası içeren Pathfinder Chlamydia Culture Confirmation System (Bio-Rad, Katalog no: 30701) ile kuyucuklarda oluşan inklüzyon cisimcikleri sayılmış ve mililitredeki ortalama inklüzyon cisimciği sayısını ifade eden *inclusion forming unit* (IFU)/ml değeri hesaplanmıştır (Critchley vd., 2002).

4.2. *Chlamydiophila pneumoniae* ile Nöroinflamasyon Modeli Oluşturulması için Optimizasyon Çalışmaları

4.2.1. *Chlamydiophila pneumoniae* lizatlarının hazırlanması

Tez kapsamında HMC3 mikrogliya ve nörona farklılaştırılmış SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı kullanılarak oluşturulmuş olan nöroinflamasyon modelinde mikrogliaların LPS yerine Cpn lizatı ile indüklenmesi hedeflenmiştir. Bu nedenle öncelikle

Cpn lizatının uygun elde edilme şekli ve aktivasyon için kullanılacak konsantrasyonunun seçilebilmesi amacıyla optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. 6 kuyucuklu plakalarda, her kuyucukta 1×10^6 yoğunlukta hücre olacak şekilde HEp-2 konakçı hücre hattı kullanılarak çoğaltılan 12.5×10^5 IFU/ml Cpn örnekleri şu şekilde elde edilmiştir:

- Kuyucuklardan toplanan Cpn süpernatantı
- Süpernatantı atılan hücrelerin MagNA Lyser cihazında parçalanmış lizati (lisis tamponu içerisinde)
- Plaka tabanından kazınan hücrelerin MagNA Lyser cihazında parçalanmış lizati (süpernatant içerisinde)
- 40 dakika ultraviyole (UV) ışığı altında bekletilmiş plaka tabanından kazınan hücreler (süpernatant içerisinde, parçalanmamış)
- 40 dakika UV ışığı altında bekletilmiş plaka tabanından kazınan hücrelerin MagNA Lyser cihazında parçalanmış lizati (süpernatant içerisinde)

Örnekler toplandıktan sonra santrifüjlenmiş, süpernatantlar alınarak liyofilize edilmiş ve alikotlanarak saklanmıştır.

4.2.2. Monositik THP-1 hücrelerinin makrofaja farklılaştırılması ve sitokin seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi

Kan hücresi olan monositler dokuda makrofaja farklılaşmaktadırlar. Bu nedenle sitokin çalışmalarında THP-1 monosit hücreleri makrofaja farklılaştırıldıktan sonra deneylere devam edilmiştir. Öncelikle 5×10^5 THP-1 hücresi Cedex XS (Innovatis) cihazında sayılmış ve 24 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Monosit/makrofaj farklılaşmasını sağlamak için kuyucuklara 100 ng/mL konsantrasyonda forbol 12-miristat 13-asetat (PMA) uygulanmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda süspansiyon haldeki THP-1 hücreleri farklılaşma nedeniyle plaka tabanına tutunmaktadır. Kuyucuklardan PMA içeren besiyeri uzaklaştırılmış ve temiz besiyerinde hücreler 48 saat dinlenme inkübasyonuna bırakılmıştır. 48 saat sonunda kuyucuklara yukarıdaki yöntemlerde açıklanan Cpn lizatları uygulanmıştır (Daigneault vd., 2010; Dehai vd., 2014).

Nöroinflamasyon modelinde mikroglia hücrelerinin Cpn inklüzyon cisimcikleri ile indüklenmesi hedeflenmiştir. Bu nedenle Cpn inklüzyon cisimcikleri içeren örneklerden

çeşitli şekillerde parçalanarak elde edilen lizatlar, makrofaja değişimi gerçekleştirilmiş THP-1 hücre hattı ile muamele edilmiş ve inflamatuvar cevabın ana bileşenlerinden olan proinflamatuvar CD218a ve IL-1 β sitokinlerinin ölçümü akış sitometri kullanılarak belirlenmiştir. 12.5×10^5 IFU/ml Cpn, *multiplicity of infection* (MOI) = 1 olacak konsantrasyonda dilüe edilerek uygulanmıştır. MOI, enfekte edici ajanın tanımlanan bir alanda enfeksiyon hedefine oranını ifade etmektedir (Appelt vd., 2008). 5×10^5 THP-1 hücresi üzerine 1 ml'de 5×10^5 inklüzyon cisimciği oluşturacak hacimde Cpn örneği (1:10 dilüe edilmiş 4 μ l Cpn) eklenmiştir. Toplanan örnekler 1100 *rounds per minute* (rpm) santrifüj edilmiş, daha sonra yıkama ve inkübasyon işlemleri kit prosedürlerine uygun olarak yapılmıştır.

CD218a hücre yüzeyinde yer aldığı için, 6'lık kuyucuktaki hücreler kaldırılarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti, 2 kez 2 ml soğuk PBS ile yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra pellet 100 μ l PBS ilave edilerek üzerine 5 μ l CD218a antikoru (BD, 564675) ilave edilmiştir. Daha sonra karanlıkta buzun üzerinde 20 dakika inkübasyona bırakılan tüpler inkübasyon süresi sonunda 2 kez daha 2 mL PBS ile yıkanarak 30 dakika içinde akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) okunmuş ve aynı cihazın analiz programı (BD Accuri C6 Software) kullanılarak veriler analiz edilmiştir.

IL-1 β hücre içinde yer aldığı için, 6'lık kuyucuktaki hücreler plaka tabanından kaldırılarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti, 2 kez 2 ml soğuk PBS ile yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra süpernatant uzaklaştırılmış kalan pelletin üzerine fiksasyon ve permeabilizasyon için 500 μ l cytofix/cytoperm solüsyonu ilave edilerek 20 dk buzda bekletilmiştir. 1200 rpm de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra, pellet 2 kez 500 μ l "perm wash" ile yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra pellet 100 μ l perm wash ile resüspanse edilerek üzerine 5 μ l IL-1 β antikoru (BioLegend, 508206) eklenmiş ve 20 dk karanlıkta oda ısısında inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresi sonunda tüplere 1000 μ l perm wash ilave edilerek santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda pellet 350 μ l perm wash ile akış sitometri cihazında analiz (Accuri C6, BD) okunmuş ve aynı cihazın analiz programı (BD Accuri C6 Software) kullanılarak veriler analiz edilmiştir.

Deney sonuçlarına göre UV ışığı altında bekletilerek inaktive edilen ve MagNA Lyser cihazında parçalanmış Cpn lizatı ve Cpn süpernatantı proinflamatuvar sitokin seviyelerini arttırmada en etkili olarak bulunmuştur. Cpn lizatı UV ışığı altında bekletilse de kontaminasyona neden olduğu için lizat elenerek Cpn süpernatantları toplanmış ve liyofilize edilip DMSO ile stok çözeltisi hazırlanmış (50 mg/ml) ve alikotlanarak sonraki deneylerde ana stoktan dilüe edilerek kullanılmıştır.

4.2.3. Mikroglia hücrelerini aktive eden *Chlamydiophila pneumoniae* konsantrasyonunun LPS ile karşılaştırılması

4.2.3.1. Çeşitli *Chlamydiophila pneumoniae* ve LPS konsantrasyonlarının *IL-1 β* , *TNF- α* ve *IL-8* gen ekspresyonları üzerine etkilerinin araştırılması

Nörodejeneratif hastalıkların neredeyse tamamında, nöroinflamasyon varlığı gösterilmiş ve özellikle mikroglial aktivasyonun bu hastalıkların patojenezine katkısı gözlenmiştir. *In vitro* nöroinflamasyon modelleri, sıklıkla mikroglial aktivasyona katılan molekülleri ve yolakları karakterize etmek için kullanılmaktadır. Bu modellerin çoğunda, mikroglial aktivasyonun ya da aday moleküllerin potansiyel antiinflamatuvar etkilerinin araştırılması için LPS ya da benzeri diğer proinflamatuvar sitokinler kullanılmıştır (Gresa-Arribas vd., 2012).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'daki özgül bölgelerin çoğaltılması için kullanılan bir yöntemdir (Bustin, 2000; Engür vd., 2015). Çeşitli Cpn ve LPS konsantrasyonlarının proinflamatuvar sitokin aktivasyonu üzerine etkilerinin RT-PCR yöntemi ile gen ekspresyonu düzeyinde karşılaştırılabilmesi için HMC3 mikroglia hücreleri 1×10^6 /kuyucuk yoğunlukta 6 kuyucuklu plakalara ekilerek 24 saatlik inkübasyondan sonra, IFN- γ (10 ng/ml) ile kombine halde veya yalnızca 1, 10 ve 100 μ g/ml konsantrasyonda Cpn veya LPS ile 24 saat muamele edilmiştir. Daha sonra, MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Kat. No: 04802993001, Roche, Almanya) kullanılarak MagNA Pure Compact System (Roche, Almanya) cihazında total RNA izolasyonları yapılmıştır. İzole edilen toplam mRNA miktarları NanoDrop 2000 (Thermo Fisher, ABD) spektrofotometrede 260 ve 280 nm'de ölçülmüştür. Toplam mRNA örneklerinden eşit miktarda (500 ng/ μ l) kullanılarak Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Katalog no: 05091284001, Roche, Almanya) ile kit protokolü takip edilerek cDNA, cDNA örnekleri

de PCR yöntemi ile çoğaltılarak IL-1 β , TNF- α ve IL-8 (PRZ BioTech, Türkiye) mRNA ekspresyon seviyeleri Light Cycler 480 Real-Time PCR System (Roche, Almanya) cihazı ile belirlenmiştir. Housekeeping gen olarak aktin-beta (ACTB) kullanılmıştır. IL-1 β , TNF- α , IL-8 ve ACTB'ye ait gen dizilimleri **Tablo 4.2.**'de yer almaktadır. Sonuç olarak seçilen aktif genlerin RT-PCR yöntemiyle "Advanced Relative Quantification" programı (Software Release 1.5.0 SP4 version 1.5.0.39) kullanılarak kontrol grubuna göre amplifikasyon düzeyindeki artış ya da azalışlar analiz edilmiştir.

Tablo 4.2. IL-1 β , TNF- α , IL-8 ve ACTB dizilimleri

Genler	Kısa adı	Baz Dizisi (Forward Primer- Reverse Primer)
İnterlökin-1 Beta	IL-1 β	Forward: 5'-AAGATGCTGGTTCCTGCC-3' Reverse: 5'-GCGTGCAGTTCAGTGATCGTAC-3'
Tümör nekroz faktörü-alfa	TNF- α	Forward: 5'-GGCTTTCGGAACCTCACTGGA-3' Reverse: 5'-CCCGTAGGGCGATTACAGTC-3'
İnterlökin-8	IL-8	Forward: 5'-CCGGAAGGAACCATCTCACT-3' Reverse: 5'-ACTTCTCCACAACCCTCTGC-3'
Aktin beta	ACTB	Forward: 5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3' Reverse: 5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'

4.2.3.2. Akış sitometride çeşitli *Chlamydia pneumoniae* ve LPS konsantrasyonlarının aktif mikrogliya belirteci (CD11b antikoru) üzerine etkilerinin belirlenmesi

Aktif mikrogliya ve farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri ile ko-kültür nöroinflamasyon modeli oluşturabilmek için, öncelikle proinflamatuvar sitokin gen ekspresyonu düzeyleri üzerinde en etkili konsantrasyon olarak bulunan 100 ng/ml LPS + IFN- γ (10 ng/ml) konsantrasyon grubu ile, IFN- γ (10 ng/ml) kombine halde uygulanan 10, 100 ng/ml ve 1 μ g/ml Cpn konsantrasyonlarının, aktif mikrogliya belirteci olan CD11b antikoru üzerindeki etkileri 24 ve 48 saat süreyle karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, HMC3 mikrogliya hücreleri 12 kuyucuklu plakalara 75x10³ yoğunlukta ekilmiş ve 24 saat inkübasyon sonrasında konsantrasyon grupları ile 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. İnkübasyon süreleri sonunda hücreler tripsin yardımıyla kaldırılıp Cell Staining Buffer (BioLegend, Kat. No: 420201) ile 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. 100 μ l Cell Staining Buffer içerisinde dilüe edilen 5 μ l Human TruStain Fc α (BioLegend, Kat. No: 422302) Fc reseptör blokörü

solüsyonuyla 10 dakika oda sıcaklığında spesifik olmayan immünofloresan boyamanın azaltılması için bloklama yapılmıştır. Santrifüj ile blokör atılmış ve hücreler 20 µl Cell Staining Buffer içerisinde 1:5 dilüe edilen 5 µl PE anti-mouse/human CD11b Antibody (BioLegend, Kat. No: 101208) ile 15 dakika karanlıkta ve buz üzerinde bekletilerek boyanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hücreler 2 ml Cell Staining Buffer ile 2 kez yıkanmış ve 500 µl tampon ile BD Accuri™ C6 akış sitometri cihazında analiz edilmiştir.

4.3. WST-1 Yöntemiyle Sitotoksik Olmayan Konsantrasyonların Belirlenmesi

WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate), memeli hücrelerinde hücre proliferasyonunu, hücre canlılığını ve sitotoksiteyi ölçmek için kullanılan bir tetrazolyum tuzudur. Deney protokolü, WST-1 tetrazolyum tuzunun hücresel mitokondriyal dehidrojenazlarla formazan tuzuna dönüşmesine dayanır. Canlı hücrelerin sayısı arttıkça, mitokondriyal dehidrojenazların aktivitesi ve sonuçta oluşan formazan tuzu miktarı artar. İnkübasyon dışında, yıkama ve çözünürleştirme aşaması içermediği için diğer sitotoksite ölçme yöntemlerinden daha hızlı ve hassastır (Engür ve Dikmen, 2017).

WST-1 yöntemiyle, geniş konsantrasyon aralıklarında ön tarama yapılmıştır. SH-SY5Y ve HMC3 hücreleri %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren EMEM büyüme besiyerinde 37 °C' de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştıktan sonra Cedex XS (Innovatis, ABD) cihazında sayım yapılarak 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 5x10³ hücre olacak şekilde ekilmiş ve hücrelerin plakalara yapışmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında besiyerleri, TSA, Givinostat, RG108 ve Rifampin (200, 100, 50, 25 ve 12.5 µM); LPS ve liyofilize Cpn süpernatantı (200, 100, 50, 25 ve 12.5 µg/ml) içeren 100 µl besiyeri ile değiştirilmiştir. Kontrol grubu olarak %0.1 DMSO içeren besiyeri kullanılmış ve hücreler 24 ve 48 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda plakalardaki mevcut besiyerleri içerisine 10 µl WST-1 solüsyonu ilave edilerek hücreler 4 saat inkübatörde bekletilmiştir. Sonrasında plakaların absorbans değerleri Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader'da 540 nm dalga boyunda, her bir konsantrasyon için 8 tekrar olacak şekilde okunmuştur. Kontrol kuyularının absorbans değerleri ortalaması %100 kabul edilmiş ve diğer konsantrasyonların % canlılık değerleri hesaplanmıştır (Kaya-Tilki vd., 2016).

4.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence RTCA-DP) Kullanılarak SH-SY5Y ve HMC3 Hücre Canlılığının Belirlenmesi Çalışmaları

xCELLigence RTCA-DP sistemi, altın elektrotlar içeren özel plakaların (E-plate), hücrelerin plaka tabanına tutunmasıyla oluşan elektriksel sinyali istenilen ölçüm aralıklarında ekrana yansıtması yöntemiyle gerçek zamanlı veriler oluşturan bir cihazdır. E-plakalardan belirlenen aralıklarla cihaza aktarılan veriler, literatürde birimsiz “cell index (CI)” (hücre indeksi) olarak kabul edilen bir değer olarak hesaplanır. E-plaka kuyucuklarında hücre proliferasyonu arttıkça cihaza aktarılan sinyaller de paralel olarak artmaktadır (Limame vd., 2012; Mustafa vd., 2015).

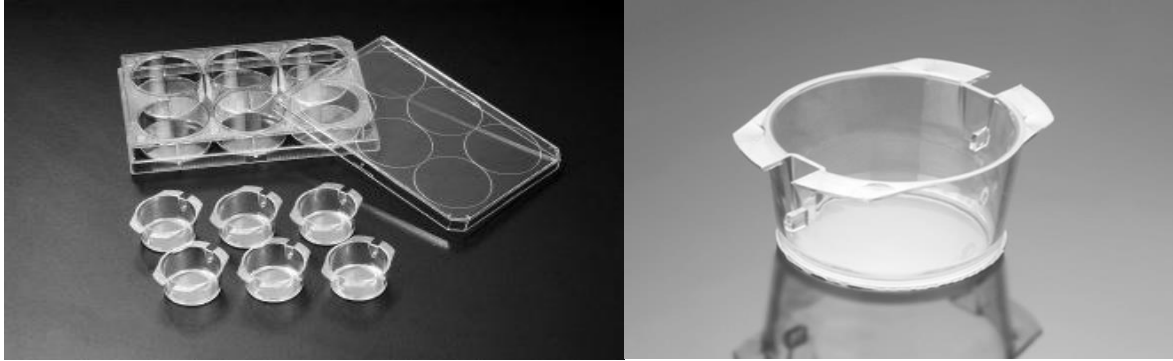
Bu sistem kullanılarak 16’lık altın ve elektrot kaplı plakalara her bir kuyucukta 5×10^3 hücre olacak şekilde deney öncesinde farklılaştırılmış ve farklılaşmamış SH-SY5Y ve HMC3 hücreleri ekilmiş ve bir log fazına ulaşınca kadar (24 saat) beklenmiştir. 24 saat sonunda cihaz durdurularak mevcut besiyeri üzerine TSA, Givinostat, RG108 ve Rifampin’in 100, 10 ve 1 μ M konsantrasyonları uygulanarak hücre canlılığı gerçek zamanlı olarak izlenmiş ve RTCA DP Software 1.2.1 programında 24. ve 48. saat IC_{50} değerleri analiz edilmiştir. Aynı zamanda 24 ve 48. saatteki hücre indeksi değerleri kullanılarak slope grafikleri çizilmiş ve kontrol kuyularının CI değerleri ortalaması %100 kabul edilerek bulunan % canlılık değerlerinin istatistiksel yönden anlamlılığı belirlenmiştir.

4.5. *Chlamydiophila pneumoniae* ve Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücreleri ile Nöroinflamasyon Ko-kültür Modelinin Oluşturulması

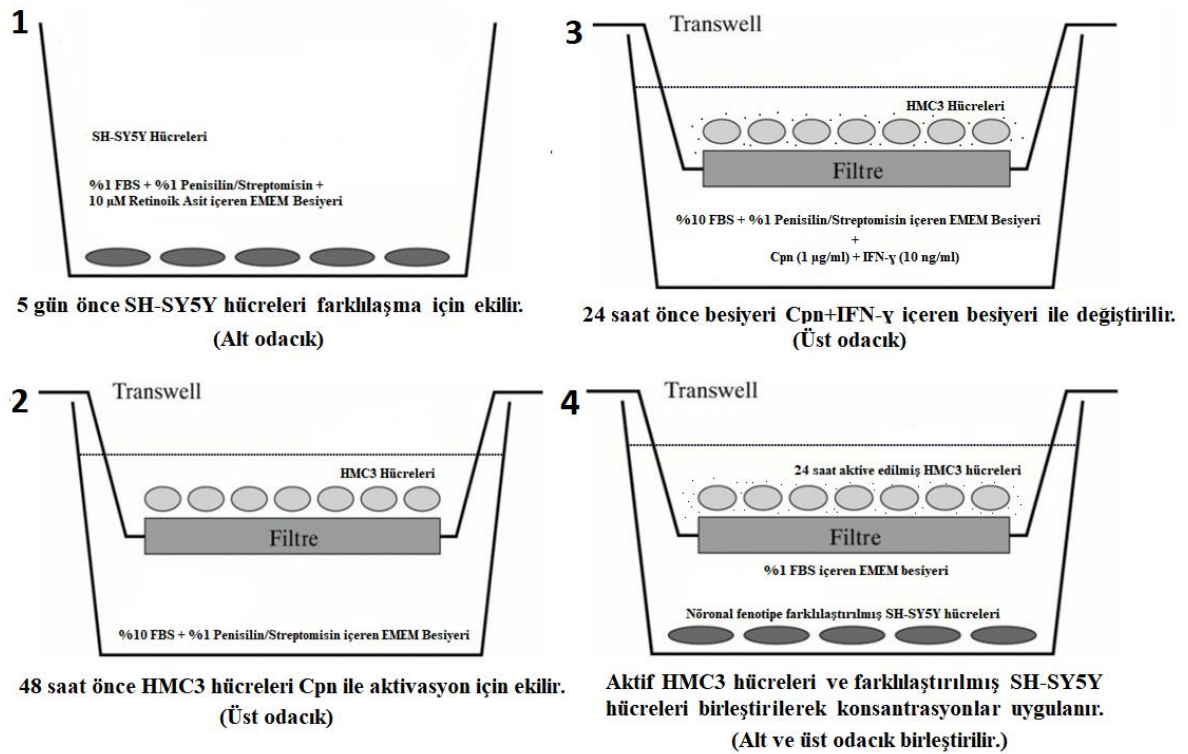
Santral sinir sisteminin yerleşik bağışıklık hücreleri olan mikroglialar, kontrollü inflamatuvar cevaplara aracılık ederek nöronların işleyişini ve hayatta kalmalarını destekleyen ortamı sürdürmede faydalı bir rol oynamaktadırlar (Block vd., 2007). Yaralanma veya çeşitli uyaranlara cevap olarak mikroglia aktif forma dönüşür ve bir dizi morfolojik ve fonksiyonel değişiklik geçirerek hem koruyucu hem de sitotoksik faktörler salgılayarak nöronal fonksiyonları ve nöron canlılığını etkilerler (Luo ve Chen, 2012). Bu süreçte yaşanan bozulmalar sonucunda pro-inflamatuvar sitokinler salgılayan aktif mikroglialının nöroinflamatuvar hasara büyük katkı sağladığı bilinmektedir (Block vd., 2007).

Cpn enfeksiyonunun inflamazom yolağı ve epigenetik kromatin düzenlenmesi ile ilişkili enzimler üzerindeki olası etkilerinin araştırılması için optimize edilen

nöroinflamasyon modelinde kullanılan plaka (Şekil 4.1.) ve deney protokolünün şematik gösterimi (Şekil 4.2.) aşağıda yer almaktadır.



Şekil 4.1. Nöroinflamasyon modeli için kullanılan 6 kuyucuklu plaka (Sol) ve 0.4 µm por açıklığına sahip üst odacık (Sağ).



Şekil 4.2. Cpn ile oluşturulmuş nöroinflamasyon modelinin şematik gösterimi.

Cpn ile aktive edilen mikrogliya ve farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri ile oluşturulan nöroinflamasyon ko-kültür modeli sonrasında SH-SY5Y hücrelerinden mRNA eldesi amaçlanmıştır. SH-SY5Y hücrelerinin verimli bir şekilde farklılaşabilmesi için her deney

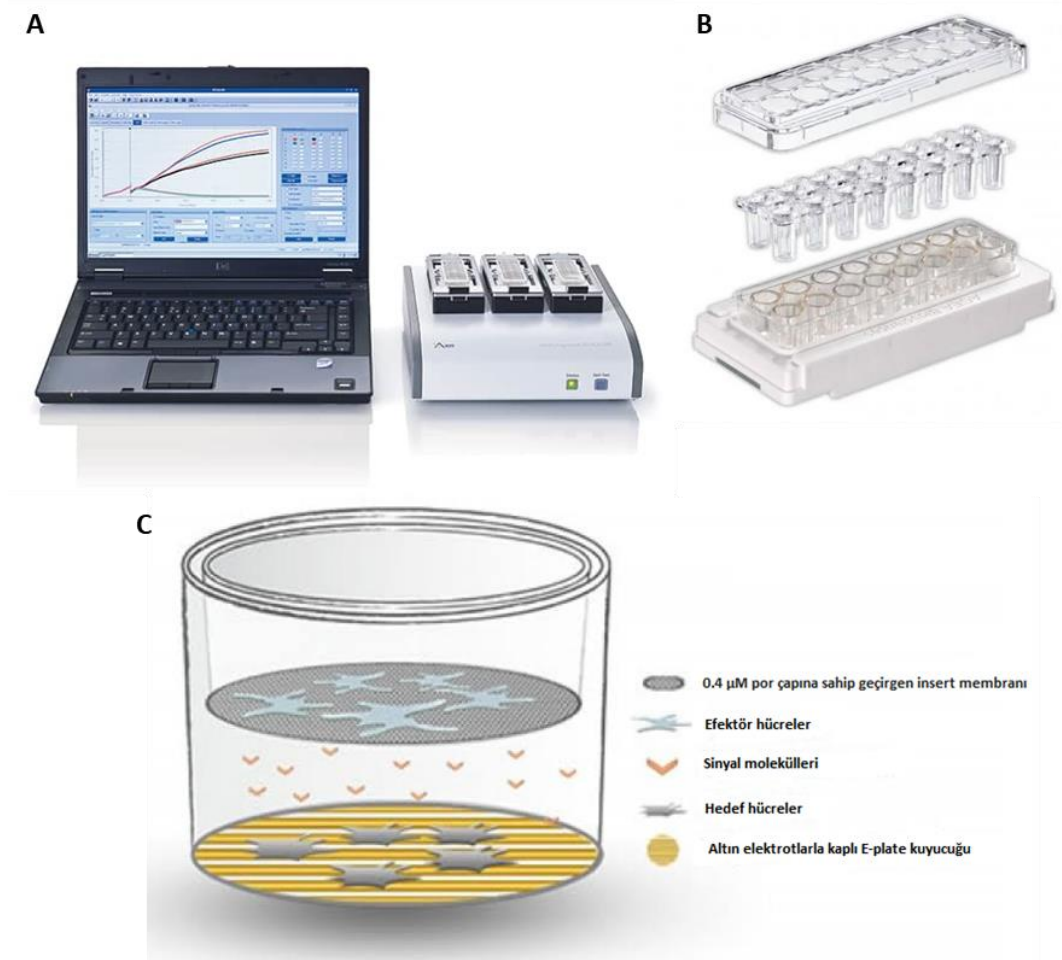
grubu 3 tekrarlı olacak şekilde mRNA eldesi tasarlanan günün 5 gün öncesinde SH-SY5Y hücreleri %1 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve 10 μ M RA içeren EMEM farklılaşma besiyeri içerisinde 3×10^5 yoğunlukta 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve farklılaşma için bırakılmıştır. Deneyden 48 saat önce HMC3 hücreleri %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren EMEM besiyeri içerisinde 3×10^5 yoğunlukta 6 kuyucuklu plakaların üst odacıklarına ekilmiştir. 24 saat inkübasyon süresi sonunda mevcut besiyeri mikrogliya aktivasyonu için Cpn (1 μ g/ml) + IFN (10 ng/ml) içeren besiyeri ile değiştirilmiştir. Aktivasyon için 24 saat inkübe edilen üst odacıklardaki mevcut besiyeri atıldıktan ve hücreler PBS ile yıkandıktan sonra, aynı şekilde besiyeri atılan ve yıkanan farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin bulunduğu 6 kuyucuklu plakalara yerleştirilmiş ve %1 FBS ve %1 penisilin/streptomisin EMEM farklılaşma besiyeri içerisinde **Tablo 4.3.**'de görülen konsantrasyonlar uygulanmıştır. Uygulanacak ilaç konsantrasyonları, RT-PCR ile yapılan IL-1 β , TNF- α ve IL-8 gen ekspresyonu çalışmalarının sonuçlarına göre belirlenmiştir.

Tablo 4.3. *Nöroinflamasyon ko-kültür modeli oluşturulan konsantrasyon grupları.*

Konsantrasyonlar	HMC3 Aktivasyonu	Ko-Kültür Sonrası Uygulanan Konsantrasyonlar
Kontrol	Farklılaşma Besiyeri	Farklılaşma Besiyeri
Cpn	Cpn (1 μ g/ml) + IFN- γ (10 ng/ml)	Farklılaşma Besiyeri
TSA	Cpn (1 μ g/ml) + IFN- γ (10 ng/ml)	TSA (100 nM)
Rifampin	Cpn (1 μ g/ml) + IFN- γ (10 ng/ml)	Rifampin (100 nM)
Givinostat	Cpn (1 μ g/ml) + IFN- γ (10 ng/ml)	Givinostat (100 nM)
RG108	Cpn (1 μ g/ml) + IFN- γ (10 ng/ml)	RG108 (100 nM)

4.5.1. *Chlamydiophila pneumoniae* ve farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücreleri ile oluşturulan nöroinflamasyon ko-kültür modelinde hücre canlılığının Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile izlenmesi çalışmaları

xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi, daha önce bahsedildiği gibi hücre canlılığını invaziv olmayan bir şekilde izlemek için birbirine kenetlenmiş altın mikroelektrotlar içeren plakaları kullanarak elektriksel empedansı gerçek zamanlı birimsiz hücre indeksi verileri olarak (CI) ekrana aktaran bir cihazdır (Ke vd., 2011). Bu sistemde kullanılan altın elektrotlar içeren özel plakaların içerisine yerleştirilen E-plate Insert'ler aracılığıyla, hücre-hücre etkileşimlerini gerçek zamanlı olarak izlemek mümkün olmaktadır (Şekil 4.3.) (Thibeault vd., 2014).



Şekil 4.3. Gerçek zamanlı hücre analizi çalışmalarında kullanılan xCELLigence RTCA-DP cihazı (A), E-plate ve E-plate Insert (B) ve xCELLigence ile oluşturulan ko-kültür modelinin şematik gösterimi (C).

Cpn ile aktive edilen mikrogliya ve farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri ile oluşturulan nöroinflamasyon ko-kültür modeli sırasında hücre canlılığının gerçek zamanlı izlenmesi amacıyla, öncelikle SH-SY5Y hücreleri %1 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve 10 µM RA içeren EMEM farklılaşma besiyeri içerisinde her kuyucukta 5×10^3 hücre olacak şekilde E-plate'lere ekilmiş ve 5 gün süreyle farklılaşma için inkübe edilmiştir. E-plate ve E-plate Insert'ler birleştirilerek ko-kültür modeli uygulanmadan 48 saat önce HMC3 hücreleri %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren EMEM besiyeri içerisinde 5×10^3 yoğunlukta E-plate Insert'lerin içine ekilmiş ve 24 saat inkübasyon süresi sonunda mevcut besiyeri mikrogliya aktivasyonu için Cpn (1 µg/ml) + IFN (10 ng/ml) içeren besiyeri ile değiştirilmiştir. Aktivasyon için 24 saat inkübe edilen E-plate Insert'lerdeki mevcut besiyeri atıldıktan ve hücreler PBS ile yıkandıktan sonra, aynı şekilde besiyeri atılan ve yıkanan farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin bulunduğu E-plate'lerin üzerine E-plate Insert'ler yerleştirilmiş ve %1 FBS ve %1 penisilin/streptomisin EMEM farklılaşma besiyeri içerisinde konsantrasyonlar uygulanmıştır. Deney grupları **Tablo 4.4.**'de açıklanmıştır.

Tablo 4.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile nöroinflamasyon ko-kültür modeli oluşturulan ve hücre canlılığı izlenen konsantrasyon grupları.

Gruplar	HMC3 Aktivasyonu	Ko-Kültür Sonrası Uygulanan Konsantrasyonlar
Kontrol	Büyüme Besiyeri	Farklılaşma Besiyeri
Cpn	Cpn (1 µg/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	Farklılaşma Besiyeri
TSA + Cpn	Cpn (1 µg/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	TSA (100 nM)
Rifampin + Cpn	Cpn (1 µg/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	Rifampin (100 nM)
Givinostat + Cpn	Cpn (1 µg/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	Givinostat (100 nM)
RG108 + Cpn	Cpn (1 µg/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	RG108 (100 nM)
LPS	LPS (100 ng/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	Farklılaşma Besiyeri

Tablo 4.4. (Devam) *Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile nöroinflamasyon ko-kültür modeli oluşturulan ve hücre canlılığı izlenen konsantrasyon grupları.*

TSA + LPS	LPS (100 ng/ml) + IFN- γ (10 ng/ml)	TSA (100 nM)
Rifampin + LPS	LPS (100 ng/ml) + IFN- γ (10 ng/ml)	Rifampin (100 nM)
Givinostat + LPS	LPS (100 ng/ml) + IFN- γ (10 ng/ml)	Givinostat (100 nM)
RG108 + LPS	LPS (100 ng/ml) + IFN- γ (10 ng/ml)	RG108 (100 nM)

Deney sırasında ko-kültür gruplarının yanı sıra, E-plate Insert içermeyen kuyucuklarda farklılaşmış E-plate'ler üzerinde farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerine yalnızca Cpn (1 μ g/ml) + IFN- γ (10 ng/ml), LPS (100 ng/ml) + IFN- γ (10 ng/ml), TSA (100 nM), Rifampin (100 nM), Givinostat (100 nM) ve RG108 (100 nM) uygulanmış ve hücre canlılığı üzerindeki etkileri kontrol amacıyla gerçek zamanlı olarak kaydedilmiştir.

4.6. *Chlamydiophila pneumoniae* Enfeksiyonunun Etkilerinin Gen Düzeyinde Araştırılması Çalışmaları

Cpn enfeksiyonunun, inflamazom yolağı ve epigenetik kromatin düzenlenmesi ile ilişkili enzimler üzerindeki etkilerinin gen ekspresyonu düzeyinde araştırılması amacıyla Cpn ile oluşturulan nöroinflamasyon ko-kültür modelinden öncelikle mRNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Kat. No: 04802993001, Roche, Almanya) kullanılarak MagNA Pure Compact System (Roche, Almanya) cihazında total RNA izolasyonları yapılmıştır. İzole edilen toplam mRNA miktarları NanoDrop 2000 (Thermo Fisher, ABD) spektrofotometrede 260 ve 280 nm'de ölçülmüştür. Toplam mRNA örneklerinden eşit miktarda (500 ng/ μ l) kullanılarak Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Katalog no: 05091284001, Roche, Almanya) ile kit protokolü takip edilerek cDNA elde edilmiştir. cDNA örnekleri de PCR yöntemiyle çoğaltıldıktan sonra, inflamazom gen ailelerini içeren inflamazomla ilişkili gen paneli (Roche, Realtime Ready Custom panel 96, 05582563001) (**Tablo 4.5.**) ve epigenetik

kromatin modifikasyonundan sorumlu enzimleri düzenleyen enzimleri içeren gen paneli (Roche, Realtime Ready Custom panel 96, 100141919) (**Tablo 4.6.**) kullanılarak ekspresyon seviyeleri Light Cycler 480 Real-Time PCR System (Roche, Almanya) cihazı ile belirlenmiştir. Housekeeping gen olarak aktin-beta (ACTB) kullanılmıştır. Sonuç olarak seçilen aktif genlerin RT-PCR yöntemiyle “Advanced Relative Quantification” programı (Software Release 1.5.0 SP4 version 1.5.0.39) kullanılarak kontrole göre amplifikasyon düzeyindeki artış ya da azalışlar analiz edilmiştir.

Tablo 4.5. *İnflamazom ile ilişkili genler ve primer dizilimleri.*

Genler	Açılımı	Primer Dizilimi
BCL2	B-Hücreli Lenfoma 2	Forward: 5'-TGGTGTATCAGATGCTCAAAGG-3' Reverse: 5'-AGAATCTTCAGTTCACAGTCCTCA-3'
BCL2L1	B-Hücreli Lenfoma 2-Benzeri 1	Forward: 5'-CACCTGTGGTCCACCTGAC-3' Reverse: 5'-AGCTGGCTGGACATCTCG-3'
BIRC2	Bakuloviral IAP Tekrar İçeren Protein 2	Forward: 5'-TTTATTCCCTTGTTGGTCATCTGGT-3' Reverse: 5'-TTGATTATACCCCTGCAAATAGG-3'
BIRC3	Bakuloviral IAP Tekrar İçeren Protein 3	Forward: 5'-TGAGGGAAATAATTGTTGGTAATG-3' Reverse: 5'-TTCAATGCTTTGTTCCAGGT-3'
CARD6	Kaspaz Dahili Alanı Aile Üyesi 6	Forward: 5'-GGTAACTTTAACCATGTTTCCTTGA-3' Reverse: 5'-CCACTTAGGCCTCTGCTCTG-3'
CASP8	Kaspaz-8	Forward: 5'-TGCAGTTCCTTCTGTGGTGA-3' Reverse: 5'-GAAAACACTTCCCTCCAGCA-3'
CFLAR	CASP8 ve FADD Benzeri Apoptoz Düzenleyici	Forward: 5'-AGTGCAGTGGCATCATCTTG-3' Reverse: 5'-AGGCTGAGGCAGGAGAATC-3'
CHUK	Korunmuş Helix-loop-helix Ubikuitöz Kinaz	Forward: 5'-CCAAAGTGTATATTTGCATGTGAAG-3' Reverse: 5'-CCAGTTTTCCATGGGTTCTACT-3'
CTSB	Katepsin B	Forward: 5'-TACCTGGTTTGCATAGATGATTG-3' Reverse: 5'-TGGAAGCCGGATCCTAGA-3'
CXCL2	Kemokin (C-X-C motif) Ligand 2	Forward: 5'-TGGTGTATCAGATGCTCAAAGG-3' Reverse: 5'-AGAATCTTCAGTTCACAGTCCTCA-3'
FADD	Flavin Adenin Dinükleotid	Forward: 5'-AGGTAGCCCAGCACTGTGAA-3' Reverse: 5'-AGGTGGTCTGTGGCTCACTC-3'
HSP90AA1	Isı Şok Proteini 90kDa Alfa (Sitozolik), Üye A1	Forward: 5'-CCAAAGAGCGGAGGAAGAG-3' Reverse: 5'-GACAGTCCCTGTCCCGAAG-3'
HSP90AB1	Isı Şok Proteini 90kDa Alfa (Sitozolik), Sınıf B Üye 1	Forward: 5'-TCTGTAATTTTGTGCTGTGAAAGG-3' Reverse: 5'-GGAGCAATTAAATCCGGACA-3'
HSP90B1	Isı Şok Proteini 90kDa Beta Üye 1	Forward: 5'-TTGATGGGAAGAGGTTCCAG-3' Reverse: 5'-CTCCTTAGTTTTCTCACTTTCATCG-3'
IFNB1	Interferon Beta 1	Forward: 5'-CTTTGCTATTTTCAGACAAGATTCA-3' Reverse: 5'-GCCAGGAGGTTCTCAACAAT-3'
IFNG	Interferon Gamma	Forward: 5'-GGAAAGAGGAGAGTGACAGAAAA-3' Reverse: 5'-TTGGATGCTCTGGTCATCTTTA-3'

Tablo 4.5. (Devam) *İnflamazom ile ilişkili genler ve primer dizilimleri.*

IKBKB	Nükleer Faktör Kappa-B Kinaz Alt Birim Beta İnhibitörü	Forward: 5'-CACGGATCCACGTATGG -3' Reverse: 5'-CCCGTGACCATGTTCAAGATA-3'
IKBKG	B-Hücrelerinde Kappa Light Polipeptid Gen Arttırıcısının İnhibitörü	Forward: 5'-GACGTACTGGGCGAAGAGTC-3' Reverse: 5'-CCCTGTTCTGAAGGCAGGT-3'
IL12A	İnterlökin-12 Alfa Alt Birimi	Forward: 5'-CACTCCCAAAACCTGCTGAG -3' Reverse: 5'-TCTCTTCAGAAGTGCAAGGGTA-3'
IRAK1	İnterlökin-1 Reseptörü ile İlişkili Kinaz 1	Forward: 5'-TGGAGCCCAGTAGGTCAAGA-3' Reverse: 5'-GCTACCACGCCAGGCTAATA-3'
IRF1	Interferon Düzenleyici Faktör 1	Forward: 5'-GGCAAGGGCTGGCTTACT-3' Reverse: 5'-CCGCAGTCTCCGTAGGTC-3'
IRF2	Interferon Düzenleyici Faktör 2	Forward: 5'-CTCAGCAACATGGGGACTC-3' Reverse: 5'-TCCGGTTTGTGGAAGTGAC-3'
MAP3K7	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz Kinaz Kinaz 7	Forward: 5'- GAAGAAAAATAATGGAATGGAAGT-3' Reverse: 5'-GCCTGGTTTATTTCTCATTTGGT-3'
MAPK1	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz 1	Forward: 5'-CCCACACAAGAGGATTGAAGT-3' Reverse: 5'-CTCGTCACTCGGGTCGTAAT-3'
MAPK12	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz 12	Forward: 5'-AAGACCTCTGGCCGACCT-3' Reverse: 5'-GCTCTGAGGTTTCTGAGAGCAC-3'
MAPK13	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz 13	Forward: 5'-AAGGGCTTCTACAAGCAGGA-3' Reverse: 5'-TCGGGGACACGTAGGTCTT-3'
MAPK3	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz 3	Forward: 5'-GAGGGGAGGAGTGAGATG-3' Reverse: 5'-GACCCCTCGGTTCTACG-3'
MAPK8	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz 8	Forward: 5'-GCCAGCCTTGTCATTGTTCT-3' Reverse: 5'-TGTCCTCTCCCTCCATCTTT-3'
MAPK9	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz 9	Forward: 5'-TGACGGTGTGGAGGGTTT-3' Reverse: 5'-TAGGCACGCTCGCCTCTA-3'
NFKB1	Nükleer Faktör NF-kappa-B p105 Alt Ünitesi	Forward: 5'-TAGCCTGCCATGTTTGCTG-3' Reverse: 5'-AGCCAGGTGCAGTGCTGT-3'
NFKBIA	NFKB İnhibitörü Alfa	Forward: 5'-GCTGATGTCAATGCTCAGGA-3' Reverse: 5'-ACACCAGGTCAGGATTTTGC -3'
NFKBIB	NFKB İnhibitörü Beta	Forward: 5'-CCCTTCATTTGGCAGTGG-3' Reverse: 5'-CTGCCCTCAGGAGAAGCTC-3'
NLRP1	NACHT, LRR ve PYD Alanları Taşıyan Protein 1	Forward: 5'-TTGTTGACTAGGCGCTGTTT-3' Reverse: 5'-CTGGCTCCAGGTTTCTTC-3'
NLRP12	NACHT, LRR ve PYD Alanları Taşıyan Protein 12	Forward: 5'-CGGGAGCTGGACTTGAGTT-3' Reverse: 5'-GATGTTGCAGCCCCTCAG-3'
NLRX1	NLR Aile Üyesi X1	Forward: 5'-TTCCTGCGCCTCAACTTC-3' Reverse: 5'-CCATCAGGGACAAATTGGAG-3'
NOD1	Nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alanı içeren protein 1	Forward: 5'-CTGGTTGGCTTCAGCAATG-3' Reverse: 5'-GGTGGTGTGGTCCAGGAG-3'

Tablo 4.5. (Devam) *İnflamazom ile ilişkili genler ve primer dizilimleri.*

PEA15	Astrositik fosfoprotein PEA-15	Forward: 5-GAGAATAAGGAGCCTTTCTTATGGA-3' Reverse: 5'-TCTGCTGAAAAGAACCCTGTC-3'
PYCARD	CARD İçeren Apoptoz ile İlişkili	Forward: 5'-GAACTGGACCTGCAAGGACT-3' Reverse: 5'-TCCTCCACCAGGTAGGACTG -3'
PYDC1	Leke Benzeri Protein Pirin Alanı Taşıyan 1	Forward: 5'-CAATCCCCACCTCAACAATTT-3' Reverse: 5'-CTAGAGGGTCCCCCAGTTTC-3'
RAGE	Gelişmiş Glikasyon Son Ürünleri İçin Reseptör	Forward: 5'-GACGGTTGCTAGGGTGACA-3' Reverse: 5'-CCTCGAAGGAGAGCGTTAGA-3'
RELA	Nükleer Faktör NF-Kappa-B P65 Alt Birimi	Forward: 5'-AGGTCTCTGCCGGCTCTT-3' Reverse: 5'-TGGAGAGAGCCAGTGCTGT-3'
RIPK2	Reseptör-Etkileşimli Serin / Treonin- Protein Kinaz 2	Forward: 5'-TCAGCTCTGGTTTCGAGAAG-3' Reverse: 5'-CCGCAACACTAGGTCACGA-3'
SUGT1	SKP1 Homologunun G2 Alelini Baskılayıcı	Forward: 5'-CTCGGATGCCCTAATCGAC-3' Reverse: 5'-TGGTTTCTGTTCCAAAGCCTTA-3'
TAB1	TGF-Beta Aktifleştirilmiş Kinaz 1 (MAP3K7) Bağlayıcı Protein 1	Forward: 5'-TCATCTGTTGTAAACGTTTCAGGAG-3' Reverse: 5'-CCTGGCTCCTTTCCACCT-3'
TAB2	TGF-Beta Aktifleştirilmiş Kinaz 1 (MAP3K7) Bağlayıcı Protein 2	Forward: 5'-AAGGACGCTGCTTACTCAGAA-3' Reverse: 5'-TGCAGTGAGCTCATCTCTACG-3'
TIRAP	Toll-İnterlökin 1 Reseptörü (TIR) Alanı Taşıyan Adaptör Protein	Forward: 5'-CCTCCAATGTGTACTTTTGTGC-3' Reverse: 5'-TTCAGCAAAAAGAGGGGTCA-3'
TNF	Tümör Nekroz Faktör	Forward: 5'-CGCTCCCCAAGAAGACAG-3' Reverse: 5'-CCACGATCAGGAAGGAGAAG-3'
TNFSF4	Tümör Nekroz Faktör Süperailisi Üye 4	Forward: 5'-GCCAAGATTCGAGAGGAACA-3' Reverse: 5'-TGCAGGCAGATGTAGGTGAA-3'
TXNIP	Tiyoredoksin ile Etkileşen Protein	Forward: 5'-ATGCCCCTGAGTTCAAGTTC-3' Reverse: 5'-ACTGCACATTGTTGTTGAGGA-3'
ACTB	Aktin, beta	Forward: 5'-GCTACGAGCTGCCTGACG-3' Reverse: 5'-GGCTGGAAGAGTGCCTCA-3'

Tablo 4.6. *Epigenetik kromatin modifikasyonundan sorumlu enzimleri düzenleyen genler ve primer dizilimleri.*

Genler	Açılımı	Primer Dizilimi
RPS6KA5	Ribozomal Protein S6 Kinaz	Forward: 5'-GAAATGGATCCCACTTATTCTCC-3' Reverse: 5'-AGGAGCAACAAAGGAATAGCC-3'
KAT2B	Lizin Asetiltransferaz 2B	Forward: 5'-CCAGCTAGGCATCCAAACAG-3' Reverse: 5'-AGGGAAGATGAGGTTGAATTGTA-3'
HDAC4	Histon Deasetilaz 4	Forward: 5'-CTTGCTGGGAAACGAGCTT-3' Reverse: 5'-GTTTGCATTGGGTCTTTGCT-3'
NCOA1	Nükleer Reseptör Koaktivatör 1	Forward: 5'-TGCAGCAGAATGTCTTCCAG-3' Reverse: 5'-AAAGTTGGCCTCACCTTGG-3'
SETD2	SET Alanı İçeren 2	Forward: 5'-AGGAACGATCTCGTAAGAAGGA-3' Reverse: 5'-CCCTCACCATTTTCCATCAG-3'
MLL	Miyeloid/Lenfoid ya da Karma Kökenli Lösemi	Forward: 5'-AGCAGCTCTCATTTGCAGGT-3' Reverse: 5'-ATGAGGAACACAACCTGCATCA-3'
SETD4	SET Alanı İçeren 4	Forward: 5'-TCGAAGCTACTTAGGGGCATAC-3' Reverse: 5'-TGAAACTAAAAAGGTGCACAGC-3'
HDAC6	Histon Deasetilaz 6	Forward: 5'-GGCATGGCCATCATTAGG-3' Reverse: 5'-CCACGTGGTTGAACATGC-3'

Tablo 4.6. (Devam) *Epigenetik kromatin modifikasyonundan sorumlu enzimleri düzenleyen genler ve primer dizilimleri.*

AURKA	Aurora Kinaz A	Forward: 5'-GCAGATTTTGGGTGGTCAGT-3' Reverse: 5'-TCCGACCTTCAATCATTTC-3'
DOT1L	DOT-1 Benzeri, Histon H3 Metiltransferaz	Forward: 5'-CGTTTTAATTGACTATGACACCAAA-3' Reverse: 5'-GGCACGGTTGTACTTGTTCG-3'
CIITA	Sınıf II, Majör Doku Uyuşması Kompleks Transaktivatörü	Forward: 5'-CAGGGAGGCTTATGCCAATA-3' Reverse: 5'-TCTGGTCCTATGTGCTTGAAAA-3'
DNMT3A	DNA Metiltransferaz 3 Alfa	Forward: 5'-ACTACATCAGCAAGCGCAAG-3' Reverse: 5'-CACAGCATTCAATCCTGCAA-3'
CARM1	Koaktivatör İlişkili Arjinin Metiltransferaz 1	Forward: 5'-AACCACACCGACTTCAAGGA-3' Reverse: 5'-AAAAACGACAGGATCCAGA-3'
HDAC8	Histon Deasetilaz 8	Forward: 5'-GGCAGTTGGCAACACTCAT-3' Reverse: 5'-GTCAAGTATGTCCAGCATCGAG-3'
MLL5	Miyeloid/Lenfoid ya da Karma Kökenli Lösemi 5	Forward: 5'-AAGTCCTCCAAAAATGAGCAAG-3' Reverse: 5'-TGTGAATATTTCCCGTGTGC-3'
HDAC7	Histon Deasetilaz 7	Forward: 5'-CCATGGGGGATCCTGAGT-3' Reverse: 5'-GAGAACTCTCGGGCGATG-3'
PRMT5	Protein Arjinin Metiltransferaz 5	Forward: 5'-TGAATTGTGCGCTGAGTGC-3' Reverse: 5'-GGGATGCTCACACCATCAT-3'
HDAC5	Histon Deasetilaz 5	Forward: 5'-CAGCTACAGCTGGGCAAGAT-3' Reverse: 5'-CTCCTCAGGGTGGGTGGT-3'
KDM4C	Lizin Spesifik Demetilaz 4C	Forward: 5'-CCAAGAGAGTGAAAGCTCGATT-3' Reverse: 5'-GCTCCATAAAACGTGTCTTCAA-3'
AURKC	Aurora Kinaz C	Forward: 5'-ATTGCAGATTTTGGCTGGTC-3' Reverse: 5'-GTCCAGTGTCCCACACATTG-3'
PAK1	P21 Protein (Cdc42/Rac)-Aktive Edilmiş Kinaz 1	Forward: 5'-ACGGTTTGAGAAGATTGGACA-3' Reverse: 5'-GTGGCCACATCCATTGCT-3'
PRMT7	Protein Arjinin Metiltransferaz 7	Forward: 5'-GAGGACCTACAGGGCAGAAA-3' Reverse: 5'-CAGCAGGCTGGTAGTGAAGA-3'
SETDB2	SET Alanı, Bifurkasyonlu 2	Forward: 5'-GTGGCATTCTTCACCAACAG-3' Reverse: 5'-CCCACATTGGCAGAAAGATTT-3'
SETDB1	SET Alanı, Bifurkasyonlu 1	Forward: 5'-GCATCAAGGATGAGGGAGAC-3' Reverse: 5'-CATCTTGTTTCGGTCGTCAG-3'
SETD6	SET Alanı İçeren 6	Forward: 5'-GGATGAAAAGGAGCCCAACT-3' Reverse: 5'-CTACCATCCGAAGACAATTGCG-3'
KAT5	Lizin Asetiltransferaz 6	Forward: 5'-GGTTTTTCCCCAGAATGGAG-3' Reverse: 5'-TCAGAGCTGTCCTGGGAGTC-3'
UBE2A	Ubikuitin Bağlayıcı Enzim E2A	Forward: 5'-TGTGTCTTCCATTCTAACATCCA-3' Reverse: 5'-TGCAGAAACACGCTTTTCATA-3'
NSD1	Nüklear Reseptör Bağlayıcı SET Alan Proteini 1	Forward: 5'-GGAATCCCAGTTTGACACC-3' Reverse: 5'-GTTTCTTCTCTGACCGCACA-3'
KDM5C	Lizin Spesifik Demetilaz 5C	Forward: 5'-CGAACGCATTGTTTATCCCTA-3' Reverse: 5'-CAAATGGACGTGTGTTACTG-3'
SETD7	SET Alanı İçeren 7	Forward: 5'-ATGGATAGCGACGACGAGA-3' Reverse: 5'-TAATCCGTCATCGTCCAGGT-3'
KDM4A	Lizin Spesifik Demetilaz 4A	Forward: 5'-ATGGAAGGGGTGGAGGAT-3' Reverse: 5'-TTTGTCCCTATTCGGTGCTT-3'
PRMT6	Protein Arjinin Metiltransferaz 6	Forward: 5'-GAGGGGAGGGAAGTGAAGAG-3' Reverse: 5'-CCGTTCCCGCTTAGTCCT-3'
SUV420H1	Çeşitlilik Baskılayıcı 4-20 Homolog 1	Forward: 5'-CCTCTCAGGAGTCGGTATGC-3' Reverse: 5'-GGTTTCCCTAGAAGGCATCA-3'
MYST2	MYST Histon Asetiltransferaz 2	Forward: 5'-GACGATCTGCTCGAGTCACC-3' Reverse: 5'-ATTCGAACAGGACTGGAATCT-3'

Tablo 4.6. (Devam) *Epigenetik kromatin modifikasyonundan sorumlu enzimleri düzenleyen genler ve primer dizilimleri.*

HDAC3	Histon Deasetilaz 3	Forward: 5'-TGCATTGTGCTCCAGTGTG-3' Reverse: 5'-CTTGACATATTCAACGCATTCC-3'
DZIP3	DAZ ile ilişkili Protein 3	Forward: 5'-TCAACAAGGAATTGCTCTACAGTC-3' Reverse: 5'-TCTTCTTCCTCATTCTGTAACTCTTCT-3'
EHMT2	Histon-Lizin-N-Metiltransferaz, H3 Lizin-9 Spesifik 3	Forward: 5'-GGGACCTTCATCTGCGAGTA-3' Reverse: 5'-TCTCACATCAGCCTCAGCAT-3'
SETD5	SET Alanı İçeren 5	Forward: 5'-AAGCAGGACAACATATCAGGTG-3' Reverse: 5'-CACAGTGGAAGGAGAAAGCTC-3'
SMYD3	SET ve MYND Alanı İçeren 3	Forward: 5'-TATCCTCCAGACTCCGTTCCG-3' Reverse: 5'-TGAAGGTGCTCCATCCATAA-3'
UBE2B	Ubikuitin Bağlayıcı Enzim 2B	Forward: 5'-GCTGGATGAACCGAATCCTA-3' Reverse: 5'-TCATATTCTCGTTTGTTCCTGA-3'
KDM5B	Lizin Spesifik Demetilaz 5B	Forward: 5'-TAGAACCCGAGGAGACAACG-3' Reverse: 5'-TGCTTGATGCTACTCTTCATTCT-3'
WHSC1	Wolf-Hirschhorn Sendrom Adayı 1	Forward: 5'-ATGGGCAGCTTAAAATGTGG-3' Reverse: 5'-ACAGCTGGGTTCTCACTTCAG-3'
DNMT1	DNA Metiltransferaz 1	Forward: 5'-GATGTGGCGTCTGTGAGGT-3' Reverse: 5'-CCTTGCAGGCTTTACATTTCC-3'
HDAC11	Histon Deasetilaz 11	Forward: 5'-CTCCAGGGCTACCATCATTG-3' Reverse: 5'-TTGTCGTCCATGAAGTCTCG-3'
SETD1A	SET Alanı İçeren 1A	Forward: 5'-GAGACAGAGGTGTGCGATGG-3' Reverse: 5'-CAGAGAACATTTGGAAGACGAA-3'
ATF2	Transkripsiyon Faktör Aktivatörü 2	Forward: 5'-TGAAGTGGCACAGCTGAAAC-3' Reverse: 5'-TCTTCTGAACTATCATCTTTATCAGCA-3'
KAT2A	Lizin Asetiltransferaz 2A	Forward: 5'-GTTGTGAGCACCCTTGG-3' Reverse: 5'-TCTCCACATCCACCACCA-3'
KDM6B	Lizin Spesifik Demetilaz 6B	Forward: 5'-CACCCACTGTGGTCTGTTGT-3' Reverse: 5'-TGTCTCCGCTCAGTAACAG-3'
PRMT3	Protein Arjinin Metiltransferaz 3	Forward: 5'-ACTAGTGTGCTTGCAGGACCTC-3' Reverse: 5'-AGCTTTCTGTTTCGTATTTTGTCT-3'
SETD1B	SET Alanı İçeren 1B	Forward: 5'-CCTGAGCGAGCTCCAGAA-3' Reverse: 5'-GGCAAGGGGAGCATCATA-3'
ASH1L	Ash1 Benzeri	Forward: 5'-CATTCCCTTGGAGGCTGTAG-3' Reverse: 5'-CCTTTACTCCTTTGGGTCTCC-3'
PRMT1	Protein Arjinin Metiltransferaz 1	Forward: 5'-CCCAACGCCAAGAACAAC-3' Reverse: 5'-AGCTGGCCCTTGAAGTCC-3'
HDAC2	Histon Deasetilaz 2	Forward: 5'-TTGTTTCAATCTAACAGTCAAAGGTC-3' Reverse: 5'-CAACATTACGGATTGTGTAGCC-3'
PRMT2	Protein Arjinin Metiltransferaz 2	Forward: 5'-GACGTGCTGGTGTCTGAGTG-3' Reverse: 5'-GGCATACAGGATGGACTCG-3'
RNF2	Yüzük Parmağı Proteini 2	Forward: 5'-TGAAGATACAGGCCATGAACAG-3' Reverse: 5'-TCTGCTCCACTACCATTTTCAA-3'
HAT1	Histon Asetiltransferaz 1	Forward: 5'-GGTGATCGTAGCTCGGAAAT-3' Reverse: 5'-TGTTACATTTGTACTCTGCCAGTTT-3'
SUV39H1	Çeşitlilik Baskılayıcı 3-9 Homolog 1	Forward: 5'-CATGGAGTACGTGGGAGAGAT-3' Reverse: 5'-CCTGACGGTCGTAGATCTGG-3'
MYST3	MYST Histon Asetiltransferaz 3	Forward: 5'-ACAAAGCCCACGCTGAAG-3' Reverse: 5'-ATTGTGGTGTTCGCGCTTT-3'
KDM1A	Lizin Spesifik Demetilaz 1A	Forward: 5'-CCACATTCGCAAAAGGAAAC-3' Reverse: 5'-AGCCATAGGATTCCTCCA-3'
MLL3	B Melanoma Antijen Ailesi, 3. Üye	Forward: 5'-GAAAAAGGAAACCATACAGACCA-3' Reverse: 5'-TTGCCAGTTCGACTTCTTT-3'

Tablo 4.6. (Devam) *Epigenetik kromatin modifikasyonundan sorumlu enzimleri düzenleyen genler ve primer dizilimleri.*

AURKB	Aurora Kinaz B	Forward: 5'-ATTGCTGACTTCGGCTGGT-3' Reverse: 5'-GTCCAGGGTGCCACACAT-3'
SETD8	SET Alanı İçeren 8	Forward: 5'-AGTGGGAAGGAAGAAGGAATG-3' Reverse: 5'-GTCGGTGATCTCGATGAGG-3'
SETD3	SET Alanı İçeren 3	Forward: 5'-CCGAGTATTCTGTATGACTGAAGAAG-3' Reverse: 5'-GAAATTCCGAGTTCCCAAG-3'
MYST1	MYST Histon Asetiltransferaz 1	Forward: 5'-AGCAACATCTCCGTGTACGA-3' Reverse: 5'-CAGCAGACACAGGTTCTGACA-3'
MYST4	MYST Histon Asetiltransferaz 4	Forward: 5'-CGTTTGAAGTTCCAATTCTGGT-3' Reverse: 5'-ACTGCATTCCGGTGAAGAAC-3'
HDAC1	Histon Deasetilaz 1	Forward: 5'-CGATGGCCTGTTTGAGTTCT-3' Reverse: 5'-TTCACAGCGATGTCCGTCT-3'
CSRP2BP	CSRP Bağlayıcı Protein 2	Forward: 5'-ATAACAAGCCCCCAACGAT-3' Reverse: 5'-AAAGTTGGTTTTGAGGCTGCT-3'
CDYL	Kromodomain Protein, Y-benzeri	Forward: 5'-CAGCATCTCCGTGAGCAGT-3' Reverse: 5'-TTTGCAACAATCCTTTCAACCT-3'
DNMT3B	DNA Metiltransferaz 3 Beta	Forward: 5'-TCCTATCGAAAAGCCATGTACC-3' Reverse: 5'-GGTCCTCCAATGAGTCTCCA-3'
DPEP2	Dipeptidaz 2	Forward: 5'-TGGGAAGCGTTAGGAAGTTG-3' Reverse: 5'-GGCAGGTAGGTCAGGTGATT-3'
ESCO1	Uyum Kurulması 1 Homolog 1	Forward: 5'-AGGAATGGTTTTGTCTAATTTTCTTC-3' Reverse: 5'-CCTTTTGTGCTGCCGTTTAG-3'
ESCO2	Uyum Kurulması 1 Homolog 2	Forward: 5'-TGGCAGCTCTTACTCCAAGG-3' Reverse: 5'-ACAGATTTTCAGTGAAGTGTAAGG-3'
HDAC10	Histon Deasetilaz 10	Forward: 5'-GGGGAGGGACCTCTGAAC-3' Reverse: 5'-ACGCTCGATCTCGCACTC-3'
HDAC9	Histon Deasetilaz 9	Forward: 5'-GCACAAGATGCAAAGGATGAT-3' Reverse: 5'-TTAACCTGGACCGCACCTT-3'
MYSM1	Myb-benzeri, SWIRM ve MPN Alanları 1	Forward: 5'-ATATCGAAGGGGACGTGGTA-3' Reverse: 5'-AACTGATGCTGTATTTTCAACCACT-3'
NCOA3	Nüklear Reseptör Koaktivatörü 3	Forward: 5'-CAGGGCAGGGAGTTATTGAT-3' Reverse: 5'-CCACAAATAGGAAACCATCCA-3'
NCOA6	Nüklear Reseptör Koaktivatörü 6	Forward: 5'-AAGTGTGGAAAATGGACATCG-3' Reverse: 5'-GATTGCACCGCACTGGTTAT-3'
NEK6	NIMA-ilişkili Kinaz 6	Forward: 5'-TTGGACTCGTTTATCGAAGACA-3' Reverse: 5'-GCCGCTTCTGCTTCTTAAAGT-3'
PRMT8	Protein Arjinin Metiltransferaz 8	Forward: 5'-GATTGAAGGTGGGGCAGTC-3' Reverse: 5'-CAGGTCATGTCAAAGCCATAGA-3'
RNF20	Yüzük Parmağı Proteini 20	Forward: 5'-AGGACCCAAGCCTTAGAGATG-3' Reverse: 5'-CCAACTCCAGTTGTGCTTTG-3'
RPS6KA3	Ribozomal Protein S6 Kinaz	Forward: 5'-GCAAATTATGGATGAACCTATGG-3' Reverse: 5'-TTGCAATTTCTTTGATACTGACTTCT-3'
USP21	Ubikuitin Spesifik Peptidaz 21	Forward: 5'-TCTTTCCTCCATGTTTCCAGA-3' Reverse: 5'-CACACTGGGAGCATCTTGTG-3'
USP16	Ubikuitin Spesifik Peptidaz 16	Forward: 5'-GCTCCTCTGTTCTTACTCTTCA-3' Reverse: 5'-TGTGTTTGTAACTTTGCGTAGG-3'
USP22	Ubikuitin Spesifik Peptidaz 22	Forward: 5'-ACGTCACCTGCCAAGTCTG-3' Reverse: 5'-GGGGAGATCCAAGCTGATG-3'
ACTB	Aktin Beta	Forward: 5'-TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA-3' Reverse: 5'-CGTGGATGCCACAGGACT-3'

4.7. Amiloid Beta ile Oluşturulmuş Nörotoksisite Hücre Modelinde Epigenetik Mekanizmalar Üzerine Etkili İlaçların Nöroprotektif Etkilerinin Araştırılması

4.7.1. Amiloid Beta ile indüklenen nörotoksisite modelinin oluşturulması

Alzheimer hastalığındaki patolojik bozulma, esasen amiloid prekürsör proteinden (APP), β ve γ -sekretazların ardışık eylemiyle üretilen β -amiloid ($A\beta$) peptidinin aşırı üretilmesiyle ilişkilidir. Alzheimer hastaları üzerinde yapılan çalışmalarda iki çeşit $A\beta$ varyantına rastlanmıştır: $A\beta$ (1-40) ve (1-42). Bu formlardan $A\beta$ (1-42) varyantı, Alzheimer hastalarında daha baskın olarak bulunan toksik formdur (Findeis, 2007).

Deney öncesinde SH-SY5Y hücre hattı, %1 fötal sıgır serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisin ve 10 μ M retinoik asit içeren EMEM farklılaşma besiyeri içerisinde her kuyuda 5×10^3 hücre olacak yoğunlukta xCELLigence cihazı ile uyumlu altın elektrotlar içeren özel plakalara ekim yapılmış ve cihaz üzerinden gerçek zamanlı olarak gözlenerek 5 gün süreyle nöronal fenotipe farklılaşma sağlanmıştır. Farklılaşma sağlandıktan sonra, nöroprotektif etkinin belirlenmesi amacıyla mevcut besiyeri içerisinde toksik olmadığı belirlenen Trikostatin A, Givinostat (ITF2357), RG108 ve rifampinin 100 nM, LPS/IFN- γ 'nın 100 ng/ml ve Cpn/IFN- γ lizatının 1 μ g/ml konsantrasyonlarını içeren besiyerleri ile değiştirilmiş ve 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Deneyin öncesinde 0.02 M NaOH içeren PBS içerisinde çözülmüş Ham's F12 Nutrient Mixture besiyeri ile 50 μ M konsantrasyonda dilüe edilen β -amiloid (1-42) proteini 37 $^{\circ}$ C'lik inkübatörde 7 gün bekletilerek peptit agregatlarının oluşumu sağlanmıştır. İlaç konsantrasyonları ile 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 50 μ M konsantrasyonda β -amiloid (1-42) peptit agregatları taze besiyeri ile 5 μ M'a seyreltilerek 100 μ l besiyeri içerisinde kuyucuklara eklendikten sonra xCELLigence Real-Time Cell Analyzer cihazında hücre canlılığı verileri 24 saat boyunca gerçek zamanlı olarak analiz edilmiştir (Kucukkilinc vd., 2017).

4.7.2. Akış sitometride immünofloresans boyama yöntemi ile $A\beta$ agregatlarının belirlenmesi

Nörotoksisite modelinde oluşturulan $A\beta$ agregatlarının ve konsantrasyon gruplarının bu agregatlar üzerindeki nöroprotektif etkisinin belirlenmesi amacıyla, akış sitometri yardımıyla $A\beta$ agregatlarının kantitatif olarak ölçümü yapılmıştır. Bu amaçla, 24 kuyucuklu

plakalara 25×10^3 yoğunlukta ekilen farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri üzerine A β nörotoksisite modeli uygulanmış ve inkübasyon süreleri sonunda, Immunofluorescence Application Solutions Kit (Cell Signaling Technology, Kat. No: 12727) ile kit protokolüne uygun olarak boyanmıştır. Öncelikle hücreler 1xPBS solüsyonu ile yıkanmış ve tripsin yardımıyla plakadan kaldırılarak 15 mL'lik santrifüj tüpleri içerisinde %4 formaldehit ile oda sıcaklığında 15 dakika fikse edilmiştir. Hücreler 1xPBS ile 3 kez yıkanmış ve soğuk %100 metanol ile -20 °C'de 10 dakika bekletilerek permeabilize edilmiştir. Hücreler yıkandıktan sonra sonra birincil antikorun β -Amyloid (1-42 Specific) (D9A3A) Rabbit mAb'nin (Cell Signaling, 14974S) özgül olmayan bağlanmalarını önlemek amacıyla hücreler kit içerisinde yer alan bloklayıcı solüsyonuyla 1 saat inkübe edilmiştir. Antikorları sulandırmak amacıyla kit içerisinde yer alan antikor dilüsyon solüsyonu kullanılmış ve birincil antikor 1:500 oranında dilüe edilmiştir. Sulandırılan antikor her kuyucuğa 200 μ l dağıtılmış ve plaka bir gece +4 °C'de bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonunda, birincil antikorlu karışım kuyucuklardan çekilip atılmış ve hücreler 1xPBS ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkama sonrasında birincil antikorda kullanılan aynı solüsyonla 1:500 oranında sulandırılan ikincil antikor (Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor 594 Conjugate), Cell Signaling Technology (Kat. No: 8889) her kuyucuğa 200 μ l dağıtılmış ve 1 saat karanlıkta, oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonunda hücreler, soğuk 1xPBS ile bir kere yıkanmış ve sonrasında 400 μ l PBS içerisinde BD Accuri™ C6 akış sitometri cihazında analiz edilmiştir.

4.7.3. Akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi

Alzheimer hastalığında gözlenen senil plakların ana bileşeni olan hidrofobik A β peptidinin birikiminin, hastalarda bilişsel işlev bozukluğunun ilerlemesi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. A β proteininin, hem *in vitro* hem de *in vivo* nörotoksik etkileri vardır ve özellikle nöron kültüründe A β maruziyetinin nöronal apoptoz ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Qin vd, 2009).

Annexin V-PI ile yöntemi, sağlıklı hücre zarlarının iç kısmında bulunan fosfatidilserinin apoptotik hücrelerde hücre zarının parçalanması ile birlikte hücrenin dış kısmına çıkması temeline dayanır (Van Engeland vd., 1998). Floresan izotiyosiyanat (FITC) ve Annexin V'in hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı akış sitometri ile

ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Annexin V-FITC ve nekrotik boya olan propidyum iyodit ile akış sitometride boyama özelliklerine göre, canlı hücreler ([AnnexinV- /PI-]), erken apoptotik hücreler ([AnnexinV+ /PI-]), geç apoptotik hücreler ([AnnexinV+ /PI +]) ve nekrotik hücreler ([AnnexinV- /PI +]) birbirinden ayırt edilebilmektedir (Overbeeke vd., 1998; Tesarik vd., 1998).

24 kuyucuklu plakalara 25×10^3 yoğunlukta ekilen farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri üzerine A β nörotoksisite modeli uygulanmış ve 24 saat inkübasyon süresi sonunda plakadan tripsin yardımıyla kaldırılmıştır. Daha sonra, CF 488A Annexin V and PI Apoptosis Kit (Biotium, Kat. No: 30061) protokolüne uygun olarak boyama yapılmıştır. Hücreler 1xPBS ile yıkandıktan sonra kit içerisinde yer alan Annexin V bağlama tamponu ile PI dilüe edilerek çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Santrifüj tüplerine alınarak 100 μ l Annexin V bağlama tamponu ilave edilen örnekler 5 μ l Annexin V ve 2 μ l PI çalışma solüsyonu eklenmiştir. Örnekler 30 dakika buzda ve karanlıkta inkübe edildikten sonra her tüpe 400 μ l Annexin V bağlama tamponu eklenmiş ve örnekler BD Accuri C6 akış sitometri cihazında ölçülerek analiz edilmiştir (Kaya-Tilki vd., 2016).

4.7.4. Toplam reaktif oksijen türevleri (ROS) miktarının belirlenmesi

Nörodejeneratif hastalıkların patojenezinde, lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın ROS-aracılı oksidatif hasarı anahtar bir rol oynamaktadır (Łagowska-Lenard vd., 2008). Deney gruplarının, A β nörotoksisite modeli uygulanan SH-SY5Y hücrelerindeki koruyucu etkilerini belirlemek amacıyla, toplam ROS miktarının ölçümü Total ROS/Superoxide Detection Kit (ENZ-51010, Enzo) ile kit prosedürüne uygun şekilde yapılmıştır. %1 FBS, %1 Penisilin-streptomisin ve 10 μ M retinoik asit içeren EMEM farklılaşma besiyeri ile 2×10^4 yoğunlukta 96 kuyucuklu plakaya ekilen SH-SY5Y hücreleri ve 5 gün inkübasyonda farklılaşmaya bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra hücrelere önce 24 saat konsantrasyonlar (100 nM TSA, Rifampin, RG108 ve Givinostat; 100 ng/ml LPS ve 1 μ g/ml Cpn + 10 nM IFN- γ) uygulanmıştır. Deneyden 30 dakika önce negatif kontrol gruplarına ROS inhibitörü 5 mM N-asetil sistein (NAC) uygulanmış ve yarım saat inkübe edildikten sonra kit içerisinde bulunan “ROS/Superoxide Detection Solution” kuyucuklara 100 μ L eklenmiştir. Aynı işlem

kit prosedürüne göre ROS inhibitörü 5 mM N-asetil sistein (NAC) uygulaması yapılmadan da kontrollü olarak yapılmıştır. Boyanmış hücrelerin florometrik analizi, 490/525 nm ve 550/620 nm filtre setleri kullanılarak, Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (BioTek) cihazında okuma yapılarak analiz edilmiştir (Zhao vd., 2013).

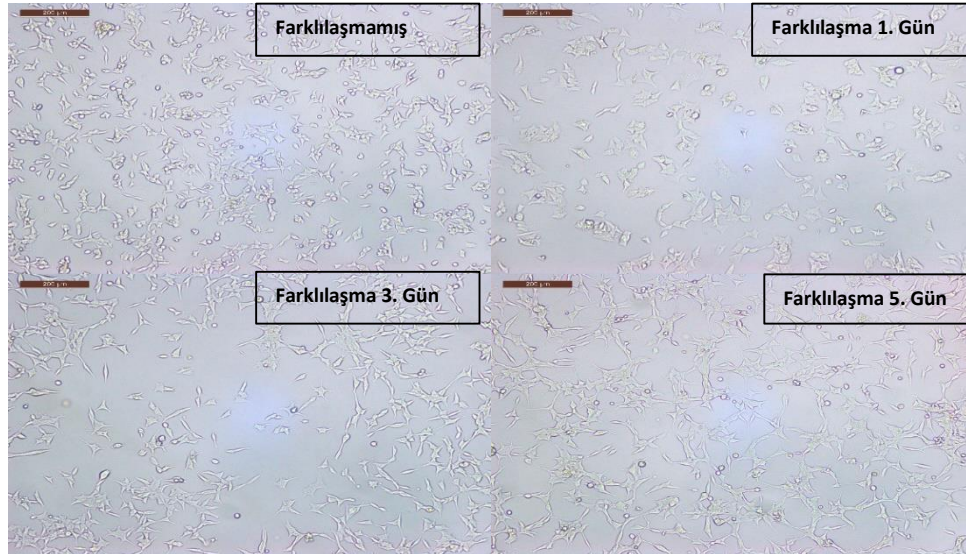
4.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler ve grafiklerin çizilmesi için GraphPad Prism 6.0 programı kullanılmıştır. Elde edilen veriler tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak analiz edilmiştir. Anlamlılık değerleri; $p > 0.05$ fark yok, $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$ ve $p < 0.0001^{****}$ olarak değerlendirilmiştir.

5. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1. SH-SY5Y Kültürü ve Farklılaştırma Çalışmalarının Değerlendirilmesi

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri farklılaşmamış haldeyken hızla proliferasyona uğrarlar ve kutuplaşmamış halde bulunurlar. Genellikle kümeler halinde büyürler ve olgunlaşmamış nöron belirteçlerini ifade etmektedirler (Kovalevich ve Langford, 2013). Farklılaştıklarında ise proliferasyon azalır, kutuplaşma artar ve dallanmış, uzun nörit gelişimi başlar (Gimenez-Cassina vd., 2006; Kovalevich ve Langford, 2013). Primer nöron kültürünün her zaman mümkün olmaması, etik problemler ve sınırlı sayıda bölünme kapasitesi nedeniyle, araştırmacıların SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerini kültür ortamının manipülasyonu yoluyla daha olgun, nöron benzeri bir fenotipe sahip hücrelere farklılaştırabilmesi, sinirbilim araştırmaları alanında sayısız fayda sağlamıştır (Kovalevich ve Langford, 2013). SH-SY5Y hücreleri öncelikle %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren EMEM büyüme besiyerinde %70-80 yoğunluğa ulaşana kadar büyütülmüş, sonrasında ise %1 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve 10 μ M retinoik içeren farklılaşma besiyeri içerisinde 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler farklılaşma süresi boyunca 0., 1, 3. ve 5. gün fotoğraflanmıştır. SH-SY5Y hücrelerinin kutuplaştığı, dallandığı ve nörit gelişiminin başladığı **Şekil 5.1.**'de görülmektedir.

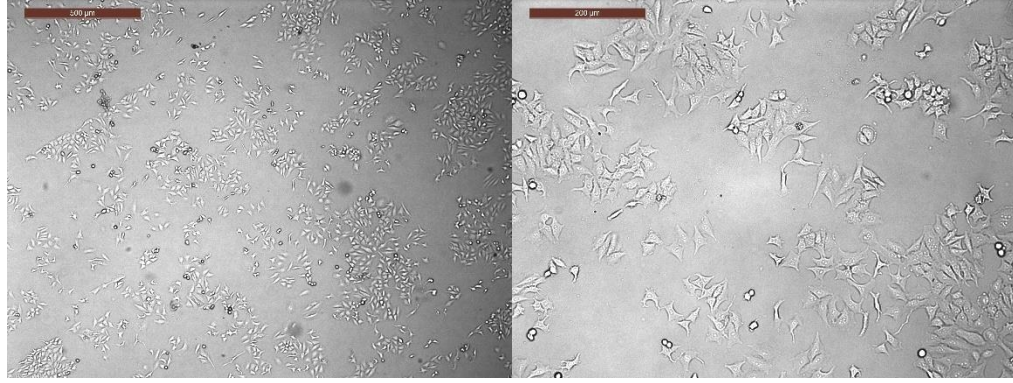


Şekil 5.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattının 5 gün süreyle nöronal fenotipe farklılaştırılması (Mikroskop büyütmesi 10x, bar çubuğu: 200 μ m).

Literatürde yer alan çalışmalarda, kromozom olarak stabil insan SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattının olgun nöronal hücelere farklılaşma yeteneği daha önce gösterilmiştir (Biedler vd., 1973; Encinas vd., 2000; Gimenez-Cassina vd., 2006; Christensen vd., 2011; Shipley vd., 2016; Shipley vd., 2017). SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri, ana hücre hattı SK-N-SH'den türetilmiş bir alt klondur. Farklılaşmamış, bölünebilen SH-SY5Y hücreleri yaklaşık olarak 3-10 günde terminal olarak farklılaşır. Terminal olarak farklılaşma, hücrelerin artık bölünmediği, nörotrofine bağımlı hale geldiği ve nöronal bir fenotipe sahip olduğu durum olarak tanımlanmaktadır. Bu dönüşüm sırasında epitel benzeri hücreler, RA eklenmesi ve serum düzeyi düşürülerek serum açlığı aracılığıyla ortadan kaldırılır. Serum açlığının epitel hücrelerde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Allsopp vd., 2000; Schamberger vd., 2005). RA ise nöronal hücrelerde tirozin reseptör kinaz (Trk) B'yi aktive ederek sadece nörotrofine bağımlı hücrelerin hayatta kalmasına yol açar (Påhlman vd., 1995; Encinas vd., 2000; Patapoutian ve Reichardt, 2001). Sonuç olarak, çok az epitel hücresi kalır veya hiç kalmaz, bu da olgun insan nöronlarına benzeyen homojen bir hücre popülasyonuna yol açar ve farklılaşmış SH-SY5Y hücre hattının primer nöron kültürü modeli olarak kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır.

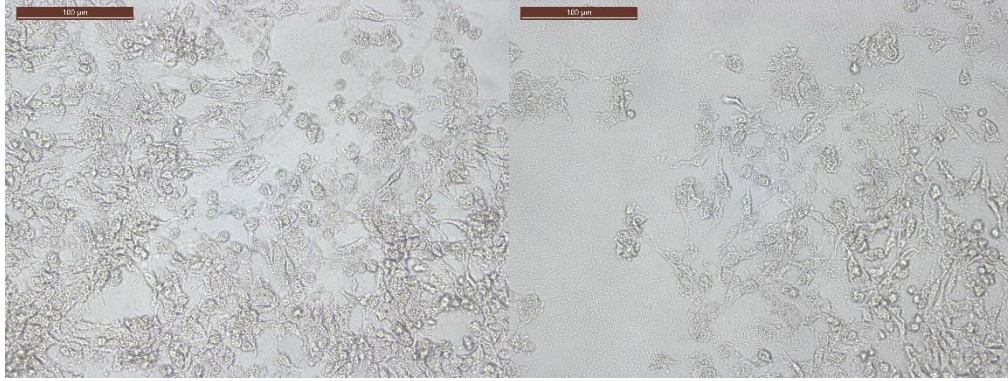
5.2. *Chlamydiophila pneumoniae* Kültürü ve Lizatların Hazırlanması Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Cpn'nin hücre kültüründe izole edilmesi zor bir organizma olması sebebiyle insan epitelyal karsinoma hücresi olan HEP-2 hücre hattı konakçı olarak kullanılmış ve Cpn inokülasyonu sağlanmıştır. Bu amaçla HEP-2 hücreleri %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren EMEM medyumda %70-80 yoğunluğa ulaşana kadar %5 oranında CO₂ içeren 37 °C'lık inkübatörde inkübe edilmiştir. HEP-2 hücrelerinin görüntüsü **Şekil 5.2.**'de görülmektedir.



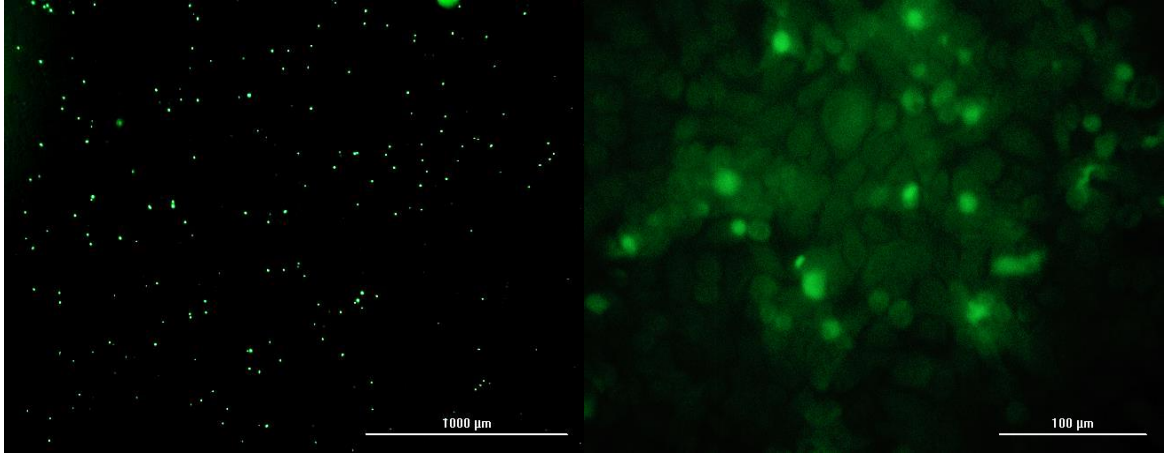
Şekil 5.2. HEP-2 hücrelerinin görüntüsü (Mikroskop büyütmesi: sol 4x, sağ 10x; bar çubuğu: sol 500 μ m, sağ 200 μ m).

Cpn inklüzyon cisimcikleri oluşturmak için HEP-2 hücreleri tripsin yardımıyla flasktan kaldırıldıktan sonra deneyden 48 saat önce 6 kuyucuklu plakada çoğaltılmıştır. 72 saat Cpn ile inkübe edilen HEP-2 hücrelerinin görüntüsü **Şekil 5.3.**'de yer almaktadır.



Şekil 5.3. Cpn ile muamele edilen HEP-2 hücrelerinin görüntüsü (Mikroskop büyütmesi: 20x, bar çubuğu: 100 μ m).

HEP-2 hücreleri konakçı olarak kullanılarak Cpn inklüzyon cisimcikleri oluşturulduktan sonra oluşum cins spesifik antikor boyası içeren Pathfinder *Chlamydia* Culture Confirmation System (Bio-Rad, Katalog no: 30701) ile doğrulanmıştır (**Şekil 5.4.**). Doğrulama sonrasında, inklüzyonlar sayılmış ve ortalamalar alınmış (12.5 IFU/ml), yöntemlerde açıklanan şekilde kuyucuklardan örnekler toplanmış ve liyofilize edilerek saklanmıştır.

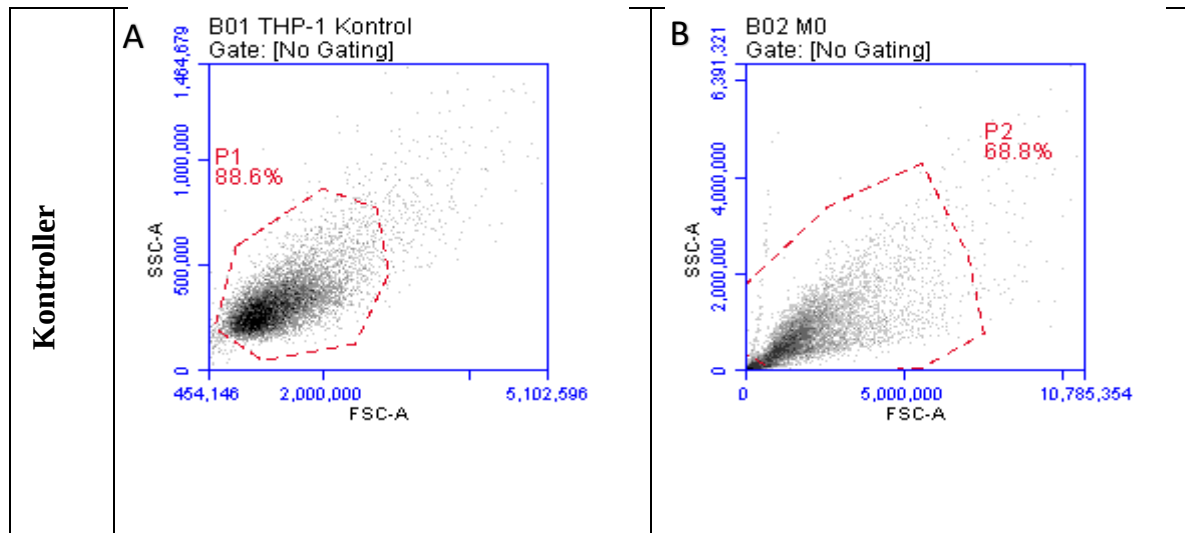


Şekil 5.4. *Cpn* inklüzyon cisimciklerinin görüntüsü (sol: 2.5x, sağ: 10x).

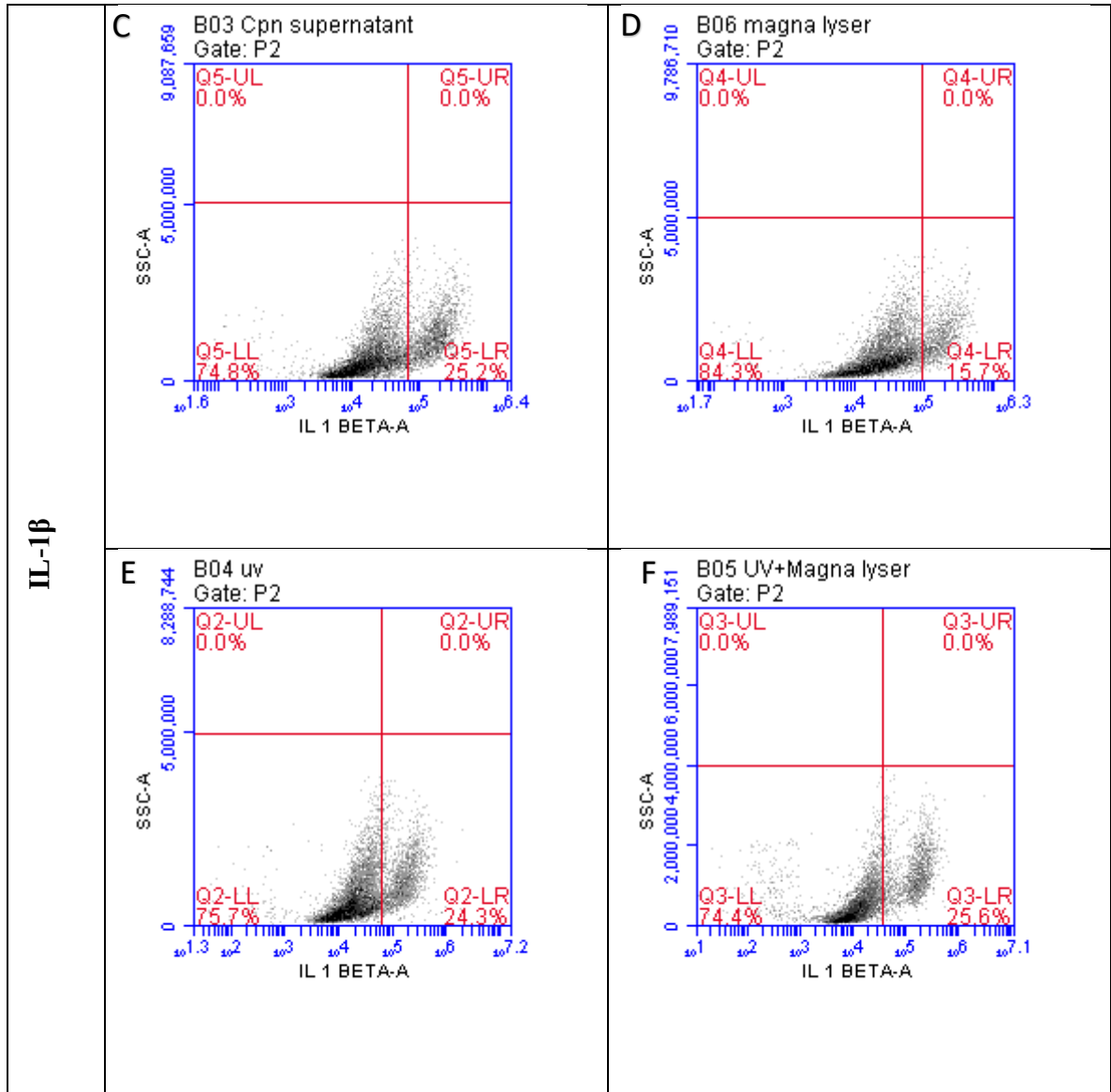
Daha önce bahsedildiği gibi klamidy ailesinin diğer üyelerinin aksine *Cpn* başlangıç kültürü, yayılması ve izolasyonu zor bir bakteridir. Hücre kültüründe büyümesi yetersiz ve oluşan inklüzyonlar diğer klamidyalarda görülenlerden daha küçük olmasına rağmen izolasyon en iyi şekilde hücre kültürüyle gerçekleştirilebilmektedir (Kuo vd., 1995). Kuo ve Grayston tarafından TW-183 ve AR39 suşları ile yapılan bir çalışmada, *Cpn*'nin ilk izolasyonu için HeLa 229 hücre hattının McCoy hücre hattına göre daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Kuo ve Grayston, 1988). Sonrasında Cles ve Stamm tarafından yapılan bir çalışmada, insan akciğer türevli bir hücre hattı olan HL hücrelerinin TW-183 suşu için başlangıç inokülasyonu ve pasaj için daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (Cles ve Stamm, 1990). Kuo ve Grayston daha sonra üç *Cpn* suşu (TW-183, AR39 ve AR388) kullanarak Cles ve Stamm'in bulgusunu doğrulamıştır (Kuo ve Grayston, 1990). Bahsedilen hücre hatlarında, *C. trachomatis* ile olduğu gibi, inokulumun tek katmanlı hücre tabakası üzerine santrifüjlenmesi ve konakçı hücre metabolizmasını inhibe etmek için kültür ortamına sikloheksimidin veya dietilaminoetil (DEAE)-dekstran gibi bir maddenin dahil edilmesi izolasyon duyarlılığını arttırmaktadır. Ancak Roblin ve arkadaşları tarafından HeLa 229, McCoy, HL, HEp-2, ve HTED hücre hatlarının, TW-183 suşu ve diğer iki klinik izolatin inokülasyonuna duyarlılıklarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, en duyarlı hücre hattının HEp-2 olduğu bildirilmiş ve aynı zamanda bu hücre hattında DEAE-dekstranla veya benzeri bir madde ile ön muamele gerekmediği gösterilmiştir. HEp-2 hücreleri DEAE-dekstran ile inokülasyon öncesinde muamele edildiğinde, bu madde HEp-2 hücrelerinde iyileşme

yönünde olumsuz bir etkiye sebep olmuş ve görülmesi zor, küçük inokülasyonlara sebep olmuştur (Roblin vd., 1992). Bütün bu bilgiler ışığında, diğer hücre hatlarının aksine pasaj ve ön muamele gerektirmemesi, özellikleri iyi bilinen ve ticari olarak satın alınabilen bir hücre hattı olması sebebiyle, çalışmamızda Cpn kültürü için HEp-2 hücre hattı tercih edilmiştir.

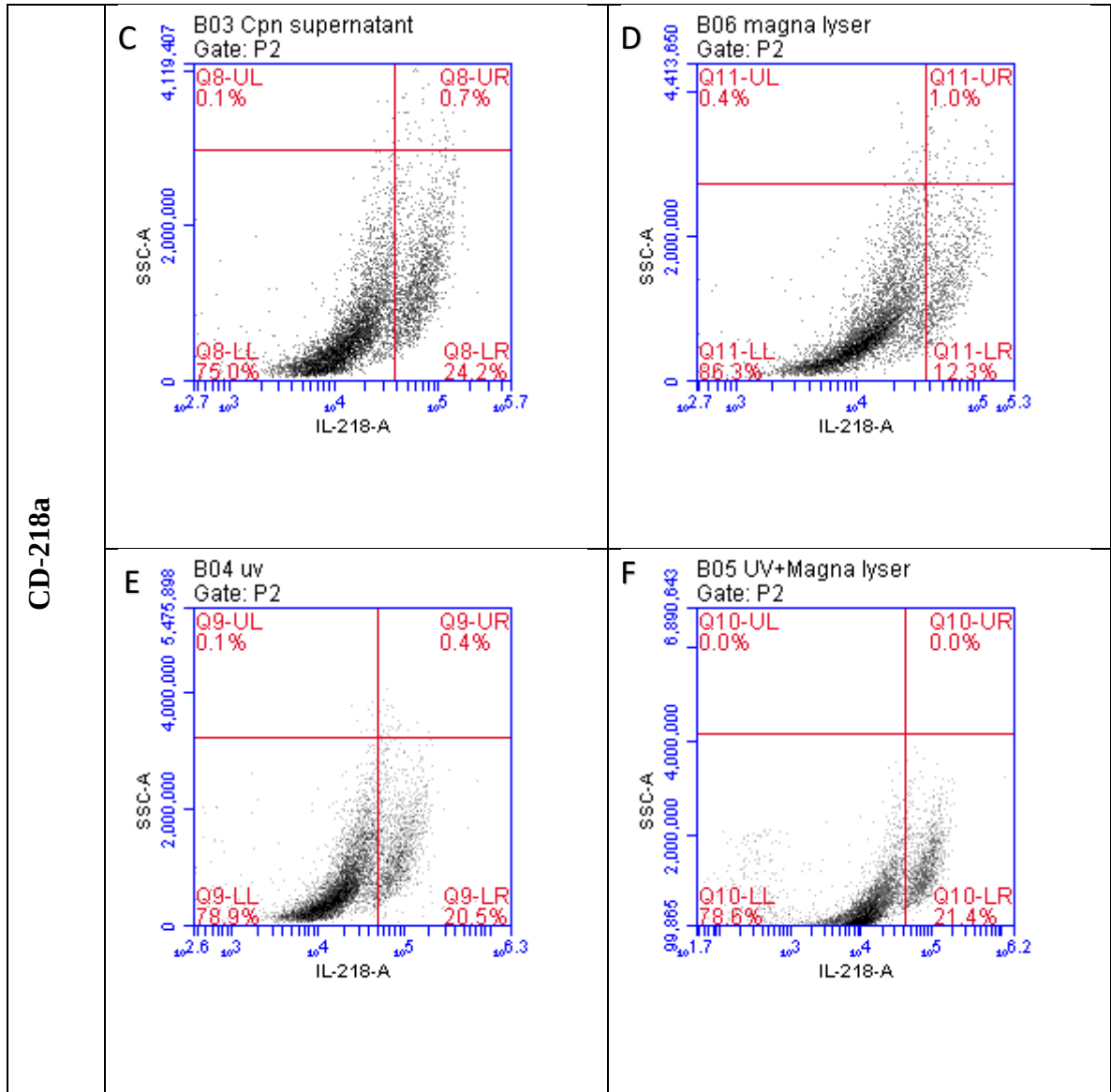
Hazırlanan Cpn örneklerinin THP-1 hücre aktivasyonu üzerindeki etkinliği sitokin çalışmasıyla karşılaştırılmıştır. Sitokin ölçümü sonuçlarına göre Cpn süpernatantı, süpernatantı atılan hücrelerin MagNA Lyser cihazında parçalanmış lizatı, 40 dakika UV ışığı altında bekletilmiş plaka tabanından kazınan hücreler, 40 dakika UV ışığı altında bekletilmiş plaka tabanından kazınan hücrelerin MagNA Lyser cihazında parçalanmış lizatından hazırlanan grupların, M0 makrofaj kontrol grubuna göre IL-1 β sitokin düzeyini sırasıyla %25.2, 15.7, 24.3 ve 25.6; ve CD218a için de sırasıyla %24.2, 12.3, 20.5 ve 21.4 oranında artırmıştır (**Şekil 5.5.**). Süpernatantı atılan hücrelerin MagNA Lyser cihazında lizis tamponu içerisinde parçalanmış lizatı ise hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi nedeniyle deney dışı bırakılmıştır. Deney sonuçlarına göre en yüksek sitokin artışı, IL-1 β için 40 dakika UV ışığı altında bekletilmiş plaka tabanından kazınan hücrelerin MagNA Lyser cihazında parçalanmış lizatı ile CD218a için ise Cpn süpernatantı olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.5. Akış sitometri yöntemiyle belirlenen IL-1 β ve CD218a sitokin miktarları. (A: THP-1 kontrol, B: M0 kontrol, C: Cpn süpernatantından elde edilen lizat, D: Süpernatantı alınan hücrelerin MagNA Lyser cihazında parçalanmış lizatı, E: UV ışığı altında bekletilmiş süpernatant içerisinde plaka tabanından kazınan hücrelerin lizatı, F: UV ışığı altında bekletilmiş süpernatant içerisinde plaka tabanından kazınan ve MagNA Lyser cihazında parçalanmış hücrelerin lizatı).



Şekil 5.5. (Devam) Akış sitometri yöntemiyle belirlenen IL-1 β ve CD218a sitokin miktarları.



Şekil 5.5. (Devam) Akış sitometri yöntemiyle belirlenen IL-1 β ve CD218a sitokin miktarları.

IL-1'in β (IL-1 β) formu, birçok hücre tipi tarafından salınan bir proinflamatuvar sitokindir ve enfeksiyon sırasında önemli bir inflamasyon aracısıdır. IL-1 β üretimi, birden fazla seviyede düzenlenme ve tipik olarak aktivasyon ve salım için iki ayrı sinyal gerektiren oldukça sıkı kontrol edilen bir süreçtir. Bir proinflamatuvar sinyal ilk olarak NF- κ B aktivasyonuna ve 35-kDa öncü proteini olan pro-IL-1 β 'nın sentezine yol açar. İkinci sinyal, pro-IL-1 β 'yı olgun ve biyolojik olarak aktif IL-1 β 'ya parçalayan, evrimsel olarak korunmuş bir sistein proteaz olan ve inflamazom olarak bilinen bir multiprotein kompleksi yoluyla

biyolojik olarak aktive edilmesi gereken bir protein olarak üretilen kaspaz-1'in aktivasyonunu içerir (Meylan vd., 2006). Bizim sonuçlarımıza benzer olarak, Cpn enfeksiyonunun IL-1 β da dahil olmak üzere, TNF- α , IL-6 ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokin ekspresyonunu indüklediği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Heinemann vd., 1996; Netea vd., 2000; Blessing vd., 2002). Sonrasında IL-1 β indüksiyonuna TLR2/MyD88 sinyalizasyonu aracılığıyla NLRP3 inflamazomunun aktivasyonunun aracılık ettiği bildirilmiştir (He vd., 2010; Shimada vd., 2011).

CD218a, diğer adıyla IL-18R1, bakteriler, virüsler ve protozoalar gibi hücre içi mikropolarla enfeksiyona karşı konak savunmasında kritik bir rol oynayan güçlü bir proinflamatuvar sitokindir. Bununla birlikte, bu faktörün aynı zamanda şiddetli inflamatuvar bozuklukları indüklemeye potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir, bu da IL-18'in astım gibi çeşitli inflamatuvar bozukluklarda patofizyolojik role sahip olduğunu düşündürmektedir (Nakanishi vd., 2001). TNF- α ve IL-1 β 'nin aksine, Cpn'nin, MyD88 bağımlı ancak TLR2, TLR4 ve CD14 bağımsız yollar aracılığıyla de novo protein sentezini içermeyen posttranskripsiyonel mekanizmaların aracılık ettiği, IL-18 üretimini indüklediği bildirilmiştir (Netea vd., 2004).

Nöroinflamasyon çalışmalarında model olarak genellikle farklılaştırılmış THP-1 hücreleri kullanılması nedeniyle, sitokin çalışmasında Cpn örneklerinin farklı yollardan aktive olan proinflamatuvar sitokinler üzerindeki etkinliği karşılaştırılmıştır (Lee vd., 2010; Little vd., 2012; Madeira vd., 2014; Lee vd., 2015). IL-1 β ve CD218a sitokin deneyi sonuçlarına göre UV ışığı altında bekletilerek inaktive edilen ve MagNA Lyser cihazında parçalanmış Cpn lizatı ve Cpn süpernatantından elde edilen lizat proinflamatuvar sitokin seviyelerini arttırmada en etkili olarak bulunmuştur. Cpn lizatı UV ışığı altında bekletilse de THP-1 hücrelerinde kontaminasyona neden olduğu için ileri çalışmalarımızda bu hücre lizatı elenerek Cpn süpernatantları toplanmış ve liyofilize edilip DMSO ile stok çözeltisi hazırlanmış (50 mg/ml) ve dilüe edilerek sonraki deneylerde kullanılmıştır.

5.3. Mikroglia Hücrelerini Aktive Eden *Chlamydiophila pneumoniae* Konsantrasyonunun LPS ile Karşılaştırılarak Belirlenmesi Çalışmaları

5.3.1. *Chlamydiophila pneumoniae* ve LPS'nin farklı konsantrasyonlarının IL-1 β , TNF- α ve IL-8 gen ekspresyonları üzerine etkileri

Farklı Cpn ve LPS konsantrasyonlarının proinflamatuvar sitokin aktivasyonu üzerine etkilerinin RT-PCR yöntemi ile gen ekspresyonu düzeyinde karşılaştırılabilmesi için HMC3 mikroglia hücreleri 1×10^6 yoğunlukta 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonrasında, Cpn veya LPS nin farklı konsantrasyonları (10, 100 ng/ml ve 1 μ g/ml) tekli ya da IFN- γ (10 ng/ml) ile kombine olarak hücreler üzerine uygulanmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. IFN- γ kullanılmadan tek başına 10, 100 ng/ml ve 1 μ g/ml LPS ve Cpn konsantrasyon gruplarının TNF- α geni mRNA ekspresyonu seviyeleri kontrol grubuna göre sırasıyla, 1.790, 13.780, 2.676 ve 2.434, 2.617, 8.937 kat artmıştır (**Tablo 5.1.**).

Tablo 5.1. Yalnızca LPS ve Cpn konsantrasyonları ile inkübe edilmiş HMC3 mikroglia hücrelerinde RT-PCR sonucunda hesaplanan TNF- α genine ait hedef/referans oranları ve normalize değerleri (n=3).

Gruplar	Hedef/Referans Oranı (TNF- α /ACTB)	Normalize Değer	Standart Sapma
Kontrol	4.44×10^{-5}	1.000	7.84×10^{-5}
LPS (10 ng/ml)	7.95×10^{-5}	1.790	1.04×10^{-2}
LPS (100 ng/ml)	6.12×10^{-4}	13.780	5.03×10^{-3}
LPS (1 μ g/ml)	1.19×10^{-4}	2.676	4.07×10^{-5}
Cpn (10 ng/ml)	1.08×10^{-4}	2.434	6.07×10^{-2}
Cpn (100 ng/ml)	1.16×10^{-4}	2.617	9.37×10^{-5}
Cpn (1 μ g/ml)	3.97×10^{-4}	8.937	8.65×10^{-5}

IFN- γ kullanılmadan yalnızca 10, 100 ng/ml ve 1 μ g/ml LPS ve Cpn konsantrasyon gruplarının IL-1 β geni mRNA ekspresyonu seviyeleri kontrol grubuna sırasıyla, 1.908, 3,328, 2.703 ve 1.040, 1.068, 1.405 kat artmıştır (**Tablo 5.2.**).

Tablo 5.2. Yalnızca LPS ve Cpn konsantrasyonları ile inkübe edilmiş HMC3 mikroglia hücrelerinde RT-PCR sonucunda hesaplanan IL-1 β genine ait hedef/referans oranları ve normalize değerleri (n=3).

Gruplar	Hedef/Referans Oranı (IL-1 β /ACTB)	Normalize Değer	Standart Sapma
Kontrol	1.74x10 ⁻³	1.000	7.77x10 ⁻⁴
LPS (10 ng/ml)	3.32x10 ⁻³	1.908	1.25x10 ⁻³
LPS (100 ng/ml)	5.79x10 ⁻³	3.328	1.78x10 ⁻³
LPS (1 μg/ml)	4.70x10 ⁻³	2.703	8.90x10 ⁻⁴
Cpn (10 ng/ml)	1.81x10 ⁻³	1.040	3.17x10 ⁻⁴
Cpn (100 ng/ml)	1.86x10 ⁻³	1.068	3.94x10 ⁻⁴
Cpn (1 μg/ml)	2.44x10 ⁻³	1.405	4.61x10 ⁻⁴

IFN- γ kullanılmadan yalnızca 10, 100 ng/ml ve 1 μ g/ml LPS ve Cpn konsantrasyon gruplarının IL-8 geni mRNA gen ekspresyonu seviyeleri kontrol grubuna sırasıyla, 2.453, 14.51, 5.819 ve 1.638, 0.7285, 0.2126 kat artmıştır (**Tablo 5.3.**).

Tablo 5.3. Yalnızca LPS ve Cpn konsantrasyonları ile inkübe edilmiş HMC3 mikroglia hücrelerinde RT-PCR sonucunda hesaplanan IL-8 genine ait hedef/referans oranları ve normalize değerleri (n=3).

Gruplar	Hedef/Referans Oranı (IL-8/ACTB)	Normalize Değer	Standart Sapma
Kontrol	8.62x10 ⁻⁵	1.000	3.75x10 ⁻⁵
LPS (10 ng/ml)	2.11x10 ⁻⁴	2.453	2.99x10 ⁻⁴
LPS (100 ng/ml)	1.25x10 ⁻³	14.51	6.02x10 ⁻⁴
LPS (1 μg/ml)	5.02x10 ⁻⁴	5.819	2.03x10 ⁻³
Cpn (10 ng/ml)	1.41x10 ⁻⁴	1.638	1.74x10 ⁻⁴
Cpn (100 ng/ml)	6.28x10 ⁻⁵	0.7285	4.16x10 ⁻⁵
Cpn (1 μg/ml)	1.83x10 ⁻⁵	0.2126	1.80x10 ⁻⁶

LPS (10, 100 ng/ml veya 1 µg/ml) ve Cpn (10, 100 ng/ml ve 1 µg/ml) ile IFN-γ (10 ng/ml) kombine konsantrasyonlarının kontrole (%0.1 DMSO) göre TNF-α geni mRNA ekspresyonu seviyeleri sırasıyla, 1.546, 1.414, 0.8201 ve 4.421, 3.621, 5.182 kat artmıştır (Tablo 5.4.).

Tablo 5.4. *HMC3 mikroglia hücrelerinde, LPS ve Cpn'nin farklı konsantrasyonlarının IFN-γ (10 ng/ml) ile kombine olarak inkübasyonu (24 saat) sonrasında TNF-α genine ait hedef/referans oranları ve normalize değerleri (n=3).*

Gruplar	Hedef/Referans Oranı (TNF-α/ACTB)	Normalize Değer	Standart Sapma
Kontrol	9.23x10 ⁻⁴	1.000	2.57x10 ⁻³
LPS (10 ng/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	1.59x10 ⁻³	1.546	1.37x10 ⁻²
LPS (100 ng/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	1.31x10 ⁻³	1.414	1.83x10 ⁻²
LPS (1 µg/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	7.57x10 ⁻⁴	0.8201	5.18x10 ⁻⁴
Cpn (10 ng/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	4.08x10 ⁻³	4.421	8.00x10 ⁻³
Cpn (100 ng/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	3.34x10 ⁻³	3.621	1.32x10 ⁻²
Cpn (1 µg/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	4.78x10 ⁻³	5.182	4.37x10 ⁻³

LPS (10, 100 ng/ml veya 1 µg/ml) ve Cpn (10, 100 ng/ml ve 1 µg/ml) ile IFN-γ (10 ng/ml) kombine konsantrasyonlarının kontrole (%0.1 DMSO) göre IL-1β geni mRNA ekspresyonu seviyeleri sırasıyla, 1.645, 3.212, 1.825 ve 3.160, 2.137, 2.172 kat artmıştır (Tablo 5.5.).

Tablo 5.5. *HMC3 mikroglia hücrelerinde, LPS ve Cpn'nin farklı konsantrasyonlarının IFN-γ (10 ng/ml) ile kombine olarak inkübasyonu (24 saat) sonrasında IL-1β genine ait hedef/referans oranları ve normalize değerleri (n=3).*

Gruplar	Hedef/Referans Oranı (IL-1β/ACTB)	Normalize Değer	Standart Sapma
Kontrol	2.99x10 ⁻²	1.000	2.99x10 ⁻²
LPS (10 ng/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	4.92x10 ⁻²	1.645	7.82x10 ⁻²
LPS (100 ng/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	9.61x10 ⁻²	3.212	0.1306
LPS (1 µg/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	5.46x10 ⁻²	1.825	0.1305
Cpn (10 ng/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	9.45x10 ⁻²	3.160	0.1928
Cpn (100 ng/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	6.39x10 ⁻²	2.137	0.3377
Cpn (1 µg/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	6.50x10 ⁻²	2.172	0.4096

LPS (10, 100 ng/ml veya 1 µg/ml) ve Cpn (10, 100 ng/ml ve 1 µg/ml) ile IFN-γ (10 ng/ml) kombine konsantrasyonlarının kontrole (%0.1 DMSO) göre IL-8 geni mRNA ekspresyonu seviyeleri sırasıyla, 3.070, 3.879, 13.64 ve 10.56, 32.72, 4.144 kat artmıştır (Tablo 5.6.).

Tablo 5.6. HMC3 mikroglia hücrelerinde, LPS ve Cpn'nin farklı konsantrasyonlarının IFN-γ (10 ng/ml) ile kombine olarak inkübasyonu (24 saat) sonrasında IL-8 genine ait hedef/referans oranları ve normalize değerleri (n=3).

Gruplar	Hedef/Referans Oranı (IL-8/ACTB)	Normalize Değer	Standart Sapma
Kontrol	2.32x10 ⁻⁴	1.000	7.58x10 ⁻⁵
LPS (10 ng/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	7.12x10 ⁻⁴	3.070	1.53x10 ⁻³
LPS (100 ng/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	8.99x10 ⁻⁴	3.879	3.45x10 ⁻³
LPS (1 µg/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	3.16x10 ⁻³	13.64	2.91x10 ⁻²
Cpn (10 ng/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	2.45x10 ⁻³	10.56	9.75x10 ⁻²
Cpn (100 ng/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	7.58x10 ⁻³	32.72	1.51x10 ⁻²
Cpn (1 µg/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	9.60x10 ⁻⁴	4.144	5.12x10 ⁻²

Reaktif glia veya nöroinflamasyonun varlığı tüm nörodejeneratif hastalıklarda tanımlanmıştır ve glial aktivasyon, özellikle de mikroglial aktivasyonun gözlemlenen nöropatolojilere katkıda bulunduğu bilinmektedir (Glass vd., 2010; Perry vd., 2010). Nöroinflamasyonun inhibisyonu, nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde ulaşılmak istenen bir hedef olarak görülmektedir ve pek çok araştırma, reaktif glia varlığında meydana gelen deneysel nörodejenerasyon modellerinde anti-inflamatuvar ajanların potansiyel nöroprotektif etkilerinin araştırılmasına odaklanmıştır. *In vivo* ve *in vitro* mikroglia arasındaki bariz farklılıklara rağmen, hücre kültürü yapılabilen *in vitro* mikroglia, farklı ajanların anti-inflamatuvar etkilerini incelemek için güçlü bir araçtır (Carson vd., 2008). Literatürde *in vitro* yaklaşımlar genellikle mikroglial aktivasyonda yer alan molekülleri ve yolları karakterize etmek için kullanılmaktadır. Birçok çalışmada, LPS veya IFN-γ gibi proinflamatuvar sitokinlerle muamele sonrasında glial aktivasyon karakterize edilmiş ve aday bileşiklerin potansiyel anti-inflamatuvar etkileri test edilmiştir. Tip II IFN (IFN-γ), ağırlıklı olarak yardımcı tip T hücreleri 1 (Th1), sitotoksik T lenfositleri ve doğal öldürücü hücrelerden (NK) salınan çözünür bir sitokindir (Colton, 2009). Özellikle, inme, multipl skleroz ve AH da dahil olmak üzere çeşitli nörolojik bozukluklarda ve hayvan modellerinde

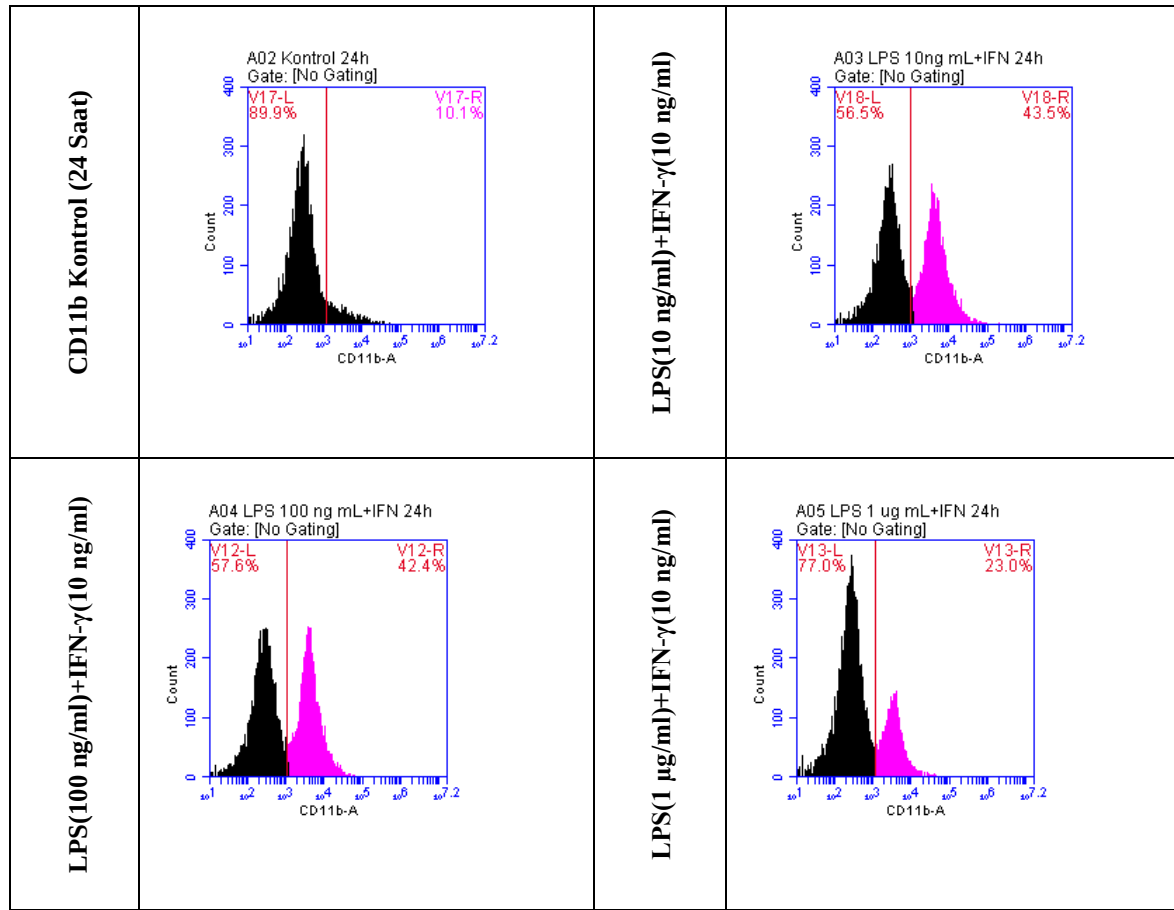
T hücreleri infiltrasyonu ve / veya yüksek düzeyde IFN- γ bildirilmiştir (Togo vd., 2002; Giunti vd., 2003; Heesen vd., 2006; Yılmaz vd., 2006; Murphy vd., 2010; Browne vd., 2013). Sonuçlarımıza benzer şekilde, IFN- γ 'nın hücrelerde bağışıklık sistemini harekete geçirmesi ve LPS'nin indükleyici etkisini artırması sebebiyle genellikle inflamasyon modellerinde LPS ve IFN- γ kombine halde kullanılmaktadır (Ucla vd., 1990; Hayes vd., 1995; Medvedev vd., 1998; Held vd., 1999).

Yapılan literatür taramasında, tek başına veya IFN- γ ile kombine halde LPS ve Cpn ile HMC3 mikrogliya hücrelerinin aktivasyonu sonrasında proinflamatuvar sitokin gen ekspresyonlarının araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak benzer sonuçlar Netea ve arkadaşları tarafından periferik kan mononükleer hücreleri ile yapılan bir çalışma ile elde edilmiştir. Sonike edilmiş 10^4 IFU/ml Cpn ile 24 saat boyunca inklüzyon sonrasında TNF- α ve IL-1 β sitokinlerinin üretimi kontrol grubuna göre sırasıyla beş ve iki kat artmışken, IL-6 ve IL-8 üretimi neredeyse 40 kat artmıştır (Netea vd., 2000). Lim ve arkadaşları tarafından THP-1 monosit hücrelerinin MOI = 1 Cpn ile enfekte edildiği bir çalışmada, enfeksiyondan 48 saat sonra doğuştan gelen veya adaptif bağışıklık sistemi ile ilgili gen ekspresyonlarının araştırıldığı bir çalışmadan elde edilmiştir. Cpn ile enfekte olmuş THP-1 insan monositleri, enfeksiyondan 48 saat sonra enfekte olmamış kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, TNF- α başta olmak üzere, 17 gende 4 kat veya daha fazla anlamlı bir ekspresyon artışı bildirilmiştir. Ayrıca, IL-1 β , IL-6, IL-8 sitokin sekresyonunun 5 güne kadar devam ettiği ve bu nedenle Cpn enfeksiyonunun sporadik / geç başlangıçlı AH'da inflamasyonun başlamasında potansiyel bir rolü olabileceği öne sürülmüştür (Lim vd., 2014). Russo ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da, HMC3 hücrelerinde 24 saat 100 ng/ml LPS ve sonrasında 30 dakika 5 mM adenosin trifosfat (ATP) ile muamele sonrasında TNF- α ve IL-1 β ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre sırasıyla 5.37 ve 4.71 kat artmıştır (Russo vd., 2018).

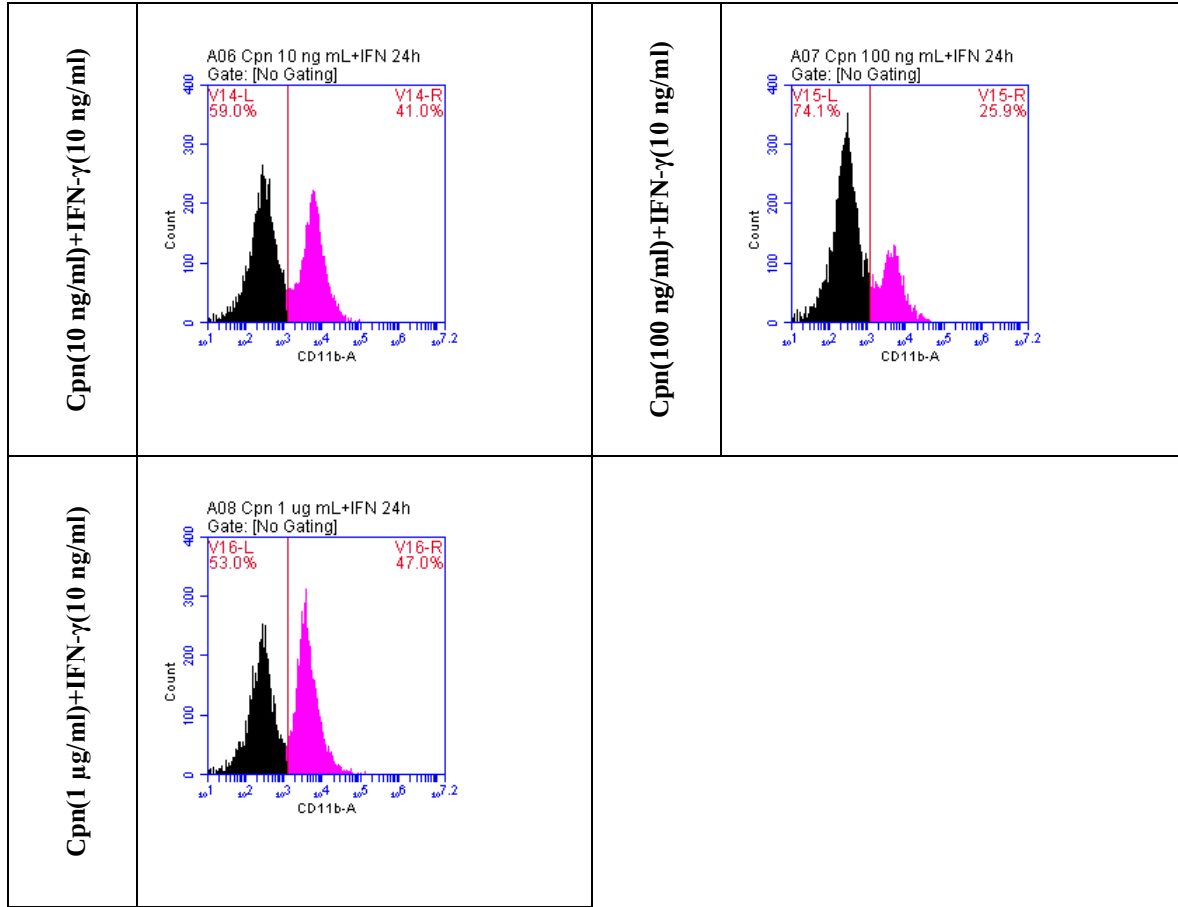
Tüm sitokin gen ekspresyon sonuçları karşılaştırıldığında, IL-1 β , TNF- α ve IL-8 proinflamatuvar genlerin 10 ng/ml IFN- γ ile kombine halde kullanılan 100 ng/ml LPS ve 1 μ g/ml Cpn konsantrasyonlarında en fazla olduğu bulunmuştur. Bu nedenle daha sonraki diğer deneylerde HMC3 mikrogliya hücrelerinin aktivasyonu için 100 ng/ml LPS ve 1 μ g/ml Cpn ile 10 ng/ml IFN- γ kombine konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verilmiştir.

5.3.2. *Chlamydiophila pneumoniae* ve LPS'nin farklı konsantrasyonlarının akış sitometride aktif mikroglia belirteci üzerine etkilerinin karşılaştırılması

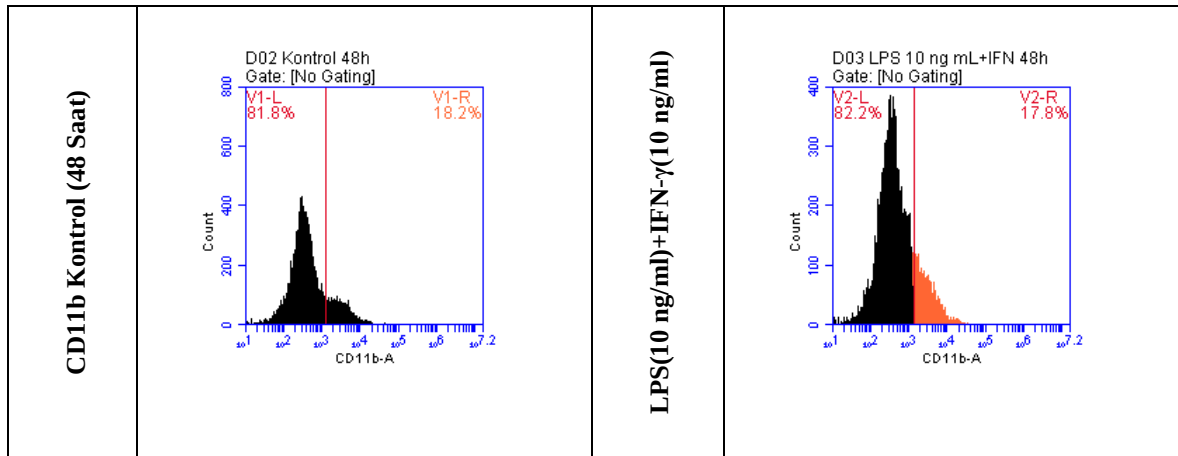
HMC3 insan mikroglia hücrelerini nöroinflamasyon modellerinde kullanılmakta olan LPS dozlarına yakın düzeyde aktive eden Cpn konsantrasyonunun bulunması amacıyla akış sitometride Cpn ve LPS'nin (10, 100 ng/ml ve 1 µg/ml) farklı konsantrasyonları ile 10 ng/ml IFN-γ kombinasyonlarının 24 ve 48 saatlik inkübasyonları sonrasında, aktif mikroglia belirteci olan CD11b antikoru seviyelerine bakılarak mikroglia aktivasyonlarına etkileri karşılaştırılmıştır (Şekil 5.6. ve 5.7.).



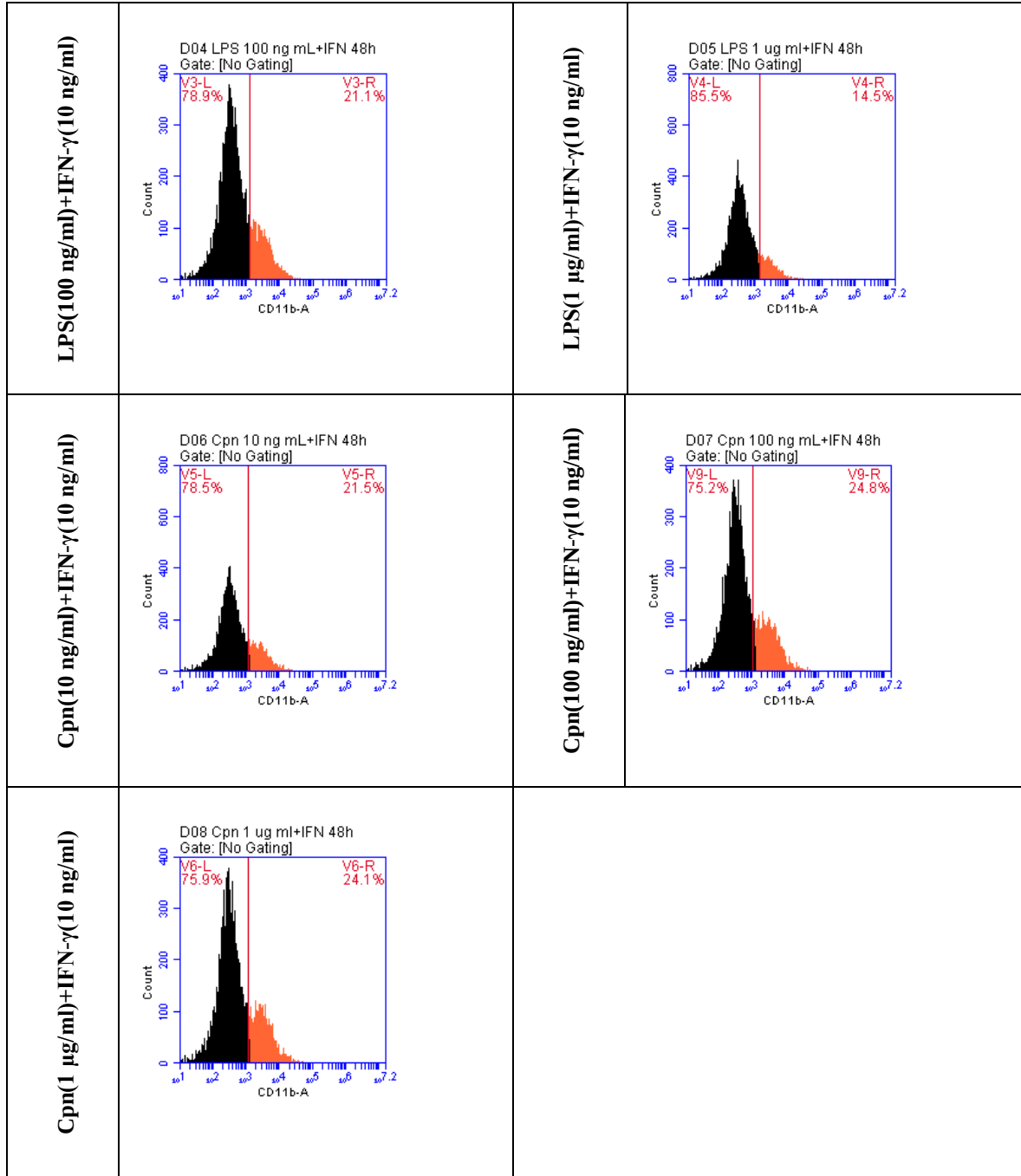
Şekil 5.6. LPS ve Cpn (10, 100 ng/ml veya 1 µg/ml) + IFN-γ (10 ng/ml) kombine konsantrasyonlarının 24 saat sonunda aktif mikroglia belirteci CD11b antikor seviyeleri üzerine etkileri.



Şekil 5.6. (Devam) LPS ve Cpn (10, 100 ng/ml veya 1 μ g/ml) + IFN- γ (10 ng/ml) kombine konsantrasyonlarının 24 saat sonunda aktif mikroglia belirteci CD11b antikor seviyeleri üzerine etkileri.



Şekil 5.7 LPS ve Cpn (10, 100 ng/ml veya 1 μ g/ml) + IFN- γ (10 ng/ml) kombine konsantrasyonlarının 48 saat sonunda aktif mikroglia belirteci CD11b antikor seviyeleri üzerine etkileri.



Şekil 5.7 (Devam) LPS ve Cpn (10, 100 ng/ml veya 1 μ g/ml) + IFN- γ (10 ng/ml) kombine konsantrasyonlarının 48 saat sonunda aktif mikrogliya belirteci CD11b antikoru seviyeleri üzerine etkileri.

Deney sonuçlarımıza göre, 24 saatte CD11b antikoru seviyelerini kontrol grubu %10.1 artırırken, 10, 100 ng/ml veya 1 μ g/ml LPS ve Cpn konsantrasyonları 10 ng/ml IFN- γ ile

kombine halde sırasıyla %43.5, 42.4 ve 23; ve %41, 25.9 ve 47 oranında artırmıştır. 48 saatte ise, kontrol grubu %18.2 artırırken, LPS konsantrasyonları sırasıyla %17.8, 21.1 ve 14.5 ve Cpn konsantrasyonları sırasıyla %21.5, 24.8 ve 24.1 oranında artırmıştır (**Tablo 5.7.**).

Tablo 5.7. LPS ve Cpn + IFN- γ kombine konsantrasyonlarının 24 ve 48 saat sonunda aktif mikroglia belirteci CD11b antikör seviyeleri üzerine etkilerinin karşılaştırılması.

Konsantrasyonlar	CD11b	
	24 Saat	48 Saat
Kontrol (%0.1 DMSO)	%10.1	%18.2
LPS (10 ng/ml)+IFN-γ (10 ng/ml)	%43.5	%17.8
LPS (100 ng/ml)+IFN-γ (10 ng/ml)	%42.4	%21.1
LPS (1 μg/ml)+IFN-γ (10 ng/ml)	%23	%14.5
Cpn (10 ng/ml)+IFN-γ (10 ng/ml)	%41	%21.5
Cpn (100 ng/ml)+IFN-γ (10 ng/ml)	%25.9	%24.8
Cpn (1 μg/ml)+IFN-γ (10 ng/ml)	%47	%24.1

Mikroglia hücreleri, santral sinir sistemindeki patolojik herhangi bir duruma yanıt vererek ana bağışıklık efektör hücreleri olarak görev yapan yerleşik makrofajlardır. Mikroglia aktivasyonu, Parkinson hastalığı, Creutzfeld-Jacob hastalığı, insan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV) ile ilişkili demans, inme, multipl skleroz ve AH da dahil olmak üzere çeşitli nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır (Gonzalez-Scarano ve Baltuch, 1999). Aktif mikroglialının, nörodejeneratif santral sinir sisteminde yaralanma veya plak bölgelerinde biriktiği bulunmuştur (Rock vd., 2004). Aktif mikrogliaların santral sinir sisteminden ölü hücreleri temizlemesine ve nöronal sağkalım için farklı nörotrofik faktörler salgılamasına rağmen (Gonzalez-Scarano ve Baltuch, 1999; Carson, 2002; Rock vd., 2004), şiddetli aktivasyonun nöronal ölüm ve beyin hasarına yol açan çeşitli otoimmün cevaplara neden olduğu düşünülmektedir (Jackson-Lewis vd., 2002; Dauer ve Przedborski, 2003; Barcia vd., 2004). Şiddetli aktivasyon sırasında mikroglia sadece çeşitli nörotoksik moleküller salgılamakla kalmaz, aynı zamanda farklı proteinleri ve yüzey belirteçlerini de eksprese eder. Farklı yüzey belirteçleri arasında, CD11b, biyolojik önemi en fazla olanıdır (Ling ve Wong, 1993). Morfolojik olarak mikroglial aktivasyon, şekil ve motilitedeki değişikliklerin artan CD11b ekspresyonu ile ilişkili olduğu yoğun dallanma ve sitoskeletal yeniden düzenlenme ile ilişkilidir (Rock vd., 2004). Aktive edilmiş mikroglia, majör doku uygunluk kompleksi (MHC) sınıf II moleküllerini ifade ettikleri için santral sinir sisteminin

antijen sunan hücreleri olarak kabul edilir. Bununla birlikte, dinlenme sırasında mikroglia düşük seviyelerde MHC sınıf II ifade eder (Etemad vd., 2012).

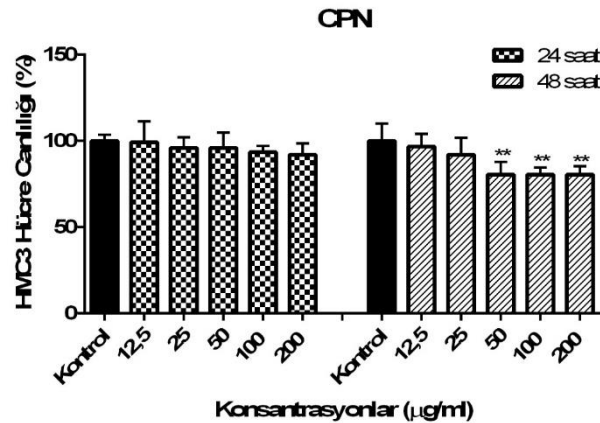
Mikroglial aktivasyonun, artan CD11b ekspresyonu ile temsil edilmesi nedeniyle (Roy vd., 2006), nöroinflamasyon modelinde kullanılacak Cpn konsantrasyonu ve aktivasyon süresi, akış sitometride CD11b antikör seviyeleri üzerine etkileri ölçülerek LPS ile karşılaştırılmıştır. Literatürde, mikroglial aktivasyon belirteci olarak CD11b antikör seviyelerinin akış sitometri yoluyla belirlendiği pek çok çalışma bulunmaktadır (Nikolakopoulou vd., 2013; Noristani vd., 2015; Zhou vd., 2017; McGill vd., 2018; Krukowski vd., 2018). Klasik olarak, IFN- γ ve / veya LPS'ye *in vitro* maruz kalma, morfolojik değişiklikler ve aktif veya "M1" fenotipinin indüksiyonu ile ilişkilendirilmiştir (Timmerman vd., 2018). HMC3 insan mikroglia hücre hattının, insan beyni kökenli embriyonik makrofajlardan SV40'ın büyük T antijenini kodlayan bir plazmid ile transfeksiyonu ile aracılığıyla elde edildiği ilk çalışmada, CD11b+ hücreler kontrol grubuna oranla %86 iken, monositler %89 ve primer mikroglia hücreleri %93 oranında pozitif bulunmuştur (Janabi vd., 1995). Kontrol grubunda ölçülen 24 saatte %10.1 ve 48 saatte %18.2 CD11b seviyesi bulgularımıza benzer olarak, dinlenme fazında da bu hücre hattının bazal düzeyde CD11b+ olduğu bildirilmiştir (Janabi vd., 1995; Rajalakshmy vd., 2015; Zhu vd., 2016). Çalışmamıza benzer olarak, Zhu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, Alzheimer hastalarının entorhinal korteksindeki lipid mediyatörlerinin analiz edilerek nöronlar ve mikroglia üzerindeki doğrudan etkilerinin *in vitro* yöntemlerle incelendiği bir çalışmada, insan CHME3 (HMC3) mikroglial hücrelerinin 10 μ g/ml A β ₄₂ ile, 1 ve 6 saatlik inkübasyonundan sonra CD11b seviyeleri kontrol grubuna göre yaklaşık olarak %20 artmıştır (Zhu vd., 2016). Akış sitometri ile yapılan CD11b seviyelerinin karşılaştırılması sonrasında, mikroglia hücrelerinin en etkili aktivasyon süresi 24 saat ve moleküler düzeydeki incelemelerde kullanılacak aktivasyon konsantrasyonları da 10 ng/ml IFN- γ ile kombine halde LPS için 100 ng/ml ve Cpn için de 1 μ g/ml olarak belirlenmiştir.

5.4. WST-1 Yöntemiyle Sitotoksik Olmayan Konsantrasyonların Değerlendirilmesi

5.4.1. WST-1 yöntemiyle HMC3 hücreleri üzerinde sitotoksik olmayan konsantrasyonların belirlenmesi

Oluşturulacak nöroinflamasyon ko-kültür modelinde, sitotoksik olmayan ilaç konsantrasyonlarını belirlemek için, önce WST-1 yöntemi ile 24 ve 48. saatlerde geniş konsantrasyon aralığında konsantrasyon taraması yapılmıştır. Daha sonra WST-1 sonuçlarına göre belirli konsantrasyonlarda gerçek zamanlı hücre analizi cihazında (xCELLigence RTCA-DP) hücrelerin proliferasyon verileri takip edilmiş ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

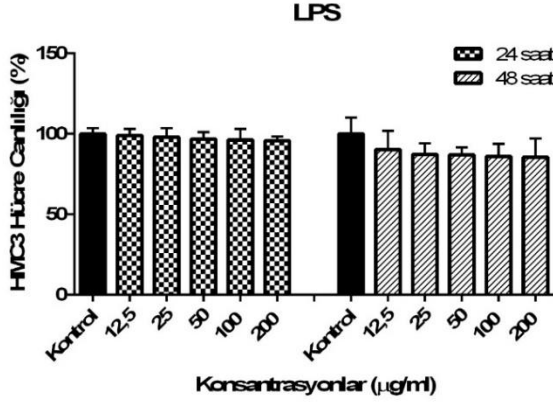
WST-1 deneyi sonuçlarına göre, HMC3 hücreleri üzerinde, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 µg/ml Cpn ile konsantrasyonları, kontrol grubuna göre hücre canlılığını 24 saatte sırasıyla % 0.82, 3.95, 4.09, 6.4 ve 8.04 oranında, 48 saatte de sırasıyla % 3.32, 7.99, 19.4, 19.5 ve 19.55 oranında azalmıştır (Şekil 5.8.). Hücre canlılığındaki azalma yalnızca 48 saatte 50, 100 ve 200 µg/ml Cpn konsantrasyonunda anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01^{**}$).



Şekil 5.8. Cpn konsantrasyonlarının, HMC3 mikroglia hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (çözücü kontrol: %0.1 DMSO) (Ortalama ± Standart Sapma) ($n=8$) (anlamlı farklılık var: $p < 0.01^{**}$, fark yok: $p > 0.05$).

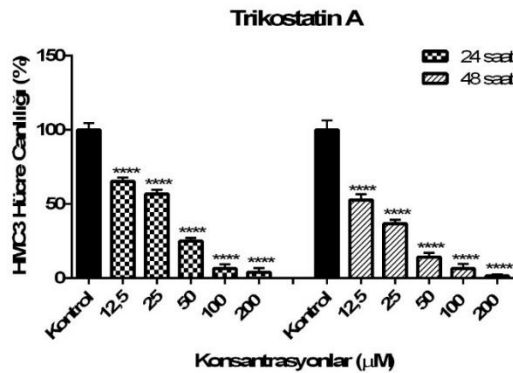
WST-1 deneyi sonuçlarına göre, HMC3 hücreleri üzerinde, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 µg/ml LPS konsantrasyonları, kontrol grubuna göre hücre canlılığını 24 saatte sırasıyla % 0.88, 2.04, 3.21, 3.72 ve 4.24 oranında, 48 saatte de sırasıyla % 9.7, 12.68, 13.03, 14.02 ve

14.52 oranında azalmıştır (Şekil 5.9.). Hücre canlılığındaki azalma kontrol grubuna göre anlamlı bulunmamıştır.



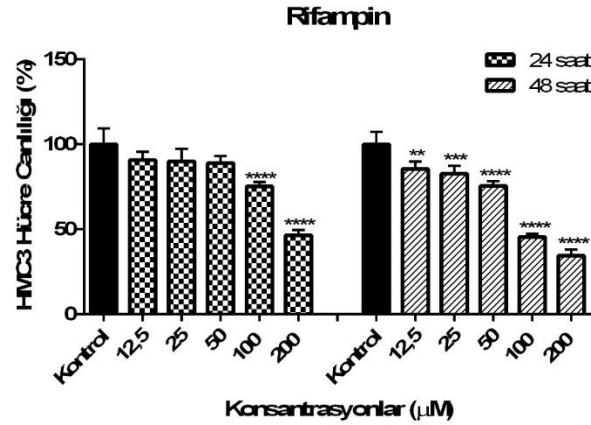
Şekil 5.9. LPS konsantrasyonlarının, HMC3 mikrogliya hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (çözücü kontrol: %0.1 DMSO) (Ortalama $\pm$ Standart Sapma) (n=8) (fark yok: $p>0.05$).

WST-1 deneyi sonuçlarına göre, HMC3 hücreleri üzerinde, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 µM TSA konsantrasyonları, kontrol grubuna göre hücre canlılığını 24 saatte sırasıyla % 34.82, 43.33, 75.06, 93.46 ve 95.95 oranında, 48 saatte sırasıyla % 47.33, 63.16, 85.84, 93.52 ve 98.54 oranında azalmıştır (Şekil 5.10.). Hücre canlılığındaki azalma tüm konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmuştur ($p<0.0001$ ****). TSA'nın konsantrasyon artışına bağlı olarak HMC3 hücreleri üzerinde önemli sitotoksik etkileri olduğu belirlenmiştir.



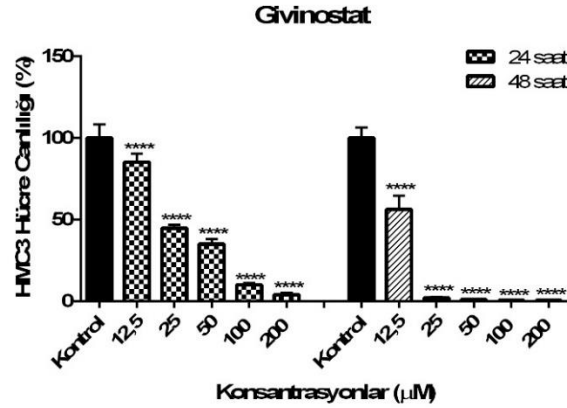
Şekil 5.10. TSA konsantrasyonlarının, HMC3 mikrogliya hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (çözücü kontrol: %0.1 DMSO) (Ortalama $\pm$ Standart Sapma) (n=8) (anlamlı farklılık var: $p<0.0001$ ****).

WST-1 deneyi sonuçlarına göre, HMC3 hücreleri üzerinde, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 μ M Rifampin konsantrasyonları, kontrol grubuna göre hücre canlılığını 24 saatte sırasıyla % 9.36, 10.02, 10.94, 24.81 ve 53.5, 48 saatte de sırasıyla % 14.58, 17.31, 24.55, 54.56 ve 65.52 oranında azalmıştır (**Şekil 5.11.**). Hücre canlılığındaki azalma 24 saatte 100 ve 200 ($p<0.0001****$) μ M, 48 saatte 12.5 ($p<0.01**$), 50 ($p<0.001***$), 100 ve 200 μ M ($p<0.0001****$) konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmuştur. % hücre inhibisyon oranlarına göre Rifampin'in yüksek konsantrasyonlarında, özellikle 24. saatte 200 μ M, 48. saatte de 100 ve 200 μ M konsantrasyonda olmak üzere HMC3 hücreleri üzerinde önemli sitotoksik etkileri olduğu görülmektedir.



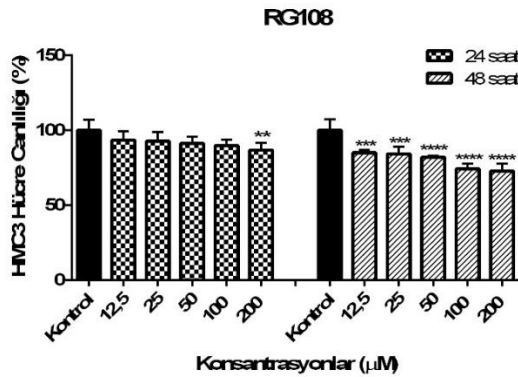
Şekil 5.11. Rifampin konsantrasyonlarının, HMC3 mikrogliya hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (çözücü kontrol: %0.1 DMSO) (Ortalama $\pm$ Standart Sapma) ($n=8$) (anlamlı farklılık var: $p<0.01**$, $p<0.001***$, $p<0.0001****$; fark yok: $p>0.05$).

WST-1 deneyi sonuçlarına göre, HMC3 hücreleri üzerinde 12.5, 25, 50, 100 ve 200 μ M Givinostat konsantrasyonları, kontrol grubuna göre hücre canlılığını 24 saatte sırasıyla % 14.64, 55.18, 65.06, 89.94 ve 96, 48 saatte de sırasıyla % 43.66, 97.88, 98.95, 99.45 ve 99.61 oranında azalmıştır (**Şekil 5.12.**). Hücre canlılığındaki azalma hem 24 hem de 48 saatte tüm konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmuş olup sitotoksik etkinin çok fazla olduğu görülmektedir ($p<0.0001****$).



Şekil 5.12. Givinostat konsantrasyonlarının, HMC3 mikrogliya hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (çözücü kontrol: %0.1 DMSO) (Ortalama $\pm$ Standart Sapma) (n=8) (anlamlı farklılık var: $p<0.0001$ ****).

WST-1 deneyi sonuçlarına göre, HMC3 hücreleri üzerinde, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 µM RG108 konsantrasyonları, kontrol grubuna göre hücre canlılığını 24 saatte sırasıyla % 6.62, 7.18, 8.79, 10.15 ve 13.19, 48 saatte de sırasıyla % 15.1, 15.82, 17.95, 25.77 ve 27.19 oranında azalmıştır (Şekil 5.13.). Hücre canlılığındaki azalma 24 saatte 200 ($p<0.01$ **) µM, 48 saatte 12.5 ve 25 ($p<0.001$ ***); 50, 100 ve 200 µM ($p<0.0001$ ****) konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmuştur, ancak bu sitotoksik etkiler hücre canlılığını %50'den fazla inhibe etmemiştir.

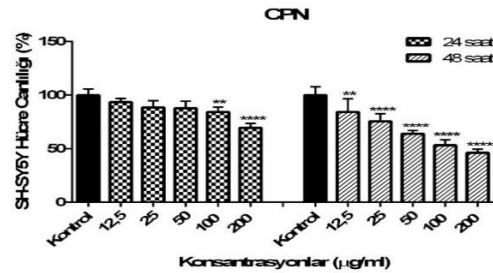


Şekil 5.13. RG108 konsantrasyonlarının, HMC3 mikrogliya hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (çözücü kontrol: %0.1 DMSO) (Ortalama $\pm$ Standart Sapma) (n=8) (anlamlı farklılık var: $p<0.01$ **, $p<0.001$ ***, $p<0.0001$ ****; fark yok: $p>0.05$).

WST-1 çalışmamıza benzer şekilde, HMC3 hücre hattı üzerinde Cpn lizati, TSA, RG108, givinostat veya rifampinin sitotoksik etkilerini araştıran çalışmalara ilişkin literatür bilgisine rastlanmamıştır. LPS ile yapılan WST-1 çalışmasının sonucuna paralel bulgular, Li ve arkadaşları tarafından anestetik bir ajan olan deksmedetomidinin 100 ng/ml LPS ve 5 mM ATP ile indüklenen HMC3 hücre hattı inflamasyonunu inhibe ettiğinin gösterildiği bir çalışmada bildirilmiştir. 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) boyası ile yapılan sitotoksisite deneyi sonuçlarına göre 24 saat inkübasyon sonrasında kontrol grubuna oranla %50'nin üzerinde hücre canlılığı saptanmıştır (Li vd., 2018). Dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) ile aktive edilmiş kinaz 1 (TAK1) inhibisyonunun makrofajlarda apoptozu indükleyici yollar ile ilişkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada, 100 ng/ml LPS ile 2, 4 ve 6 saatlik inkübasyon sonrasında yapılan MTT deneyi sonuçlarına göre kemik iliği kökenli makrofaj hücrelerinde kontrol grubuna oranla hücre canlılığı artışı bildirilmiştir (Wang vd., 2015). Benzer şekilde, bir ramnozid olan PL201'in AH nöroinflamasyonunu inhibe edici etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 300 ng/ml LPS ile 24 saat inkübasyon sonrasında BV2 mikrogliya hücre hattı canlılığında bir azalma bulunamamıştır (An vd., 2020).

5.4.2. WST-1 yöntemiyle SH-SY5Y hücreleri üzerinde sitotoksik olmayan konsantrasyonların belirlenmesi

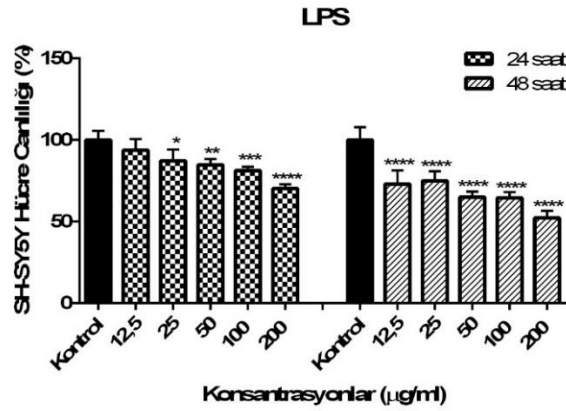
WST-1 deneyi sonuçlarına göre, SH-SY5Y hücreleri üzerinde, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 μ g/ml Cpn konsantrasyonları, kontrol grubuna göre hücre canlılığını 24 saatte sırasıyla % 6.54, 11.41, 12.33, 15.72 ve 30.51, 48 saatte de sırasıyla % 15.82, 24.45, 36.1, 46.75 ve 53.73 oranında azalmıştır (Şekil 5.14).



Şekil 5.14. Cpn konsantrasyonlarının, SH-SY5Y hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (çözücü kontrol: %0.1 DMSO) (Ortalama $\pm$ Standart Sapma) (n=8) (anlamlı farklılık var: $p < 0.01$ **, $p < 0.0001$ ****; fark yok: $p > 0.05$).

Hücre canlılığındaki azalma 24 saatte 100 ($p<0.01^{**}$) ve 200 ($p<0.0001^{****}$) μM , 48 saatte 12.5 ($p<0.01^{**}$), 50, 100 ve 200 μM ($p<0.0001^{****}$) konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmuştur.

WST-1 deneyi sonuçlarına göre, SH-SY5Y hücreleri üzerinde, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 $\mu\text{g/ml}$ LPS konsantrasyonları kontrol grubuna göre hücre canlılığını 24 saatte sırasıyla % 6.34, 12.86, 15.29, 18.87 ve 29.77, 48 saatte de sırasıyla % 27.11, 25, 34.9, 35.59 ve 47.71 oranında azalmıştır (Şekil 5.15.).

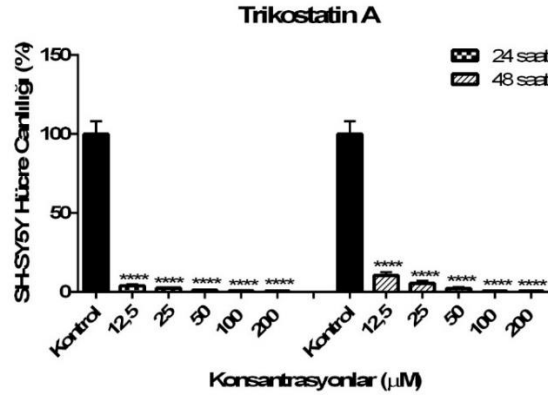


Şekil 5.15. LPS konsantrasyonlarının, SH-SY5Y hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (çözücü kontrol: %0.1 DMSO) (Ortalama $\pm$ Standart Sapma) ($n=8$) (anlamlı farklılık var: $p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$, $p<0.0001^{****}$; fark yok: $p>0.05$).

Hücre canlılığındaki azalma 24 saatte 25 ($p<0.05^*$), 50 ($p<0.01^{**}$), 100 ($p<0.001^{***}$) ve 200 ($p<0.0001^{****}$) μM , 48 saatte 12.5, 25, 50, 100 ve 200 μM ($p<0.0001^{****}$) konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmuştur.

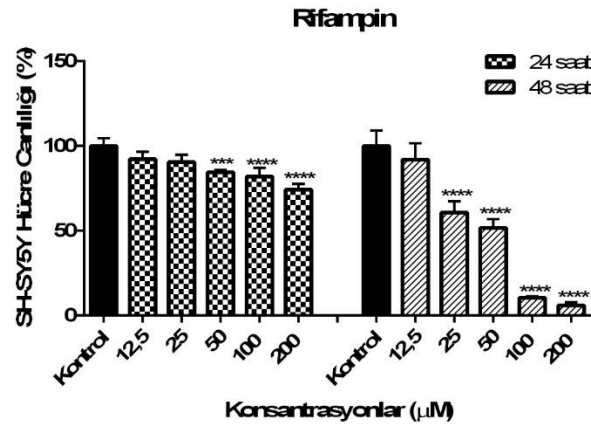
WST-1 deneyi sonuçlarına göre, SH-SY5Y hücreleri üzerinde, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 μM TSA konsantrasyonları kontrol grubuna göre hücre canlılığını 24 saatte sırasıyla % 95.9, 97.41, 98.63, 99.31 ve 99.42, 48 saatte de sırasıyla % 89.5, 94.5, 97.71, 99.41 ve 99.5 oranında azalmıştır.

Hücre canlılığındaki azalma tüm konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmuştur ($p<0.0001$ ****) (Şekil 5.16.).



Şekil 5.16. TSA konsantrasyonlarının, SH-SY5Y hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (çözücü kontrol: %0.1 DMSO) (Ortalama $\pm$ Standart Sapma) ($n=8$) (anlamlı farklılık var: $p<0.0001$ ****).

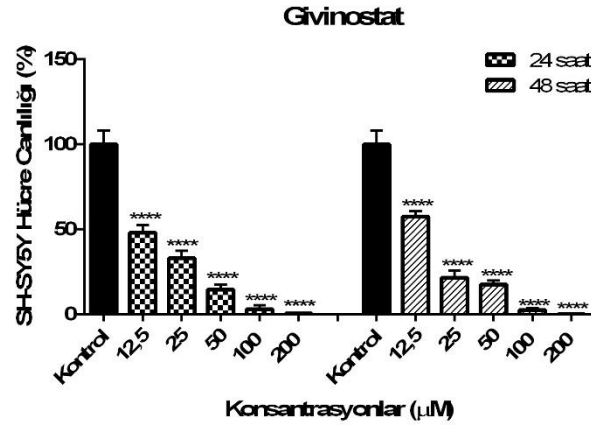
WST-1 deneyi sonuçlarına göre, SH-SY5Y hücreleri üzerinde, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 µM Rifampin konsantrasyonları kontrol grubuna göre hücre canlılığını 24 saatte sırasıyla % 7.65, 9.42, 15.58, 18.1 ve 25.77, 48 saatte de sırasıyla % 7.96, 39.33, 48.24, 89.51 ve 93.99 oranında azalmıştır (Şekil 5.17.).



Şekil 5.17. Rifampin konsantrasyonlarının, SH-SY5Y hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (çözücü kontrol: %0.1 DMSO) (Ortalama $\pm$ Standart Sapma) ($n=8$) (anlamlı farklılık var: $p<0.001$ *** ve $p<0.0001$ ****; fark yok: $p>0.05$).

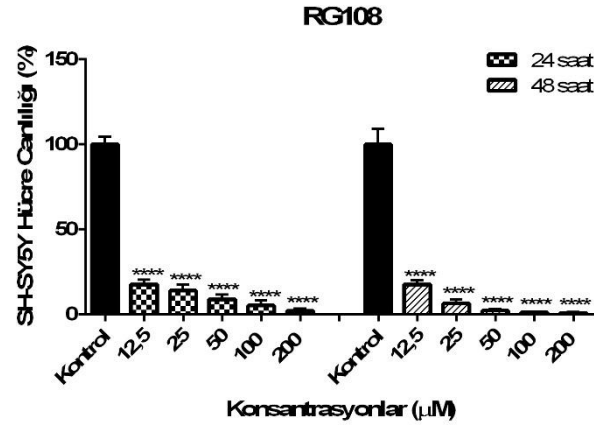
Hücre canlılığındaki azalma 24 saatte 50 ($p<0.001^{***}$), 100 ve 200 ($p<0.0001^{****}$) μM , 48 saatte 25, 50, 100 ve 200 μM ($p<0.0001^{****}$) konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmuştur.

WST-1 deneyi sonuçlarına göre, SH-SY5Y hücreleri üzerinde, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 μM Givinostat konsantrasyonları kontrol grubuna göre hücre canlılığını 24 saatte sırasıyla % 52.01, 67.01, 85.61, 97.07 ve 99.58, 48 saatte de sırasıyla % 42.57, 78.56, 82.52, 97.47 ve 99.67 oranında azalmıştır (Şekil 5.18.). Hücre canlılığındaki azalma tüm konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmuştur ($p<0.0001^{****}$).



Şekil 5.18. Givinostat konsantrasyonlarının, SH-SY5Y hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (çözücü kontrol: %0.1 DMSO) (Ortalama $\pm$ Standart Sapma) ($n=8$) (anlamlı farklılık var: $p<0.0001^{****}$).

WST-1 deneyi sonuçlarına göre, SH-SY5Y hücreleri üzerinde, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 μM Givinostat konsantrasyonları kontrol grubuna göre hücre canlılığını 24 saatte sırasıyla % 82.47, 86.07, 91.15, 94.75 ve 97.91, 48 saatte de sırasıyla % 82.5, 93.54, 97.84, 98.86 ve 99.2 oranında azalmıştır (Şekil 5.19.). Hücre canlılığındaki azalma tüm konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmuştur ($p<0.0001^{****}$).



Şekil 5.19. RG108 konsantrasyonlarının, SH-SY5Y hücre hattında WST-1 yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (çözücü kontrol: %0.1 DMSO) (Ortalama $\pm$ Standart Sapma) (n=8) (anlamli farklılık var: $p < 0.0001$ ****).

Yapılan literatür taramasında, Cpn lizati, RG108 ve Givinostat ile SH-SY5Y hücreleri üzerinde bir sitotoksosite çalışmasına rastlanmamıştır. Shakya ve Chongthammakun tarafından 17 β -östradiol'ün kronik olarak aktif mikroglianin Wnt sinyal yolağı aracılığıyla SH-SY5Y hücre proliferasyonunu azaltıcı etkisini hafiflettiğinin bildirildiği bir çalışmada, LPS ile yapılan WST-1 çalışmasına benzer bulgular elde edilmiştir (Shakya ve Chongthammakun, 2019). Çalışmada 0.4 ng-0.4 µg/ml doz aralığında LPS ile çalışılmış ve bu doz aralığında yalnızca LPS uygulaması yapılan SH-SY5Y hücrelerinde anlamlı bir canlılık azalması görülmemiştir. Aktif mikrogliya ile ko-kültür hücre canlılığını azalttığı halde yalnızca LPS uygulamasının hücre canlılığı üzerine bir etkisinin olmaması, SH-SY5Y hücrelerinde TLR4 reseptörü olmaması ile açıklanmıştır (Molteni vd., 2004). LPS ile indüklenmiş BV2 mikrogliya ve SH-SY5Y hücreleriyle oluşturulan ko-kültür modelinde luteolinin apoptoz üzerine etkisinin incelendiği benzer bir çalışmada da 0.1, 1.0 ve 10.0 µg/ml LPS uygulamasının SH-SY5Y hücre canlılığını azaltmadığı bildirilmiştir (Zhu vd., 2014).

TSA ile yapılan sitotoksosite çalışmasına paralel bulgular, TSA'nın çeşitli nöroblastoma hücre hatları (SH-SY5Y, IMR32, SH-EP1, SK-N-AS, GOTO, SMS-KCN-69n, LA1-55n LA1-5s, SH-310 ve WSN) üzerindeki sitotoksik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada elde edilmiştir. Subramanian ve arkadaşları tarafından yapılan ve 0.25, 0.5, 0.75 ve 1 µM TSA kullanılan bu çalışmada, 24 saat sonunda hücre canlılığında düşüş en yüksek

konsantrasyon olan 1 μM ile kontrol grubuna oranla yaklaşık olarak %40, 48 saat sonunda ise %80 oranında azalmıştır (Subramanian vd., 2007). TSA'nın dopaminerjik nöronal hücre (sıçan N27, fare MN9D ve insan SH-SY5Y hücre hattı) sağkalımı üzerine etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada, TSA'nın düşük konsantrasyonlarının (10, 25 ve 50 nM) etkileri 12—96 saat sonunda tripan mavisi yöntemiyle belirlenmiştir. Hücre canlılığı 48 saat sonunda, 50 nM TSA ile kontrol grubuna göre yaklaşık olarak %90 oranında azalmıştır (Wang vd., 2009). RA ve HDACi olan SAHA ve TSA'nın SH-SY5Y hücre hattı üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada, 48 saat sonunda yapılan MTT analizinde 200 ve 500 nmol/L TSA ile anlamlı ve konsantrasyon artışıyla paralel hücre canlılığında azalma bildirilmiştir (De los Santos vd., 2007). TSA'nın SH-SY5Y hücreleri ile oluşturulan $\text{A}\beta_{25-35}$ kullanılarak oluşturulan bir AH modeli üzerindeki nöroprotektif etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 100, 80, 60, 40, 20 ve 10 nM TSA konsantrasyonları ile yapılan MTT çalışmasında hücre canlılığında anlamlı bir azalma bildirilmemiştir (Li vd., 2020).

Rifampin ile yapılan sitotoksisite çalışmasına benzer bulgular ise, Wu ve arkadaşları tarafından rifampinin rotenon ile indüklenen SH-SY5Y apoptozu üzerine koruyucu etkilerinin incelendiği bir çalışmada saptanmıştır. 5×10^3 SH-SY5Y hücresi 100 μM Rifampin ile 24 saat muamele edildikten sonra yapılan *Cell Counting Kit-8* sitotoksisite testi sonrasında hücre canlılığında düşüş saptanmış ancak anlamlı bulunmamıştır (Wu vd., 2018).

Elde edilen WST-1 doz taraması sonuçlarına göre sonraki deneylerde kullanılacak sitotoksik olmayan konsantrasyonları belirlemek üzere, konsantrasyon grubu sayısı azaltılarak, 1, 10 ve 100 μM TSA, Rifampin, Givinostat ve RG108 ile gerçek zamanlı hücre analiz çalışmalarına devam edilmesine karar verilmiştir.

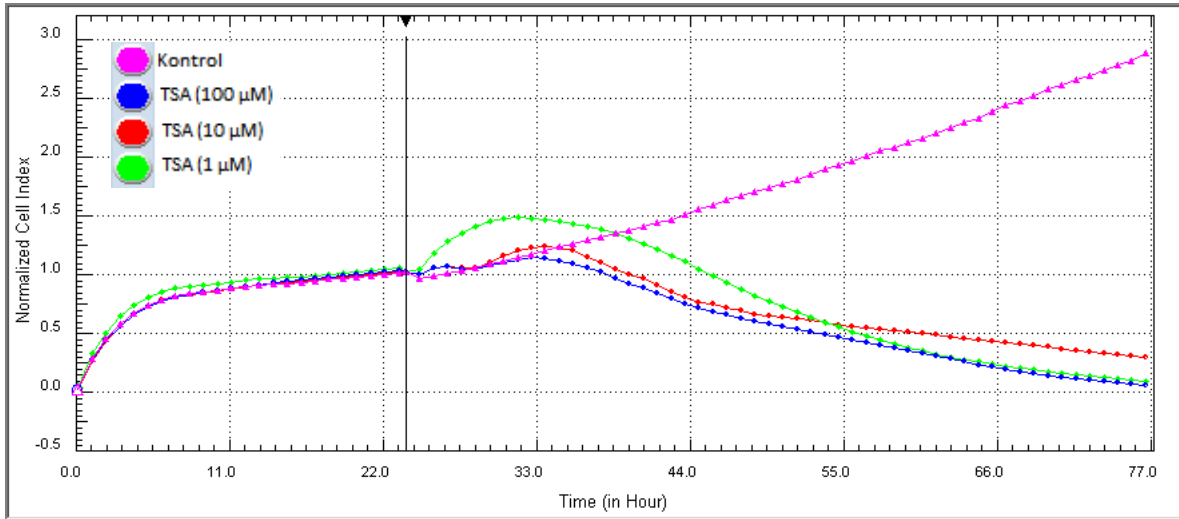
5.5. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence RTCA-DP) Kullanılarak SH-SY5Y ve HMC3 Hücre Canlılığı Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Nöroinflamasyon ko-kültür modelinde kullanılacak sitotoksik olmayan dozları belirlemek üzere, 16'lık altın ve elektrot kaplı plakalara ayrı ayrı her bir kuyucukta 5×10^3 hücre olacak şekilde HMC3, farklılaştırılmış veya farklılaştırılmamış SH-SY5Y hücreleri ekilmiş ve hücreler bir log fazına ulaşınca kadar (24 saat) inkübe edilmiştir. Daha sonra 1, 10 ve 100 μM TSA, Rifampin, Givinostat ve RG108 konsantrasyonları hücrelere

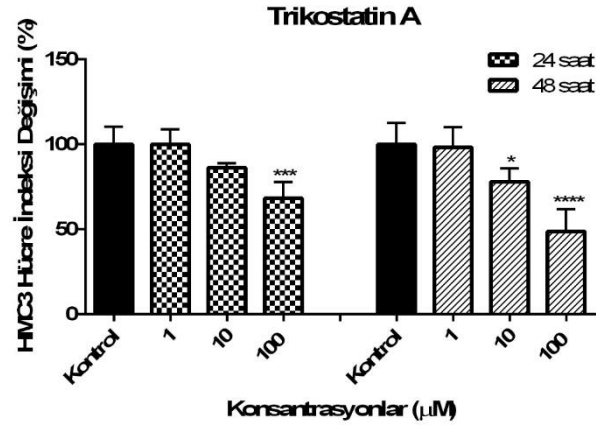
uygulanarak HMC3 (Şekil 5.20., 5.23., 5.26., ve 5.29.), farklılaşmamış SH-SY5Y (Şekil 5.32., 5.35., 5.38. ve 5.41.) ve farklılaştırılmış SH-SY5Y (Şekil 5.44., 5.47., 5.50. ve 5.53.) hücrelerinin hücre indeks değerlerine göre hücre proliferasyon eğrileri gerçek zamanlı olarak izlenmiş, slope grafikleri çizilmiş (Şekil 5.21., 5.24., 5.27., 5.30., 5.33., 5.36., 5.39., 5.42., 5.45., 5.48., 5.51., ve 5.54.) ve RTCA DP Software 1.2.1 programında IC₅₀ değerleri analiz edilmiştir (Şekil 5.22., 5.25., 5.28., 5.31., 5.34., 5.37., 5.40., 5.43., 5.46., 5.49., 5.52. ve 5.55.).

5.5.1. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemiyle HMC3 hücre canlılığının belirlenmesi

HMC3 hücreleri üzerinde, TSA'nın hücre proliferasyonuna etkileri gerçek zamanlı olarak değerlendirildiğinde (Şekil 5.20.), kontrol grubuna göre hücre canlılığı 24 saatte sırasıyla % 0.04, 13.88 ve 31.68, 48 saatte ise sırasıyla % 1.75, 21.94 ve 51.2 oranında azalmıştır (Şekil 5.21.). Hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak 24. saatte 100 (p<0.001***) µM, 48. saatte 10 (p<0.05*) ve 100 µM (p<0.0001****) konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmuştur.

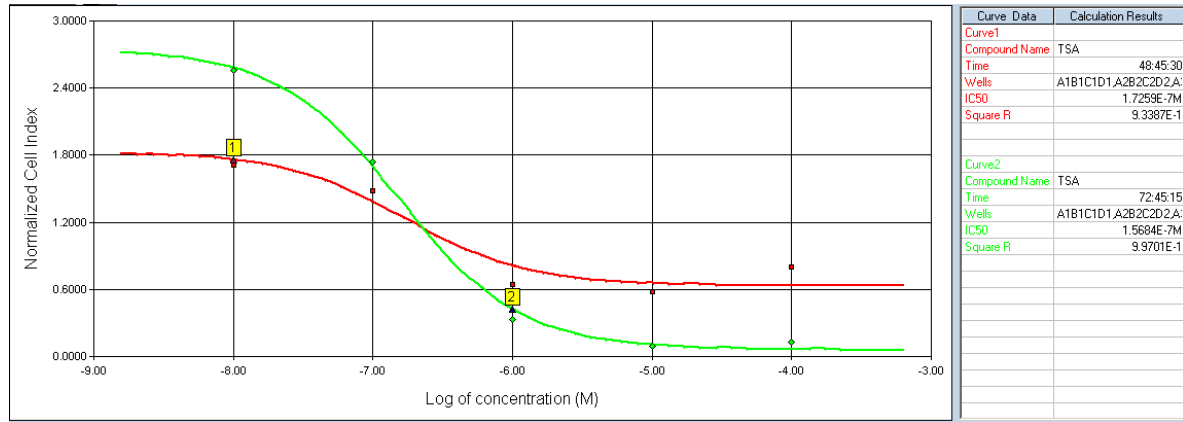


Şekil 5.20. HMC3 Hücrelerinde 1, 10 ve 100 µM TSA konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.



Şekil 5.21. RTCA DP sisteminde TSA konsantrasyonlarının HMC3 hücrelerinde 24. ve 48. saat hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği (anlamlı farklılık var: $p < 0.05$ *, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****; fark yok: $p > 0.05$ n.s.).

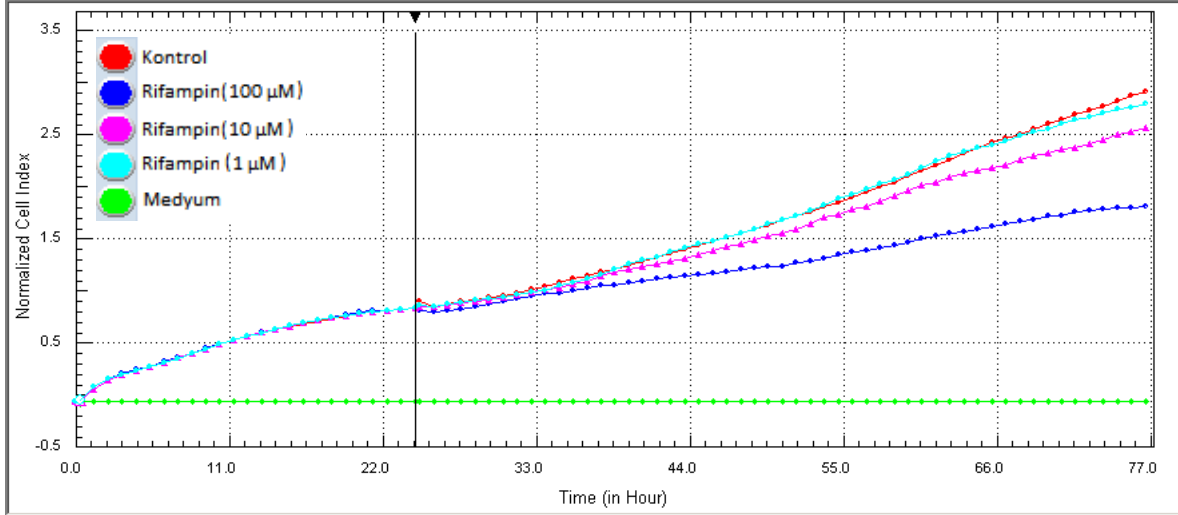
HMC3 hücrelerinde TSA'nın gerçek zamanlı hücre indeksi verilerine göre hesaplanan 24. ve 48. saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 172 ve 156 nM olarak belirlenmiştir (Şekil 5.22.).



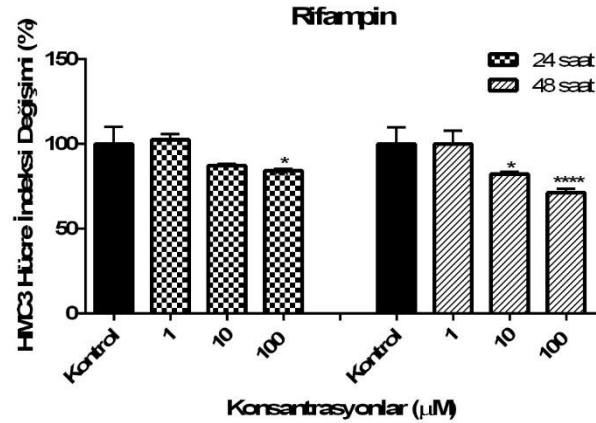
Şekil 5.22. RTCA DP sisteminde HMC3 hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 µM TSA konsantrasyonlarının HMC3 hücreleri üzerinde proliferasyon slope grafiğine göre hesaplanan 24. saat (kırmızı: 172 nM) ve 48. saatteki (yeşil: 156 nM) IC_{50} değerleri.

HMC3 hücreleri üzerinde, Rifampin'in hücre proliferasyonuna etkileri gerçek zamanlı olarak değerlendirildiğinde (Şekil 5.23.), kontrol grubuna göre hücre canlılığı 24. saatte sırasıyla 1 µM'da %2.43 artmış, 10 ve 100 µM'da %12.72 ve 15.74 oranında azalmış, 48. saatte ise sırasıyla %0, 17.79 ve 28.72 oranında azalmıştır (Şekil 5.24.). Hücre canlılığındaki

azalma istatistiksel olarak 24 saatte 100 ($p<0.05^*$) μM , 48 saatte 10 ($p<0.05^*$) ve 100 μM ($p<0.0001^{****}$) konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmuştur.

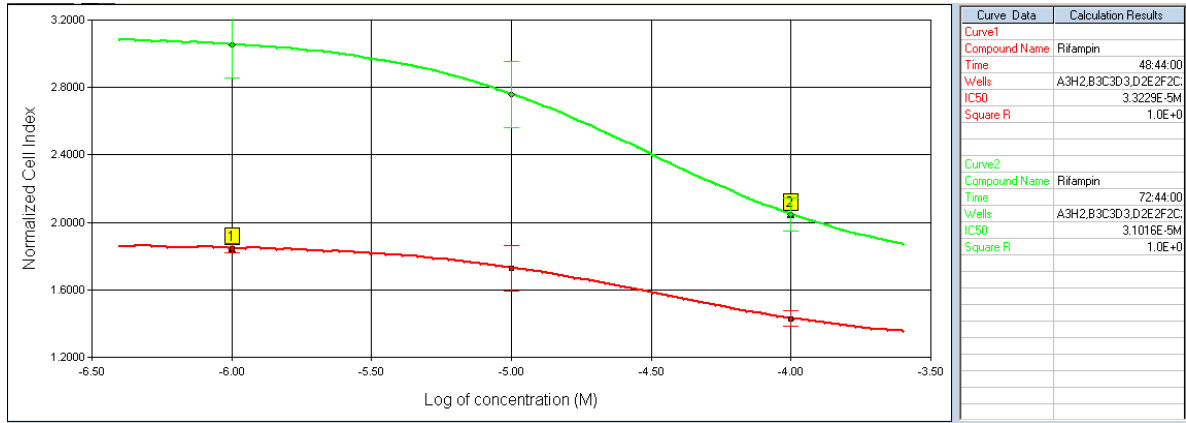


Şekil 5.23. HMC3 Hücrelerinde 1, 10 ve 100 μM Rifampin konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.



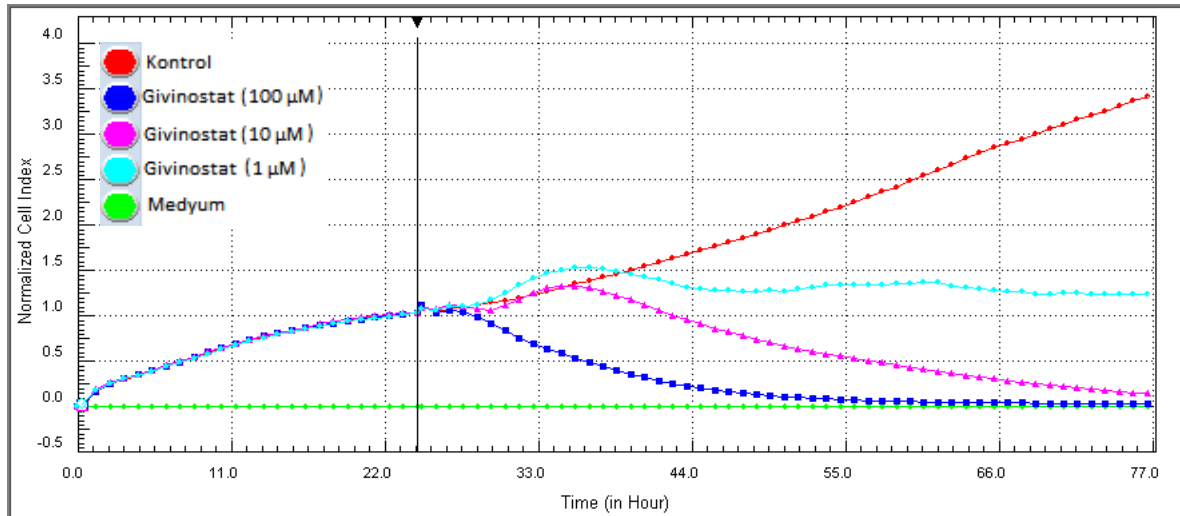
Şekil 5.24. RTCA DP sisteminde 1, 10 ve 100 μM Rifampin konsantrasyonlarının HMC3 hücrelerinde 24. ve 48. saat hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği (anlamlı farklılık var: $p<0.05^*$, $p<0.0001^{****}$; fark yok: $p>0.05$ n.s.).

HMC3 hücrelerinde Rifampin'in gerçek zamanlı hücre indeksi verilerine göre hesaplanan 24. ve 48. saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 33.2 ve 31 μM olarak belirlenmiştir (Şekil 5.25.).

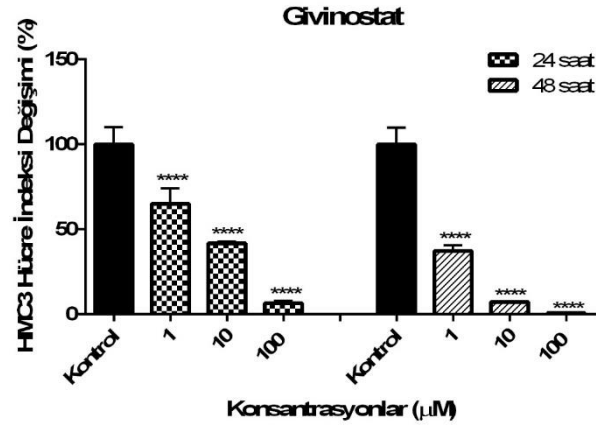


Şekil 5.25. RTCA DP sisteminde HMC3 hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 μ M Rifampin konsantrasyonlarının HMC3 hücreleri üzerinde proliferasyon slope grafiğine göre hesaplanan 24. saat (kırmızı: 33.2 μ M) ve 48. saatteki (yeşil: 31 μ M) IC₅₀ değerleri.

HMC3 hücreleri üzerinde, Givinostat'ın hücre proliferasyonuna etkileri gerçek zamanlı olarak değerlendirildiğinde (Şekil 5.26.), kontrol grubuna göre hücre canlılığı 1, 10 ve 100 μ M konsantrasyonda 24. saatte sırasıyla %35.01, 58.19 ve 93.58, 48. saatte ise sırasıyla %62.78, 92.67 ve 99.29 oranında azalmıştır (Şekil 5.27.). Hücre canlılığındaki azalma hem 24 saatte hem de 48 saatte tüm konsantrasyon gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$ ****).

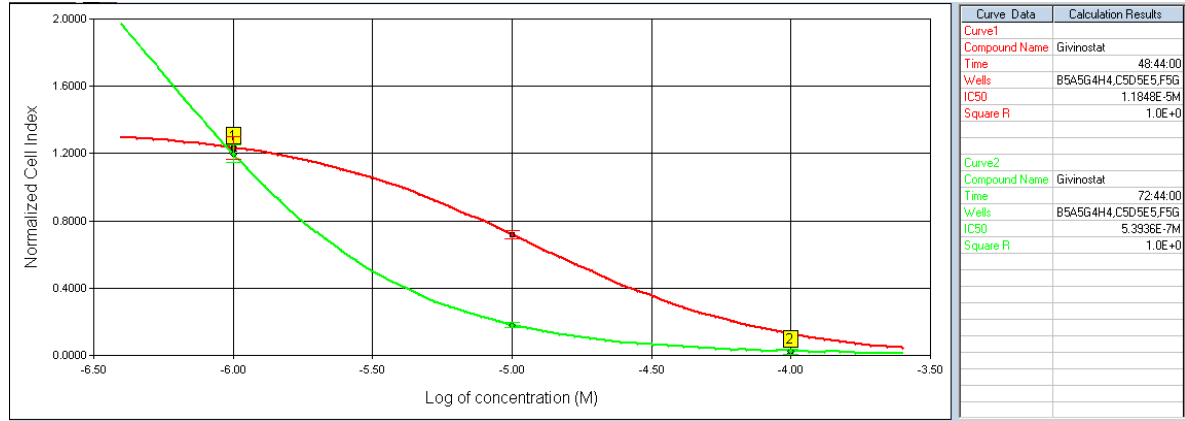


Şekil 5.26. HMC3 Hücrelerinde 1, 10 ve 100 μ M Givinostat konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.



Şekil 5.27. RTCA DP sisteminde 1, 10 ve 100 µM Givinostat konsantrasyonlarının HMC3 hücrelerinde 24. ve 48. saatlik hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği (anlamlı farklılık var: $p < 0.0001$ ****; fark yok: $p > 0.05$ n.s.).

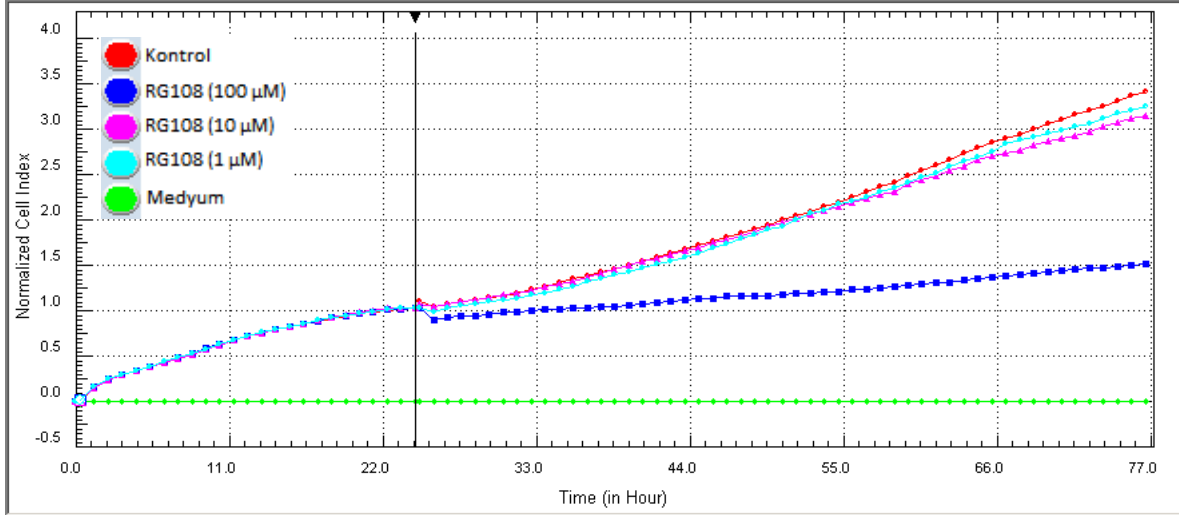
HMC3 hücrelerinde Givinostat'ın gerçek zamanlı hücre indeksi verilerine göre hesaplanan 24. ve 48. saatteki IC₅₀ değerleri sırasıyla 11.8 µM ve 539 nM olarak belirlenmiştir (Şekil 5.28.).



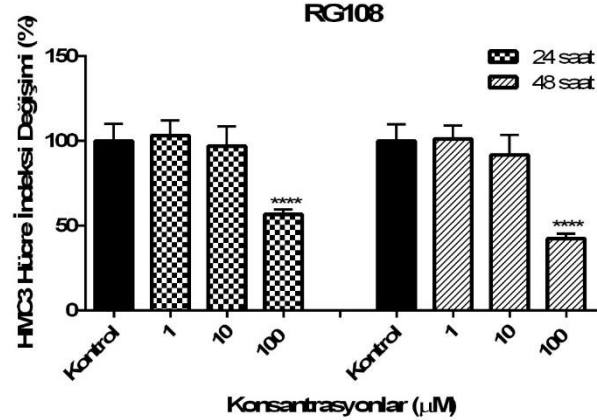
Şekil 5.28. RTCA DP sisteminde HMC3 hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 µM Givinostat konsantrasyonlarının HMC3 hücreleri üzerinde proliferasyon slope grafiğine göre hesaplanan 24. saat (kırmızı: 11.8 µM) ve 48. saatteki (yeşil: 539 nM) IC₅₀ değerleri.

HMC3 hücreleri üzerinde, RG108'in hücre proliferasyonuna etkileri gerçek zamanlı olarak değerlendirildiğinde (Şekil 5.29.), kontrol grubuna göre hücre canlılığı 24. saatte sırasıyla 1 µM'da %3.36 artmış, 10 ve 100 µM ile % 3.12 ve 43.26 oranında azalmış, 48 saatte sırasıyla 1 µM'da %1.29 artmış, 10 ve 100 µM'da %8.33 ve 57.56 oranında azalmıştır

(Şekil 5.30.). Hücre canlılığındaki azalma hem 24 saatte hem de 48 saatte 100 μM konsantrasyon gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$ ****).

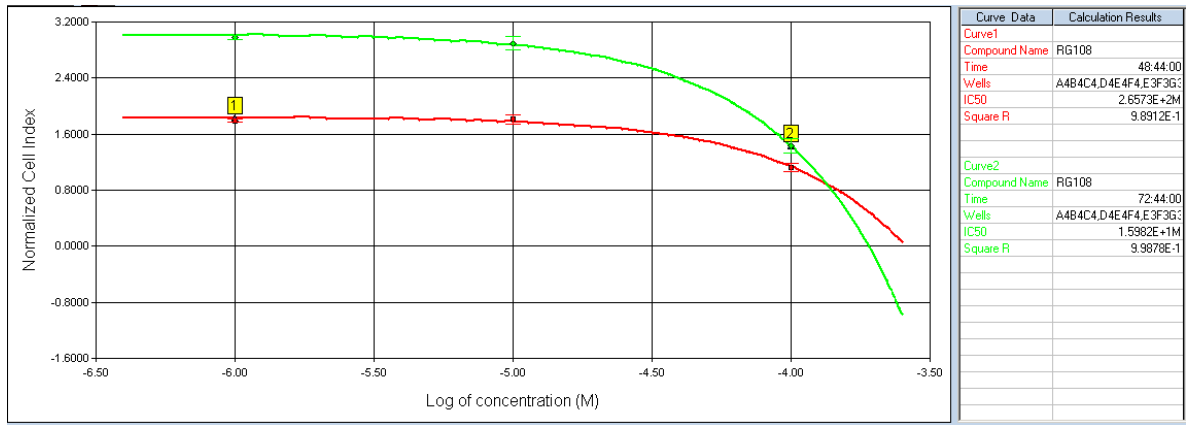


Şekil 5.29. HMC3 Hücrelerinde 1, 10 ve 100 μM RG108 konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.



Şekil 5.30. RTCA DP sisteminde RG108 konsantrasyonlarının HMC3 hücrelerinde 24. ve 48. saatlik hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği (anlamlı farklılık var: $p < 0.0001$ ****; fark yok: $p > 0.05$ n.s.).

HMC3 hücrelerinde RG108'in gerçek zamanlı hücre indeksi verilerine göre hesaplanan 24. ve 48. saatteki IC_{50} değerleri 400 μM 'dan büyük olarak belirlenmiştir (Şekil 5.31.).



Şekil 5.31. RTCA DP sisteminde HMC3 hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 μ M RG108 konsantrasyonlarının HMC3 hücreleri üzerinde proliferasyon slope grafiği'ne göre hesaplanan 24. saat (kırmızı: >400 μ M) ve 48. saatteki (yeşil: >400 μ M) IC_{50} değerleri.

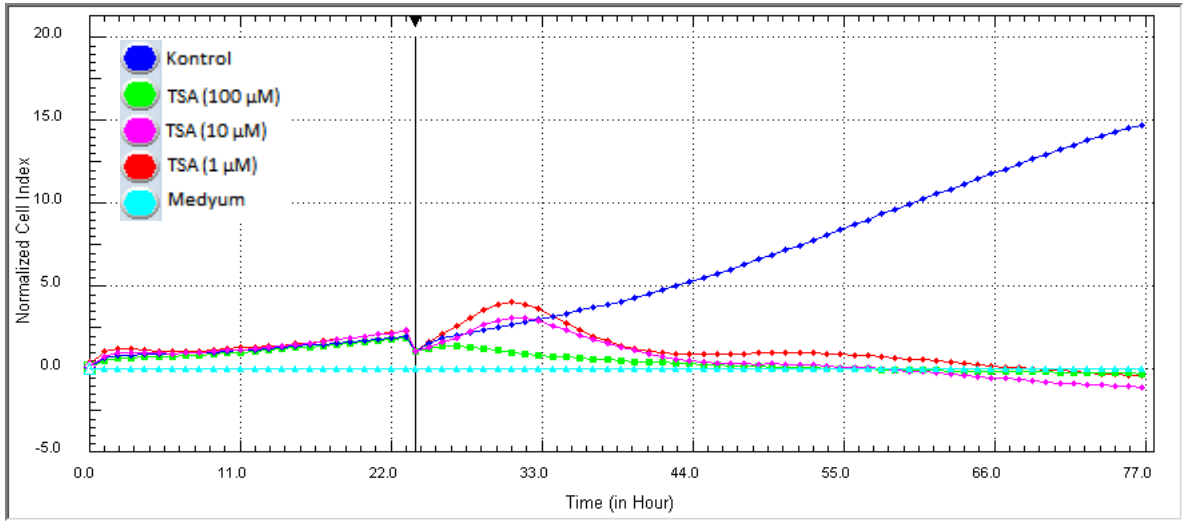
HMC3 hücrelerinde 1, 10 ve 100 μ M TSA, Rifampin, Givinostat ve RG108'in gerçek zamanlı hücre indeksi verilerine göre hesaplanan 24. ve 48. saatteki IC_{50} değerleri **Tablo 5.8.**'de gösterilmiştir.

Tablo 5.8. TSA, Rifampin, Givinostat ve RG108 konsantrasyonlarının HMC3 hücreleri üzerindeki 24. ve 48. saatteki IC_{50} değerleri.

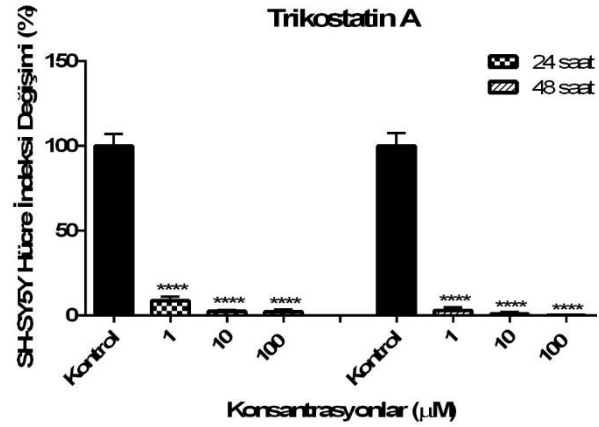
Konsantrasyonlar	HMC3 IC_{50} Değerleri	
	24. Saat	48. Saat
TSA	172 nM	156 nM
Rifampin	33.2 μ M	31 μ M
Givinostat	11.8 μ M	539 nM
RG108	>400 μ M	>400 μ M

5.5.2. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemiyle SH-SY5Y hücre canlılığının belirlenmesi

SH-SY5Y hücreleri üzerinde, TSA'nın hücre proliferasyonuna etkileri gerçek zamanlı olarak değerlendirildiğinde (Şekil 5.32.), kontrol grubuna göre hücre canlılığı 1, 10 ve 100 μ M konsantrasyonda 24. saatte sırasıyla % 91.34, 97.43 ve 97.86, 48. saatte ise sırasıyla % 97.97, 98.9 ve 99.79 oranında azalmıştır (Şekil 5.33.). Hücre canlılığındaki azalma tüm konsantrasyon gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$ ****).

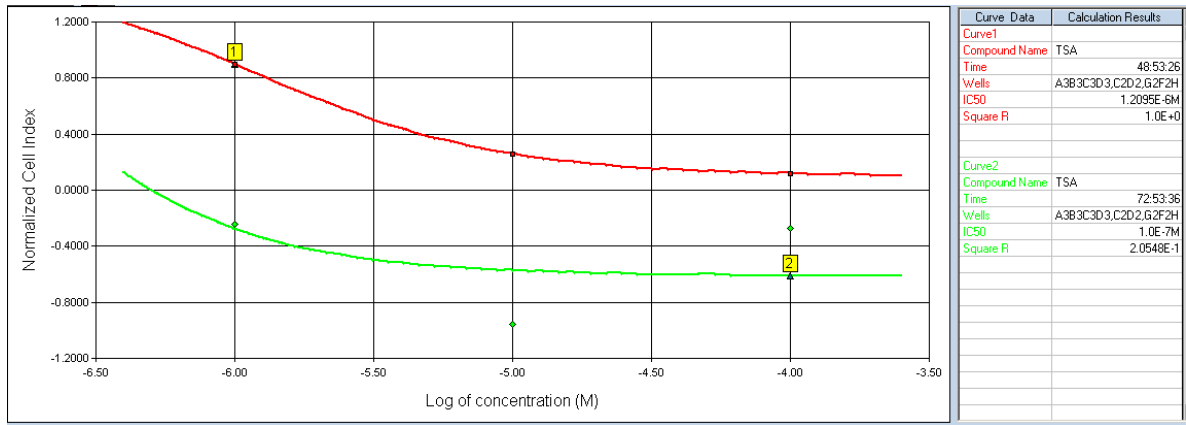


Şekil 5.32. SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10 ve 100 µM TSA konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.



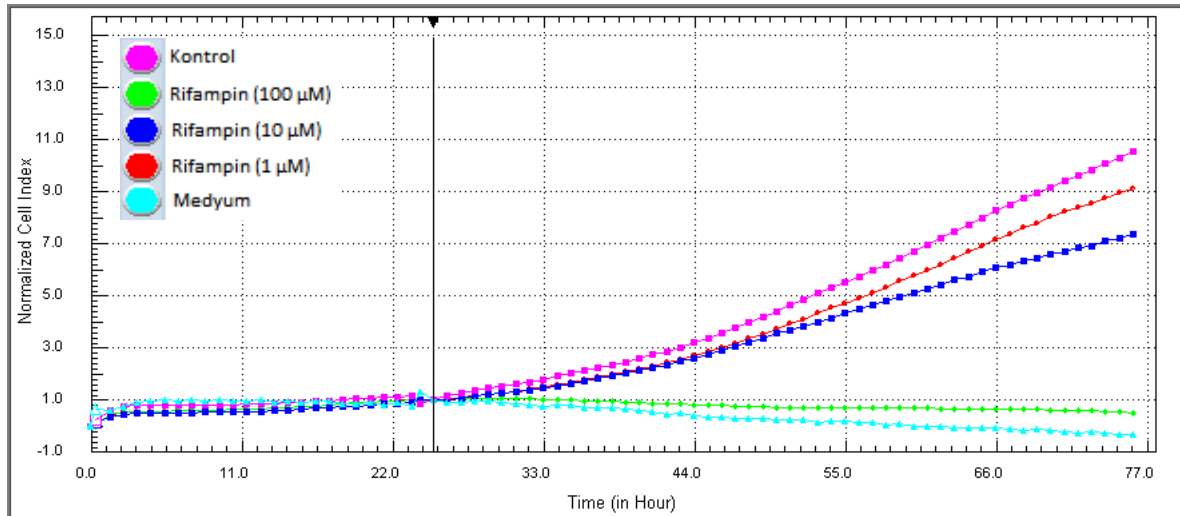
Şekil 5.33. RTCA DP Sisteminde 1, 10 ve 100 µM TSA konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücrelerinde 24. ve 48 saatlik hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği (anlamlı farklılık var: $p < 0.0001$ ****, fark yok: $p > 0.05$ n.s.).

SH-SY5Y hücrelerinde TSA'nın gerçek zamanlı hücre indeksi verilerine göre hesaplanan 24. ve 48. saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 1.21 µM ve 100 nM olarak belirlenmiştir (Şekil 5.34.).

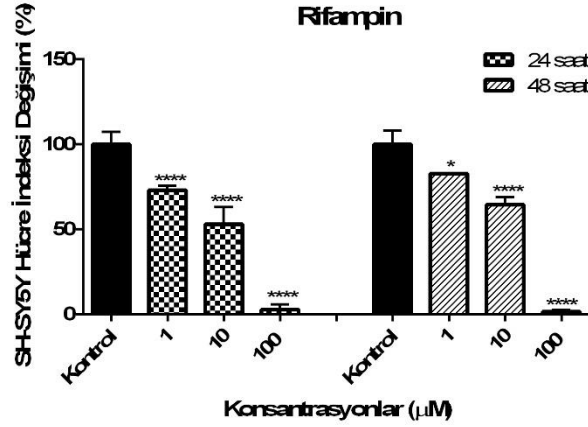


Şekil 5.34. RTCA DP sisteminde SH-SY5Y hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 μM TSA konsantrasyonlarının proliferasyon slope grafiği'ne göre hesaplanan 24. saat (kırmızı: 1.21 μM) ve 48. saatteki (yeşil: 100 nM) IC_{50} değerleri.

SH-SY5Y hücreleri üzerinde, Rifampin'in hücre proliferasyonuna etkileri gerçek zamanlı olarak değerlendirildiğinde (Şekil 5.35.), kontrol grubuna göre hücre canlılığı 1, 10 ve 100 μM 'da 24. saatte sırasıyla %30.28, 46.98 ve 97.24, 48. saatte ise sırasıyla %17.16, 25 ve 98.61 oranında azalmıştır (Şekil 5.36.). Hücre canlılığındaki azalma 24 saatte 1, 10 ve 100 ($p < 0.0001^{****}$) μM , 48 saatte 1 ($p < 0.05^*$), 10 ve 100 μM ($p < 0.0001^{****}$) konsantrasyon gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

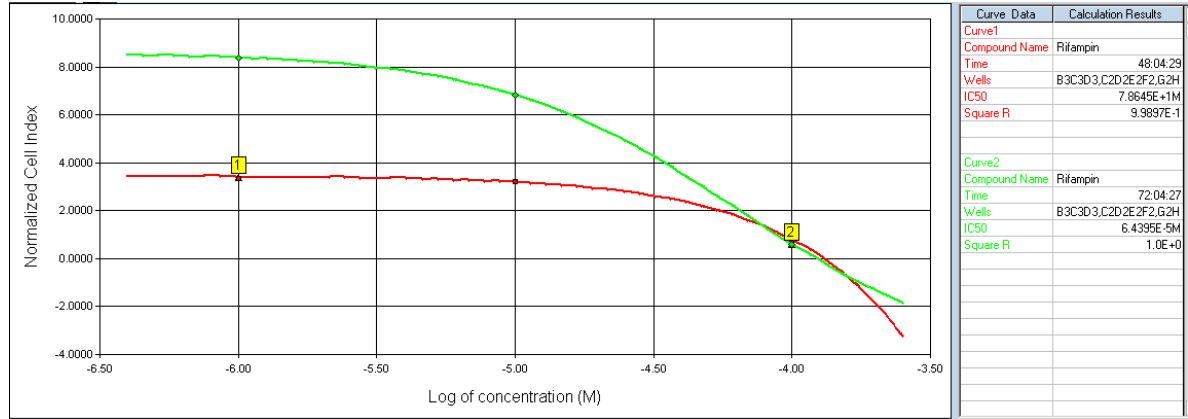


Şekil 5.35. SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10 ve 100 μM Rifampin konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.



Şekil 5.36. RTCA DP Sisteminde 1, 10 ve 100 µM Rifampin konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücrelerinde 24. ve 48. saatlik hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği (anlamlı farklılık var: $p < 0.05$ *, $p < 0.0001$ ****; fark yok: $p > 0.05$ n.s.).

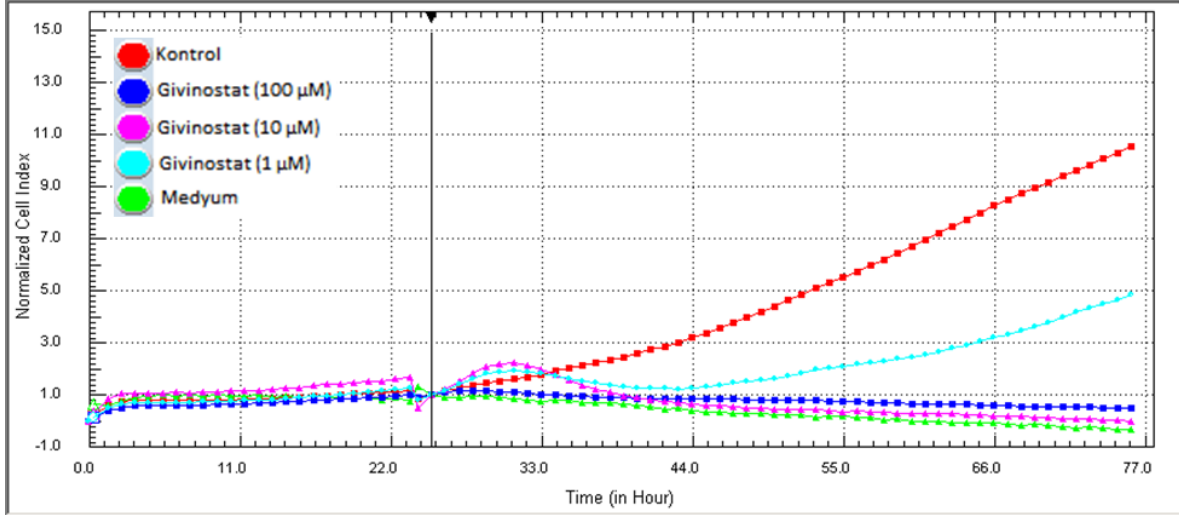
SH-SY5Y hücrelerinde Rifampin'in gerçek zamanlı hücre indeksi verilerine göre hesaplanan 24. ve 48. saatteki IC₅₀ değerleri sırasıyla >400 µM ve 64.4 µM olarak belirlenmiştir (Şekil 5.37.).



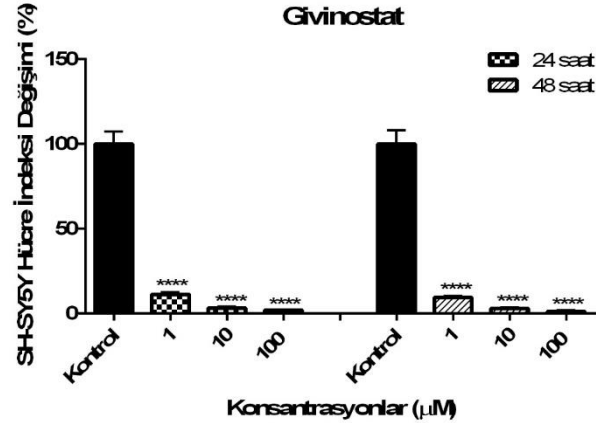
Şekil 5.37. RTCA DP sisteminde SH-SY5Y hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 µM Rifampin konsantrasyonlarının proliferasyon slope grafiği'ne göre hesaplanan 24. saat (kırmızı: >400 µM) ve 48. saatteki (yeşil: 64.4 µM) IC₅₀ değerleri.

SH-SY5Y hücreleri üzerinde, Givinostat'ın hücre proliferasyonuna etkileri gerçek zamanlı olarak değerlendirildiğinde (Şekil 5.38.), kontrol grubuna göre hücre canlılığı 24. saatte 1, 10 ve 100 µM'da sırasıyla %88.72, 96.85 ve 98.06, 48. saatte ise sırasıyla %90.56,

96.9 ve 98.77 oranında azalmıştır (Şekil 5.39.). Hücre canlılığındaki azalma tüm konsantrasyon gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$ ****).

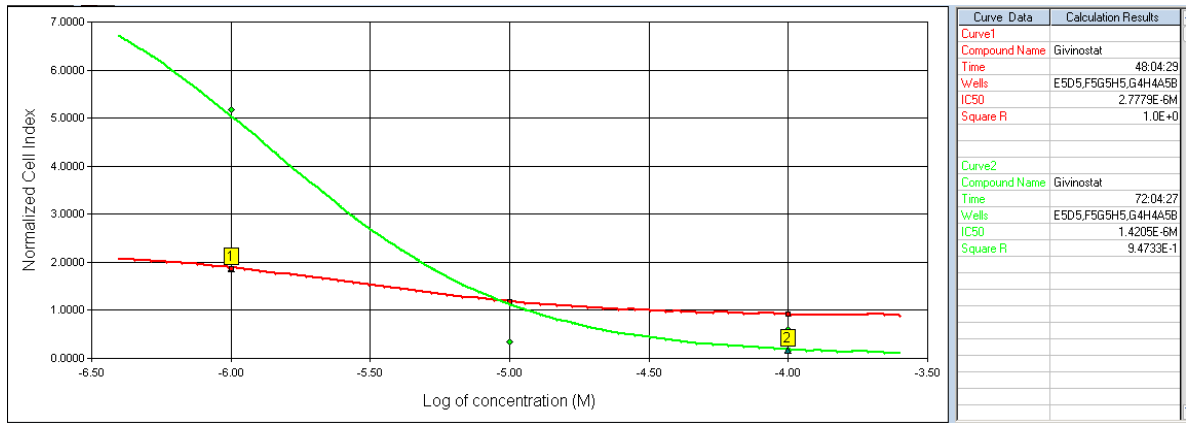


Şekil 5.38. SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10 ve 100 µM Givinostat konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.



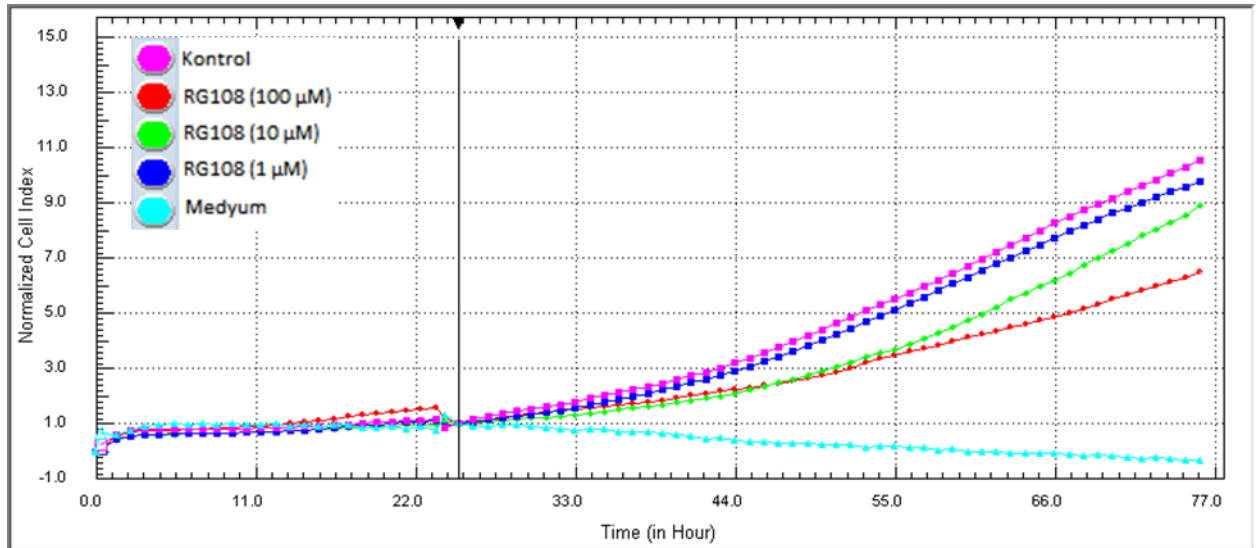
Şekil 5.39. RTCA DP Sisteminde 1, 10 ve 100 µM Givinostat konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücrelerinde 24. ve 48. saatlik hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği (anlamlı farklılık var: $p < 0.0001$ ****; fark yok: $p > 0.05$ n.s.).

SH-SY5Y hücrelerinde Givinostat'ın gerçek zamanlı hücre indeksi verilerine göre hesaplanan 24. ve 48. saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 2.78 µM ve 1.42 µM olarak belirlenmiştir (Şekil 5.40.).

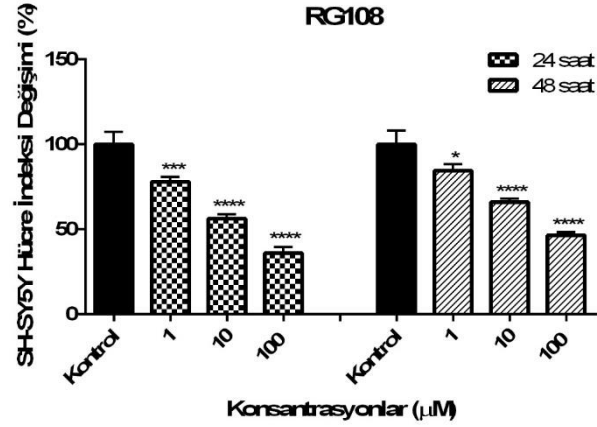


Şekil 5.40. RTCA DP sisteminde SH-SY5Y hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 μM Givinostat konsantrasyonlarının proliferasyon slope grafiği'ne göre hesaplanan 24. saat (kırmızı: 2.78 μM) ve 48. saatteki (yeşil: 1.42 μM) IC_{50} değerleri.

SH-SY5Y hücreleri üzerinde, RG108'in hücre proliferasyonuna etkileri gerçek zamanlı olarak değerlendirildiğinde (Şekil 5.41.), kontrol grubuna göre hücre canlılığı 1, 10 ve 100 μM 'da 24. saatte sırasıyla %21.98, 43.73 ve 64.03, 48. saatte ise sırasıyla %15.47, 33.89 ve 53.43 oranında azalmıştır (Şekil 5.42.). Hücre canlılığındaki azalma 24 saatte 100 ($p<0.001^{***}$) μM , 48 saatte 10 ($p<0.05^*$) ve 100 μM ($p<0.0001^{****}$) konsantrasyon gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

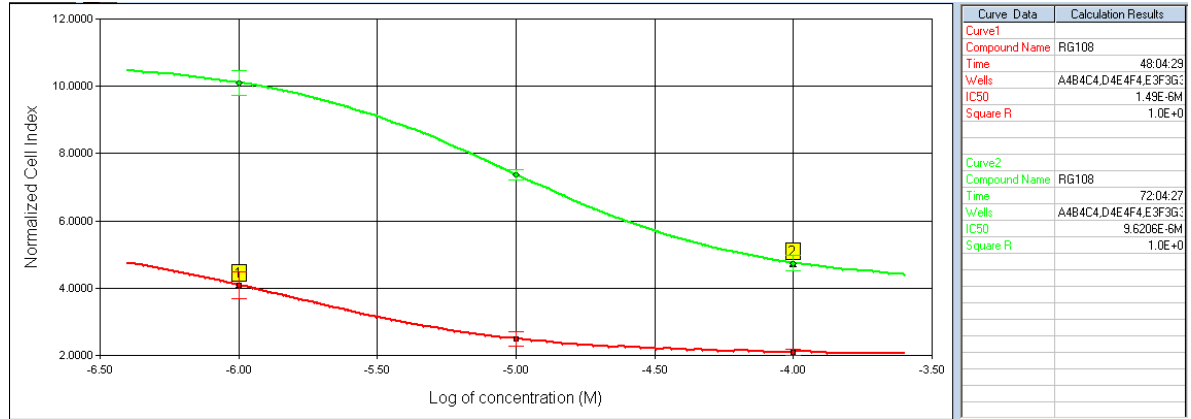


Şekil 5.41. SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10 ve 100 μM RG108 konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.



Şekil 5.42. RTCA DP Sisteminde 1, 10 ve 100 µM RG108 konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücrelerinde 24. ve 48. saatlik hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği (anlamlı farklılık var: $p < 0.05^*$, $p < 0.001^{***}$, $p < 0.0001^{****}$; fark yok: $p > 0.05$ n.s.).

SH-SY5Y hücrelerinde RG108'in gerçek zamanlı hücre indeksi verilerine göre hesaplanan 24. ve 48. saatteki IC₅₀ değerleri sırasıyla 1.49 µM ve 9.6 µM olarak belirlenmiştir (Şekil 5.43.).



Şekil 5.43. RTCA DP sisteminde SH-SY5Y hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 µM RG108 konsantrasyonlarının proliferasyon slope grafiği'ne göre hesaplanan 24. saat (kırmızı: 1.49 µM) ve 48. saatteki (yeşil: 9.6 µM) IC₅₀ değerleri.

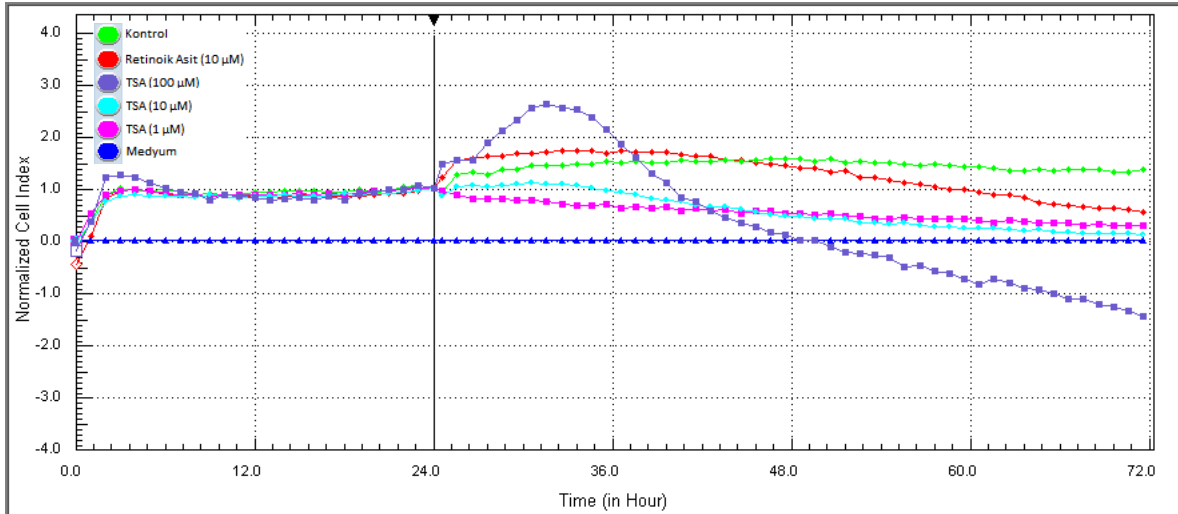
SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10 ve 100 µM TSA, Rifampin, Givinostat ve RG108'in gerçek zamanlı hücre indeksi verilerine göre hesaplanan 24. ve 48. saatteki IC₅₀ değerleri **Tablo 5.9.**'da gösterilmiştir.

Tablo 5.9. TSA, Rifampin, Givinostat ve RG108 konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücreleri üzerindeki 24. ve 48. saatteki IC₅₀ değerleri.

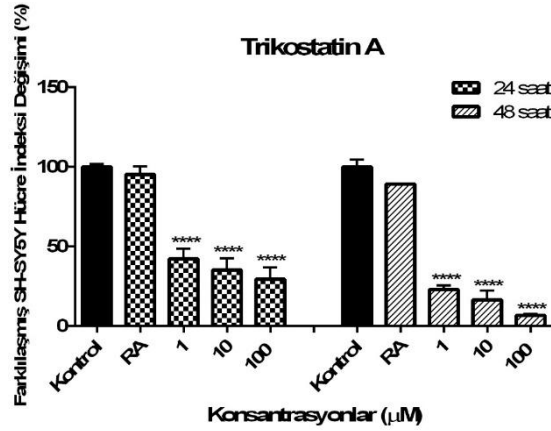
Konsantrasyonlar	SH-SY5Y IC ₅₀ Değerleri	
	24. Saat	48. Saat
TSA	1.21 µM	100 nM
Rifampin	>400 µM	64.4 µM
Givinostat	2.78 µM	1.42 µM
RG108	1.49 µM	9.6 µM

5.5.3. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemiyle farklılaşmış SH-SY5Y hücre canlılığının belirlenmesi

Farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri üzerinde, RA ve TSA'nın hücre proliferasyonuna etkileri gerçek zamanlı olarak değerlendirildiğinde (Şekil 5.44.), kontrol grubuna göre hücre canlılığı 10 µM RA ve 1, 10 ve 100 µM TSA ile 24. saatte sırasıyla %4.73, 57.67, 64.77 ve 70.6, 48. saatte ise sırasıyla %10.73, 77.04, 83.55 ve 93.28 oranında azalmıştır (Şekil 5.45.). Hücre canlılığındaki azalma 24 saatte 1, 10 ve 100 (p<0.0001****) µM, 48 saatte 1, 10 ve 100 µM (p<0.0001****) konsantrasyon gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

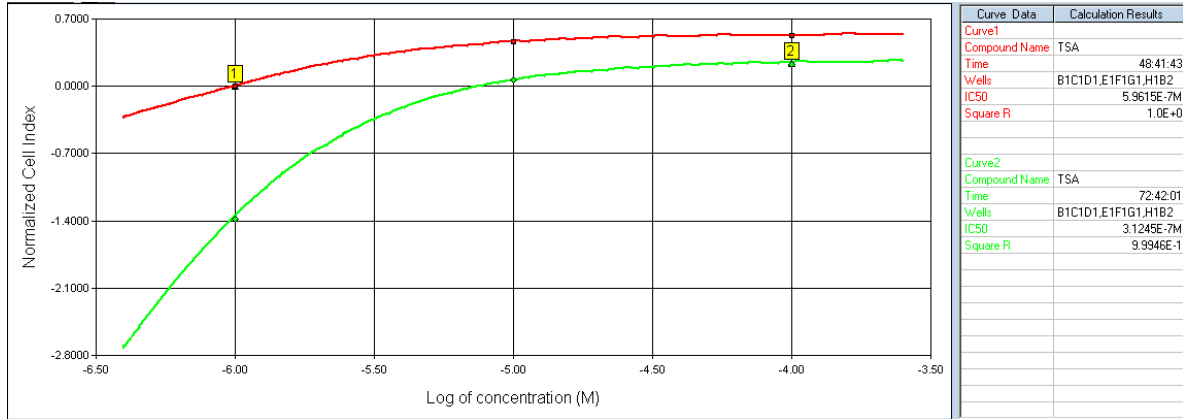


Şekil 5.44. Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10 ve 100 µM TSA ve 10 µM RA konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.



Şekil 5.45. RTCA DP sisteminde 1, 10 ve 100 µM TSA ve 10 µM RA konsantrasyonlarının farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde 24. ve 48. saatlik hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği (anlamlı farklılık var: $p < 0.0001$ ****; fark yok: $p > 0.05$ n.s.).

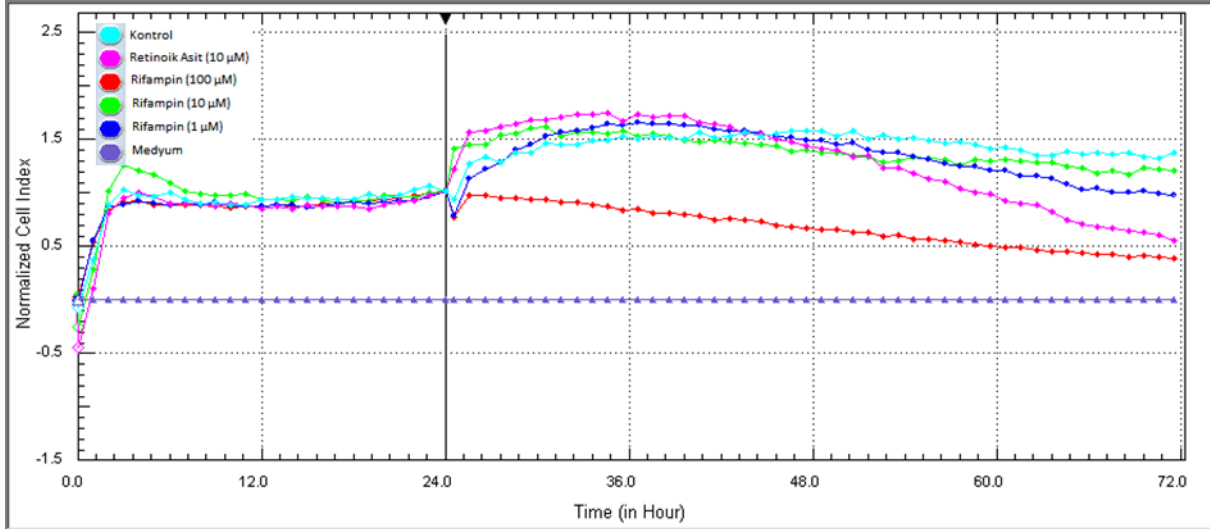
Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde TSA'nın gerçek zamanlı hücre indeksi verilerine göre hesaplanan 24. ve 48. saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 596 ve 312 nM olarak belirlenmiştir (Şekil 5.46.).



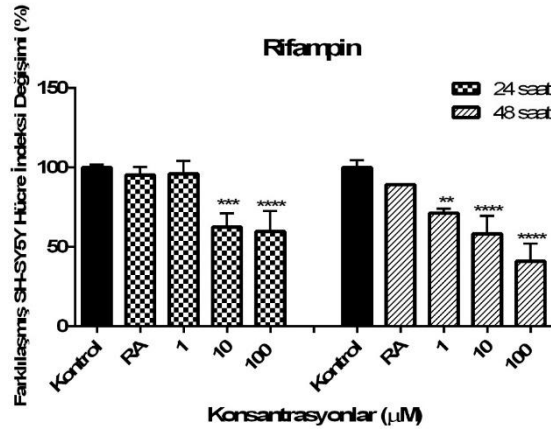
Şekil 5.46. RTCA DP sisteminde farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 µM TSA ve 10 µM RA konsantrasyonlarının proliferasyon slope grafiği'ne göre hesaplanan 24. saat (kırmızı: 596 nM) ve 48. saatteki (yeşil: 312 nM) IC_{50} değerleri.

Farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri üzerinde, RA ve Rifampin'in hücre proliferasyonuna etkileri gerçek zamanlı olarak değerlendirildiğinde (Şekil 5.47.), kontrol grubuna göre hücre canlılığı 10 µM RA ve 1, 10 ve 100 µM Rifampin ile 24. saatte sırasıyla %4.73, 4.09, 37.4 ve 40.34, 48. saatte ise sırasıyla %10.73, 28.63, 41.76 ve 58.88 oranında azalmıştır (Şekil

5.48.). Hücre canlılığındaki azalma 24 saatte 10 ($p<0.001^{***}$) ve 100 ($p<0.0001^{****}$) μM , 48 saatte 1 ($p<0.01^{**}$), 10 ve 100 μM ($p<0.0001^{****}$) konsantrasyon gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

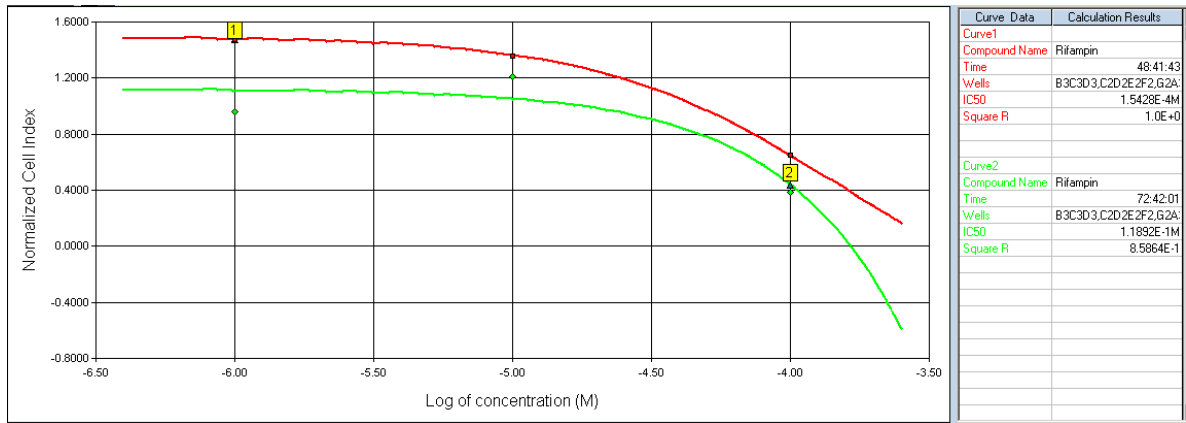


Şekil 5.47. Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10 ve 100 μM Rifampin ve 10 μM RA konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.



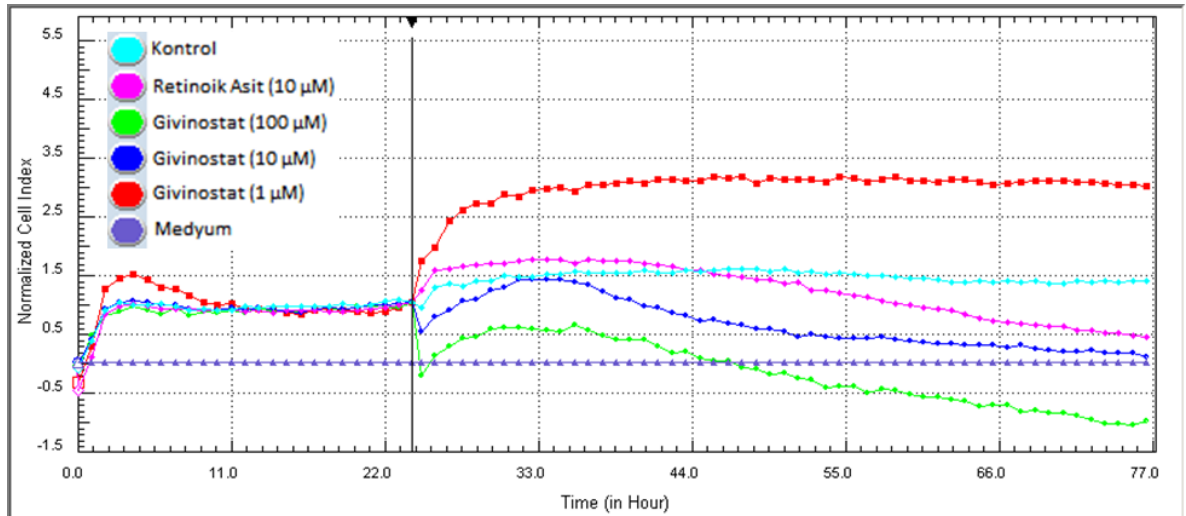
Şekil 5.48. RTCA DP sisteminde 1, 10 ve 100 μM Rifampin ve 10 μM RA konsantrasyonlarının farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde 24. ve 48. saatlik hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği (anlamlı farklılık var: $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$, $p<0.0001^{****}$; fark yok: $p>0.05$ n.s.).

Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde Rifampin'in gerçek zamanlı hücre indeksi verilerine göre hesaplanan 24. ve 48. saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 154 ve 118 μM olarak belirlenmiştir (Şekil 5.49.).

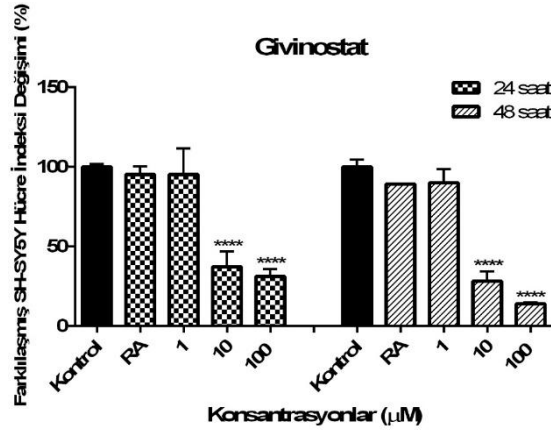


Şekil 5.49. RTCA DP sisteminde farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 μM Rifampin ve 10 μM RA konsantrasyonlarının proliferasyon slope grafiği'ne göre hesaplanan 24. saat (kırmızı: 154 μM) ve 48. saatteki (yeşil: 118 μM) IC_{50} değerleri.

Farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri üzerinde, RA ve Givinostat'ın hücre proliferasyonuna etkileri gerçek zamanlı olarak değerlendirildiğinde (Şekil 5.50.), kontrol grubuna göre hücre canlılığı 10 μM RA ve 1, 10 ve 100 μM Givinostat ile 24. saatte sırasıyla % 4.73, 4.83, 62.73 ve 68.64, 48. saatte ise sırasıyla % 10.73, 10.1, 71.66 ve 86.03 oranında azalmıştır (Şekil 5.51.). Hücre canlılığındaki azalma 24 ve 48 saatte 10 ve 100 μM konsantrasyon gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$ ****).

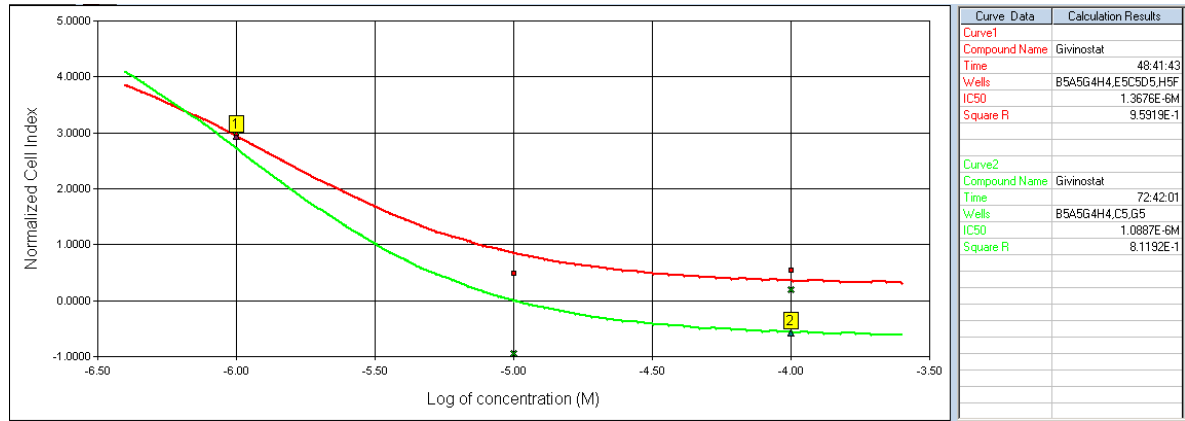


Şekil 5.50. Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10 ve 100 μM Givinostat ve 10 μM RA konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.



Şekil 5.51. RTCA DP sisteminde 1, 10 ve 100 µM Givinostat ve 10 µM RA konsantrasyonlarının farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde 24.ve 48. saatlik hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği (anlamlı farklılık var: $p < 0.0001$ ****; fark yok: $p > 0.05$ n.s.).

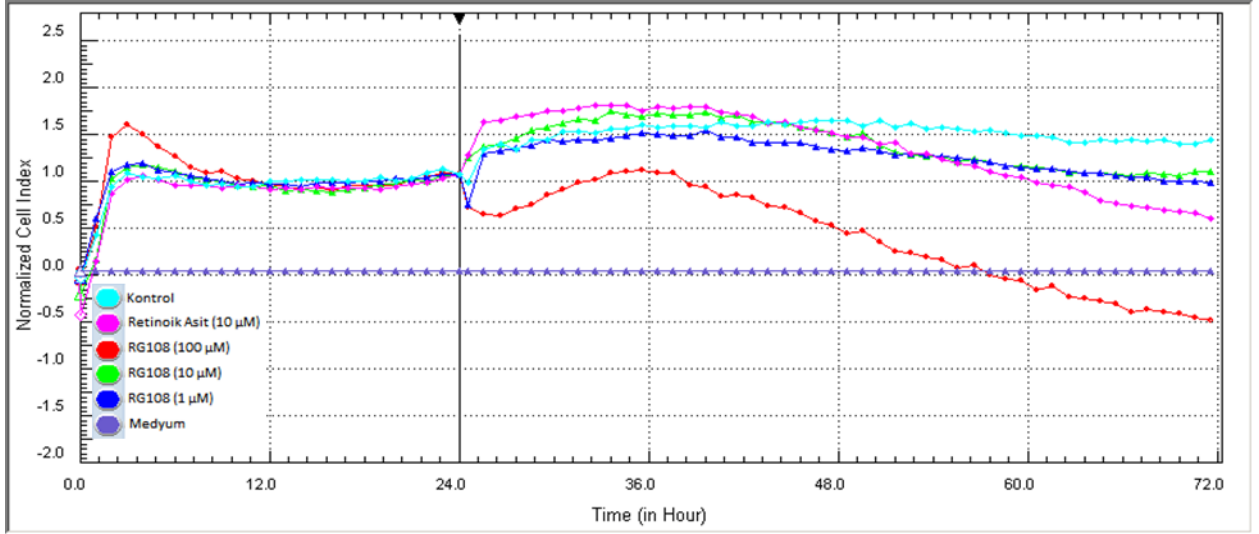
Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde Givinostat'ın gerçek zamanlı hücre indeksi verilerine göre hesaplanan 24. ve 48. saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 1.36 ve 1.09 µM olarak belirlenmiştir (Şekil 5.52.).



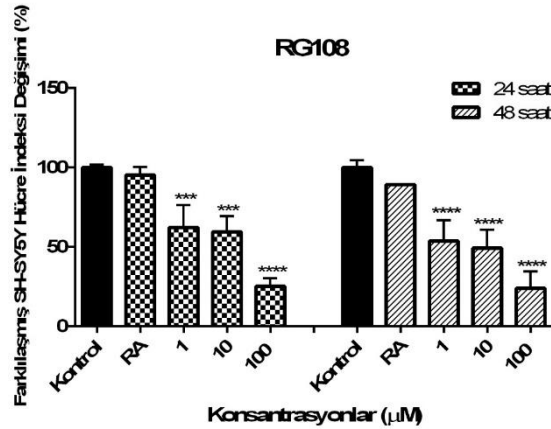
Şekil 5.52. RTCA DP sisteminde farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 µM Givinostat ve 10 µM RA konsantrasyonlarının proliferasyon slope grafiği'ne göre hesaplanan 24. saat (kırmızı: 1.36 µM) ve 48. saatteki (yeşil: 1.09 µM) IC_{50} değerleri.

Farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri üzerinde, RA ve RG108'in hücre proliferasyonuna etkileri gerçek zamanlı olarak değerlendirildiğinde (Şekil 5.53.), kontrol grubuna göre hücre canlılığı 10 µM RA ve 1, 10 ve 100 µM RG108 ile 24. saatte sırasıyla % 4.73, 37.87, 40.54 ve 74.64, 48. saatte ise sırasıyla % 10.73, 46.22, 50.78 ve 76.03 oranında azalmıştır (Şekil

5.54.). Hücre canlılığındaki azalma 24 saatte 1, 10 ($p<0.001^{***}$) ve 100 ($p<0.0001^{****}$) μM , 48 saatte 1, 10 ve 100 μM ($p<0.0001^{****}$) konsantrasyon gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

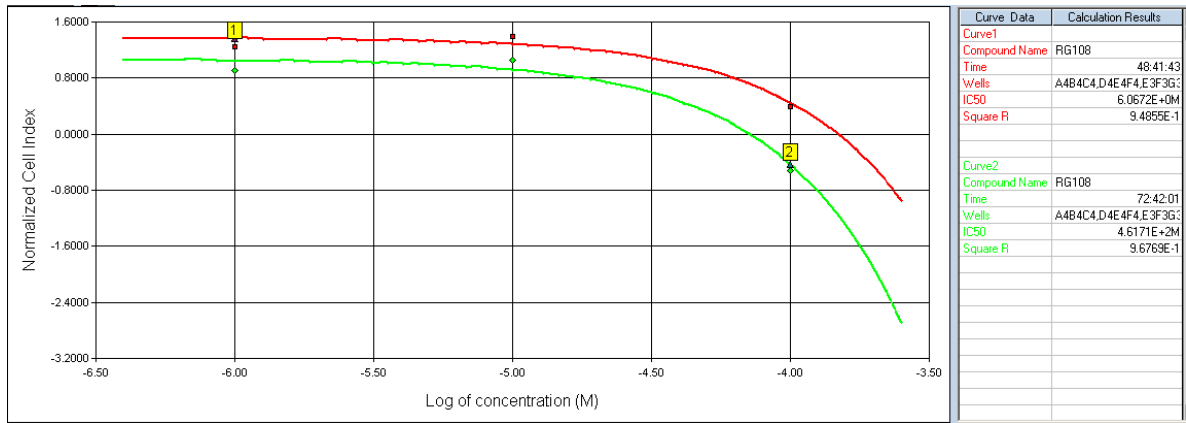


Şekil 5.53. Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10 ve 100 μM RG108 ve 10 μM RA konsantrasyonlarının RTCA DP analiz sistemi ile 48 saatlik hücre proliferasyon eğrileri.



Şekil 5.54. RTCA DP sisteminde 1, 10 ve 100 μM RG108 ve 10 μM RA konsantrasyonlarının farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde 24. ve 48. saatlik hücre indeks değerlerine göre proliferasyon slope grafiği (anlamlı farklılık var: $p<0.001^{***}$, $p<0.0001^{****}$; fark yok: $p>0.05$ n.s.).

Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde RG108'in gerçek zamanlı hücre indeksi verilerine göre hesaplanan 24. ve 48. saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 13.6 ve 10.8 μM olarak belirlenmiştir (Şekil 5.55.).



Şekil 5.55. RTCA DP sisteminde farklılaşmış SH-SY5Y hücreleri üzerinde 1, 10 ve 100 μM RG108 ve 10 μM RA konsantrasyonlarının proliferasyon slope grafiği'ne göre hesaplanan 24. saat (kırmızı: 13.6 μM) ve 48. saatteki (yeşil: 10.8 μM) IC_{50} değerleri.

Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinde 1, 10 ve 100 μM TSA, Rifampin, Givinostat ve RG108'in gerçek zamanlı hücre indeksi verilerine göre hesaplanan 24. ve 48. saatteki IC_{50} değerleri **Tablo 5.10.**'da gösterilmiştir.

Tablo 5.10. TSA, Rifampin, Givinostat ve RG108 konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücreleri üzerindeki 24. ve 48. saatteki IC_{50} değerleri.

Konsantrasyonlar	Farklılaşmış SH-SY5Y IC_{50} Değerleri	
	24. Saat	48. Saat
TSA	596 nM	312 nM
Rifampin	154 μM	118 μM
Givinostat	1.36 μM	1.09 μM
RG108	13.6 μM	10.8 μM

Cpn ile aktive edilecek HMC3 insan mikrogliya ve farklılaştırılmış SH-SY5Y ile oluşturulacak olan nöroinflamasyon ko-kültür modelinde ve A β ile oluşturulacak nörotoksisite modeli deneylerinde etkileri birbirleriyle karşılaştırılacak olan, sitotoksik olmayan TSA, Rifampin, Givinostat ve RG108 konsantrasyonlarının belirlenmesi tez kapsamında yapılan deneylerin oldukça önemli ve hassas bir kısmıdır. Kolorimetrik, florometrik, luminometrik gibi ölçüm tiplerine göre sınıflandırılan pek çok geleneksel *in*

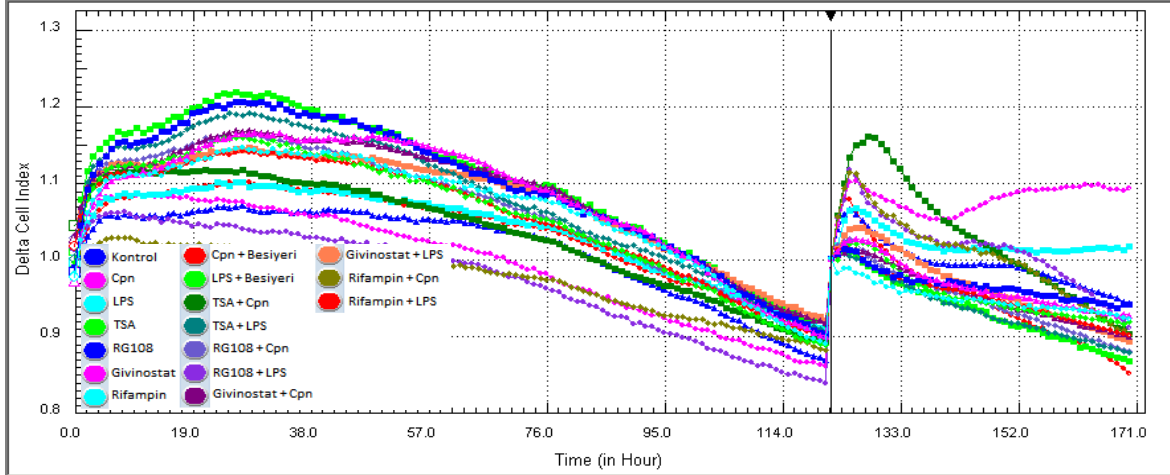
vitro hücre canlılığı ve sitotoksikite testi olmasına rağmen, bu testler ilaç geliştirme sırasında hem bileşik toksisitesini hem de tümör hücresi büyüme inhibisyonunu hızlı ve etkili bir biçimde ölçmek için tasarlanmıştır (Aslantürk, 2018). Bu nedenle sitotoksik olmayan konsantrasyonların belirlenmesinde kolorimetrik esasa dayanan WST-1 sitotoksikite testinin yanı sıra, hücresel biyolojik olayları boya veya başka bir belirteç ile etiketlemeye gerek duymadan gerçek zamanlı olarak analiz edilebilen xCELLigence sistemi de kullanılmıştır. Daha önce bahsedildiği gibi, sistemde 16-kuyucuklu, tabanında hücre sayısındaki, canlılığındaki veya adezyondaki değişimleri anlık kaydeden altın mikroeletrotlar bulunan 3 adet plaka aynı anda kullanılabilir (Özdemir vd, 2013). Bu nedenle öncelikle WST-1 çalışmasıyla yüksek konsantrasyon aralıklarında (200, 100, 50, 25 ve 12.5 μ M) doz taraması yapılmış ve sonrasında konsantrasyon sayısı azaltılarak daha düşük doz aralıklarında (100, 10 ve 1 μ M) gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde proliferasyon analizi yapılarak 24 ve 48 saatlik hücre indeksi değerlerine göre IC₅₀ konsantrasyonları belirlenmiştir. IC₅₀ konsantrasyonları karşılaştırılarak bütün hücrelerde görülen en düşük değer olan 100 nM, ileri deneylerimizde kullanılacak sitotoksik olmayan konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

5.6. *Chlamydia pneumoniae* ve Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücreleriyle Oluşturulan Nöroinflamasyon Ko-Kültür Modeli Çalışmalarının Değerlendirilmesi

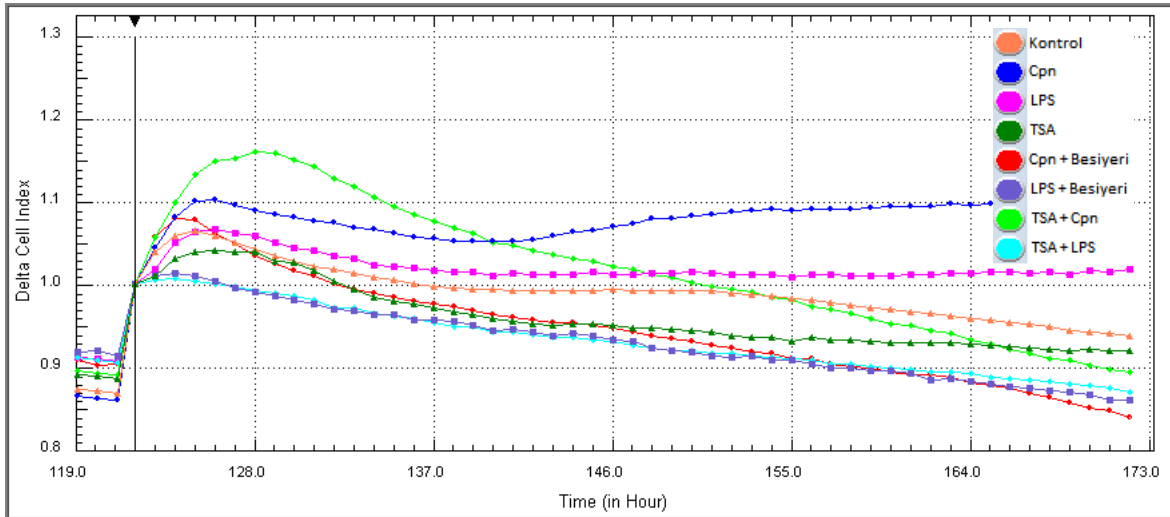
5.6.1. Nöroinflamasyon ko-kültür modelinde hücre canlılığının gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenmesi

Nöroinflamasyon ko-kültür hücre modeli oluşturulması amacıyla 5 gün süreyle farklılaştırılmış ve sonrasında Cpn veya LPS ile aktive edilmiş mikrogliya hücreleriyle 48 saat inkübe edilmiş SH-SY5Y hücrelerinin mRNA elde edilmesi öncesinde canlılıklarının izlenmesi amacıyla xCELLigence RTCA-DP analiz sistemi kullanılarak hücre indeks değerleri kaydedilmiştir (**Şekil 5.56.**). Sonraki deneylerde nöroprotektif etkiler karşılaştırılacağı ve ko-kültür modelinde mikrogliya ve SH-SY5Y hücreleri bir arada kullanılacağı için sitotoksik olmayan en yüksek konsantrasyon olan 100 nM olarak belirlenmiştir. Tek başına veya Cpn (1 μ g/ml) + IFN- γ (10 ng/ml) veya LPS (100 ng/ml) + IFN- γ (10 ng/ml) ile aktive edilmiş mikrogliya hücreleriyle ko-kültür halde uygulanan TSA

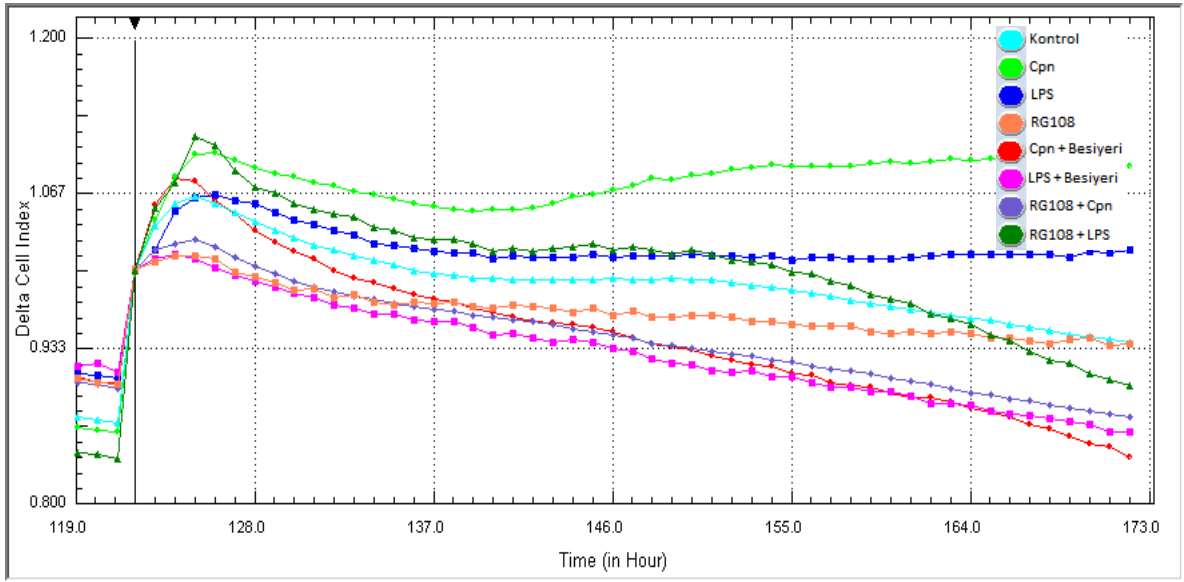
(100 nM), RG108 (100 nM), Givinostat (100 nM) ve Rifampin (100 nM)’ a ait hücre indeks verileri sırasıyla Şekil 5.57., Şekil 5.58., Şekil 5.59. ve Şekil 5.60. ‘da yer almaktadır.



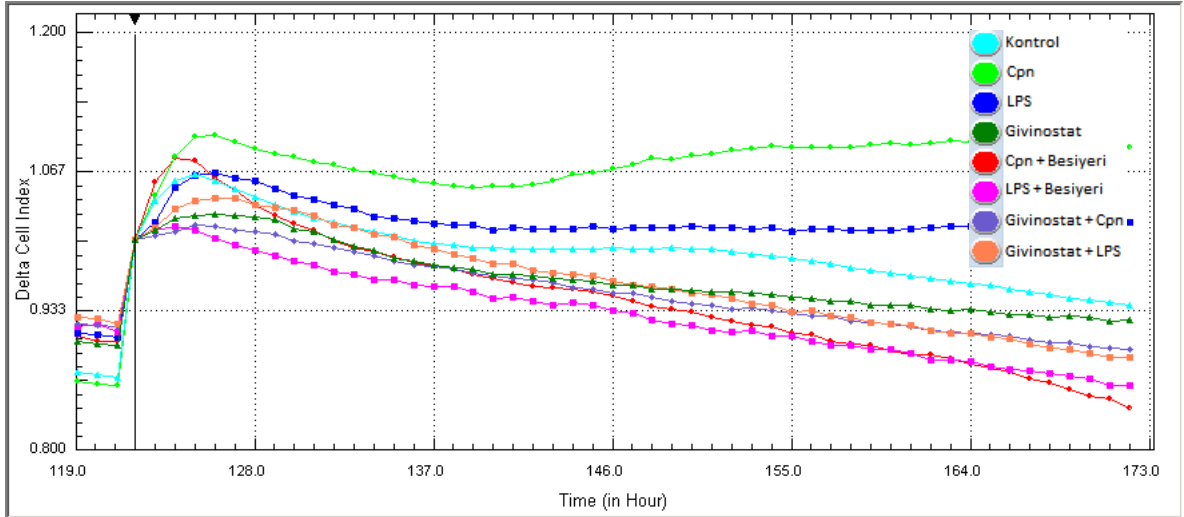
Şekil 5.56. Nöroinflamasyon ko-kültür modelinde farklılaşmış SH-SY5Y hücre canlılığının RTCA-DP sisteminde izlenmesi sırasında 7 gün boyunca ölçülen hücre indeks değerlerinin grafiği (Cpn (1 µg/ml)/LPS (100 ng/ml) + IFN-γ (10 ng/ml); TSA, RG108, Givinostat, Rifampin (100 nM)).



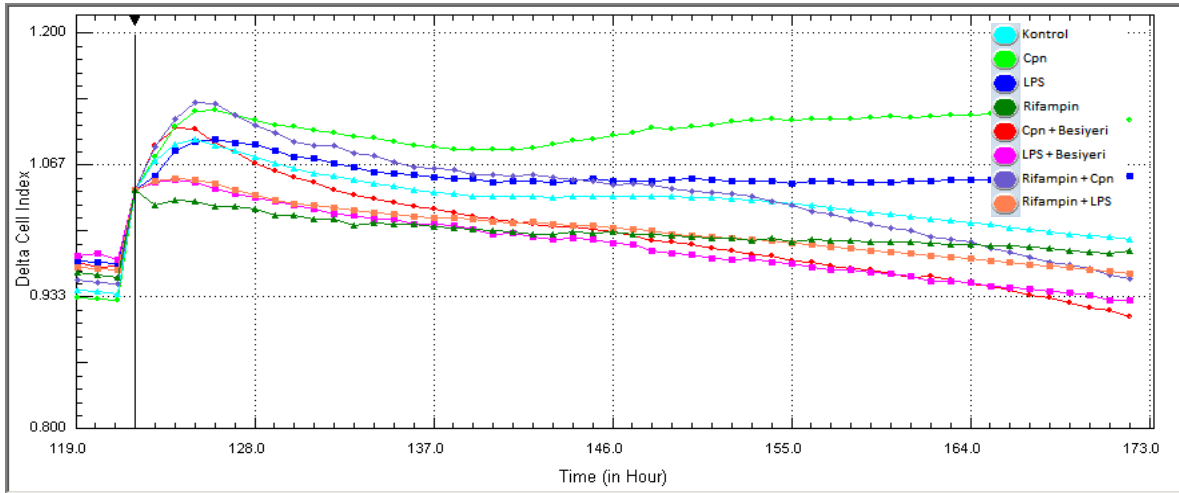
Şekil 5.57. RTCA-DP analiz sisteminde, tekli veya kombine halde Cpn, LPS ve TSA konsantrasyon gruplarının nöroinflamasyon ko-kültür modelinde farklılaşmış SH-SY5Y hücre canlılığı üzerine etkilerinin 48 saat boyunca kaydedilen hücre indeksi verilerine göre hücre proliferasyon eğrileri (Cpn (1 µg/ml)/LPS (100 ng/ml) + IFN-γ (10 ng/ml); TSA (100 nM)).



Şekil 5.58. RTCA-DP analiz sisteminde, tekli veya kombine halde Cpn, LPS ve RG108 konsantrasyon gruplarının nöroinflamasyon ko-kültür modelinde farklılaşmış SH-SY5Y hücre canlılığı üzerine etkilerinin 48 saat boyunca kaydedilen hücre indeksi verilerine göre hücre proliferasyon eğrileri (Cpn (1 $\mu\text{g/ml}$)/LPS (100 ng/ml) + IFN- γ (10 ng/ml); RG108 (100 nM)).

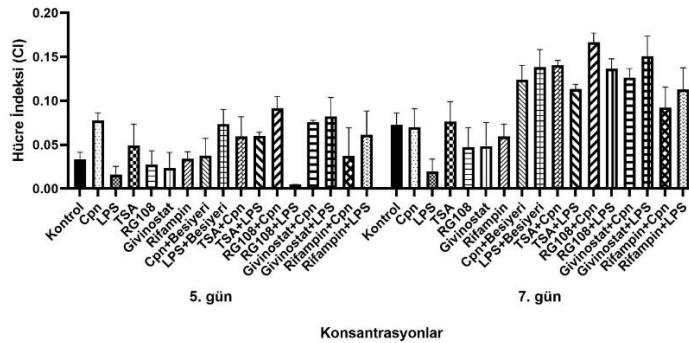


Şekil 5.59. RTCA-DP analiz sisteminde, tekli veya kombine halde Cpn, LPS ve Givinostat konsantrasyon gruplarının nöroinflamasyon ko-kültür modelinde farklılaşmış SH-SY5Y hücre canlılığı üzerine etkilerinin 48 saat boyunca kaydedilen hücre indeksi verilerine göre hücre proliferasyon eğrileri (Cpn (1 $\mu\text{g/ml}$)/LPS (100 ng/ml) + IFN- γ (10 ng/ml); Givinostat (100 nM)).



Şekil 5.60. RTCA-DP analiz sisteminde, tekli veya kombine halde Cpn, LPS ve Rifampin konsantrasyon gruplarının nöroinflamasyon ko-kültür modelinde farklılaşmış SH-SY5Y hücre canlılığı üzerine etkilerinin 48 saat boyunca kaydedilen hücre indeksi verilerine göre hücre proliferasyon eğrileri (Cpn (1 µg/ml)/LPS (100 ng/ml) + IFN-γ (10 ng/ml); Rifampin (100 nM)).

Tek başına konsantrasyon grupları veya Cpn veya LPS ile aktive edilen mikrogliya ve farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri ile oluşturulan nöroinflamasyon ko-kültür modeli sırasında kaydedilen 5. ve 7. gün hücre indeksi verileriyle çizilen slope grafiği **Şekil 5.61.**'de yer almaktadır. Gen paneliyle yapılan çalışmalar öncesinde, gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde Cpn ile indüklenen nöroinflamasyon ko-kültür modeli çalışması yapılarak hücre canlılıkları LPS ile indüklenen ko-kültür modeliyle karşılaştırılmıştır. Hücre indeksi değerleri ve grafiklerden anlaşılacağı üzere, farklılaşma ve ko-kültür süresince SH-SY5Y hücre canlılığında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma saptanmamıştır (**Şekil 5.61.**).



Şekil 5.61. RTCA DP sisteminde nöroinflamasyon ko-kültür modelinde uygulanan konsantrasyonların 5. ve 7. günlerde hücre indeksi verileri grafiği (n=4, ort ± st sapma).

Deney sonuçlarına göre, 5. günde konsantrasyonlar uygulandıktan sonra, proliferasyon grafiğinde de görülebileceği gibi, farklılaşma nedeniyle hücre indeksi değerleri yükselmekte sonrasında nörit oluşumu nedeniyle bir miktar düşmektedir. Nörit oluşumu, beyin gelişimi sırasında nöronların gelişen akson ve dendritleri uzatmak amacıyla farklılaştıkları mekanizmayı tanımlamaktadır. Bir aksonun uzaması genellikle uzun mesafeler boyunca büyümeyi ve “yol bulma” (hücre dışı sinyallere bir dönüş yanıtı) adı verilen bir süreci içerir. Nöritlerin ön kenarı olan büyüme konileri, uzayan bir nöritin ucundaki dinamik alanlardır. Aksonal uzama sırasında büyüme konileri yol bulma sürecine katılırlar ve çekici ve itici ipuçlarına yanıt verirler (Xie vd., 2003; Nikolic, 2004). CI değerlerindeki hızlı artış, SH-SY5Y hücrelerinde farklılaşmanın ilk aşamaları olarak kabul edilmektedir (Dwane vd., 2013). Bahsedilen bu ilk aşamada, hücre gövdesi empedansta bir artışa neden olacak şekilde büyüyerek şişer ve daha sonra hücreden nöritler uzadıkça hücre gövdesi küçülerek empedansta bir düşüşe neden olur (Dwane vd., 2013; Mustafa vd., 2015; Mustafa vd., 2016; Kaya-Tilki vd., 2016; Dikmen vd., 2017). xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde yapılan ko-kültür çalışmaları sıklıkla kanser araştırmalarında kullanılmaktadır (Moodley vd., 2011; Erskine vd., 2012; Berger vd., 2017). Çalışmamıza benzer olarak LPS veya başka bir ajanla aktive edilmiş BV2 mikrogliya hücre hattı ve farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleriyle yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Kwon vd., 2008; Zhu vd., 2014; Ma vd., 2015). Ancak yapılan literatür taramasında aktive edilmiş HMC3 hücre hattı ve farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleriyle yapılmış bir ko-kültür çalışmasına rastlanmamıştır ve xCELLigence teknolojisinin nöroinflamasyonun modellenmesinde kullanılması açısından çalışmamız önem taşımaktadır.

5.6.2. *Chlamydia pneumoniae* enfeksiyonunun gen düzeyindeki etkilerinin değerlendirilmesi

Cpn enfeksiyonunun inflamazom yolağı ve epigenetik kromatin düzenlenmesi ile ilişkili enzimler üzerindeki olası etkilerinin araştırılması için optimize edilen nöroinflamasyon ko-kültür modelinde HMC3 mikrogliya hücreleri veya Cpn ile aktive edilmiş ve sonrasında SH-SY5Y hücreleri ile birleştirilerek konsantrasyonlar uygulanmıştır. Sonrasında SH-SY5Y hücrelerinden elde edilen mRNA’dan cDNA sentezlenerek gen

ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre kat artışları **Tablo 5.11.** ve **5.12.**'de gösterilmiştir.

Epigenetik kromatin düzenlenmesi ile ilişkili genlerin incelendiği gen paneli sonuçlarına göre, Cpn (1 µg/ml) + IFN-γ (10 ng/ml) konsantrasyon grubunda yalnızca SETD7 ve DPEP2 genlerinde sırasıyla, 1.34 ve 1.59 oranında kat artışı gözlenmiş, diğer genlerde ise kontrol grubuna göre düşüş saptanmıştır. Cpn + TSA (100 nM) konsantrasyon grubunda yalnızca HDAC4 geninde 3.40 kat artış bulunmuştur. Cpn + Rifampin (100 nM) grubunda, HDAC10, SETD8, SUV420H1, WHSC1 ve DPEP2 genlerinde sırasıyla, 2.50, 3.92, 2.27, 1.28 ve 34.22 kat artış gözlenmiştir. Cpn + Givinostat ve Cpn + RG108 gruplarında DNMT3B geninde sırasıyla, 1.16 ve 1.14 kat artış bulunmuştur. Cpn + RG108 (100 nM) konsantrasyon grubunda SETD8, PRMT5 ve NSD1 genlerinde sırasıyla, 1.11, 1.01 ve 1.18 kat artış saptanmıştır (**Tablo 5.11.**).

Tablo 5.11. *Konsantrasyon gruplarının epigenetik kromatin modifikasyonundan sorumlu enzimlerin yer aldığı gen panelindeki ekspresyonlarının kontrol grubuna göre kat değişimleri ((+) upregülasyon).*

Genler	Kontrol	Cpn (1 µg/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	Cpn + TSA (100 nM)	Cpn + Rifampin (100 nM)	Cpn + Givinostat (100 nM)	Cpn + RG108 (100 nM)
HDAC1	1.00	0,34	0,22	0,06	0,11	0,11
HDAC2	1.00	0,27	0,17	0,08	0,16	0,21
HDAC3	1.00	0,60	0,30	0,27	0,25	0,27
HDAC4	1.00	0,49	(+) 3,40	0,09	0,04	0,04
HDAC5	1.00	0,16	0,02	Ekspresyon yok	Ekspresyon yok	Ekspresyon yok
HDAC6	1.00	0,70	0,36	Ekspresyon yok	0,06	0,02
HDAC7	1.00	0,41	0,25	0,04	0,12	0,13
HDAC8	1.00	0,35	0,11	0,08	0,09	0,09
HDAC10	1.00	0,71	0,21	(+) 2,50	0,14	0,27
HDAC11	1.00	0,36	Ekspresyon yok	0,80	0,11	0,19
HAT1	1.00	0,13	0,05	0,01	0,02	0,01
SETDB1	1.00	0,51	0,22	0,15	0,23	0,30
SETDB2	1.00	0,45	0,09	0,09	0,06	0,08
SETD1A	1.00	0,10	0,02	0,00	0,02	0,03
SETD1B	1.00	0,22	0,04	0,02	0,04	0,07

Tablo 5.11. (Devam) *Konsantrasyon gruplarının epigenetik kromatin modifikasyonundan sorumlu enzimlerin yer aldığı gen panelindeki ekspresyonlarının kontrol grubuna göre kat değişimleri.*

SETD2	1.00	0.20	0.21	0.03	0.26	0.49
SETD3	1.00	0.22	0.10	0.03	0.07	0.06
SETD4	1.00	0.54	0.20	0.29	0.13	0.18
SETD5	1.00	0.13	0.01	0.00	0.00	0.01
SETD6	1.00	0.82	0.23	0.04	0.03	0.02
SETD7	1.00	(+) 1.34	0.48	0.23	0.51	0.76
SETD8	1.00	0.23	0.61	(+) 3.92	0.59	(+) 1.11
KAT2A	1.00	0.17	0.07	0.13	0.08	0.11
KAT2B	1.00	0.21	0.19	0.09	0.32	0.49
KAT5	1.00	0.20	0.46	0.01	0.00	0.00
KDM1A	1.00	0.18	0.05	0.01	0.03	0.04
KDM4A	1.00	0.17	0.23	0.04	0.15	0.24
KDM4C	1.00	0.20	0.04	0.02	0.04	0.05
KDM5B	1.00	0.04	0.01	0.03	0.01	0.01
KDM5C	1.00	0.18	0.17	0.04	0.15	0.22
KDM6B	1.00	0.43	0.58	0.45	0.64	0.96
DNMT1	1.00	0.14	0.20	0.03	0.25	0.35
DNMT3A	1.00	0.20	0.35	0.24	0.51	0.88
DNMT3B	1.00	0.17	0.77	0.07	(+) 1.26	(+) 1.14
PRMT1	1.00	0.16	0.01	0.01	0.00	0.01
PRMT2	1.00	0.45	0.21	0.24	0.21	0.24
PRMT3	1.00	0.23	0.62	0.21	0.63	0.92
PRMT5	1.00	0.64	0.93	0.72	0.70	(+) 1.01
PRMT7	1.00	0.55	0.13	0.16	0.12	0.20
MYST1	1.00	0.26	0.02	0.02	0.01	0.01
MYST2	1.00	0.11	0.06	0.01	0.04	0.08
MYST3	1.00	0.19	0.12	0.04	0.14	0.21
MYST4	1.00	0.37	0.25	0.25	0.19	0.27
MYSM1	1.00	0.23	0.16	0.07	0.18	0.23
MLL	1.00	0.15	0.25	0.10	0.38	0.64
MLL3	1.00	0.10	0.00	0.01	0.00	0.01
MLL5	1.00	0.45	0.22	0.19	0.29	0.37
USP16	1.00	0.42	0.14	0.11	0.09	0.15

Tablo 5.11. (Devam) *Konsantrasyon gruplarının epigenetik kromatin modifikasyonundan sorumlu enzimlerin yer aldığı gen panelindeki ekspresyonlarının kontrol grubuna göre kat değişimleri.*

USP21	1.00	0.36	0.13	0.18	0.08	0.14
USP22	1.00	0.57	0.11	0.23	0.16	0.28
AURKA	1.00	0.49	0.39	0.28	0.36	0.43
AURKB	1.00	0.42	0.02	0.05	0.02	0.02
AURKC	1.00	0.43	0.05	0.05	0.01	0.01
UBE2A	1.00	0.60	0.22	0.23	0.12	0.18
UBE2B	1.00	0.97	0.25	0.39	0.17	0.28
NCOA1	1.00	0.45	0.11	0.10	0.08	0.12
ESCO1	1.00	0.10	0.17	0.05	0.54	0.90
ESCO2	1.00	0.19	0.27	0.09	0.45	0.79
NCOA3	1.00	0.18	0.12	0.03	0.38	0.48
NCOA6	1.00	0.58	0.21	0.21	0.28	0.40
SUV39H1	1.00	0.36	0.10	0.05	0.04	0.06
SUV420H1	1.00	0.33	0.23	(+) 2.27	0.28	0.41
RPS6KA5	1.00	0.67	0.64	0.06	0.08	0.10
DOT1L	1.00	0.39	0.15	0.12	0.18	0.36
PAK1	1.00	0.23	0.16	0.07	0.23	0.30
CARM1	1.00	0.31	0.26	0.17	0.33	0.49
NSD1	1.00	0.10	0.33	0.16	0.64	(+) 1.18
DZIP3	1.00	0.17	0.12	0.01	0.22	0.19
EHMT2	1.00	0.10	Ekspresyon yok	0.00	Ekspresyon yok	0.00
SMYD3	1.00	0.31	0.15	0.09	0.19	0.21
WHSC1	1.00	0.84	0.48	(+) 1.28	0.50	0.69
ATF2	1.00	0.43	0.07	0.10	0.07	0.14
ASH1L	1.00	0.18	0.11	0.06	0.19	0.28
RNF2	1.00	0.13	0.03	0.01	0.05	0.06
CSRP2BP	1.00	0.22	0.14	0.01	0.14	0.11
DPEP2	1.00	(+) 1.59	0.11	(+) 34.22	Ekspresyon yok	0.20
NEK6	1.00	0.55	0.15	0.14	0.08	0.07
RNF20	1.00	0.11	0.01	0.00	0.00	Ekspresyon yok
RPS6KA3	1.00	0.05	0.03	0.00	0.02	0.03

SETD7 (SET Alanı Taşıyan Lizin Metiltransferaz 7), histon H3'ün 4. lizini spesifik olarak metilleyen bir lizin metiltransferazdır. H3 'Lys-4' metilasyonu, epigenetik transkripsiyonel aktivasyon için spesifik bir etiketi temsil eder. Kollajenaz veya insülin gibi çeşitli genlerin transkripsiyonel aktivasyonunda merkezi bir rol oynar. Bichmann ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, hiperfosforile olmayan nükleer tau proteinlerinde SETD7 aracılı lizin monometilasyonunun bol miktarda bulunduğu bildirilmiştir. AH da dahil olmak üzere insan tauopatileri, tau'nun posttranslasyonel modifikasyon paterninde, çözünmez agregatların, nöronal disfonksiyonun ve dejenerasyonun oluşumuna yol açan değişiklikler ile karakterizedir. Erken AH beyinlerinden izole edilen örneklerde, tau üzerinde birden fazla lizin monometilasyon bölgesi tespit edilmiştir (Bichmann vd., 2020). Aynı zamanda, oksidatif stresle indüklenen NF- κ B aktivitesinin, SETD7 inhibisyonu ile azaltıldığı bildirilmiştir (He vd., 2015). Epigenetik panel sonuçları incelendiğinde, Cpn konsantrasyon grubu ile SETD7 geninde 1.34 kat ekspresyon artışı saptanmıştır. Bu bilgiler ışığında, epigenetik bağlamda Cpn enfeksiyonu ve AH ilişkisine SETD7 geni aracılık ediyor olabilir.

DPEP2 (Dipeptidaz 2), zara bağlı dipeptidazlar familyasına aittir. Bu enzimler, lökotrien D4, bazı antibiyotiklerin beta-laktam halkası ve glutatyon yıkımı sırasında oluşan sistinil-bis-glisin (cys-bis-glis) dahil olmak üzere çeşitli dipeptidleri hidrolize ederler. Bu gen tarafından kodlanan protein, bir proteaz inhibitörü ve sitokin taşıyıcısıdır. Tripsin, trombin ve kollajenaz da dahil olmak üzere geniş bir proteaz spektrumunu engellemek için yem ve tuzak mekanizmasını kullanır. Ayrıca, inflamatuvar sitokinleri de inhibe edebilir ve böylece inflamatuvar kaskadları bozar. Bu gendeki mutasyonlar, alfa-2-makroglobulin eksikliğinin bir nedenidir. Bu genin ekspresyonundaki artış, A β birikintilerinin ana bileşeni olan A β 'nın klerensine ve bozunmasına aracılık etmesi nedeniyle Alzheimer hastalığı açısından öneme sahiptir (Habib vd., 2003). Son zamanlarda, DPEP ekspresyonunun, inflamatuvar hastalıklarda bağışıklık tepkileri ile potansiyel ilişkilerine dair veriler artmaktadır (Däbritz vd., 2015; Chen vd., 2015; Yang vd., 2019). Yang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, kardiyak inflamasyonun Koksaki virüs B3 kaynaklı viral miyokarditin patojenik bir mekanizması olduğu ve enfeksiyon sırasında kardiyak dokuya sızan makrofajlar tarafından üretilen DPEP2 ekspresyonunun oldukça arttığı bildirilmiştir. Ancak, makrofaj

spesifik DPEP2 delesyonu kalp dokusunda artmış TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokin ekspresyonuyla sonuçlanmış ve virüs kaynaklı kardiyak inflamasyonu daha da şiddetlendirmiştir. Ek olarak, DPEP2'den yoksun kemik iliği kaynaklı makrofajlar, kontrol grubuna kıyasla virüs stimülasyonuna karşı artmış proinflamatuvar sitokin cevabı vermiştir. DPEP2'nin makrofajlar üzerindeki baskılayıcı etkisine NF- κ B sinyal yolağı baskılanmasının aracılık ettiği bildirilmiştir (Yang vd., 2019). Rifampinin nöroprotektif etki mekanizmasına da NF- κ B sinyal yolağı baskılanmasının aracılık ettiği bilinmektedir (Bi vd., 2011; Kim vd., 2009; Bi vd., 2013). DPEP2 geninde Cpn+Rifampin konsantrasyon grubu ile edilen 34.22 kat ekspresyon artışı bu açıdan önemli bir bulgudur ve DPEP2 geni rifampinin nöroprotektif etkilerine aracılık ediyor olabilir. Aynı zamanda Cpn grubu ile görülen 1.59 kat ekspresyon artışının da enfeksiyona gösterilen inflamatuvar cevaptan kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

Histon deasetilaz 10 (HDAC10), kromatin yapısının ve gen ekspresyonunun modüle edilmesinde gerekli olan yeni keşfedilmiş bir sınıf II histon deasetilazdır (Tong vd., 2002). HDAC10 ayrıca immün yanıtlarda rol oynar (Oehme vd., 2013, Stammeler vd., 2015, Pinto vd., 2016, Liao vd., 2019). HDAC10 upregülasyonunun, temporomandibular eklemde IL-1 β aracılı sinoviyum kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin inflamatuvar aktivasyonuna katkıda bulunduğu (Liao vd., 2019) ve *in vitro* ve *in vivo* nöroblastoma hücrelerinde otofaji aracılı sağkalımı desteklediği bildirilmiştir (Oehme vd., 2013). Wang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, intraserebral kanama sonrasında insanlarda ve sıçanlarda HDAC10 gen ekspresyonunda artış bildirilmiştir. HDAC10 geninin susturulması, protein tirozin fosfataz, reseptör olmayan tip 22 (PTPN22) yolağı aracılığıyla NLRP3 inflamazom kaskadını aktive etmiş ve bu da intraserebral kanama hasarında artışla sonuçlanmıştır. Bu nedenle HDAC10'un intraserebral kanama hasarına karşı nöroprotektif bir ajan olabileceği öne sürülmüştür (Wang vd., 2020). Cpn + Rifampin konsantrasyon grubunda kontrol grubuna göre 2.50 kat artış saptanmıştır. Bu sonuçlara göre, Rifampinin nöroprotektif etkilerine, epigenetik bağlamda, HDAC10 aracılık ediyor olabilir.

Epigenetik panelinden elde edilen bir diğer önemli bulgu da, Cpn+TSA grubu ile HDAC4 gen ekspresyon seviyesinde bulunan 3.40 kat artıştır. Histon deasetilazlar (HDAC'ler), histon asetilasyonunun durumunu düzenleyerek hem fizyolojik hem de

patolojik olaylarda yer almaktadırlar. TSA, HDAC inhibitörlerinin hidroksamat sınıfında yer alan, sınıf I ve II HDAC üzerine etkili, sitostatik ve farklılaştırıcı özellikler gösteren, antifungal bir ajandır. TSA'nın hidroksamit asit grubu aracılığıyla histon deasetilaz enzimlerinin aktif bölgesine bir çinko iyonu kenetlemesi ile katalitik reaksiyonu önlediği öne sürülmüştür. Memeli hücre kültüründe parçalanmış hücre nükleer ekstraktlarında, düşük nanomolar konsantrasyonlarda, kompetitif olmayan, geri dönüşümlü HDAC inhibitör aktivitesi göstermiştir (Vigushin vd., 2001). Her ne kadar HDAC ailesinin bir üyesi olan histon deasetilaz 4 (HDAC4), HDAC aktivitesinden yoksun olsa da, sinaptik plastisite, nöronal hayatta kalma ve transkripsiyon faktörleri, sinyal transdüksiyon molekülleri ve HDAC3 (HDAC ailesinin bir diğer üyesi) ile etkileşime girerek nöro gelişimde yer alan genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesinde aktif rol oynamaktadır. HDAC4, beyinde yüksek oranda ifade edilir ve homeostazi, bilişsel işlevlerin sürdürülmesi için çok önemlidir. HDAC4 ekspresyonu düzensizliğinin, nörodejeneratif hastalıklar ve bilişsel bozukluklar da dahil olmak üzere çeşitli nöronal hastalıklarda önemli bir etken olduğu yönündeki kanıtlar giderek artmaktadır (Mielcarek vd., 2015; Wu vd., 2016). Cpn + TSA konsantrasyon grubuyla saptanan 3.40 kat ekspresyon artışı saptanmıştır. HDAC4, TSA'nın nöroprotektif etkilerine aracılık ediyor olabilir.

Epigenetik kromatin düzenlenmesi ile ilişkili enzimlerin yer aldığı gen panelinden elde edilen bir başka ilginç bulgu ise Cpn + Rifampin ve Cpn + RG108 konsantrasyon gruplarıyla SETD8 geninde kontrol grubuna göre sırasıyla 3.92 ve 1.11 kat ekspresyon artışıdır. SETD8, *in vivo* histon H4'ün (H4K20) 20. lizini monometillediği bilinen tek lizin metiltransferazdır. Çoğalan hücrelerin nükleer antijeni ve p53 dahil olmak üzere histon olmayan proteinlerin lizin kalıntılarını da monometiller. Sonuç olarak enzimin metiltransferaz aktivitesi, DNA replikasyonu, DNA hasar yanıtı, transkripsiyon modülasyonu ve hücre döngüsü regülasyonu dahil olmak üzere birçok temel hücresel işlemde rol oynar (Milite vd., 2016). Parsiyel hepatektomi sonrasında karaciğer yenilenmesinde miRNA'ların rolünün araştırıldığı bir çalışmada, ilk 24 saatte miR-127 ekspresyonunun azaldığı ve ters orantılı olarak Bcl6 ve SETD8 gen ekspresyonlarının artış gösterdiği bildirilmiştir. SETD8 ekspresyonunda, parsiyel hepatektomiden 24 ve 120 saat sonra yüksek bir indüksiyon görülürken, SETD8 katalizati olan H4-K20me1'de, 24 saatte maksimum artış ve karaciğer rejenerasyonunun

terminal aşamasında ise azalma görülmüştür. Katalizatta görülen bu azalmanın H4-K20me1'in, *suppressor of variegation* (renklilik baskılayıcı) (SUV) 420H1, SUV420H2 ve *nuclear receptor binding SET domain protein 2* (nükleer reseptör bağlayıcı SET alan protein 2) NSD2 gibi diğer histon H4 metiltransferazlar tarafından ayrıca di-metillenmesi ve / veya tri-metillenmesi nedeniyle olabileceği öne sürülmüştür (Pan vd., 2012). Cpn + Rifampin grubunda SUV420H1 geninde 2.27 kat, Cpn + RG108 grubunda ise bir diğer histon metiltransferaz olan NSD1 geninde görülen 1.18 kat ekspresyon artışı da benzer bir mekanizmayı işaret ediyor olabilir.

İnflamazom ile ilişkili genlerin incelendiği gen paneli sonuçlarına göre, Cpn (1 µg/ml) + IFN-γ (10 ng/ml) konsantrasyon grubunda kontrol grubuna göre BIRC3, CARD6, CFLAR, CTSB, HSP90AB1, IFNG, IKBKB, IKBKG, IRF2, MAPK12, MAPK9, NLRP12, NLRX1, PYCARD, PYDC1, RAGE, RELA, TIRAP ve TNFSF4 genlerinde sırasıyla, 2.95, 2.00, 1.29, 3.93, 1.80, 2.18, 1.27, 1.05, 1.29, 1.05, 5.50, 10.48, 1.35, 2.90, 1.87, 4.99, 40417.53, 1.05 ve 2.09 kat artış bulunmuştur. Cpn + TSA (100 nM) konsantrasyon grubunda kontrol grubuna göre BCL2L1, BIRC3, CARD6, CASP8, CTSB, CXCL2, IFNB1, IFNG, IKBKB, IKBKG, IRF1, IRF2, MAPK3, MAPK8, MAPK9, NFKBIA, NFKBIB, NLRP12, PYCARD, PYDC1, RAGE, TAB2, TIRAP ve TNFSF4 genlerinde sırasıyla, 1.49, 4.41, 2.46, 2.18, 1.05, 1.33, 2.93, 7.29, 1.51, 1.38, 8.58, 1.10, 1.02, 1.09, 31.37, 1.20, 1.12, 38.52, 1.36, 2.75, 1.04, 2.25, 1.07 ve 2.24 kat artış bulunmuştur. Cpn + Rifampin (100 nM) grubunda ise, kontrole göre BCL2, BCL2L1, CARD6, CFLAR, CTSB, CXCL2, FAD, HSP90AB1, IFNB1, IFNG, IKBKG, IRF1, IRF2, MAPK12, MAPK3, MAPK9, NFKBIA, NFKBIB, NLRP12, PYCARD, PYDC1, RELA, RIPK2, SUGT1, TAB2, TIRAP, TNF ve TNFSF4 genlerinde sırasıyla, 2.33, 1.14, 535.48, 32.81, 4.54, 1.12, 5.63, 1.17, 405.30, 691.61, 3.16, 10.78, 5.18, 2.73, 6.36, 5.46, 1.47, 3.97, 28140, 302.78, 337.09, 3.45, 1.22, 1.16, 1.07, 1.87, 555.87 ve 372.02 kat artış gözlenmiştir. Cpn + Givinostat (100 nM) konsantrasyon grubunda CTSB, MAPK12 ve RIPK2 genlerinde kontrole göre sırasıyla, 2.07, 2.35 ve 3.57 kat artış gözlenmiştir. Cpn + RG108 (100 nM) konsantrasyon grubunda, BCL2L1, BIRC2, BIRC3, CFLAR, CTSB, CXCL2, FAD, HSP90B1, IKBKG, IL12A, IRAK1, IRF1, IRF2, MAPK12, MAPK3, MAPK8, NFKB1, NFKB1A, NFKB1B, NOD1, PEA15, PYCARD, PYDC1, RELA, RIPK2, TAB1, TIRAP ve TNFSF4 genlerinde kontrol grubuna göre sırasıyla, 12.72,

233.71, 31.64, 73.28, 435.14, 23.99, 7.53, 362.42, 4.13, 25.26, 14.49, 3.66, 9.08, 1121.78, 5.88, 82.79, 3.50, 20.39, 21.45, 3.80, 9.68, 1.16, 5.14, 134.22, 2625.04, 4.24, 3.25 ve 11.93 kat artışı belirlenmiştir (**Tablo 5.12.**).

Tablo 5.12. *Konsantrasyon gruplarının inflamazom ile ilişkili gen panelindeki ekspresyonlarının kontrol grubuna göre kat değişimleri ((+) upregülasyon).*

Genler	Kontrol	Cpn (1 µg/ml) + IFN-γ (10 ng/ml)	Cpn + TSA (100 nM)	Cpn + Rifampin (100 nM)	Cpn + Givinostat (100 nM)	Cpn + RG108 (100 nM)
BCL2	1.00	0.52	0.85	(+) 2.33	0.00	0.00
BCL2L1	1.00	0.50	(+) 1.49	(+) 1.14	0.01	(+) 12.72
BIRC2	1.00	0.52	0.90	0.61	0.33	(+) 233.71
BIRC3	1.00	(+) 2.95	(+) 4.41	0.53	0.00	(+) 31.64
CARD6	1.00	(+) 2.00	(+) 2.46	(+) 535.48	0.00	0.00
CASP8	1.00	0.28	(+) 2.15	0.28	0.13	0.90
CFLAR	1.00	(+) 1.29	0.61	(+) 32.81	0.09	(+) 73.28
CHUK	1.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.91
CTSB	1.00	(+) 3.93	(+) 1.05	(+) 4.54	(+) 2.07	(+) 435.14
CXCL2	1.00	0.62	(+) 1.33	(+) 1.12	0.03	(+) 23.99
FAD	1.00	0.54	0.88	(+) 5.63	0.02	(+) 7.53
HSP90AA1	1.00	0.30	0.84	0.50	0.00	0.40
HSP90AB1	1.00	(+) 1.80	0.11	(+) 1.17	0.02	0.00
HSP90B1	1.00	0.30	0.72	0.71	0.60	(+) 362.42
IFNB1	1.00	0.82	(+) 2.93	(+) 405.30	0.00	0.09
IFNG	1.00	(+) 2.18	(+) 7.29	(+) 691.61	0.00	0.00
IKBKB	1.00	(+) 1.27	(+) 1.51	0.22	0.00	0.00
IKBKG	1.00	(+) 1.05	(+) 1.38	(+) 3.16	0.01	(+) 4.13
IL12A	1.00	0.21	0.71	0.79	0.01	(+) 25.26
IRAK1	1.00	0.30	0.79	0.85	0.02	(+) 14.49
IRF1	1.00	0.02	(+) 8.58	(+) 10.78	0.01	(+) 3.66
IRF2	1.00	(+) 1.29	(+) 1.10	(+) 5.18	0.05	(+) 9.08
MAP3K7	1.00	0.14	0.96	0.14	0.00	0.10
MAPK1	1.00	0.24	0.87	0.30	0.00	0.00
MAPK12	1.00	(+) 1.05	0.73	(+) 2.73	(+) 2.35	(+) 1121.78
MAPK13	1.00	0.98	0.79	0.04	0.00	0.01

Tablo 5.12. (Devam) *Konsantrasyon gruplarının inflamazom ile ilişkili gen panelindeki ekspresyonlarının kontrol grubuna göre kat değişimleri.*

MAPK3	1.00	1.00	(+) 1.02	(+) 6.36	0.01	(+) 5.88
MAPK8	1.00	0.63	(+) 1.09	0.39	0.07	(+) 82.79
MAPK9	1.00	(+) 5.50	(+) 31.37	(+) 5.46	0.00	0.00
NFKB1	1.00	0.02	0.78	0.55	0.00	(+) 3.50
NFKBIA	1.00	0.60	(+) 1.20	(+) 1.47	0.06	(+) 20.39
NFKBIB	1.00	0.94	(+) 1.12	(+) 3.97	0.06	(+) 21.45
NLRP1	1.00	0.20	0.27	0.15	0.00	0.04
NLRP12	1.00	(+) 10.48	(+) 38.52	(+) 28140.00	0.00	0.14
NLRX1	1.00	(+) 1.35	0.11	0.53	1.00	0.00
NOD1	1.00	0.72	0.80	1.41	0.00	(+) 3.80
PEA15	1.00	0.26	0.82	0.52	0.02	(+) 9.68
PYCARD	1.00	(+) 2.90	(+) 1.36	(+) 302.78	0.00	(+) 1.16
PYDC1	1.00	(+) 1.87	(+) 2.75	(+) 337.09	0.01	(+) 5.14
RAGE	1.00	(+) 4.99	(+) 1.04	0.48	0.00	0.77
RELA	1.00	(+) 40417.53	0.69	(+) 3.45	0.27	(+) 134.22
RIPK2	1.00	0.59	0.85	(+) 1.22	(+) 3.57	(+) 2625.04
SUGT1	1.00	0.12	0.57	(+) 1.16	0.00	0.00
TAB1	1.00	0.03	0.13	0.21	0.00	(+) 4.24
TAB2	1.00	0.11	(+) 2.25	(+) 1.07	0.00	0.00
TIRAP	1.00	(+) 1.05	(+) 1.07	(+) 1.87	0.01	(+) 3.25
TNF	1.00	1.00	0.93	(+) 555.87	0.00	0.70
TNFSF4	1.00	(+) 2.09	(+) 2.24	(+) 372.02	0.01	(+) 11.93
TXNIP	1.00	0.05	0.06	0.04	0.00	0.00

Gelişmiş glikasyon son ürünü reseptörü (RAGE) tarafından kodlanan gen, hücre yüzeyi reseptörlerinin immünoglobulin süper ailesinin bir üyesidir. RAGE geni, gelişmiş glikasyon son ürünlerinin etkileşimlerine ve bunların yanı sıra homeostazis, gelişim, inflamasyon, diyabet ve AH gibi bazı hastalıklarda rol oynayan moleküller ile de etkileşimlere aracılık eden multiligand bir reseptördür. Gelişmiş glikasyon son ürünleri, yaşlanma ve diyabette yüksek oranlarda damar dokusunda biriken ve glikasyonu enzimatik olmayan proteinlerdir. Ateroskleroz gibi durumlarda ve özellikle diyabetin bir komplikasyonu olarak hem akut hem

de kronik vasküler inflamasyona aracı olarak görev yapar. Aynı zamanda A β peptidinin reseptörüdür. Kortikal nöronlarda, A β 'nın hücre zarı boyunca hücre dışından hücre içi alana geçişine katkıda bulunur. A β tarafından başlatılan RAGE sinyalleri, özellikle p38 mitojenle aktive olan protein kinazın (MAPK) uyarılması, A β 'yı RAGE ile bir kompleks halinde intranöronal alana ileten bir taşıma sistemini harekete geçirme kapasitesine sahiptir (Schmidt vd., 2009). RAGE'nin Alzheimer benzeri patofizyolojik değişikliklerin altında yatan hem inflamatuvar bir aracı hem de kritik bir oksidatif stres indükleyicisi olarak etki ettiğini gösteren kanıtlar giderek artmaktadır. Alzheimer patofizyolojisinde, A β üretimine ve birikimine, nörofibriler yumakların oluşmasına, sinaptik transmisyonun başarısızlığına ve nöronal dejenerasyona neden olan kritik bir role sahiptir (Cai vd., 2016). Panel sonuçları incelendiğinde, RAGE geninde mRNA kat artışı Cpn konsantrasyon grubu ile 4.99 kat artarken, TSA, RG108 ve Rifampin varlığında sırasıyla, 1.04, 0.77 ve 0.48 kata düşmektedir.

NOD-benzeri reseptörler (NOD-like receptors, NLR'ler), sitoplazmadaki DAMP'ları ve PAMP'ları algılamada rol oynayan geniş bir sitozolik reseptör ailesidir. Bazı NLR'ler birbirleriyle ilişkisiz çok farklı yapıları tanıma özelliğine sahiptir ve özel bir sinyal ileti düzeneği kullanırlar. En ayrıntılı tanımlanmış olan NLR prototipi olan NLRP-3 (NOD-benzeri reseptör ailesi, pyrin bükümü içeren 3), mikroorganizma yanısıra hücre hasarı ve ölümünü gösteren adenosin trifosfat (ATP) gibi maddeleri algılar. NLRP-3, bir adaptör protein ve kaspaz-1 enziminin etkisiz (pro) formu ile oligomerize olur. Birleşmeyi takiben kaspaz-1 etkinleşir, IL-1 β öncül yapısını parçalayarak biyolojik olarak aktif IL-1 β oluşumuna yol açar. NLRP-3'ün sitozolik bileşkesi, adaptör ve kaspaz-1 inflamazom olarak adlandırılır. İnflamazom konağın savunma mekanizması dışında bazı hastalıklarda da etkilidir (Broz ve Dixit, 2016).

Mikroglia aktivasyonunu takiben oluşturulan nöroinflamasyon ko-kültür modelinde inflamazom ile ilişkili genler, nöronal fenotipe farklılaştırılmış insan nöroblastoma hücrelerinde mRNA gen ekspresyonu düzeyinde incelenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, Cpn grubunda RELA geninde 40417.53 kat artış saptanmıştır. Ancak bu artış TSA, Rifampin, Givinostat ve RG108 (100 nM) varlığında baskılanarak sırasıyla, 0.69 ve 3.45, 0.37 ve 134.22 kata inmiştir. NF-kappa-B (NF- κ B), hemen hemen bütün hücre tiplerinde mevcut olan bir pleiotropik transkripsiyon faktörüdür ve iltihaplanma, bağışıklık, farklılaşma, büyüme,

tümör oluşumu ve apoptoz gibi birçok biyolojik işlemle ilgili geniş bir uyaran dizisi tarafından başlatılan bir dizi sinyal iletim olayının bitiş noktasıdır. NF- κ B, Rel benzeri alan içeren proteinler RELA / p65, RELB, NFKB1 / p105, NFKB1 / p50, REL ve NFKB2 / p52 tarafından oluşturulan homo veya heterodimerik bir komplekstir. Heterodimerik RELA-NFKB1 kompleksi en bol görülenidir (Gilmore, 2006). Dimerler, hedef genlerinin DNA'sındaki κ B bölgelerine bağlanır ve bireysel dimerler, ayırt edilebilir afinite ve özgüllük ile bağlayabilecekleri farklı κ B bölgeleri için farklı tercihlere sahiptir. Farklı dimer kombinasyonları, sırasıyla transkripsiyonel aktivatörler veya baskılayıcılar olarak işlev görür. NF- κ B heterodimerik RELA-NFKB1 ve RELA-REL kompleksleri, transkripsiyonel aktivatörler olarak işlev görür. NF- κ B, çeşitli post-translasyonel modifikasyon ve subseleler kompartmanizasyon mekanizmalarının yanı sıra diğer kofaktörler veya koruyucular ile etkileşimler yoluyla kontrol edilir. NF- κ B kompleksleri sitoplazmada, NF- κ B inhibitörü I- κ B (I κ B) familyasının üyeleriyle kompleksleşmiş aktif olmayan bir durumda tutulur. Geleneksel aktivasyonda, I- κ B, farklı aktivatörlere cevap olarak I- κ B kinazlar (IKK'lar) tarafından fosforile edilir, daha sonra bozulur ve böylece çekirdeğe doğru yer değiştiren aktif NF- κ B kompleksini serbest bırakır. I- κ B'nin NF- κ B üzerindeki inhibitör etkisi, I- κ B'nin esasen RELA ile etkileşime girerek sitoplazmada tutulması yoluyla sağlanmaktadır. IKBKB, NF- κ B sinyal yolunda, inflamatuvar sitokinler, bakteriyel veya viral ürünler, DNA hasarları veya diğer hücresel stresler gibi çoklu uyaranlarla aktive edilen bir serin kinazdır ve IKK kompleksine katılarak NF- κ B inhibitörlerini iki serin kalıntısı üzerinden fosforile ederek NF- κ B aktivasyonunun geleneksel yolağında görev yapar (Schmid ve Birbach, 2008). RELA geninin yanı sıra, IKK kompleksine katılan IKBKB geninde Cpn, TSA ve Rifampin gruplarında sırasıyla, geninde 1.27, 1.51 ve 3.16 kat artış gözlenmiştir. IKBKG geninde ise Cpn, TSA, Rifampin ve RG108 ile sırasıyla, 1.05, 1.38, 3.16 ve 4.13 kat artış görülmüştür.

RELA, NF- κ B kompleksinde DNA bağlanmasına doğrudan katkıda bulunabilecek zayıf bir DNA bağlama bölgesine sahiptir. Doğrudan bir transkripsiyonel aktivatör olarak aktivitesinin yanı sıra, promotörlerin transkripsiyon faktörlerine erişilebilirliğini modüle edebilir ve böylece gen ekspresyonunu dolaylı olarak düzenleyebilir. T-hücrelerinde sitokin gen ekspresyonu için gereklidir. NF- κ B homodimerik RELA-RELA kompleksinin, IL-8 ekspresyonunun invazin aracılı aktivasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir (Bettelli vd.,

2005). 10, 100 ng/ml ve 1 µM Cpn + IFN-γ (10 ng/ml) ile aktivasyon sonrası mikrogliya hücrelerinde IL-8 gen ekspresyonu seviyelerindeki sırasıyla 10.56, 32.72 ve 4.144 kat artışın sebebi de Cpn enfeksiyonunun RELA genini yüksek oranda upregüle etmesi olabilir.

İnflamazom panelinden elde edilen ilgi çekici bir veri de, Cpn enfeksiyonu varlığında düşük doz rifampin ile TNF ve TNFSF4 genlerinde görülen sırasıyla, 555.87 ve 372.02 kat mRNA gen ekspresyonu artışıdır. Rifampin, *Streptomyces mediterranei*'den üretilen yarı sentetik bir antibiyotiktir. Çeşitli Mycobacterium formlarına karşı geniş bir antibakteriyel etki spektrumuna sahiptir. Duyarlı organizmalarda, enzim ile stabil bir kompleks oluşturarak DNA'ya bağımlı RNA polimeraz aktivitesini inhibe eder. Böylece RNA sentezinin başlamasını bastırır. Rifampin bakterisidaldir ve hem hücre içi hem de hücre dışı organizmalara etki eder (Campbell vd., 2011). Aynı zamanda Aβ nörotoksisitesine karşı koruyucu etkileri olduğu bilinmektedir. Ancak düşük dozda (100 nM), *C. pneumoniae* ile indüklenmiş mikrogliya hücrelerinin varlığında SH-SY5Y hücrelerinde neden olduğu proinflamatuvar TNF mRNA gen ekspresyonundaki aşırı artışın nedeninin incelenmesi gerekmektedir. Rifampin ile elde edilen bir diğer dikkat çekici veri de, PYCARD ve PYDC1 gen ekspresyonlarında görülen 302.78 ve 337.09 kat artışıdır. Aynı genlerde yalnızca Cpn grubunda sırasıyla, 2.90 ve 1.87 kat, Cpn+TSA grubunda sırasıyla, 1.36 ve 2.75 Cpn+RG108 grubunda ise 1.16 ve 5.14 kat artış gözlenmiştir. Her iki gen de IKK kompleksine katılarak NF-κB aktivasyonunda rol almaktadır.

C. trachomatis, *C. pneumoniae* ve *C. psittaci* gibi *Chlamydiae* türleri, insanlarda ve hayvanlarda, kronik ve lokalize inflamasyon ile karakterize enfeksiyonlara neden olmaktadır. *Chlamydiae* türleri ile enfekte olmuş insan monositleri, NLRP3 ve kaspaz-1 aktivasyonunun birleştirilmesinin ardından IL-1β salgırlar (Abdul-Sater vd., 2010). Ancak enfeksiyon sonrası, inflamazom yolağı aktivasyonunun zararlı veya yardımcı olup olmadığı hala tartışmalıdır (Walton, 2016). Kaspaz-1 knockout farelerde azalmış *C. pneumoniae* klerensi nedeniyle mortalite artarken (Shimada vd., 2011), akciğer fibroblastlarında kaspaz-1 inhibitörü ile aktivitesinin baskılanması hücreleri enfeksiyona karşı daha dirençli hale getirmektedir (Jorgensen vd., 2011). Monosit ve makrofajların enfeksiyonu takiben proinflamatuvar sitokinlerin üretimine yönelirken epitelyal hücreler için

durum farklıdır, bu bağlamda aradaki farkın enfeksiyonun doğasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Walton, 2016).

5.7. Amiloid Beta ile Oluşturulmuş Nörotoksisite Modelinde Epigenetik Mekanizmalar Üzerine Etkili İlaçların Nöroprotektif Etkilerinin Değerlendirilmesi

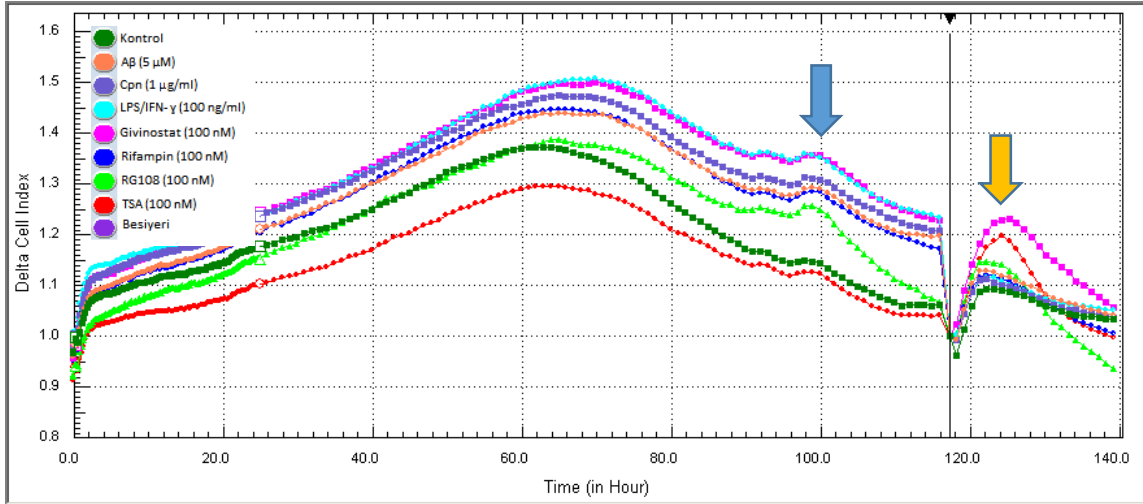
5.7.1. Amiloid Beta ile indüklenen nörotoksisite modelinin oluşturulması

Nöronal apoptoz ve nekroz çok sayıda nörodejeneratif hastalıkta ortaya çıkmaktadır. Buna neden olan nörotoksik maddelerin araştırılması amacıyla yıllardır pek çok farklı *in vitro* nörotoksisite modeli uygulanmaktadır. Nöronal hücre ölümünün zamanla ilgili analizleri ve altta yatan mekanizmaların kinetiği, birçok zaman noktasını kapsayan zahmetli deneyler gerektirmektedir ve bu nedenle nöronlarda hücre ölüm sinyallerinin prensiplerini anlamada ilerleme kaydedilmiş olsa da, veri toplama ve yorumlamayı engelleyen teknik sorunlar devam etmektedir. Hücre indeksi (CI) değerlerinde değişiklik olarak kaydedilen empedans ölçümü mantığına dayanan xCELLigence sistemi, hücrelerin elektrotlar içeren kuyucuklara yapışmasından sonra hücre morfolojisindeki değişiklikler ile alternatif akım devrelerinin direncindeki değişiklikleri ilişkilendirir ve gerçek zamanlı analiz yapma imkanı sağlar (Limame vd., 2012; Mustafa vd., 2015).

Aβ ile indüklenen nörotoksisite modelinde SH-SY5Y hücre hattı, farklılaşma besiyeri içerisinde xCELLigence cihazı ile uyumlu altın elektrotlar içeren özel plakalara ekilmiş ve cihaz üzerinden gerçek zamanlı olarak belirlenen nöronal fenotipe farklılaşma sağlanmıştır. Bu çalışmada SH-SY5Y hücreleri farklılaşma besiyeri içerisinde (%1 serum ve 10 µM RA) ekildiği için CI değerindeki ani artış, proliferasyondan daha çok hücrelerin farklılaşarak nörit uzantısı yapması ile ilişkilendirilmiştir. **Şekil 5.62.** ve **5.63'**de görüldüğü üzere CI değerindeki ani artış SH-SY5Y farklılaşmasının başlangıç aşamaları sırasında hücre gövdesinin büyümesi ile ilgilidir. Daha sonra hücrelerde nöritler uzamaya başlar ve hücre gövdesinin büyüklüğünün küçülmesi ile birlikte CI değerleri düşer (Dwane vd., 2013).

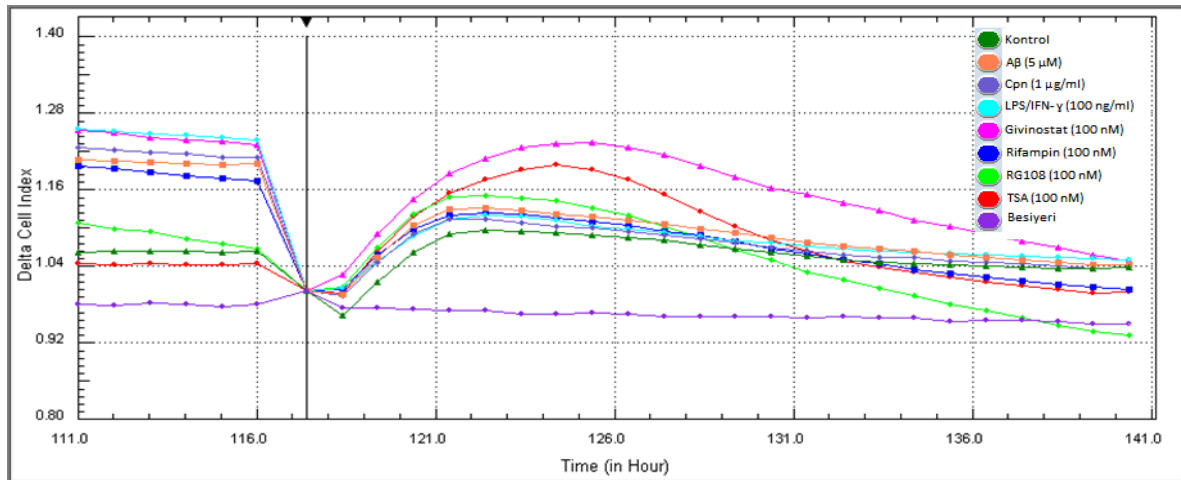
Farklılaşma sağlandıktan sonra, nöroprotektif etkinin belirlenmesi amacıyla mevcut besiyeri içerisinde toksik olmadığı belirlenmiş olan 100 nM Trikostatin A, Givinostat (ITF2357), RG108 ve rifampinin; LPS (100 ng/ml) + IFN-γ (10 ng/ml) ve Cpn (1 µg/ml) +

IFN- γ (10 ng/ml) lizatının konsantrasyonlarını içeren besiyerleri ile değiştirilmiş ve 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Konsantrasyonların uygulandığı deneyin 100. saati civarındaki CI artışı da farklılaşmanın artışı ile ilişkilidir (Şekil 5.62.).



Şekil 5.62. xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile amiloid beta ile indüklenen nörotoksisite modelinin oluşturulması ($n=5$, mavi ok: konsantrasyon gruplarının uygulanması sonrasında CI artışı; sarı ok: A β uygulaması sonrası CI değerleri).

Farklılaşma süreci ve konsantrasyon grupları ile inkübasyon sonrasında A β ile nörotoksisiteyi indüklemek amacıyla, deneyin öncesinde 37 $^{\circ}$ C'lik inkübatörde falkon tüpte serum içermeyen besiyeri içerisinde 7 gün bekletilerek peptit agregatlarının oluşumu sağlanan 50 μ M konsantrasyonda β -amiloid (1-42) peptit agregatları taze besiyeri ile 5 μ M'a seyreltilmiştir. Konsantrasyon grupları ile 24 saat inkübe edilmiş kuyucuklardaki mevcut besiyeri ile 5 μ M β -amiloid (1-42) peptit agregatları içeren besiyeri değiştirildikten sonra cihazdan alınan CI verileri karşılaştırılarak uygulanan ilaç konsantrasyonlarının A β nörotoksisitesine karşı koruyucu etkileri belirlenmiştir (Şekil 5.63.).



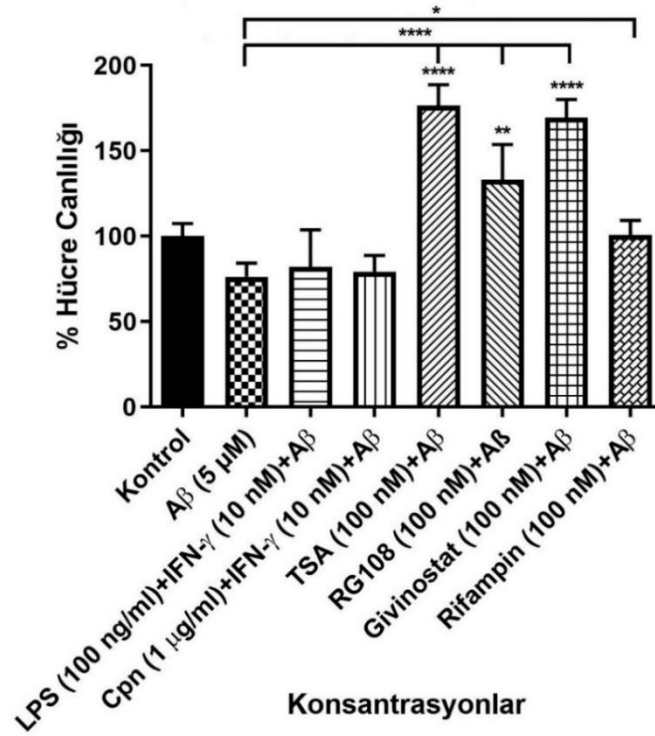
Şekil 5.63. Nörotoksisite modeli uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin konsantrasyon grupları ile 24 saat inkübe edildikten sonra 5 μ M A β toksisitesine karşı koruyucu etkilerinin gerçek zamanlı grafiği (n=5).

Deney sonuçlarına göre A β (5 μ M), Cpn + IFN- γ (1 μ g/ml) ve LPS + IFN- γ (100 ng/ml) gruplarında kontrol grubuna göre CI değerleri sırasıyla %27.8, 20.8 ve 17.9 oranında azaltmıştır; TSA, Givinostat, Rifampin ve RG108 (100 nM) ise kontrol grubuna göre CI değerlerini sırasıyla %76.6, 69.5, 0.6 ve 33.2 oranında arttırmıştır. Ayrıca hücre canlılıkları A β pozitif kontrol grubu ile kıyaslandığında, Cpn + IFN- γ , LPS + IFN- γ , TSA, Givinostat, Rifampin ve RG108 grupları CI değerlerini sırasıyla, %9.8, 7, 104.4, 97.3, 28.4 ve 61 oranında arttırmıştır (**Tablo 5.13.**).

Tablo 5.13. Nörotoksisite modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde konsantrasyon gruplarının gerçek zamanlı hücre analizinde A β uygulaması sonrası 24. saatteki hücre indeksi (CI) değerlerine göre koruyucu etkileri (n=5, kontrole göre % değerler).

Konsantrasyon Grupları	%CI Değerleri (Ort. $\pm$ Std. Sapma)
Kontrol	100 $\pm$ 9.60
A β (5 μ M)	72.2 $\pm$ 11.49
LPS (100 ng/ml) + IFN- γ (10 ng/ml)	82 $\pm$ 12.17
Cpn (1 μ g/ml) +IFN- γ (10 ng/ml)	79.2 $\pm$ 9.55
TSA (100 nM)	176.6 $\pm$ 11.98
Givinostat (100 nM)	169.5 $\pm$ 7.13
Rifampin (100 nM)	100.7 $\pm$ 12.68
RG108 (100 nM)	133.2 $\pm$ 14.39

CI verilerine göre çizilen % hücre canlılığı grafiğine göre (Şekil 5.64.), nörotoksisite modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde A β , Cpn + IFN- γ ve LPS + IFN- γ gruplarında hücre canlılığı kontrol grubuna göre azalmış, ancak bu azalma yalnızca A β grubunda anlamlı bulunmuştur ($p<0.05^*$). Ayrıca kontrol grubuna göre TSA, Givinostat ($p<0.0001^{****}$) ve RG108 ($p<0.01^{**}$) gruplarında anlamlı derecede hücre canlılığı artışı belirlenmiştir. A β grubuna göre hücre canlılığı artışları incelendiğinde, TSA, Givinostat, RG108 ($p<0.0001^{****}$) ve Rifampin ($p<0.5^*$) gruplarında anlamlı derecede hücre canlılığı artışı saptanmıştır. Bu verilere dayanarak Şekil 5.64’de görüldüğü üzere, TSA, Givinostat, RG108 ve Rifampin’in SH-SY5Y hücrelerinde A β nörotoksisitesine karşı nöroprotektif etkisi belirlenmiştir.



Şekil 5.64. Nörotoksisite modeli uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin A β uygulaması sonrası 24. saat CI verileri ile çizilen slope grafiği ((n=6, ort. $\pm$ std. sapma, fark yok: $p>0.05$ n.s.; anlamlı farklılık var: $p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$ ve $p<0.0001^{****}$).

Uygulanan konsantrasyon gruplarının etkileri incelendiğinde, A β , Cpn ve LPS grubunda hücre canlılıkları kontrol grubuna göre azalırken TSA, givinostat, rifampin ve

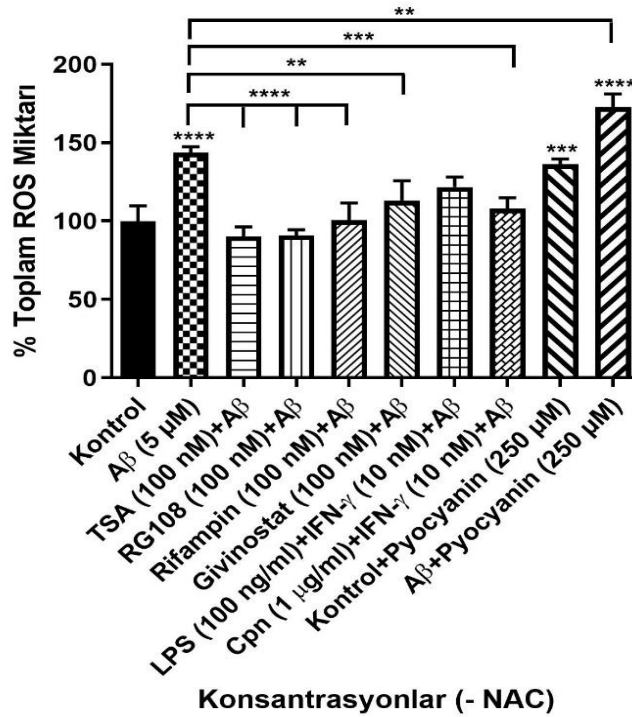
RG108 ile hücre canlılıkları anlamlı olarak artmış ve bu gruplar A β nörotoksitesine karşı nöroproteksiyon sağlamıştır. Literatür taraması sonucunda daha önce xCELLigence cihazı kullanılarak bu ilaçların nöroprotektif etkilerinin, A β ₁₋₄₂ ile indüklenen SH-SY5Y nörotoksite modelinde incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Benzer şekilde Qosa ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, rifampin ve kafeinin AH üzerindeki koruyucu etkileri araştırılmış ve rifampinin lipoprotein ile ilişkili reseptör-1 (LRP-1) ve P-glikoprotein (P-gp) upregülasyonunu artırarak A β klerensini arttırdığı ve koruyucu etkinin bundan kaynaklanabileceği gösterilmiştir (Qosa vd., 2012). Umeda ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan başka bir çalışmada, rifampinin APP'yi ifade eden ve A β oligomerizasyonunu artıran Osaka (E693 Δ) mutasyonlu COS-7 hücrelerinde rifampin, kurkumin, epigallocateşin-3-gallat, mirisetin ve scyllo-Inositol'ün çözünebilir oligomerler olan A β , tau ve α -sinüklein agregasyonu üzerindeki etkileri araştırılmış ve rifampin diğer moleküllerden daha etkili bulunmuştur (Umeda vd., 2016). Kilgore ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, sınıf 1 histon deasetilaz inhibitörlerinin sistemik kullanımının AH fare modelinde bağlamsal bilişsel bozukluklar üzerine etkileri incelenmiş ve “epigenetik hafıza kurtarımı” olarak adlandırılan bir süreç ile bu bozuklukları tersine çevirdikleri gösterilmiştir (Kilgore vd., 2010). Seo ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, TSA'nın kalsiyumla indüklenen nörotoksiteye karşı SH-SY5Y hücrelerini koruduğu gösterilmiş ve bu etkiye, AH patofizyolojisinde kalsiyum kaynaklı nöronal hücre toksitesinde rol oynayan kalpain inhibitörü kalpastatin ekspresyonunu artırmasının aracılık ettiği bildirilmiştir (Seo vd., 2013). DNMT katalitik aktivitesinin RG108 gibi küçük moleküller ile inhibisyonunun, motor nöronları aşırı DNA metilasyonundan ve apoptozdan koruduğu daha önce gösterilmiştir (Martin ve Wong, 2013), ancak A β ile ilişkili bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

5.7.2. Toplam reaktif oksijen türevleri (ROS) miktarının belirlenmesinin değerlendirilmesi

Nörotoksite modeli uygulanan SH-SY5Y hücreleri üzerinde konsantrasyon gruplarının A β ile indüklenen ROS üretimine karşı karşı koruma sağlayıp sağlamadığını değerlendirmek için, yöntemlerde açıklandığı gibi SH-SY5Y hücrelerinde, ROS-ID Total

ROS/Superoxide Detection Kiti (Kat. No: ENZ-51010, ENZO Life Sciences, İsviçre) kullanılarak ROS miktarları ölçülmüştür.

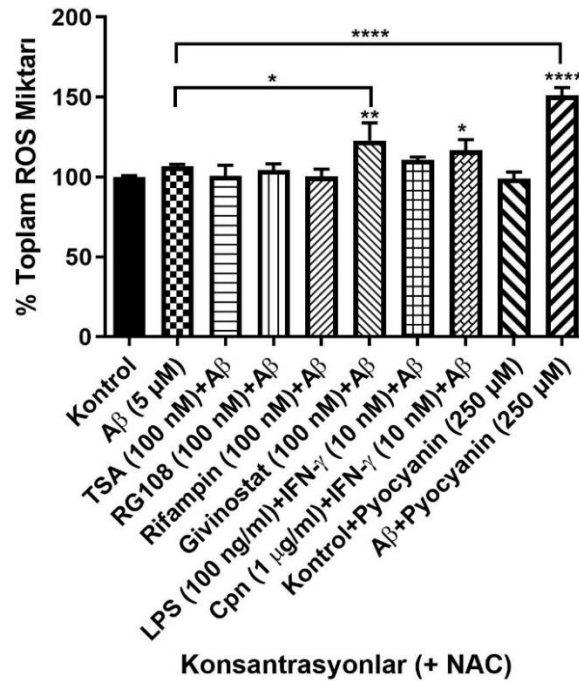
Deney sonuçları incelendiğinde, yalnızca A β varlığında ROS miktarı %43.58 oranında artmıştır. ROS indükleyicisi pyocyanin varlığında kontrol grubunda ROS seviyesi %36.49 oranında artmıştır. A β grubunda da pyocyanin varlığında, ROS üretimi %72.71 oranında artmıştır. Kontrol grubuna göre ROS miktarındaki bu artış, yalnızca pyocyanin ($p<0.001^{***}$), yalnızca A β ($p<0.0001^{****}$) ve A β +pyocyanin ($p<0.0001^{****}$) gruplarında anlamlı bulunmuştur. A β maruziyeti öncesinde konsantrasyon grupları ile bekletilen hücrelerde ise, TSA ve RG108 ile toplam ROS miktarı kontrol grubuna göre sırasıyla %9.85 ve 9.03 oranında azalmış; Rifampin, Givinostat, LPS/IFN- γ ve Cpn/IFN- γ gruplarında ise toplam ROS miktarı kontrol grubuna göre sırasıyla, %0.43, 13.09, 21.67 ve 7.89 oranında artmış ancak bu değişimler anlamlı bulunmamıştır (Şekil 5.65.).



Şekil 5.65. ELISA yöntemiyle belirlenen toplam ROS miktarının gruplara göre yüzde değer grafiği (ROS inhibitörü 5 mM N-asetil sistein (NAC) uygulaması yapılmamıştır) ($n=4$, ort. $\pm$ std. sapma, fark yok: $p>0.05$ ns; anlamlı farklılık var: $p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$ ve $p<0.0001^{****}$).

Toplam ROS miktarı A β grubuna göre incelendiğinde, TSA, Rifampin, Givinostat, RG108, LPS + IFN- γ ve Cpn + IFN- γ gruplarında sırasıyla, %53.43, 43.14, 30.49, 52.61, 21.91 ve 35.69 oranında azalmıştır. A β grubuna göre toplam ROS miktarındaki bu azalma, TSA, RG108 ve Rifampin ($p<0.0001$ ****), Givinostat ve Cpn + IFN- γ ($p<0.01$ **) gruplarında anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.65.).

Hücreler toplam ROS miktarı ölçülmeden önce ROS inhibitörü NAC ile 30 dakika inkübe edildiğinde, A β grubunda toplam ROS miktarı kontrol grubuna göre %6.62 oranında artmıştır. A β maruziyeti öncesinde TSA, Rifampin, Givinostat, RG108, LPS + IFN- γ ve Cpn + IFN- γ grupları ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerinde sırasıyla % 0.7, 0.25, 22.87, 4.29, 10.54 ve 16.52 oranında artmış, ancak bu artış yalnızca Givinostat ($p<0.01$ **) ve Cpn + IFN- γ ($p<0.5$ *) grubunda anlamlı bulunmuştur. Bu veri, Givinostat ve Cpn + IFN- γ ile ROS aktivasyonunun, ROS inhibitörü NAC ile farklı bir yoldan çalıştığı şeklinde yorumlanabilir (Şekil 5.66.).



Şekil 5.66. ELISA yöntemiyle belirlenen toplam ROS miktarının gruplara göre yüzde değer grafiği (ROS inhibitörü 5 mM N-asetil sistein (NAC) uygulaması yapılmıştır ($n=4$, ort. $\pm$ std. sapma, fark yok; $p>0.05$ ns; anlamlı farklılık var: $p<0.05$ *, $p<0.01$ **, $p<0.001$ *** ve $p<0.0001$ ****)).

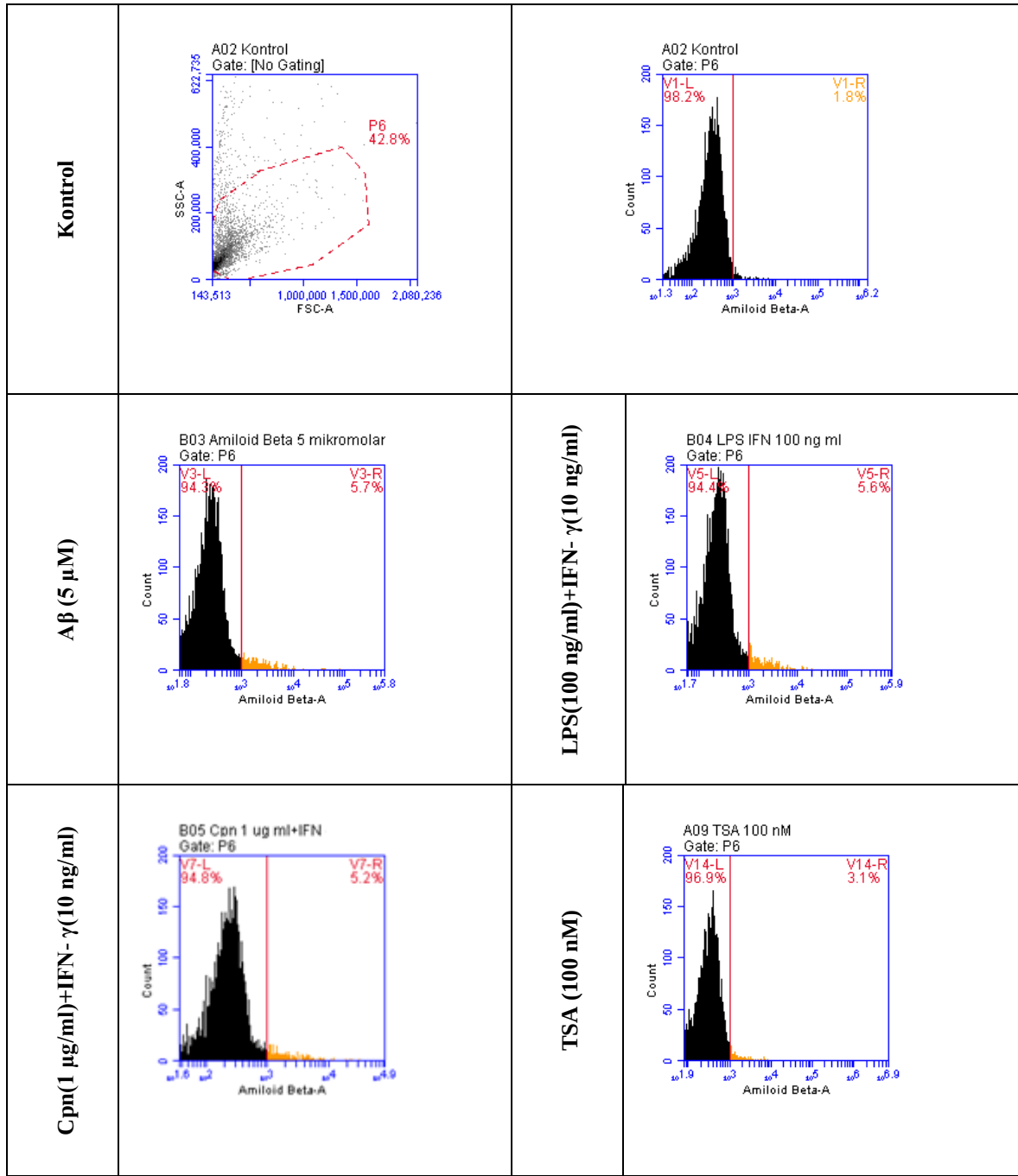
ROS indükleyicisi pyocyanin varlığında, ROS miktarı yalnızca pyocyanin varlığında %0.85 oranında azalmış ve pyocyanin+A β varlığında %51.07 oranında artmış, ancak bu değişim yalnızca pyocyanin+A β grubunda anlamlı bulunmuştur ($p<0.0001****$). ROS inhibitörü NAC varlığında yalnızca A β grubundaki ve yalnızca pyocyanin grubundaki ROS miktarlarında anlamlı bir artış olmaması, ancak A β +pyocyanin varlığında ROS miktarındaki artışın NAC tarafından inhibe edilememiş olması A β ve pyocyaninin birbirinin etkisini potansiyalize etmiş olabileceği şeklinde yorumlanabilir (**Şekil 5.66.**).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu nöronal hasar AH'nın da dahil olduğu pek çok nörodejeneratif hastalığın patojenezinde yer almaktadır. AH'larından elde edilen beyin omurilik sıvısında artmış 8-hidroksiguanozin (Nunomura vd., 2001; Abe vd., 2002) ve F2-izoprostanlar (Montine vd., 2002) gibi ROS belirteçlerine rastlanması, sırasıyla artmış DNA oksidasyonu ve lipid peroksidasyonunu göstermektedir. Ölüm sonrası incelemelerde AH'larının beyinlerinde de F2-izoprostan miktarı artmıştır (Montine vd., 1999). Her ne kadar oksidan kaynaklı nöronal hasar AH'da nöronal kaybın başlangıç sebebi olmasa da, potansiyel olarak tedavi edilebilir bir ikincil nedendir. AH'da artan oksidatif hasarın mekanizması, bu hastalıkta üretilen peptit A β 'nın yüksek konsantrasyonlarıyla ilişkili görünmektedir. 38-42 amino asit içeren bu peptidin hücre içi H₂O₂ ve ROS üretimini arttırdığı pek çok hücre kültürü çalışmasıyla gösterilmiştir (Huang ve May, 2006). A β , glutamat/N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin aktivasyonu (Harkany vd., 1999) ve L-tipi voltaja duyarlı kalsiyum kanalları (Ueda vd., 1997; Ekinci vd., 1999) yoluyla hücre içi kalsiyum alımını artırır. Artmış hücre içi kalsiyum mitokondriyi depolarize ederek ROS üretir (Ekinci vd., 2000). Doğrudan sitotoksik etkiye ek olarak, A β nöronal kültür hücrelerinde apoptoza neden olur ancak bunun ROS üretimi ile ilgili olup olmadığı tartışmalıdır. Bu bağlamda, deneyler kapsamında konsantrasyon gruplarının A β ile oluşturulan nörotoksisite modelinde toplam ROS miktarı ve apoptoz üzerine etkileri incelenmiştir. Deney sonuçları incelendiğinde, TSA, RG108, Rifampin, Givinostat ve Cpn/IFN- γ gruplarının A β ile indüklenen ROS'un hücre içi üretimini azaltarak nöronları potansiyel olarak koruyabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda, her ikisi de bakteriyel ekzopolisakkaritlerden elde edilen LPS/IFN- γ ve Cpn/IFN- γ 'nın, hücre içi ROS üretimini birbirinden farklı yollar üzerinden indüklediği anlaşılmaktadır.

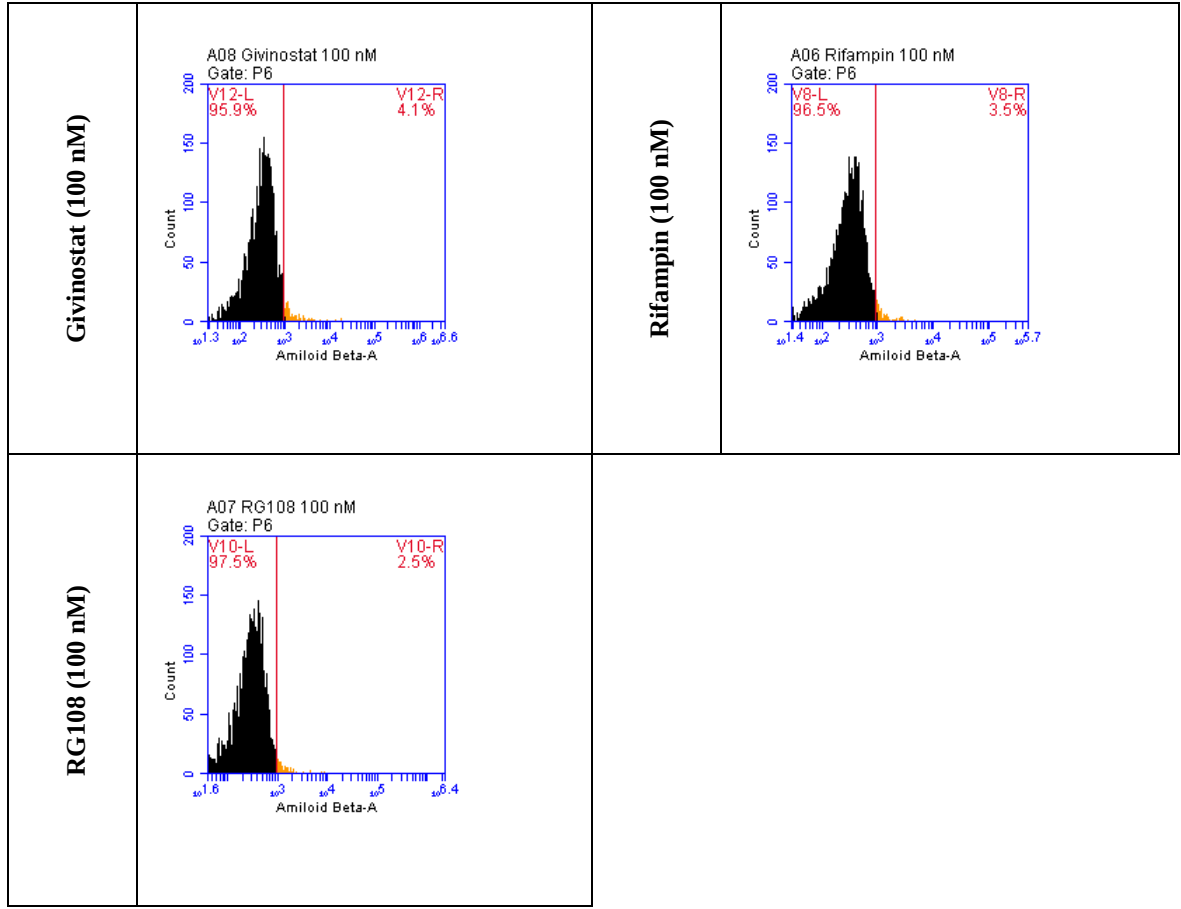
Rifampinin nöroprotektif etkisinin serbest radikal süpürücü yeteneğinden kaynaklandığı daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Tomiyama vd., 1996). Rifampin ile tedavi edilen hayvanlarda, nigrostriatal dopaminerjik nöronal yollarda oksidatif stres azalmış ve nöroproteksiyon sağlanmıştır (Oida vd., 2006). Rifampinin deneysel *Streptococcus pneumoniae* menenjitinde ROS salınımını ve sekonder beyin hasarını azalttığı ve nedenle bu hastalığın potansiyel bir tedavisi olabileceği öne sürülmüştür (Böttcher vd., 2000). *In vitro* çalışmalarda, rifampin ön tedavisi PC-12 hücrelerini rotenon kaynaklı hücre ölümüne karşı korumuş ve kalitatif ve kantitatif analizler, rifampinin mitokondriyal oksidatif stresi iyileştirerek rotenon kaynaklı apoptozu önemli ölçüde baskıladığını ortaya çıkarmıştır (Chen vd., 2010). HDACi ve DNMTi'lerinin oksidatif strese karşı koruyucu etkileri üzerine yapılan çalışmalar literatürde mevcuttur (Ryu vd., 2003; Shimazu vd., 2013; Xin vd., 2015). Çalışmamıza benzer olarak, Agudelo ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, 50 nM TSA'nın etanol kaynaklı oksidatif strese karşı HDAC2 inhibisyonu yoluyla ROS üretimini azalttığı ve nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir (Agudelo vd., 2011). DNA metilasyonu ve histon asetilasyonunun DNA hasar cevabındaki rollerinin incelendiği başka bir çalışmada, DNMT inhibitörü RG108 ve HDACi valproik asit, akut ve kronik oksidatif strese karşı protektif etkiler göstermiştir (Tokarz vd., 2016). Yapılan literatür taramasında Givinostatın A β kaynaklı ROS indüksiyonunu inhibe edici etkisi üzerine bir çalışmaya rastlanmamıştır.

5.7.3. Akış sitometride immünofloresans boyama yöntemi ile A β agregatlarının belirlenmesinin değerlendirilmesi

Nörotoksisite modeli uygulanan SH-SY5Y hücreleri üzerinde konsantrasyon gruplarının A β toksisitesi üzerindeki etkileri akış sitometride immünofloresans boyama yöntemi ile A β agregatlarının işaretlenmesi ile de araştırılmıştır. **Şekil 5.67.** ve **Tablo 5.14.**'de görüldüğü üzere A β pozitif hücrelerin yüzdeleri, kontrol, A β , LPS + IFN- γ , Cpn + IFN- γ , TSA, Givinostat, Rifampin ve RG108 gruplarında sırasıyla, %1.8, 5.7, 5.6, 5.2, 3.1, 4.1, 3.5 ve 2.5 şeklinde bulunmuştur. Bu verilere göre A β grubunda belirlenen %5.7 seviyesindeki antikor, RG108, TSA, Givinostat ve Rifampin grubu varlığında azalmıştır. Diğer gruplara oranla RG108 konsantrasyon grubu A β toksisitesine karşı daha yüksek koruyucu etki göstermiştir.



Şekil 5.67. Nörotoksisite modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde konsantrasyon gruplarının A β aktivasyonuna etkisi.

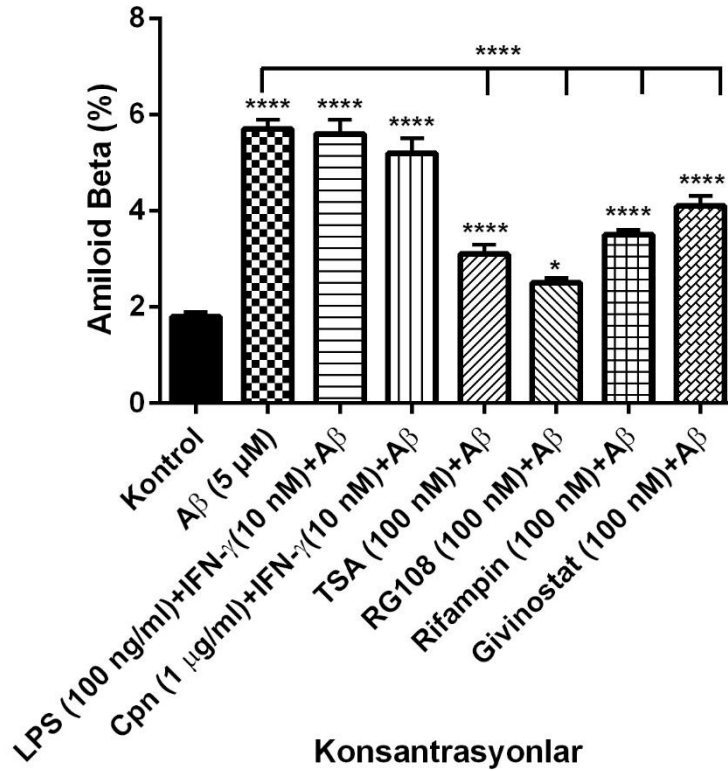


Şekil 5.67. (Devam) Nörotoksisite modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde konsantrasyon gruplarının A β aktivasyonuna etkisi.

Tablo 5.14. Nörotoksisite modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde konsantrasyon gruplarının A β aktivasyonu sonuçları.

Konsantrasyonlar	A β Negatif %	A β Pozitif %	Std. Sapma
Kontrol	98.2	1.8	± 0.11
Aβ (5 μM)	94.3	5.7	± 0.23
LPS (100 ng/ml) + IFN-γ (10 ng/ml) + Aβ	94.4	5.6	± 0.32
Cpn (1 μg/ml) + IFN-γ (10 ng/ml) + Aβ	94.8	5.2	± 0.34
TSA (100 nM) + Aβ	96.9	3.1	± 0.25
Givinostat (100 nM) + Aβ	95.9	4.1	± 0.12
Rifampin (100 nM) + Aβ	96.5	3.5	± 0.14
RG108 (100 nM) + Aβ	97.5	2.5	± 0.22

Nörotoksisite modeli uygulanan SH-SY5Y hücreleri üzerinde konsantrasyon gruplarının % A β miktarı değişimi incelendiğinde (Şekil 5.68.), kontrol grubuna oranla bütün konsantrasyon gruplarında A β antikor miktarının artışı anlamlı bulunmuştur. A β grubuna göre ise antikor miktarları LPS + IFN- γ ve Cpn + IFN- γ grupları ile anlamlı miktarda azalmamış, ancak diğer gruplarda anlamlı derecede düşmüştür ($p<0.0001$ ****).



Şekil 5.68. Nörotoksisite modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde konsantrasyon gruplarının kontrol grubuna göre A β yüzde değişim grafiği ($n=3$, fark yok: $p>0.05$ ns; anlamlı farklılık var: $p<0.05$ *, $p<0.0001$ ****).

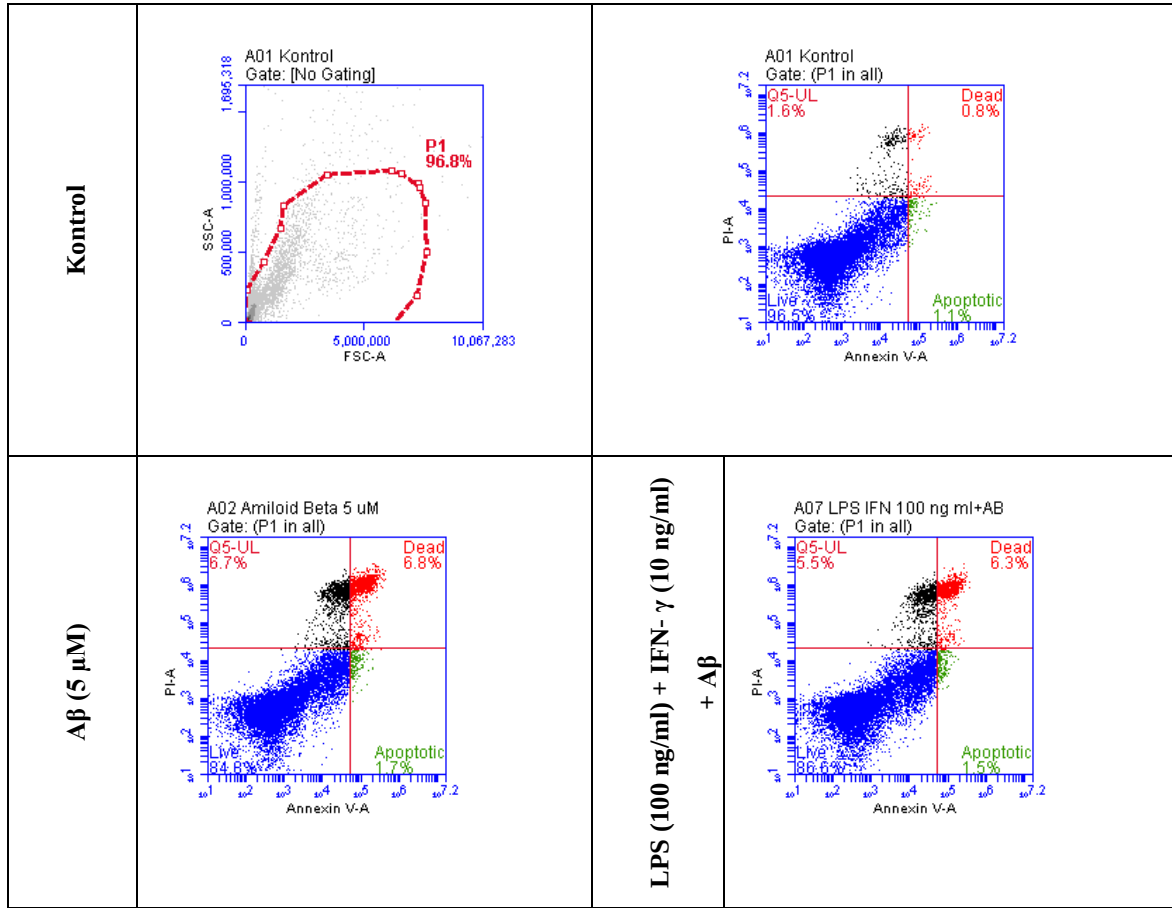
Hücre canlılığı çalışmalarına ek olarak nörotoksisite modeli uygulanan SH-SY5Y hücreleri üzerinde konsantrasyon gruplarının A β toksisitesi üzerindeki etkileri akış sitometride immünofloresans boyama yöntemi ile A β agregatlarının işaretlenmesi ile de araştırılmıştır. Deney sonuçlarına göre A β uygulanan gruptaki antikor seviyesindeki artış özellikle TSA, givinostat, RG108 ve rifampin grubu varlığında anlamlı olarak azalmıştır. Diğer gruplara oranla RG108 konsantrasyon grubu A β toksisitesine karşı daha yüksek

koruyucu etki göstermiştir. Çeşitli bileşiklerin A β ile indüklenen nörotoksisiteye karşı koruyucu etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, hücre canlılığı seviyeleri yaygın olarak MTT veya laktat dehidrogenaz (LDH) analizi gibi sitotoksisite testleriyle belirlenmektedir (Yu vd., 2005; Solorzano-Vargas vd., 2008; Kucukkilinc vd., 2017). Yapılan literatür taramasında, *in vitro* A β ₁₋₄₂ seviyelerinin akış sitometri ile belirlendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, 100 nM TSA ile görülen anlamlı A β ₁₋₄₂ azalmasının tersine, transgenik AH modeli oluşturulmuş farelerde, intraperitoneal TSA uygulaması sonrasında plazma A β ₁₋₄₀ ve A β ₁₋₄₂ seviyelerinde artış bildirilmiştir (Yang vd., 2014). Rifampinle ilişkili *in vitro* A β ₁₋₄₂ seviyesini azaltıcı etki bulgularımıza benzer olarak, Umeda ve arkadaşları rifampinin APP’i ifade eden ve A β oligomerizasyonunu artıran Osaka mutasyonlu COS-7 hücrelerinde A β agregasyonu üzerinde inhibitör etkilerini bildirmiştir (Umeda vd., 2016). LPS sonuçlarımıza benzer bir bulgu da sistemik LPS uygulamasının nöroinflamasyon ve A β birikimi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir *in vivo* çalışmada bildirilmiştir. Jendresen ve arkadaşları, A β PP ve amiloid birikintilerinde bolca bulunan heparanaz eksprese eden transgenik sıçanlarda LPS uygulamasının A β akümüasyonu üzerine bir etkisi olmadığını göstermiştir (Jendresen vd., 2019). Little ve arkadaşları, transgenik olmayan BALB/c farelerde, intranazal Cpn enfeksiyonu sonrasında hücreiçi A β ₁₋₄₂ birikiminin arttığını öne sürmüştür (Little vd., 2004). Ancak sonrasında Boelen ve arkadaşları, *in vitro* bulgularımıza benzer olarak, Little ve arkadaşları’nın benzeri BALB/c sıçanlarda Cpn enfeksiyonuyla ve aynı parametrelerle yapılmış bir çalışmayla Cpn enfeksiyonunun A β plak formasyonu üzerine bir etkisi olmadığını bildirmiştir ve bu tutarsızlığın sebebinin kullanılan Cpn suşlarının farklılığı olabileceğini öne sürmüştür (Boelen vd., 2007). Çalışmamız, Givinostat ve RG108’in A β ₁₋₄₂ seviyelerini *in vitro* olarak azaltıcı etkisi hakkındaki ilk çalışmadır ve bu açıdan önemlidir.

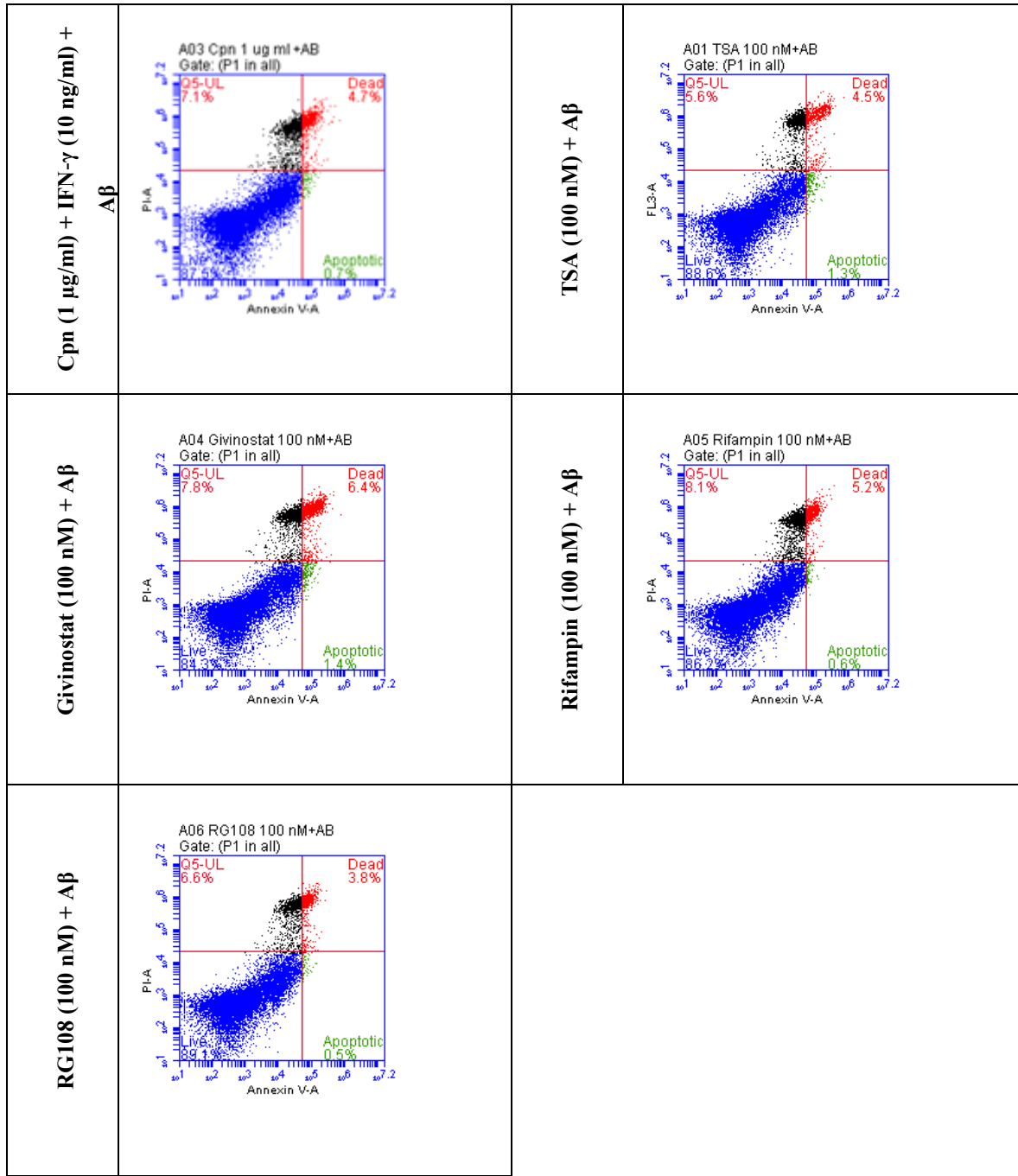
5.7.4. Akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesinin değerlendirilmesi

SH-SY5Y hücrelerinde nörotoksisite modelinin oluşturulmasından sonra konsantrasyon gruplarının apoptotik ve nekrotik etkileri akış sitometri yöntemiyle araştırılmıştır. Hücreler kaldırılarak, CF 488A Annexin V and PI Apoptosis Kit (Biotium, Kat. No: 30061) protokolü uygulanmıştır. Daha sonra örnekler akış sitometri cihazında

(Accuri C6, BD) ölçülerek analiz edilmiştir. **Şekil 5.69.** ve **Tablo 5.15.**'de görüldüğü gibi konsantrasyon gruplarının apoptotik etkisi (erken apoptoz + geç apoptoz), kontrol, A β , LPS + IFN- γ , Cpn + IFN- γ , TSA, Givinostat, Rifampin ve RG108 gruplarında sırasıyla %1.9, 8.5, 7.8, 5.4, 5.8, 7.8, 5.8 ve 4.3 şeklindedir. Bu sonuçlara göre A β grubunun SH-SY5Y hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi diğer konsantrasyon grupları ile azalmaktadır. Konsantrasyon gruplarının nekrotik etkisi ise sırasıyla %1.6, 6.7, 5.5, 7.1, 5.6, 7.8, 8.1 ve 6.6 şeklinde bulunmuştur. Bu verilere göre yalnızca LPS + IFN- γ ve TSA grubu A β grubuna göre nekrotik etkiyi azaltmıştır.



Şekil 5.69. Nörotoksisite modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde konsantrasyon gruplarında apoptotik etkinin akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile belirlenmesi.

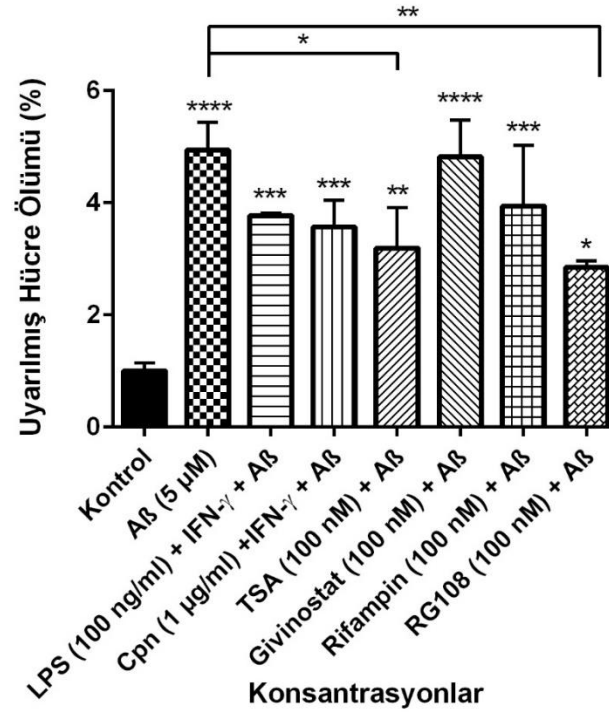


Şekil 5.69. (Devam) Nörotoksosite modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde konsantrasyon gruplarında apoptotik etkinin akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile belirlenmesi.

Tablo 5.15. *Nörotoksisite modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde konsantrasyon gruplarının apoptotik etki sonuçları.*

Konsantrasyonlar	Canlı Hücre %	Nekrotik Hücre %	Erken Apoptotik Hücre %	Geç Apoptotik Hücre %	± Std. Sapma
Kontrol	96.5	1.6	0.8	1.1	±0.14
Aβ (5 μM)	84.8	6.7	6.8	1.7	±0.49
LPS (100 ng/ml) + IFN-γ (10 ng/ml) + Aβ	86.6	5.5	6.3	1.5	±0.04
Cpn (1 μg/ml) +IFN-γ (10 ng/ml) + Aβ	87.5	7.1	4.7	0.7	±0.47
TSA (100 nM) + Aβ	88.6	5.6	4.5	1.3	±0.72
Givinostat (100 nM) + Aβ	84.3	7.8	6.4	1.4	±0.65
Rifampin (100 nM) + Aβ	86.2	8.1	5.2	0.6	±1.09
RG108 (100 nM) + Aβ	89.1	6.6	3.8	0.5	±0.12

Canlı hücrelerin yüzdesi incelendiğinde kontrol, A β , LPS + IFN- γ , Cpn + IFN- γ , TSA, Givinostat, Rifampin ve RG108 konsantrasyon gruplarının etkisi sırasıyla, %96.5, 84.8, 86.8, 87.5, 88.6, 84.3, 86.2 ve 89.1 şeklinde bulunmuştur. LPS + IFN- γ , Cpn + IFN- γ , TSA, Rifampin ve RG108 konsantrasyon grupları, A β pozitif kontrol grubuna göre hücre canlılığını sırasıyla, %2, 2.7, 3.8, 1.4 ve 4.3 oranında artırmıştır. Givinostat ise % 0.5 oranında azaltmıştır. A β 'nın apoptotik+nekrotik etkisine karşı hücre canlılığı artışı yalnızca 100 nM TSA ($p<0.5^*$) ve RG108 ($p<0.01^{**}$) konsantrasyon gruplarında anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.70.).



Şekil 5.70. Nörotoksisite modeli oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinde konsantrasyon gruplarının Aβ uygulaması sonrasında kontrol grubuna göre apoptotik+nekrotik etki grafiği (n=3, fark yok: $p>0.05$ ns; anlamlı farklılık var: $p<0.05$ *, $p<0.01$ **, $p<0.001$ *** ve $p<0.0001$ ****).

AH patolojisinin önemli bir özelliği, Aβ peptit agregatlarından oluşan plaklardır (Reis vd., 2018). Aβ, özellikle nöroinflamasyon ve kolinerjik nöronal apoptozda merkezi bir rol oynar ve bu nedenle bu hastalığın ana belirleyicisi olarak kabul edilir (Li vd., 2009). Apoptoz, normal gelişim sırasında, çok hücreli organizmaların programlanmış hücre ölümü şeklinde tanımlanmaktadır. Oksidatif stres veya birçok hücrenin sitoplazmasında inaktif olarak bulunan kaspaz gibi sitozolik enzimlerinin aktivasyonu gibi tetikleyici durumlar sonrasında hücre zarı sızması, hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik gövde oluşumu gibi karakteristik apoptotik süreçler meydana gelir (Sönmez vd., 2018). Nekrotik hücre ölümü veya nekroz, canlı dokuda programlı olmayan, rasgele tipte bir hücre ölümüdür ve enerji yetmezliği gibi patolojik faktörlerden kaynaklanır. Nekroza bağlı hücre ölümü her zaman pasiftir ve bu nedenle belirli bir hücrel sinyal yolunun aktivasyonuna ihtiyaç duymaz. Beyin iskemisine bağlı tipik bir nekrotik süreç, hücrenin ve hücre altı organellerin şişmesini, ardından çoklu organel hasarını, hücre zarı bütünlüğünün kaybını ve hücrel

içeriğın çevreleyen hücre dışı boşluğa kontrolsüz bir şekilde salınmasını içerir (Hu ve Liu, 2017). Akış sitometride A β ile indüklenen nörotoksisite üzerinde konsantrasyon gruplarının apoptotik ve nekrotik etkileri incelenmiştir. Bu deneyden elde edilen veriler incelendiğinde, A β 'nın SH-SY5Y hücreleri üzerindeki apoptotik ve uyarılmış hücre ölümü (apoptoz+nekroz) etkisi konsantrasyon grupları ile azalmaktadır. Konsantrasyon gruplarından yalnızca, RG108 ve TSA gruplarında A β 'ya göre apoptotik+nekrotik etki azalmıştır. Canlı hücrelerin yüzdesi incelendiğinde ise givinostat grubu dışında diğer grupların hücre canlılığını A β grubuna göre arttırdığı saptanmıştır. Bulgularımıza benzer sonuçlar, DNA metilasyonu aracılığıyla motor nöron hücresi ölümünün epigenetik regülasyonunun araştırıldığı bir çalışmada, DNMT enzimlerinin nöronal hücre ölümüne aracılık ettiği bildirilmiştir. Motor nöron benzeri somatodendritik fenotipe farklılaştırılmış *in vitro* NSC34 hücreleri ve *in vivo* fare beyni kullanılarak yapılan bu çalışmada, apoptoz sırasında bu hücre hattında DNMT1 ve DNMT3a enzim seviyelerinin ve çekirdekte 5-metilsitozin birikiminin arttığı bildirilmiştir. DNMT enzimlerinin RG108 ile inhibisyonunun, 5-metilsitozindeki artışı ve farelerde motor nöronların apoptozunu tamamen engellediği gösterilmiştir (Chestnut vd., 2011). Sepsis ilişkili ensefalopatide nöronal apoptozun epigenetik modülasyonu ve bilişsel işlevler üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, septik beyinde hipokampal H3 ve H4 asetilasyonu ve sitoplazmik HDAC4 ve Bcl-XL inhibisyonu şeklinde bildirilmiştir. HDACi olan TSA veya SAHA uygulanması, *in vivo* olarak Bcl-XL ve Bax değişikliklerini ve *in vitro* olarak da apoptotik hücreleri azaltmıştır. Nöronal apoptoz HDAC4 shRNA transfeksiyonu sonrasında azalmıştır (Fang vd., 2014). Epigenetik kromatin düzenleyici enzimlerin araştırıldığı gen paneli sonuçlarımıza göre, TSA'nın A β ile indüklenen apoptotik etkiyi azaltmasına HDAC4 gen ekspresyonu artışının aracılık ediyor olabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

AH, toplam demans vakalarının %75-80'i ile dünya genelinde demansın ana sebebidir; ve 65 yaşın üzerindeki nüfusun %5'ini ve 85 yaşın üzerindeki nüfusun ise % 30'unu etkilemektedir (Reitz vd., 2011). Hastalık insidansı, son yıllarda giderek artmakta olup, bu insidansın yaklaşık her 20 yılda bir artacağı tahmin edilmektedir (Joshi ve Morley, 2006). AH, genellikle önce hafif bilişsel bozulma ve sonra demans şeklinde ortaya çıkan ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Hafıza ve diğer bilişsel işlevlerde kayıp ve davranış, ruh hali ve kişilikteki değişikliklerle karakterizedir. Bu bozukluklar hastanın günlük yaşamına müdahale etmektedir ve ailelere ve sağlık sistemine ciddi bir yük olmaktadır (Terracciano ve Sutin, 2019).

AH vakalarının yaklaşık %90'ının sporadik olduğu ve sadece %10'unun kalıtsal (genellikle otozomal dominant tip) olduğu, kalıtsal vakaların da genellikle erken başlangıçlı (<65 yıl) AH ile ilişkisi olduğu tahmin edilmektedir (Cummings, 2004). AH vakalarının çoğu geç başlangıçlıdır (yaklaşık% 94) ve bugüne kadar, apolipoprotein E'nin (APOE4) sadece ε4-allel polimorfizmi tutarlı bir şekilde AH'nın sporadik formunu geliştirme riskindeki bir artışla ilişkilendirilmiştir. Son yıllarda, buna ek olarak hastalıkla ilişkili bazı kromozomal lokuslar (kromozomlar 1, 7 ve 8) tanımlanmıştır (Sleegers vd., 2010). Mendel kalıtım kalıpları görülebilmese rağmen (sıklıkla otozomal dominant), AH'nın geç başlangıçlı tipi poligenik ve çok faktörlü bir hastalık olarak görülmektedir. 21, 14 ve 1. kromozomlarda bulunan amiloid prekürsör protein (APP) ve presenilin 1 (PS1) ve 2 (PS2) mutasyonlarının, erken başlangıçlı AH vakalarının % 71'inden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Ancak bu mutasyonlar toplam AH vakalarının yalnızca %0.5'ini açıklamaktadır (Butler vd., 2009). AH başlangıcından sorumlu fizyopatogenik mekanizmalar hala ayrıntılı olarak bilinmese de, çok çeşitli olası faktörler tartışılmaktadır: (a) genetik (mutasyonlar ve aleller); (b) toksik etkiye sahip olabilecek protein ve peptitlerin anormal birikimi (Aβ, fosforile tau proteini, vb.); (c) eksojen toksik elementler (alüminyum ve civa); (d) oksidatif stres (antioksidan eksikliği, geçiş metalleri, mitokondriyal bozukluklar vb.); (e) vasküler bozukluklar (iskemi, hipertansiyon, hiperhomosisteinemi, vb.); (f) trofik faktör eksikliği; (g) bulaşıcı enflamatuvar süreçler (sitokinler, virüs vb.) ve (h) metabolik bozukluklar (diyet, dislipidemi, diyabet, vb.) gibi (Drachman, 2006). Histopatolojik açıdan, AH'nı karakterize eden beyin değişiklikleri,

(1) 38-43 amino asit birikintili A β peptidi mevcudiyetidir (amiloid plaklar, nöritik veya yayılmış halde); (2) normal fonksiyonu mikrotübülleri stabilize etmek olan ve eskiden tau proteini olarak adlandırılan mikrotübüller ile ilişkili proteinin anormal birikintileri olan hücre içi nörofibriler yumakların varlığı; (3) amiloid anjiyopati ve (4) Hirano cisimli nöronal granülovakuolar dejenerasyon. Genel olarak, tüm bu patolojik değişikliklerin esas olarak transentorinal kortekste, hipokampus, amigdala, anterior bazal beyinde ve ilerledikçe diensefalik çekirdek, beyin sapı ve striatum çekirdeklerinde bulunduğu söylenebilir (Braak ve Braak, 1991).

Nörotoksik etkiye sahip A β proteininin anormal birikimi varsayımına dayanan amiloid hipotezi, APP geninin 21. kromozom üzerinde yer aldığı bulunmasıyla birlikte Down sendromlu bireylerin hayatları boyunca çok fazla A β ürettikleri ve bu nedenle bu hastalarda tipik Alzheimer nöropatolojileri geliştiğinin keşfine dayanmaktadır (Glennner ve Wong, 1984). Amiloid hipotezi ilk kez 1991 yılında Hardy ve Allsop tarafından resmi olarak öne sürülmüştür ve günümüzde bilimsel olarak en iyi desteklenen etiyolojik hipotezlerden biri olmaya devam etmektedir. Bu hipotez, A β proteininin hem hücre içi, hem hücre dışı aşırı üretim ve birikiminin, hastalığı tamamen karakterize eden ilerleyici nöronal hasarın başlangıç olaylarından biri olduğunu açıklamaktadır (Hardy ve Allsop, 1991; Hardy ve Higgins, 1992; Eckman ve Eckman, 2007).

Amiloid hipotezinin yanı sıra, Alois Alzheimer tarafından hastalığın hipotetik nedensel açıklaması olarak enfeksiyon hipotezi öne sürülmüştür. Bu hipotez uzun süredir göz ardı edilmiş olsa da yakın zamanda yeniden gündeme gelmiştir (Itzhaki vd., 2016). Diğer mikrobiyal etkenlerin yanı sıra ölüm sonrası Alzheimer hastalarının beyinlerinde hücre içi zorunlu patojen olan gram-negatif Cpn bakterisinin keşfiyle birlikte, Alzheimer hastalarının kanındaki anti-Cpn antikoru miktarı artışı saptanmış ve bu patojenin neden olduğu sistemik enfeksiyonun AH görülme riskini 5 kat artırdığı gösterilmiştir (Balin vd., 1998; 2008). Cpn, AH ile ilişkili olduğu düşünülen Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) gibi doğrudan olfaktör (koku) kanalından vücuda girebilmektedir ve mikrogliya da dahil olmak üzere beynin farklı hücrelerini enfekte veya kolonize edebilmektedir (Bu vd., 2015). Aynı zamanda, Gérard ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan bir çalışmada Alzheimer hastalarının beynindeki plaklarının yakınında canlı Cpn bakterilerine rastlanmıştır (Gérard vd., 2006). Son

zamanlarda A β proteininin antimikrobiyal ve antiviral özelliklerini gösteren pek çok çalışma yapılmıştır (Soscia vd., 2010; Bourgade vd., 2015, 2016a, 2016b; Bode vd., 2017; Kumar vd., 2016). A β 'nın antimikrobiyal özellikleri düşünüldüğünde, AH ile enfeksiyon hipotezi arasındaki ilişki ilgi çekici hale gelmektedir ve A β 'yı doğrudan hedef alan denemelerin neden başarısız olduğunun sebebi enfeksiyon hipotezinin gözardı edilmesi olabilir.

Yapılan pek çok çalışmada astım ve ateroskleroz gibi inflamatuvar hastalıklar ile ilişkisi kesin olarak kanıtlanan zorunlu hücre içi bir gram negatif bakteri olan Cpn enfeksiyonunun, nörodejeneratif santral sinir sistemi hastalıkları ile de ilişkisi olduğu yönündeki kanıtlar giderek artmaktadır. Klamidya ailesinin diğer üyelerinin aksine Cpn başlangıç kültürü, yayılması ve izolasyonu zor bir bakteridir. Hücre kültüründe büyümesi yetersiz ve oluşan inklüzyonlar diğer klamidyalarda görülenlerden daha küçük olmasına rağmen izolasyon en iyi şekilde hücre kültürüyle gerçekleştirilebilmektedir (Kuo vd., 1995). Cpn ile yapılacak her çalışma öncesinde konakçı hücre hattında inokülasyon sağlanması ve sonrasında inklüzyon cisimciklerinin miktarının belirlenmesi gerekmektedir. *Escherichia coli* lipopolisakkaritlerinden elde edilen ve nöroinflamasyon modellerinde sıklıkla kullanılan LPS, genellikle liyofilize halde ticari olarak satın alınabilmektedir.

Literatürde, LPS veya A β gibi indükleyici bir madde aracılığıyla aktive edilen mikrogliaların, SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı ile ko-kültüre edildiği pek çok nöroprotektif etki çalışması yer almaktadır (Lo vd., 2009; Shih vd., 2011; Zhang vd., 2014; Ma vd., 2015; Pandur vd., 2019; DaSilva vd., 2019). Ancak Cpn ile yapılan benzer *in vitro* çalışmalarda yaygın olarak enfekte edilmiş hücreler üzerinde çalışılmıştır (Airenne vd., 2002; Fischer ve Häcker, 2003; Dreses-Werringloer vd., 2006; Ikejima vd., 2006; Boelen vd., 2007; Appelt vd., 2008). Enfekte hücrelerle yapılan çalışmalarda, canlı veya ölü bakteri ayrımı yapılamamakta ve analizi canlı hücrelerle sınırlamak mümkün olmamaktadır (Rogers vd., 2010). Bu nedenle, bu tez çalışmasında LPS ile oluşturulan nöroinflamasyon modeli benzeri bir çalışmayı, liyofilize Cpn lizatu ile, her deney öncesinde inokülasyon aşamasına dönmeden gerçekleştirebilmek ve sürdürülebilirliği sağlamak için moleküler farmakolojik deneylere uygun bir nöroinflamasyon modeli tasarlanmıştır.

Cpn'nin hücre kültüründe izole edilmesi zor bir organizma olması sebebiyle bu tez çalışmasında insan epitelyal karsinoma hücresi olan HEP-2 hücre hattı konakçı olarak kullanılmış ve Cpn inokülasyonu sağlanmıştır. Sonrasında, süpernatanttan veya hücreler UV ışığına maruz bırakılarak/bırakılmayarak hücre pelleti cihazda parçalanarak elde edilen Cpn lizatlarının THP-1 hücre aktivasyonu üzerindeki etkinliği IL-1 β ve CD218a proinflamatuvar sitokin çalışmasıyla karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada IL-1 β ve CD218a seviyelerini sırasıyla, %25.2 ve %24.2 oranında artıran Cpn süpernatantından elde edilen lizatla ileri deneylere devam edilmiştir. Literatürde yaygın olarak kullanılan LPS konsantrasyonlarıyla (1 μ g/ml, 100 ve 10 ng/ml) (Lund vd., 2006; Henn vd., 2009; Dai vd., 2015; Figueroa-Hall vd., 2017; Li vd., 2018), aynı konsantrasyonlardaki Cpn lizatının, yine literatürde sıklıkla LPS ile birlikte kullanılan IFN- γ (10 ng/ml) ile kombine halde veya tek başlarına, HMC3 mikroglia aktivasyonunu araştırmak amacıyla IL-1 β , TNF- α ve IL-8 proinflamatuvar sitokinleri üzerindeki indükleyici etkileri RT-PCR çalışmasıyla belirlenmiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre, IFN- γ (10 ng/ml) ile kombine halde IL-1 β , TNF- α ve IL-8 ekspresyon seviyelerini sırasıyla, 2.17, 5.18 ve 4.14 kat artıran 1 μ g/ml Cpn ve 3.21, 1.41 ve 3.87 kat artıran 100 ng/ml LPS ile antikor çalışmalarına devam edilmiştir.

Yapılan literatür taraması sonucunda, periferik kan mononükleer hücreleri (Netea vd., 2000) ve THP-1 monosit hücre hattında (Lim vd., 2014) benzeri çalışmalara rastlanmakla beraber HMC3 mikroglia hücre hattında Cpn ile benzeri bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmaya ek olarak, 10 ng/ml IFN- γ ile kombine halde kullanılmaya karar verilen Cpn ve LPS'nin aktif mikroglia belirteci olan CD11b antikoru üzerindeki etkinliği, hem konsantrasyon (1 μ g/ml, 100 ve 10 ng/ml) hem de inkübasyon (24 ve 48. saat) parametrelerine göre akış sitometri ile araştırılmıştır. Mikroglia hücrelerinin aktivasyon süresi 24 saat, aktivasyon için kullanılacak konsantrasyonlar ise CD11B seviyelerini sırasıyla, %42.4 ve %47 oranında artıran 100 ng/ml LPS ve 1 μ g/ml Cpn olarak belirlenmiştir.

1942 yılında epigenetik “fenotipleri meydana getiren genler ve onların ürünleri arasındaki nedensel etkileşimleri araştıran biyolojinin bir dalı” olarak tanımlanmıştır (Waddington, 2012). Epigenetik, mevcut DNA sekansının ötesinde faaliyet gösteren bir olgu olmakla birlikte, DNA sekansında yer alan temel bilgiler epigenetik elemanların

organizasyonunda önemli rol oynar. Bu nedenle, özellikle CpG adaları gibi DNA dizisinde tekrar edilen elemanlar kromatin organizasyonunun olduğu kadar epigenetik işleyişin de fonksiyonel bileşenleridir. Epigenetik mekanizmalar; DNA dizisinde bir değişim içermeyen ve hücre döngüsü boyunca gerçekleşen kalıtsal değişikliklerdir. Epigenetik değişiklikler; genetik modifikasyonlardan farklı olarak geri dönüşebilme potansiyellerine sahip olma, genomda yakındaki bir diğer gen grubunu etkileyebilme ve çevre ile modifiye edilebilme gibi ortak özelliklere sahiptirler (Egger vd., 2004).

Çeşitli histon proteinleri ve histon olmayan proteinler, genomu paketleyen dinamik proteinlerdir. ATP'yi yeniden düzenleyen faktörler kadar bu proteinlerin ve DNA'nın katyonik modifikasyonları da epigenetik bilginin saklanmasına, sürdürülmesine ve yayılmasına katkıda bulunur. Çeşitli evrimsel yolların bir sonucu olarak bu DNA ve protein elemanları, spesifik sinyal cevaplarını ve genom fonksiyonunu kolaylaştıracak yönde kademeli bir şekilde karmaşıklığa doğru evrimleşmiştir (Kumari vd., 2013). Moleküler biyolojinin gelişimiyle birlikte epigenetik terimi gen ifadesinde, DNA dizisini değiştirmeden, kalıtsal ve potansiyel olarak geri dönüşümlü şekilde ortaya çıkan değişiklikler şeklinde yeniden tanımlanmıştır (Sigalotti vd., 2010). Bu olayın moleküler temeli karmaşık bir olaydır ve belli genlerin aktivasyonunun ne zaman ve nasıl olacağını belirler (İzmirli, 2013).

Epigenetik mekanizmaların depresyon, şizofreni, madde bağımlılığı, bilişsel işlev bozuklukları gibi hastalıklarda ve nöroenezis, nöronal plastisite, öğrenme ve bellekte rol oynadığına dair çok sayıda delil bulunmaktadır (Erol vd., 2010). Ökaryotik protein metilasyon sisteminin çeşitli bileşenlerinin kaynağının bakteriler olabileceği düşünülmektedir. Özellikle, SET alanı içeren histon metiltransferazlar (örn., G9a, SETDB1) ilk önce prokaryotlarda karbonhidrat bağlayıcı alanların *scaffold attachment factor* (SAF) süper familyasından ortaya çıkmış olabilir (Aravind vd., 2011). Tersine, bakteriyel SET alanını içeren proteinin bir alt kümesi, ökaryotik benzerlerinin kromatinle ilişkili rolünü geliştirmiş olabilir. Bu hipotez için ilk kanıt, klamidyal SET proteinleriyle yapılan çalışmalardan ortaya çıkmıştır. İnsanlarda akut solunum yolu hastalıklarına neden olan Cpn'den bir SET alanı proteininin (cpnSET) ilk defa klamidyal histon-benzeri proteinler olan HC1 / HC2'yi metillediği gösterilmiştir (Murata vd., 2007). Bu proteinin homoloğu olan *C. trachomatis* nükleer efektörü T3SS'nin enfekte olmuş hücre çekirdeğine girerek memeli

H2B, H3 ve H4'ünü metilleyebildiği ve histon metiltransferaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. (Bierne vd., 2012). Ökaryotlarla etkileşime giren birçok bakteri türünde SET alan proteinleri bulunması sebebiyle, pek çok bakterinin aynı stratejiye sahip olduğu düşünülmektedir.

Bu bilgiler ışığında, bu tez çalışması kapsamında Cpn enfeksiyonunun epigenetik faktörler ve inflamatuvar yollar ile olası ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Oluşturulan nöroinflamasyon modelinde, Cpn ile kombine halde kullanılan epigenetik düzenleyici faktörler üzerine etkili HDACi'ler olan TSA, givinostat ve DNMTi olan RG108 ve bir antibiyotik olan rifampinin, epigenetik kromatin düzenlenmesi ve inflamazom ile ilişkili etkileri gen panelleriyle moleküler düzeyde araştırılmıştır.

Epigenetik kromatin düzenlenmesi ile ilişkili enzim panelinden elde edilen bulgulardan biri Cpn ile SETD7 geninde görülen 1.34 kat artıştır. SETD7, histon H3'ün 4. lizini spesifik olarak metilleyen bir lizin metiltransferazdır ve AH'dan izole edilen örneklerde, tau üzerinde birden fazla lizin monometilasyon bölgesi tespit edilmiştir (Bichmann vd., 2020). Bu nedenle, epigenetik bağlamda Cpn enfeksiyonu ve AH ilişkisine SETD7 geninin aracılık ediyor olabileceği düşünülmektedir.

Bir diğer bulgu ise, Cpn+rifampin konsantrasyon grubu ile DPEP2 geninde görülen 34.22 kat ekspresyon artışıdır. DPEP2 ekspresyon artışı makrofajlar üzerinde baskılayıcı etki göstererek proinflamatuvar sitokin cevabını azaltmaktadır ve bu etkiye NF- κ B sinyal yolağı baskılanmasının aracılık ettiği bildirilmiştir (Yang vd., 2019). Rifampinin nöroprotektif etki mekanizmasına da NF- κ B sinyal yolağı baskılanmasının aracılık ettiği daha önce bildirilmiştir (Bi vd., 2011; Kim vd., 2009; Bi vd., 2013). Bu nedenle, DPEP2 geni de aynı yolak üzerinde yer alıyor olabilir. Ayrıca, immün yanıtları düzenleyen ve nöroproteksiyonda rol oynadığı düşünülen (Wang vd., 2020) HDAC10 geninde görülen 2.50 kat artış da rifampinin epigenetik bağlamda nöroprotektif etki mekanizmasının aydınlatılması yönünde önemli bir bulgudur.

Başka bir önemli bulgu ise TSA ile HDAC4 geninde görülen 3.40 kat ekspresyon artışıdır. Sinaptik plastisite ve nöronal hayatta kalma gibi nörogelişimin önemli basamaklarında aktif rol oynayan bu genin ekspresyonundaki düzensizliklerin

nörodejeneratif hastalıklar ve bilişsel bozukluklar da dahil olmak üzere çeşitli nöronal hastalıklarda önemli bir etken olduğu düşünülmektedir (Mielcarek vd., 2015; Wu vd., 2016). Bu verilere ek olarak, DNA replikasyonu, DNA hasar yanıtı, transkripsiyon modülasyonu ve hücre döngüsü regülasyonu gibi birçok temel hücresel işlemde rol oynayan SETD8 geninde (Milite vd., 2016), rifampin ve RG108 gruplarında görülen sırasıyla, 3.92 ve 1.11 kat ekspresyon artışı da panelden elde edilen önemli bulgulardan biridir.

İnflamazom panelinden elde edilen en dikkat çekici bulgu, gelişmiş glikasyon son ürünlerinin etkileşimlerine ve bunların yanı sıra homeostazis, gelişim, inflamasyon, diyabet ve AH gibi bazı hastalıklarda rol oynayan moleküller ile de etkileşimlere aracılık eden multiligand bir reseptör olan RAGE geninde, Cpn ile 4.99 kat ekspresyon artışının, TSA, RG108 ve Rifampin varlığında sırasıyla, 1.04, 0.77 ve 0.48 kata düşmesidir. Ateroskleroz gibi durumlarda ve özellikle diyabetin bir komplikasyonu olarak hem akut hem de kronik vasküler inflamasyona aracılık eden bu gen, aynı zamanda A β peptidinin reseptörünü de kodlamaktadır (Schmidt vd., 2009). Cpn enfeksiyonunun, ateroskleroz ve astım gibi kronik inflamatuvar hastalıklar ile kanıtlanmış ve AH ile olası ilişkisi (Porritt ve Crother, 2016) göz önünde bulundurulduğunda, Cpn'nin bu hastalıklar üzerindeki kronik inflamasyonu tetikleyici etkilerine bu gen aracılık ediyor olabilir. TSA, RG108 ve Rifampin ile RAGE gen ekspresyonunun azaltılması da antiinflamatuvar açıdan önemli bir bulgudur.

RAGE genine benzer bir etki de RELA geninde görülmüştür. Cpn ile NF- κ B, sinyal yolağı aktivasyonunda görev yapan RELA geninde görülen 40417 kat aşırı ekspresyonun, TSA, rifampin, givinostat ve RG108 varlığında sırasıyla, 0.69, 3.45, 0.27 ve 134.22 kata düşerek baskılanması ve ayrıca NF- κ B yolağı inhibitör komplekslerine katılan IKBKB ve IKBKG genlerinde bu gruplarla görülen ekspresyon artışları, ilaç gruplarının antiinflamatuvar etkilerinin aydınlatılması açısından önemlidir.

Tez çalışması kapsamında, TSA, givinostat, RG108 ve rifampin'in A β ile oluşturulan nörotoksisite modelinde nöroprotektif etkileri de araştırılmıştır. A β , 39 ila 42 amino asitlik bir peptittir ve genellikle tüm nöronlarda, membran bağlı tip-1 bir protein olan APP'nin iki enzimatik kompleks vasıtasıyla (β ve γ sekretazlar) sıralı proteolitik işlenmesi yoluyla üretilmektedir (Vetrivel ve Thinakaran, 2006). APP, amiloidojenik ve amiloidojenik

olmayan iki enzimatik yol ile işlenebilir. Amiloidojenik olmayan yol içinde, proteolizin ilk basamağı esas olarak α -sekretaz aktivitesine sahip olan enzimler tarafından gerçekleştirilir (öncelikle ADAM 10). Bu enzimler APP'yi A β fragmanına karşılık gelen ektodomain içinde keser. Bu işlem daha büyük çözünür parçalar üretir, böylece A β gibi daha küçük parçaların oluşumunu önler. α -sekretazın bu etkisi, çözünür α APP olarak adlandırılan hücre dışı N-terminal alanını serbest bırakır ve bu alan çeşitli nörotrofik ve nöroprotektif özelliklere sahiptir. Buna ek olarak, membrana bağlı kalan APP'nin C-terminal fragmanı (CTF α), γ -sekretaz aracılığıyla tekrar proteolize edilir ve düşük hücre toksik etkilere sahip p3 fragmanını (A β 17–40/42) üretir. Aynı zamanda, bazı nöroprotektif özellikler sergileyen APP'nin hücre içi alanı hücre içine salınır (Postina, 2008). Amiloidojenik yolda ise, APP ilk olarak β -sekretaz (aynı zamanda aspartil proteaz BACE1 olarak da bilinmektedir) aracılığıyla proteolize edilir ve böylece N-terminal alanından çözünebilir bir fragman olan sAPP β ve membrana bağlı olarak kalan CTF β fragmanı oluşmuş olur. Sonraki basamakta, CTF β fragmanı γ -sekretaz kompleksi aracılığıyla proteolize uğrar ve A β üretilir. γ -sekretaz, nikastrin, PEN-2, Aph-1, enzimatik kompleksin katalitik kısmını oluşturan presenilinler olan PS1 ve PS2 isimli dört proteinden oluşan bir komplekstir. Ailesel AH tipi (APP, PS1 ve PS2) ile ilişkili tüm mutasyonların, A β üretimini arttırması veya üretim hızını değiştirmesi önemlidir (Nathalie ve Jean-Noel, 2008).

Deneyssel olarak A β 'nin farklı ve antagonistik biyolojik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir: bir taraftan trofik ve hatta antioksidan özelliklere sahiptir; öte yandan ise, çok çeşitli toksik mekanizmalara sahiptir. Çeşitli çalışmalarda A β 'nin toksik özelliklerine oksidatif stress, mitokondriyal difüzyon, membran geçirgenliğinde değişimler, inflamasyon, sinaptik disfonksiyon, nörotransmitter reseptörleriyle etkileşim yoluyla eksitotoksisite gibi çeşitli mekanizmaların aracılık ettiği gösterilmiştir (Acosta-Martinez ve Ortiz, 2004).

Bu bilgiler ışığında, xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde SH-SY5Y hücreleri 5 gün süreyle cihazın içerisinde farklılaştırılmış ve farklılaşma sürecinin bitiminde konsantrasyon gruplarıyla muamele edildikten sonra, deney öncesinde ticari halde satın alınan monomer formdan polimerik agregat haline getirilen A β ile nörotoksisite sağlanmıştır. Deney sonuçlarına göre, TSA ve Givinostat grubu daha iyi olmak üzere, tüm ilaç gruplarında nöroproteksiyon sağlanmıştır.

Aynı model üzerinde $A\beta_{1-42}$ seviyeleri akış sitometri cihazında $A\beta_{1-42}$ antikoru ile ölçülerek protein düzeyinde de nöroprotektif etkiler incelenmiştir. Pozitif kontrol grubunda indüklenen nörotoksisiteyi, $A\beta_{1-42}$ seviyesini en etkili şekilde azaltarak nöroproteksiyon sağlayan ilaç RG108 olarak belirlenmiştir. Bunlara ek olarak, ilaç gruplarının $A\beta$ nörotoksisitesine aracılık eden oksidatif stres ve apoptotik/nekrotik etkileri de araştırılmıştır. Oksidatif stres üzerine etkiler akış sitometride toplam ROS miktarı ölçülerek belirlenmiş ve ilaç gruplarının $A\beta$ ile indüklenen ROS'un hücre içi üretimini azaltarak nöronları potansiyel olarak koruyabileceği gösterilmiştir. Bu deney sonucunda en etkili ilaçlar TSA ve RG108 olarak belirlenmiş, ayrıca ROS inhibitörü NAC ve ROS indükleyicisi pyocyanin kullanılarak elde edilen verilere dayanarak her ikisi de bakteriyel ekzopolisakkaritlerden elde edilen LPS ve Cpn'nin, hücre içi ROS üretimini birbirinden farklı yollar üzerinden indüklediğini düşünmekteyiz. Literatürde Rifampin, TSA ve RG108'in oksidatif stres üzerindeki etkileri hakkında yapılan çalışmalar mevcut olmakla birlikte (Tomiyama vd., 1996; Oida vd., 2006; Böttcher vd., 2000; Chen vd., 2010; Ryu vd., 2003; Shimazu vd., 2013; Xin vd., 2015; Agudelo vd., 2011; Tokarz vd., 2016), çalışmamız Givinostatın $A\beta$ kaynaklı ROS indüksiyonunu inhibe edici etkisi üzerine ilk çalışmadır.

$A\beta$ 'nın, özellikle nöroinflamasyon ve kolinerjik nöronal apoptozda merkezi bir rol oynaması ve bu nedenle bu hastalığın ana belirleyicisi olarak kabul edilmesi (Li vd., 2009) nedeniyle nörotoksisite modeli üzerinde yapılan apoptotik+nekrotik etki deneyi sonuçlarına göre, $A\beta$ ile indüklenen uyarılmış hücre ölümü (apoptotik+nekrotik etki), $A\beta$ varlığında, yalnızca TSA ve RG108 grubuyla anlamlı olarak azalmıştır. Givinostat veya Rifampin varlığında ise uyarılmış hücre ölümünde saptanan azalma anlamlı bulunmamıştır. Her iki ilaçla da apoptotik etki azalmakta ancak nekrotik etki artmaktadır.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında Cpn ile indüklenmiş nöroinflamasyon kökültür modeli optimize edilmiş ve bu model üzerinde nöroprotektif etkileri daha önce bildirilmiş bir antibiyotik olan Rifampinin ve nörorejeneratif etkileri bilinen epigenetik düzenleme ile ilişkili ilaçlar olan TSA ve RG108'in yanı sıra, benzer etkileri ilk defa aydınlatılan givinostat'ın Cpn enfeksiyonu ile ilişkisi, ilk defa epigenetik ve inflamatuvar bağlamda araştırılmıştır. Gen panellerinden elde edilen verilerin, hem AH ve benzeri nörodejeneratif hastalıklarda potansiyel olabilecek epigenetik ve inflamatuvar mekanizmalar

üzerine etkili yeni ilaç kombinasyonlarına veya mevcut ilaçların hedeflenmesine yönelik öncül bulgular olduğu, hem de Cpn enfeksiyonunun AH patolojisindeki rolüne epigenetik yollar açısından farklı bir yaklaşım sağladığı düşünülmektedir. Bu tez çalışmasından elde edilecek çıktılar ile, TSA, RG108, givinostat ve rifampinin, AH nöropatolojisinde yer alan epigenetik düzensizlikler ve A β nörotoksisitesine karşı nöroprotektif etki mekanizmaları hakkında literatüre katkı sağlayacak ve ayrıca moleküler ve klinik düzeydeki daha ileri deneylerle terapötik seçeneklerin oldukça sınırlı olduğu kronik nörodejenaratif bir hastalık olan AH tedavisine alternatif bir basamak oluşturabilecek ön veriler elde ettiğimiz inancındayız.

KAYNAKÇA

- Abdul-Sater, A. A., Saïd-Sadier, N., Lam, V. M., Singh, B., Pettengill, M. A., Soares, F., Ojcius, D. M. (2010). Enhancement of reactive oxygen species production and chlamydial infection by the mitochondrial Nod-like family member NLRX1. *Journal of Biological Chemistry*, 285(53), 41637-41645.
- Abe, T., Tohgi, H., Isobe, C., Murata, T., Sato, C. (2002). Remarkable increase in the concentration of 8-hydroxyguanosine in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research*, 70(3), 447-450.
- Agrawal, K., Das, V., Vyas, P., Hajduch, M. (2018). Nucleosidic DNA demethylating epigenetic drugs—a comprehensive review from discovery to clinic. *Pharmacology & Therapeutics*, 188, 45-79.
- Agudelo, M., Gandhi, N., Saiyed, Z., Pichili, V., Thangavel, S., Khatavkar, P., Nair, M. (2011). Effects of alcohol on histone deacetylase 2 (HDAC2) and the neuroprotective role of trichostatin A (TSA). *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 35(8), 1550-1556.
- Airenne, S., Surcel, H. M., Tuukkanen, J., Leinonen, M., Saikku, P. (2002). Chlamydia pneumoniae inhibits apoptosis in human epithelial and monocyte cell lines. *Scandinavian Journal of Immunology*, 55(4), 390-398.
- Allsopp, T. E., McLuckie, J., Kerr, L. E., Macleod, M., Sharkey, J., Kelly, J. S. (2000). Caspase 6 activity initiates caspase 3 activation in cerebellar granule cell apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 7(10), 984.
- An, Y., Zhang, H., Huang, S., Pei, G. (2020). PL201, a reported rhamnoside against Alzheimer's disease pathology, alleviates neuroinflammation and stimulates Nrf2 signaling. *Frontiers in Immunology*, 11, 162.
- Appelt, D. M., Roupas, M. R., Way, D. S., Bell, M. G., Albert, E. V., Hammond, C. J., Balin, B. J. (2008). Inhibition of apoptosis in neuronal cells infected with Chlamydia (Chlamydia pneumoniae). *BMC Neuroscience*, 9(1), 13.
- Aravind, L., Abhiman, S., Iyer, L. M. (2011). Natural history of the eukaryotic chromatin protein methylation system. In *Progress in molecular biology and translational science* (Vol. 101, pp. 105-176). Academic Press.
- Aslantürk, Ö. S. (2018). *In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages* (Vol. 2, p. 64). InTech.
- Assis, R. I., Wiench, M., Silverio, K. G., da Silva, R. A., da Silva Feltran, G., Sallum, E. A., Casati, M. Z., Nociti Jr, F. H., Andia, D. C. (2018). RG108 increases NANOG and OCT4 in bone marrow-derived mesenchymal cells through global changes in DNA modifications and epigenetic activation. *PloS one*, 13 (12).
- Attems, J., Yamaguchi, H., Saido, T. C., Thal, D. R. (2010). Capillary CAA and perivascular A β -deposition: two distinct features of Alzheimer's disease pathology. *Journal of the Neurological Sciences*, 299 (1-2), 155-162.

- Bai, S., Ghoshal, K., Datta, J., Majumder, S., Yoon, S. O., Jacob, S. T. (2005). DNA methyltransferase 3b regulates nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells by recruiting histone deacetylase 2. *Molecular and Cellular Biology*, 25 (2), 751-766.
- Bamberger, M. E., Harris, M. E., McDonald, D. R., Husemann, J., Landreth, G. E. (2003). A cell surface receptor complex for fibrillar β -amyloid mediates microglial activation. *Journal of Neuroscience*, 23 (7), 2665-2674.
- Barbato, C., Pezzola, S., Caggiano, C., Antonelli, M., Frisone, P., Ciotti, M. T., Ruberti, F. (2014). A lentiviral sponge for miR-101 regulates RanBP9 expression and amyloid precursor protein metabolism in hippocampal neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 37.
- Barcia, C., Bahillo, A. S., Fernández-Villalba, E., Bautista, V., Poza Y Poza, M., Fernández-Barreiro, A. Herrero, M. T. (2004). Evidence of active microglia in substantia nigra pars compacta of parkinsonian monkeys 1 year after MPTP exposure. *Glia*, 46(4), 402-409.
- Barouki, R., Melén, E., Herceg, Z., Beckers, J., Chen, J., Karagas, M., Puga, A., Xia, Y., Chadwick, L., Yan, W., Audouze, K., Slama, R., Heindel, J., Grandjean, P., Kawamoto, T., Nohara, K. (2018). Epigenetics as a mechanism linking developmental exposures to long-term toxicity. *Environment International*, 114, 77-86.
- Bateman, R. J., Aisen, P. S., De Strooper, B., Fox, N. C., Lemere, C. A., Ringman, J. M., Salloway, S., Sperling, R. A., Windisch, M., Xiong, C. (2011). Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 3 (1), 1.
- Behbahani, H., Rickle, A., Concha, H., Ankarcrona, M., Winblad, B., Cowburn, R. F. (2005). Flow cytometry as a method for studying effects of stressors on primary rat neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 82(3), 432-441.
- Berger, E., Nassra, M., Atgié, C., Plaisancié, P., Géloën, A. (2017). Oleic acid uptake reveals the rescued enterocyte phenotype of colon cancer Caco-2 by HT29-MTX cells in co-culture mode. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1573.
- Bertoglat, M. J., Morris-Blanco, K. C., Vemuganti, R. (2019). Epigenetic mechanisms of neurodegenerative diseases and acute brain injury. *Neurochemistry International*, 104642.
- Betelli, E., Dastrange, M., Oukka, M. (2005). Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(14), 5138-5143.
- Bi, W., Zhu, L., Jing, X., Liang, Y., Tao, E. (2013). Rifampicin and Parkinson's disease. *Neurological Sciences*, 34 (2), 137-141.

- Bi, W., Zhu, L., Wang, C., Liang, Y., Liu, J., Shi, Q., Tao, E. (2011). Rifampicin inhibits microglial inflammation and improves neuron survival against inflammation, *Brain Research*, 1395, 12-20.
- Bichmann, M., Oriol, N. P., Ercan-Herbst, E., Schoendorf, D. C., Ramos, B. G., Schwaerzler, V., Haberkant, P., Gasparini, L., Ehrnhoefer, D. E. (2020). SETD7-mediated lysine monomethylation is abundant on non-hyperphosphorylated nuclear Tau. *bioRxiv*.
- Biedler, J. L., Helson, L., Spengler, B. A. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer research*, 33(11), 2643-2652.
- Bierne, H., Hamon, M., Cossart, P. (2012). Epigenetics and bacterial infections. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(12), a010272.
- Blessing, E., Kuo, C. C., Lin, T. M., Campbell, L. A., Bea, F., Chesebro, B., Rosenfeld, M. E. (2002). Foam cell formation inhibits growth of *Chlamydia pneumoniae* but does not attenuate *Chlamydia pneumoniae*-induced secretion of proinflammatory cytokines. *Circulation*, 105(16), 1976-1982.
- Block, M. L., Zecca, L., Hong, J. S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(1), 57.
- Boelen, E., Stassen, F. R. M., van der Ven, A. J., Lemmens, M. A., Steinbusch, H. P., Bruggeman, C. A., Schmitz, C., Steinbusch, H. W. (2007). Detection of amyloid beta aggregates in the brain of BALB/c mice after *Chlamydia pneumoniae* infection. *Acta Neuropathologica*, 114(3), 255-261.
- Borges, S., Döppler, H. R., Storz, P. (2014). A combination treatment with DNA methyltransferase inhibitors and suramin decreases invasiveness of breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 144 (1), 79-91.
- Bosshart, H., Heinzelmann, M. (2016). THP-1 cells as a model for human monocytes. *Annals of Translational Medicine*, 4(21).
- Böttcher, T., Gerber, J., Wellmer, A., Smirnov, A. V., Fakhrjanali, F., Mix, E., Nau, R. (2000). Rifampin reduces production of reactive oxygen species of cerebrospinal fluid phagocytes and hippocampal neuronal apoptosis in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *Journal of Infectious Diseases*, 181(6), 2095-2098.
- Bourgade, K., Garneau, H., Giroux, G., Le Page, A. Y., Bocti, C., Dupuis, G., Fülöp, T. (2015). β -Amyloid peptides display protective activity against the human Alzheimer's disease-associated herpes simplex virus-1. *Biogerontology*, 16 (1), 85-98.
- Bourgade, K., Le Page, A., Bocti, C., Witkowski, J. M., Dupuis, G., Frost, E. H., Fueleop Jr, T. (2016). Protective effect of amyloid- β peptides against herpes simplex virus-1 infection in a neuronal cell culture model. *Journal of Alzheimer's Disease*, 50 (4), 1227-1241.
- Braak H, Braak E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer- related changes. *Acta Neuropathologica*, 82, 239–259.

- Braak, H., Braak, E., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. (1986). Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease: a third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neuroscience Letters*, 65 (3), 351-355.
- Bradshaw, E. M., Chibnik, L. B., Keenan, B. T., Ottoboni, L., Raj, T., Tang, A., Morris, M. C. (2013). CD33 Alzheimer's disease locus: altered monocyte function and amyloid biology. *Nature Neuroscience*, 16 (7), 848-850.
- Browne, T. C., McQuillan, K., McManus, R. M., O'Reilly, J. A., Mills, K. H., Lynch, M. A. (2013). IFN- γ Production by Amyloid β -Specific Th1 Cells Promotes Microglial Activation and Increases Plaque Burden in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *The Journal of Immunology*, 190(5), 2241-2251.
- Broz, P., Dixit, V. M. (2016). Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling, *Nature Reviews Immunology*, 16(7), 407.
- Brueckner, B., Boy, R. G., Siedlecki, P., Musch, T., Kliem, H. C., Zielenkiewicz, P., Lyko, F. (2005). Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. *Cancer Research*, 65 (14), 6305-6311.
- Burns, A., Iliffe, S. (2009). Alzheimer's disease. *BMJ* 338: b158–b158.
- Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25, 169–193.
- Cacabelos, R. (2016). Epigenetics of Brain Disorders: The Paradigm of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer Disease and Parkinsonism*, 6 (229), 2161-0460.
- Cai, Z., Liu, N., Wang, C., Qin, B., Zhou, Y., Xiao, M., Zhao, B. (2016). Role of RAGE in Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(4), 483-495.
- Cairns, B. R. (2009). The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature*, 461 (7261), 193-198.
- Calhoun, M. E., Burgermeister, P., Phinney, A. L., Stalder, M., Tolnay, M., Wiederhold, K. H., Jucker, M. (1999). Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular amyloid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (24), 14088-14093.
- Campbell, E. A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., Darst, S. A. (2001). Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*, 104(6), 901-912.
- Carson, M. J. (2002). Microglia as liaisons between the immune and central nervous systems: functional implications for multiple sclerosis. *Glia*, 40(2), 218-231.
- Carson, M. J., Crane, J., Xie, A. X. (2008). Modeling CNS microglia: the quest to identify predictive models. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 5(1), 19-25.
- Carson, M. J., Doose, J. M., Melchior, B., Schmid, C. D., Ploix, C. C. (2006). CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunological Reviews*, 213 (1), 48-65.

- Carson, M. J., Thrash, J. C., Walter, B. (2006). The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival. *Clinical neuroscience research*, 6 (5), 237-245.
- Charidimou, A., Boulouis, G., Gurol, M. E., Ayata, C., Bacskai, B. J., Frosch, M. P., Viswanathan, A., Greenberg, S. M. (2017). Emerging concepts in sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Brain*, 140 (7), 1829-1850.
- Chen, H. H., Keyhanian, K., Zhou, X., Vilmundarson, R. O., Almontashiri, N. A., Cruz, S. A., Huang, H. (2015). IRF2BP2 reduces macrophage inflammation and susceptibility to atherosclerosis. *Circulation Research*, 117(8), 671-683.
- Chen, S., Sun, Y., Zeng, Z., Tao, E. (2010). Rifampicin inhibits apoptosis in rotenone-induced differentiated PC12 cells by ameliorating mitochondrial oxidative stress. *Neural Regeneration Research*, 5(4), 251-256.
- Chestnut, B. A., Chang, Q., Price, A., Lesuisse, C., Wong, M., Martin, L. J. (2011). Epigenetic regulation of motor neuron cell death through DNA methylation. *Journal of Neuroscience*, 31(46), 16619-16636.
- Christensen, J., Steain, M., Slobedman, B., Abendroth, A. (2011). Differentiated neuroblastoma cells provide a highly efficient model for studies of productive varicella-zoster virus infection of neuronal cells. *Journal of Virology*, 85(16), 8436-8442.
- Clapier, C. R., Cairns, B. R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 273-304.
- Cles, L. D., Stamm, W. E. (1990). Use of HL cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(5), 938-940.
- Colton CA. (2009). Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 4, 399–418.
- Crews, L., Rockenstein, E., Masliah, E. (2010). APP transgenic modeling of Alzheimer's disease: mechanisms of neurodegeneration and aberrant neurogenesis. *Brain Structure and Function*, 214 (2-3), 111-126.
- Critchley, I. A., Jones, M. E., Heinze, P. D., Hubbard, D., Engler, H. D., Evangelista, A. T., Thornsberry, C., Karlowky, J. A., Sahm, D. F. (2002). *In vitro* activity of levofloxacin against contemporary clinical isolates of *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* from North America and Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 8(4), 214-221.
- D'Mello, S. R. (2009). Histone deacetylases as targets for the treatment of human neurodegenerative diseases. *Drug News & Perspectives*, 22 (9), 513.
- Da Costa, E. M., McInnes, G., Beaudry, A., Raynal, N. J. M. (2017). DNA Methylation–Targeted Drugs. *The Cancer Journal*, 23 (5), 270-276.

- Däbritz, J., Weinlage, T., Varga, G., Wirth, T., Walscheid, K., Brockhausen, A., Roth, J. (2015). Reprogramming of monocytes by GM-CSF contributes to regulatory immune functions during intestinal inflammation. *The Journal of Immunology*, 194(5), 2424-2438.
- Dahm, T., Rudolph, H., Schwerk, C., Schrotten, H., Tenenbaum, T. (2016). Neuroinvasion and inflammation in viral central nervous system infections. *Mediators of Inflammation*, 2016.
- Dai, X. J., Li, N., Yu, L., Chen, Z. Y., Hua, R., Qin, X., Zhang, Y. M. (2015). Activation of BV2 microglia by lipopolysaccharide triggers an inflammatory reaction in PC12 cell apoptosis through a toll-like receptor 4-dependent pathway. *Cell Stress and Chaperones*, 20(2), 321-331.
- Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K., Dockrell, D. H. (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PloS One*, 5(1).
- Damaskos, C., Valsami, S., Kontos, M., Spartalis, E., Kalampokas, T., Kalampokas, E., Athanasiou, A., Moris, D., Daskalopoulou, A., Davakis, S., Tsourouflis, G., Kontzoglou, K., Perrea, D., Nikiteas, N., Dimitroulis, D. (2017). Histone deacetylase inhibitors: an attractive therapeutic strategy against breast cancer. *Anticancer Research*, 37 (1), 35-46.
- Dan, H., Zhang, S., Zhou, Y., Guan, Q. (2019). DNA Methyltransferase Inhibitors: Catalysts for Antitumour Immune Responses. *OncoTargets and Therapy*, 12, 10903.
- Dando, S. J., Mackay-Sim, A., Norton, R., Currie, B. J., John, J. A. S., Ekberg, J. A., Batzloff, M., Ulett, G. C., Beacham, I. R. (2014). Pathogens penetrating the central nervous system: infection pathways and the cellular and molecular mechanisms of invasion. *Clinical Microbiology Reviews*, 27 (4), 691-726.
- DaSilva, N. A., Nahar, P. P., Ma, H., Eid, A., Wei, Z., Meschwitz, S., Zawia, N. H., Slitt, A. L., Seeram, N. P. (2019). Pomegranate ellagitannin-gut microbial-derived metabolites, urolithins, inhibit neuroinflammation *in vitro*. *Nutritional Neuroscience*, 22(3), 185-195.
- Dauer, W., Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39(6), 889-909.
- de Calignon, A., Fox, L. M., Pitstick, R., Carlson, G. A., Bacskai, B. J., Spires-Jones, T. L., Hyman, B. T. (2010). Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature*, 464 (7292), 1201-1204.
- de Calignon, A., Spires-Jones, T. L., Pitstick, R., Carlson, G. A., Hyman, B. T. (2009). Tangle-bearing neurons survive despite disruption of membrane integrity in a mouse model of tauopathy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 68 (7), 757-761.

- De los Santos, M., Zambrano, A., Aranda, A. (2007). Combined effects of retinoic acid and histone deacetylase inhibitors on human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(4), 1425-1432.
- Dehai, C., Bo, P., Qiang, T., Lihua, S., Fang, L., Shi, J., Jingyan, C., Yan, Y., Guangbin, W., Zhenjun, Y. (2014). Enhanced invasion of lung adenocarcinoma cells after co-culture with THP-1-derived macrophages via the induction of EMT by IL-6. *Immunology Letters*, 160(1), 1-10.
- Dickson, D. W., Crystal, H. A., Mattiace, L. A., Masur, D. M., Blau, A. D., Davies, P., Yen, S., Aronson, M. K. (1992). Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiology of Aging*, 13 (1), 179-189.
- Dikmen, M. (2017). Comparison of the effects of curcumin and RG108 on NGF-induced PC-12 Adh cell differentiation and neurite outgrowth. *Journal of Medicinal Food*, 20 (4), 376-384.
- Dikmen, M., Kaya-Tilki, E., Engur, S., Ozturk, Y. (2017). Neuritogenic activity of epigallocatechin gallate and curcumin combination on rat adrenal pheochromocytoma cells. *Fresenius Environ. Bull*, 26, 4726-4733.
- Dillon, S. C., Zhang, X., Trievel, R. C., Cheng, X. (2005). The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biology*, 6 (8), 1.
- Doran, K. S., Fulde, M., Gratz, N., Kim, B. J., Nau, R., Prasadaraao, N., Schubert-Unkmeir, A., Tuomanen, E. I., Valentin-Weigand, P. (2016). Host-pathogen interactions in bacterial meningitis. *Acta Neuropathologica*, 131 (2), 185-209.
- Doulberis, M., Kotronis, G., Thomann, R., Polyzos, S. A., Boziki, M., Gialamprinou, D., Deretzi, G., Katsinelos, P., Kountouras, J. (2018). Impact of *Helicobacter pylori* on Alzheimer's disease: What do we know so far?. *Helicobacter*, 23 (1), e12454.
- Dreses-Werringloer, U., Gérard, H. C., Whittum-Hudson, J. A., Hudson, A. P. (2006). Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae infection of human astrocytes and microglia in culture displays an active, rather than a persistent, phenotype. *The American Journal of the Medical Sciences*, 332(4), 168-174.
- Du, J., Zhou, Y., Su, X., Yu, J. J., Khan, S., Jiang, H., Kim, J., Woo, J., Kim, J. H., Choi, B. H., He, B., Chen, W., Zhang, S., Cerione, R. A., Auwerx, J., Hao, Q., Lin, H. (2011). Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science*, 334 (6057), 806-809.
- Du, X., Huo, X., Yang, Y., Hu, Z., Botchway, B. O., Jiang, Y., Fang, M. (2017). miR-124 downregulates BACE 1 and alters autophagy in APP/PS1 transgenic mice. *Toxicology Letters*, 280, 195-205.
- Dupont, C., Armant, D. R., Brenner, C. A. (2009). Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Seminars in Reproductive Medicine*, 27 (5), 351-357.

- Dwane, S., Durack, E., Kiely, P. A. (2013). Optimising parameters for the differentiation of SH-SY5Y cells to study cell adhesion and cell migration. *BMC Research Notes*, 6(1), 366.
- Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M., Hrabeta, J. (2017). Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (7), 1414.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., Jones, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429(6990), 457-463.
- Ekinci, F. J., Linsley, M. D., Shea, T. B. (2000). β -Amyloid-induced calcium influx induces apoptosis in culture by oxidative stress rather than tau phosphorylation. *Molecular Brain Research*, 76(2), 389-395.
- Ekinci, F. J., Malik, K. U., Shea, T. B. (1999). Activation of the L Voltage-sensitive Calcium Channel by Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase following Exposure of Neuronal Cells to β -Amyloid MAP Kinase Mediates β -Amyloid-Induced Neurodegeneration. *Journal of Biological Chemistry*, 274(42), 30322-30327.
- El Khoury, J. B., Moore, K. J., Means, T. K., Leung, J., Terada, K., Toft, M., Freeman, M. W., Luster, A. D. (2003). CD36 mediates the innate host response to β -amyloid. *The Journal of Experimental Medicine*, 197 (12), 1657-1666.
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Cena, V., Comella, J. X. (2000). Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *Journal of Neurochemistry*, 75(3), 991-1003.
- Engür, S., Dikmen, M., Öztürk, Y. (2015). Comparison of antiproliferative and apoptotic effects of a novel proteasome inhibitor MLN2238 with bortezomib on K562 chronic myeloid leukemia cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 1-11.
- Engür, S., Dikmen, M. (2017). The evaluation of the anti-cancer activity of ixazomib on Caco2 colon solid tumor cells, comparison with bortezomib. *Acta Clinica Belgica*, 72(6), 391-398.
- Epelman, S., Lavine, K. J., Randolph, G. J. (2014). Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*, 41(1), 21-35.
- Erdmann, A., Halby, L., Fahy, J., Arimondo, P. B. (2015). Targeting DNA methylation with small molecules: what's next? Miniperspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58 (6), 2569-2583.
- Erol, D., Elyas, Z., Ünal, S. (2010). Psikiyatrik Hastalıkların Gelişiminde Epigenetik Mekanizmalar. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni-Bulletin of Clinical Psychopharmacology*, 20(1), 109-114.
- Erskine, C. L., Henle, A. M., Knutson, K. L. (2012). Determining optimal cytotoxic activity of human Her2neu specific CD8 T cells by comparing the Cr51 release assay to the xCELLigence system. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (66), e3683.

- Escott-Price, V., Sims, R., Bannister, C., Harold, D., Vronskaya, M., Majounie, E., Badarinarayan, N., Morgan, K., Passmore, P., Holmes, C., Powell, J., Brayne, C., Gill, M., Mead, S., Goate, A., Cruchaga, C., Lambert, J., van Duijn, C., Maier, W., Ramirez, A., Holmans, P., Jones, L., Hardy, J., Seshadri, S., Schellenberg, G. D., Amouyel, P., Williams, J. (2015). Common polygenic variation enhances risk prediction for Alzheimer's disease. *Brain*, 138 (12), 3673-3684.
- Esposito, M. M., Sherr, G. L. (2019). Epigenetic Modifications in Alzheimer's Neuropathology and Therapeutics. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 476.
- Etemad, S., Zamin, R. M., Ruitenberg, M. J., Filgueira, L. (2012). A novel in vitro human microglia model: characterization of human monocyte-derived microglia. *Journal of Neuroscience Methods*, 209(1), 79-89.
- Fang, J., Lian, Y., Xie, K., Cai, S., Wen, P. (2014). Epigenetic modulation of neuronal apoptosis and cognitive functions in sepsis-associated encephalopathy. *Neurological Sciences*, 35(2), 283-288.
- Figuerola-Hall, L. K., Anderson, M. B., Das, S., Stevens, C. W., Davis, R. L. (2017). LPS-induced TLR4 neuroinflammatory signaling in CHME-5 microglial cells. *Neuroimmunology and Neuroinflammation*, 4(10), 2017.
- Findeis, M. A. (2007). The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease. *Pharmacology & therapeutics*, 116(2), 266-286.
- Fischer, S. F., Häcker, G. (2003). Characterization of antiapoptotic activities of Chlamydia pneumoniae in infected cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1010(1), 565-567.
- Fitzpatrick, A. W., Falcon, B., He, S., Murzin, A. G., Murshudov, G., Garringer, H. J., Crowther, R. A., Ghetti, B., Goedert, M., Scheres, S. H. (2017). Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature*, 547 (7662), 185-190.
- Forner, S., Baglietto-Vargas, D., Martini, A. C., Trujillo-Estrada, L., LaFerla, F. M. (2017). Synaptic impairment in Alzheimer's disease: a dysregulated symphony. *Trends in Neurosciences*, 40 (6), 347-357.
- Forrest, G. N., Tamura, K. (2010). Rifampin combination therapy for nonmycobacterial infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 23 (1), 14-34.
- Francis, Y. I., Fa, M., Ashraf, H., Zhang, H., Staniszewski, A., Latchman, D. S., Arancio, O. (2009). Dysregulation of histone acetylation in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 18 (1), 131-139.
- Fujino, T., Yokokawa, R., Oshima, T., Hayakawa, M. (2018). SIRT1 knockdown up-regulates p53 and p21/Cip1 expression in renal adenocarcinoma cells but not in normal renal-derived cells in a deacetylase-independent manner. *The Journal of Toxicological Sciences*, 43 (12), 711-715.

- Funk, K. E., Mrak, R. E., Kuret, J. (2011). Granulovacuolar degeneration (GVD) bodies of Alzheimer's disease (AD) resemble late-stage autophagic organelles. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 37 (3), 295-306.
- Gaub, P., Tedeschi, A., Puttagunta, R., Nguyen, T., Schmandke, A., Di Giovanni, S. (2010). HDAC inhibition promotes neuronal outgrowth and counteracts growth cone collapse through CBP/p300 and P/CAF-dependent p53 acetylation. *Cell Death & Differentiation*, 17 (9), 1392-1408.
- Gibson, P. H., Tomlinson, B. E. (1977). Numbers of Hirano bodies in the hippocampus of normal and demented people with Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 33 (1-2), 199-206.
- Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives, *Oncogene*, 25(51), 6680.
- Gimenez-Cassina, A., Lim, F., Diaz-Nido, J. (2006). Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by herpesviral vectors. *Journal of Neuroscience Research*, 84(4), 755-767.
- Giunti, D., Borsellino, G., Benelli, R., Marchese, M., Capello, E., Valle, M. T., Mancardi, G. L. (2003). Phenotypic and functional analysis of T cells homing into the CSF of subjects with inflammatory diseases of the CNS. *Journal of Leukocyte Biology*, 73(5), 584-590.
- Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Cage FH (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140: 918–934.
- Glozak, M. A., Sengupta, N., Zhang, X., Seto, E. (2005). Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*, 363, 15-23.
- Golay, J., Cuppini, L., Leoni, F., Mico, C., Barbui, V., Domenghini, M., Lombardi, L., Neri, A., Barbui, A. M., Salvi, A., Pozzi, P., Porro, G., Pagani, P., Fossati, G., Mascagni, P., Introna, M., Rambaldi, A. (2007). The histone deacetylase inhibitor ITF2357 has anti-leukemic activity in vitro and in vivo and inhibits IL-6 and VEGF production by stromal cells. *Leukemia*, 21 (9), 1892-1900.
- Gómez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J. H., Petersen, R. C., Parisi, J. E., Hyman, B. T. (1997). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 41 (1), 17-24.
- Gómez-Isla, T., Price, J. L., McKeel Jr, D. W., Morris, J. C., Growdon, J. H., Hyman, B. T. (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 16 (14), 4491-4500.
- Gonzalez-Scarano, F., Baltuch, G. (1999). Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annual review of neuroscience*, 22(1), 219-240.

- Govindarajan, N., Rao, P., Burkhardt, S., Sananbenesi, F., Schlüter, O. M., Bradke, F., Lu, J., Fischer, A. (2013). Reducing HDAC6 ameliorates cognitive deficits in a mouse model for Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine*, 5 (1), 52-63.
- Graça, I., J Sousa, E., Baptista, T., Almeida, M., Ramalho-Carvalho, J., Palmeira, C., Henrique, R., Jerónimo, C. (2014). Anti-tumoral effect of the non-nucleoside DNMT inhibitor RG108 in human prostate cancer cells. *Current Pharmaceutical Design*, 20 (11), 1803-1811.
- Gräff, J., Rei, D., Guan, J. S., Wang, W. Y., Seo, J., Hennig, K. M., Nieland, T. J. F., Fass, D. M., Kao, P. F., Kahn, M., Su, S. C., Samirei, A., Joseph, N., Haggarty, S., J., Delalle, I., Tsai, L. (2012). An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature*, 483 (7388), 222-226.
- Gresa-Arribas, N., Viéitez, C., Dentesano, G., Serratos, J., Saura, J., Solà, C. (2012). Modelling neuroinflammation in vitro: a tool to test the potential neuroprotective effect of anti-inflammatory agents. *PLoS One*, 7(9), e45227.
- Griciuc, A., Serrano-Pozo, A., Parrado, A. R., Lesinski, A. N., Asselin, C. N., Mullin, K., Hooli, B., Choi, S. H., Hyman, B. T., Tanzi, R. E. (2013). Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron*, 78 (4), 631-643.
- Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, J. S. K., Younkin, S., Hazrati, L., Collinge, J. (2013). TREM2 variants in Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 368 (2), 117-127.
- Gui, J., Mustachio, L. M., Su, D. M., Craig, R. W. (2012). Thymus size and age-related thymic involution: early programming, sexual dimorphism, progenitors and stroma. *Aging and Disease*, 3 (3), 280.
- Habib, G. M., Shi, Z. Z., Cuevas, A. A., Lieberman, M. W. (2003). Identification of two additional members of the membrane-bound dipeptidase family. *The FASEB Journal*, 17(10), 1313-1315.
- Haggarty, P. (2015). Genetic and metabolic determinants of human epigenetic variation. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 18 (4), 334-338.
- Hahnen, E., Hauke, J., Tränkle, C., Eyüpoglu, I. Y., Wirth, B., Blümcke, I. (2008). Histone deacetylase inhibitors: possible implications for neurodegenerative disorders. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 17 (2), 169-184.
- Hall, A. C., Brennan, A., Goold, R. G., Cleverley, K., Lucas, F. R., Gordon-Weeks, P. R., Salinas, P. C. (2002). Valproate regulates GSK-3-mediated axonal remodeling and synapsin I clustering in developing neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 20 (2), 257-270.
- Hao, Y., Creson, T., Zhang, L., Li, P., Du, F., Yuan, P., Gould, T. D., Manji, H. K., Chen, G. (2004). Mood stabilizer valproate promotes ERK pathway-dependent cortical neuronal growth and neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, 24 (29), 6590-6599.

- Happel, N., Doenecke, D. (2009). Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene*, 431 (1-2), 1-12.
- Harding, A., Gonder, U., Robinson, S. J., Crean, S., Singhrao, S. K. (2017). Exploring the association between Alzheimer's disease, oral health, microbial endocrinology and nutrition. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 398.
- Harkany, T., Hortobágyi, T., Sasvári, M., Kónya, C., Penke, B., Luiten, P. G., Csaba, N. (1999). Neuroprotective approaches in experimental models of β -amyloid neurotoxicity: relevance to Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 23(6), 963-1008.
- Harrison, I. F., Dexter, D. T. (2013). Epigenetic targeting of histone deacetylase: therapeutic potential in Parkinson's disease?. *Pharmacology & Therapeutics*, 140 (1), 34-52.
- Harry, G. J., Kraft, A. D. (2008). Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4 (10), 1265-1277.
- Harry, G. J., Kraft, A. D. (2012). Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. *Neurotoxicology*, 33 (2), 191-206.
- Harshman, S. W., Young, N. L., Parthun, M. R., Freitas, M. A. (2013). H1 histones: current perspectives and challenges. *Nucleic Acids Research*, 41 (21), 9593-9609.
- Hasan, M. R., Kim, J. H., Kim, Y. J., Kwon, K. J., Shin, C. Y., Kim, H. Y., Han, S. H., Choi, D. H., Lee, J. (2013). Effect of HDAC inhibitors on neuroprotection and neurite outgrowth in primary rat cortical neurons following ischemic insult. *Neurochemical Research*, 38 (9), 1921-1934.
- Hayes, M. P., Freeman, S. L., Donnelly, R. P. (1995). IFN- γ priming of monocytes enhances LPS-induced TNF production by augmenting both transcription and mRNA stability. *Cytokine*, 7(5), 427-435.
- He, S., Owen, D. R., Jelinsky, S. A., Lin, L. L. (2015). Lysine methyltransferase SETD7 (SET7/9) regulates ROS signaling through mitochondria and NFE2L2/ARE pathway. *Scientific Reports*, 5, 14368.
- He, X., Mekasha, S., Mavrogiorgos, N., Fitzgerald, K. A., Lien, E., Ingalls, R. R. (2010). Inflammation and fibrosis during Chlamydia pneumoniae infection is regulated by IL-1 and the NLRP3/ASC inflammasome. *The Journal of Immunology*, 184(10), 5743-5754.
- Hebbel, R. P., Vercellotti, G. M., Pace, B. S., Solovey, A. N., Kollander, R., Abanonu, C. F., Nguyen, J., Vineyard, J. V., Belcher, J. D., Abdulla, F., Osifuye, S., Eaton, J. W., Kelm, J. R., Slungaard, A. (2010). The HDAC inhibitors trichostatin A and suberoylanilide hydroxamic acid exhibit multiple modalities of benefit for the vascular pathobiology of sickle transgenic mice. *Blood*, *The Journal of the American Society of Hematology*, 115 (12), 2483-2490.

- Hébert, S. S., Horré, K., Nicolai, L., Papadopoulou, A. S., Mandemakers, W., Silahtaroglu, A. N., Kauppinen S., Delacourte, A., De Strooper, B. (2008). Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/ β -secretase expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (17), 6415-6420.
- Heesen, C., Nawrath, L., Reich, C., Bauer, N., Schulz, K. H., Gold, S. M. (2006). Fatigue in multiple sclerosis: an example of cytokine mediated sickness behaviour?. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 77(1), 34-39.
- Heinemann, M., Susa, M., Simnacher, U., Marre, R., Essig, A. (1996). Growth of *Chlamydia pneumoniae* induces cytokine production and expression of CD14 in a human monocytic cell line. *Infection and Immunity*, 64(11), 4872-4875.
- Held, T. K., Weihua, X., Yuan, L., Kalvakolanu, D. V., Cross, A. S. (1999). Gamma interferon augments macrophage activation by lipopolysaccharide by two distinct mechanisms, at the signal transduction level and via an autocrine mechanism involving tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. *Infection and Immunity*, 67(1), 206-212.
- Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14 (4), 388-405.
- Henn, A., Lund, S., Hedtjärn, M., Schratzenholz, A., Pörzgen, P., Leist, M. (2009). The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation*, 26(2), 83-94.
- Hoover, B. R., Reed, M. N., Su, J., Penrod, R. D., Kotilinek, L. A., Grant, M. K., Pitstick, R., Carlson, G. A., Lanier, L. M., Yuan, L. L., Ashe, K. H. (2010). Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron*, 68 (6), 1067-1081.
- Hoozemans, J. J., van Haastert, E. S., Nijholt, D. A., Rozemuller, A. J., Eikelenboom, P., Scheper, W. (2009). The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus. *The American Journal of Pathology*, 174 (4), 1241-1251.
- Howitz, K. T. (2015). Screening and profiling assays for HDACs and sirtuins. *Drug Discovery Today: Technologies*, 18, 38-48.
- Hu, B. R., Liu, C. L. (2017). Mechanisms of Neuron Death (Necrosis, Apoptosis, Autophagy) After Brain Ischemia. In *Primer on Cerebrovascular Diseases* (pp. 209-215). Academic Press.
- Huang, J., May, J. M. (2006). Ascorbic acid protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from apoptosis and death induced by β -amyloid. *Brain Research*, 1097(1), 52-58.

- Ikejima, H., Friedman, H., Yamamoto, Y. (2006). *Chlamydia pneumoniae* infection of microglial cells in vitro: a model of microbial infection for neurological disease. *Journal of Medical Microbiology*, 55(7), 947-952.
- Itzhaki, R. F., Lathe, R., Balin, B. J., Ball, M. J., Bearer, E. L., Braak, H., Bullido, M. J., Carter, C., Clerici, M., Cosby, S. L., Del Tredici, K., Field, H., Fulop, T., Grassi, C., Griffin, W. S. T., Haas, J., Hudson, A. P., Kamer, A. R., Kell, D. B., Licastro, F., Letenneur, L., Lövhelm, H., Mancuso, R., Miklossy, J., Otth, C., Palamara, A. T., Perry, G., Preston, C., Pretorius, E., Strandberg, T., Tabet, N., Taylor-Robinson, S. D., Whittum-Hudson, J. A. (2016). Microbes and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 51 (4), 979.
- İzmirli, M. (2013). Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar. *Van Tıp Dergisi*, 20(1), 48-51.
- Jackson-Lewis, V., Vila, M., Tieu, K., Teismann, P., Vadseth, C., Choi, D. K., Przedborski, S. (2002). Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *Journal of Neuroscience*, 22(5), 1763-1771.
- Janabi, N., Peudenier, S., Héron, B., Ng, K. H., Tardieu, M. (1995). Establishment of human microglial cell lines after transfection of primary cultures of embryonic microglial cells with the SV40 large T antigen. *Neuroscience Letters*, 195(2), 105-108.
- Jendresen, C., Digre, A., Cui, H., Zhang, X., Vlodavsky, I., Li, J. P., Nilsson, L. N. (2019). systemic Lps-induced A β -solubilization and clearance in A β pp-transgenic mice is diminished by heparanase overexpression. *Scientific Reports*, 9(1), 1-12.
- Jeong, J. W., Lee, W. S., Shin, S. C., Kim, G. Y., Choi, B. T., Choi, Y. H. (2013). Anthocyanins downregulate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in BV2 microglial cells by suppressing the NF- κ B and Akt/MAPKs signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (1), 1502-1515.
- Jeong, M. R., Hashimoto, R., Senatorov, V. V., Fujimaki, K., Ren, M., Lee, M. S., Chuang, D. M. (2003). Valproic acid, a mood stabilizer and anticonvulsant, protects rat cerebral cortical neurons from spontaneous cell death: a role of histone deacetylase inhibition. *FEBS Letters*, 542 (1-3), 74-78.
- Ji, K., Akgul, G., Wollmuth, L. P., Tsirka, S. E. (2013). Microglia actively regulate the number of functional synapses. *PloS One*, 8 (2).
- Jin, C., Li, J., Green, C. D., Yu, X., Tang, X., Han, D., Xian, B., Wang, D., Huang, X., Cao, X., Yan, Z., Hou, Z., Liu, J., Shukeir, N., Khaitovich, P., Chen, C. D., Zhang, H., Jenuwein, T., Han, J. D. J. (2011). Histone demethylase UTX-1 regulates *C. elegans* life span by targeting the insulin/IGF-1 signaling pathway. *Cell Metabolism*, 14 (2), 161-172.
- Jorgensen, I., Bednar, M. M., Amin, V., Davis, B. K., Ting, J. P., McCafferty, D. G., Valdivia, R. H. (2011). The Chlamydia protease CPAF regulates host and bacterial

- proteins to maintain pathogen vacuole integrity and promote virulence, *Cell Host & Microbe*, 10(1), 21-32.
- Kaminskas, E., FARRELL, A., Wang, Y. C., Sridhara, R., Pazdur, R. (2005). FDA Commentary. *The Oncologist*, 10, 176-182.
- Karch, C. M., Goate, A. M. (2015). Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biological Psychiatry*, 77 (1), 43-51.
- Kaya-Tilki, E., Dikmen, M., Ozturk, Y. (2016). Effects of DNMT and HDAC inhibitors (RG108 and Trichostatin A) on NGF-induced neurite outgrowth and cellular migration. *International Journal of Pharmacology*, 12 (4), 351-360.
- Kazantsev, A. G., Thompson, L. M. (2008). Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7 (10), 854-868.
- Ke, N., Wang, X., Xu, X., Abassi, Y. A. (2011). The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. In *Mammalian Cell Viability* (pp. 33-43). Humana Press.
- Ke, S., Yang, Z., Yang, F., Wang, X., Tan, J., Liao, B. (2019). Long Noncoding RNA NEAT1 Aggravates A β -Induced Neuronal Damage by Targeting miR-107 in Alzheimer's Disease. *Yonsei Medical Journal*, 60 (7), 640-650.
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological Reviews*, 91 (2), 461-553.
- Kilgore, M., Miller, C. A., Fass, D. M., Hennig, K. M., Haggarty, S. J., Sweatt, J. D., Rumbaugh, G. (2010). Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology*, 35(4), 870-880.
- Kilic, Ü., Kilic, E., Lingor, P., Yulug, B., Bähr, M. (2004). Rifampicin inhibits neurodegeneration in the optic nerve transection model in vivo and after 1-methyl-4-phenylpyridinium intoxication in vitro. *Acta Neuropathologica*, 108 (1), 65-68.
- Kim, H. J., Rowe, M., Ren, M., Hong, J. S., Chen, P. S., Chuang, D. M. (2007). Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 321 (3), 892-901.
- Kim, S. K., Kim, Y. M., Yeum, C. E., Jin, S. H., Chae, G. T., Lee, S. B. (2009). Rifampicin inhibits the LPS-induced expression of Toll-like receptor 2 via the suppression of NF- κ B DNA-binding activity in RAW 264.7 cells. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 13 (6), 475-482.
- Kosik, K. S., Rapp, P. R., Raz, N., Small, S. A., Sweatt, J. D., Tsai, L. H. (2012). Mechanisms of age-related cognitive change and targets for intervention: epigenetics. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 67 (7), 741-746.

- Kovalevich, J., Langford, D. (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology, In *Neuronal Cell Culture* (pp. 9-21). *Humana Press, Totowa, NJ*.
- Kramer, J. M. (2013). Epigenetic regulation of memory: implications in human cognitive disorders. *Biomolecular Concepts*, 4 (1), 1-12.
- Kristensson, K., Masocha, W., Bentivoglio, M. (2013). Mechanisms of CNS invasion and damage by parasites. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 114, pp. 11-22). Elsevier.
- Krukowski, K., Feng, X., Paladini, M. S., Chou, A., Sacramento, K., Grue, K., Rosi, S. (2018). Temporary microglia-depletion after cosmic radiation modifies phagocytic activity and prevents cognitive deficits. *Scientific Reports*, 8(1), 1-13.
- Kucukkilinc, T. T., Yangghagh, K. S., Ayazgok, B., Roknipour, M. A., Moghadam, F. H., Moradi, A., Emami, S., Amini, M., Irannejad, H. (2017). Synthesis and neuroprotective activity of novel 1, 2, 4-triazine derivatives with ethyl acetate moiety against H₂O₂ and A β -induced neurotoxicity. *Medicinal Chemistry Research*, 26(11), 3057-3071.
- Kudo, K., Ozaki, T., Shin-ya, K., Nishiyama, M., Kuzuyama, T. (2017). Biosynthetic origin of the hydroxamic acid moiety of trichostatin A: identification of unprecedented enzymatic machinery involved in hydroxylamine transfer. *Journal of the American Chemical Society*, 139 (20), 6799-6802.
- Kumar, A., Singh, A. (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological Reports*, 67 (2), 195-203.
- Kumari, S., Swaminathan, A., Chatterjee, S., Senapati, P., Boopathi, R., Kundu, T. K. (2013). Chromatin organization, epigenetics and differentiation: an evolutionary perspective. In *Epigenetics: Development and Disease* (pp. 3-35). Springer, Dordrecht.
- Kummer, M. P., Heneka, M. T. (2014). Truncated and modified amyloid-beta species. *Alzheimer's Research & Therapy*, 6 (3), 28.
- Kuo, C. C., Grayston, J. T. (1988). Factors affecting viability and growth in HeLa 229 cells of Chlamydia sp. strain TWAR. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(5), 812-815.
- Kuo, C. C., Grayston, J. T. (1990). A sensitive cell line, HL cells, for isolation and propagation of Chlamydia pneumoniae strain TWAR. *Journal of Infectious Diseases*, 162(3), 755-758.
- Kuo, C. C., Jackson, L. A., Campbell, L. A., Grayston, J. T. (1995). Chlamydia pneumoniae (TWAR). *Clinical Microbiology Reviews*, 8(4), 451-461.
- Kwon, S. J., Ahn, T. B., Yoon, M. Y., Jeon, B. S. (2008). BV-2 stimulation by lactacystin results in a strong inflammatory reaction and apoptotic neuronal death in SH-SY5Y cells. *Brain Research*, 1205, 116-121.
- Łagowska-Lenard M, Bielewicz J, Raszewski G, Stelmasiak Z, BartosikPsujek H. (2008). Oxidative stress in cerebral stroke. *Pol Merkur Lek* 25: 205–208

- Lau, P., Bossers, K., Salta, E., Frigerio, C. S., Barbash, S., Rothman, R., Sierksma, A. S. R., Thathiah, A., Greenberg, D., Papadopoulou, A. S., Achsel, T., Ayoubi, T., Soreq, H., Verhaagen, J., Swaab, D. F., Aerts, S., De Strooper, B. (2013). Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine*, 5 (10), 1613-1634.
- Lee, C. Y., Huang, C. H., Lu, P. L., Ko, W. C., Chen, Y. H., Hsueh, P. R. (2017). Role of rifampin for the treatment of bacterial infections other than mycobacteriosis. *Journal of Infection*, 75(5), 395-408.
- Lee, M., McGeer, E. G., McGeer, P. L. (2016). Sodium thiosulfate attenuates glial-mediated neuroinflammation in degenerative neurological diseases. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 32.
- Lee, M., Shi, X., Barron, A. E., McGeer, E., McGeer, P. L. (2015). Human antimicrobial peptide LL-37 induces glial-mediated neuroinflammation. *Biochemical Pharmacology*, 94(2), 130-141.
- Lee, M., Sparatore, A., Del Soldato, P., McGeer, E., McGeer, P. L. (2010). Hydrogen sulfide-releasing NSAIDs attenuate neuroinflammation induced by microglial and astrocytic activation. *Glia*, 58(1), 103-113.
- Leoni, F., Fossati, G., Lewis, E. C., Lee, J. K., Porro, G., Pagani, P., Modena, D., Moras, M. L., Pozzi, P., Reznikov, L. L., Siegmund, B., Fantuzzi, G., Dinarello, C. A., Mascagni, P. (2005). The histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces production of pro-inflammatory cytokines in vitro and systemic inflammation in vivo. *Molecular Medicine*, 11 (1-12), 1-15.
- Lewandowski, S. L., Janardhan, H. P., Trivedi, C. M. (2015). Histone deacetylase 3 coordinates deacetylase-independent epigenetic silencing of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) to orchestrate second heart field development. *Journal of Biological Chemistry*, 290 (45), 27067-27089.
- Lewis, E. C., Blaabjerg, L., Størling, J., Ronn, S. G., Mascagni, P., Dinarello, C. A., Mandrup-Poulsen, T. (2011). The oral histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces cytokines and protects islet β cells in vivo and in vitro. *Molecular Medicine*, 17 (5-6), 369-377.
- Li, H., Liu, C. C., Zheng, H., Huang, T. Y. (2018). Amyloid, tau, pathogen infection and antimicrobial protection in Alzheimer's disease—conformist, nonconformist, and realistic prospects for AD pathogenesis. *Translational Neurodegeneration*, 7 (1), 34.
- Li, H., Zhang, X., Chen, M., Chen, J., Gao, T., Yao, S. (2018). Dexmedetomidine inhibits inflammation in microglia cells under stimulation of LPS and ATP by c-Fos/NLRP3/caspase-1 cascades. *EXCLI Journal*, 17, 302.
- Li, J., Hu, J., Shao, B., Zhou, W., Cui, Y., Dong, C., Ezoulin, J. M. M., Zhu, X., Ding, W., Heymans, F., Chen, H. (2009). Protection of PMS777, a new AChE inhibitor with PAF antagonism, against Amyloid- β -Induced neuronal apoptosis and neuroinflammation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 29(4), 589-595.

- Li, J., Zhu, M., Rajamani, S., Uversky, V. N., Fink, A. L. (2004). Rifampicin inhibits α -synuclein fibrillation and disaggregates fibrils. *Chemistry & Biology*, 11 (11), 1513-1521.
- Li, L. H., Peng, W. N., Deng, Y., Li, J. J., Tian, X. R. (2020). Action of trichostatin A on Alzheimer's disease-like pathological changes in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neural Regeneration Research*, 15(2), 293.
- Li, W., Sun, Z. (2019). Mechanism of Action for HDAC Inhibitors—Insights from Omics Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (7), 1616.
- Li, Y., Seto, E. (2016). HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6 (10), a026831.
- Liang, Z., Zhao, Y., Ruan, L., Zhu, L., Jin, K., Zhuge, Q., ... Zhao, Y. (2017). Impact of aging immune system on neurodegeneration and potential immunotherapies. *Progress in Neurobiology*, 157, 2-28.
- Liao, W., Sun, J., Liu, W., Li, W., Jia, J., Ou, F., Sun, Y. (2019). HDAC10 upregulation contributes to interleukin 1 β -mediated inflammatory activation of synovium-derived mesenchymal stem cells in temporomandibular joint. *Journal of Cellular Physiology*, 234(8), 12646-12662.
- Limame R, Wouters A, Pauwels B, Fransen E, Peeters M, Lardon F, De Wever O, Pauwels P. (2012). 'Comparative Analysis of Dynamic Cell Viability, Migration and Invasion Assessments by Novel Real-Time Technology and Classic Endpoint Assays. *Plos One*, 7(10).
- Lin, D., Jing, X., Chen, Y., Liang, Y., Lei, M., Peng, S., ... Yang, L. (2017). Rifampicin pre-treatment inhibits the toxicity of rotenone-induced PC12 cells by enhancing sumoylation modification of α -synuclein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 485 (1), 23-29.
- Ling, E. A., Wong, W. C. (1993). The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia*, 7(1), 9-18.
- Little, C. S., Hammond, C. J., MacIntyre, A., Balin, B. J., Appelt, D. M. (2004). Chlamydia pneumoniae induces Alzheimer-like amyloid plaques in brains of BALB/c mice. *Neurobiology of Aging*, 25(4), 419-429.
- Little, J. P., Madeira, J. M., Klegeris, A. (2012). The saturated fatty acid palmitate induces human monocytic cell toxicity toward neuronal cells: exploring a possible link between obesity-related metabolic impairments and neuroinflammation. *Journal of Alzheimer's Disease*, 30(s2), S179-S183.
- Liu, C. G., Wang, J. L., Li, L., Xue, L. X., Zhang, Y. Q., Wang, P. C. (2014). MicroRNA-135a and-200b, potential Biomarkers for Alzheimer's disease, regulate β secretase and amyloid precursor protein. *Brain Research*, 1583, 55-64.

- Liu, K., Wu, H., Gao, R., Han, G. (2020). DNA Methylation May be Involved in the Analgesic Effect of Hyperbaric Oxygen via Regulating FUNDC1. *Pain Research and Management*, 2020.
- Liu, Y., Walter, S., Stagi, M., Cherny, D., Letiembre, M., Schulz-Schaeffer, W., Heine, H., Penke, B., Neumann, H., Fassbender, K. (2005). LPS receptor (CD14): a receptor for phagocytosis of Alzheimer's amyloid peptide. *Brain*, 128 (8), 1778-1789.
- Lo, Y. C., Shih, Y. T., Wu, D. C., Lee, Y. C. (2009). In vitro effects of Helicobacter pylori-induced infection in gastric epithelial AGS cells on microglia-mediated toxicity in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Inflammation Research*, 58(6), 329-335.
- Low, P. A., Robertson, D., Gilman, S., Kaufmann, H., Singer, W., Biaggioni, I., ... Lessig, S. (2014). Efficacy and safety of rifampicin for multiple system atrophy: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology*, 13 (3), 268-275.
- Lund, S., Christensen, K. V., Hedtj rn, M., Mortensen, A. L., Hagberg, H., Falsig, J., ... Leist, M. (2006). The dynamics of the LPS triggered inflammatory response of murine microglia under different culture and in vivo conditions. *Journal of Neuroimmunology*, 180(1-2), 71-87.
- Luo, X. G., Chen, S. D. (2012). The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease, *Translational Neurodegeneration*, 1(1), 9.
- Lyman, M., Lloyd, D. G., Ji, X., Vizcaychipi, M. P., Ma, D. (2014). Neuroinflammation: the role and consequences. *Neuroscience research*, 79, 1-12.
- Ma, C., D'Mello, S. R. (2011). Neuroprotection by histone deacetylase-7 (HDAC7) occurs by inhibition of c-jun expression through a deacetylase-independent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 286 (6), 4819-4828.
- Ma, K., Wu, H. Y., Zhang, B., He, X., Li, B. X. (2015). Neurotoxicity effects of atrazine-induced SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells via microglial activation. *Molecular BioSystems*, 11(11), 2915-2924.
- Ma, K., Wu, H. Y., Zhang, B., He, X., Li, B. X. (2015). Neurotoxicity effects of atrazine-induced SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells via microglial activation. *Molecular BioSystems*, 11(11), 2915-2924.
- Madeira, J. M., Bajwa, E., Stuart, M. J., Hashioka, S., Klegeris, A. (2014). Gold drug auranofin could reduce neuroinflammation by inhibiting microglia cytotoxic secretions and primed respiratory burst. *Journal of Neuroimmunology*, 276(1-2), 71-79.
- Madsen, A. S., Olsen, C. A. (2012). Profiling of substrates for zinc-dependent lysine deacylase enzymes: HDAC3 exhibits decrotonylase activity in vitro. *Angewandte Chemie International Edition*, 51 (36), 9083-9087.
- Marei, H. E., Althani, A., Suhonen, J., El, M. E., Caceci, T. (2016). Recent Perspective About the Amyloid Cascade Hypothesis and Stem Cell-Based Therapy in the Treatment of Alzheimer's Disease. United Arab Emirates: Bentham Science.

- Margueron, R., Trojer, P., Reinberg, D. (2005). The key to development: interpreting the histone code?. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15 (2), 163-176.
- Martin, L. J., Wong, M. (2013). Aberrant regulation of DNA methylation in amyotrophic lateral sclerosis: a new target of disease mechanisms. *Neurotherapeutics*, 10(4), 722-733.
- Masliyah, E., Hansen, L., Albright, T., Mallory, M., Terry, R. D. (1991). Immunoelectron microscopic study of synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 81 (4), 428-433.
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15056.
- McAllister, A. K., van de Water, J. (2009). Breaking boundaries in neural-immune interactions. *Neuron*, 64 (1), 9-12.
- McGill, B. E., Barve, R. A., Maloney, S. E., Strickland, A., Rensing, N., Wang, P. L., Milbrandt, J. (2018). Abnormal microglia and enhanced inflammation-related gene transcription in mice with conditional deletion of Ctcf in Camk2a-Cre-expressing neurons. *Journal of Neuroscience*, 38(1), 200-219.
- Meadows, J. P., Guzman-Karlsson, M. C., Phillips, S., Holleman, C., Posey, J. L., Day, J. J., ... Sweatt, J. D. (2015). DNA methylation regulates neuronal glutamatergic synaptic scaling. *Science Signaling*, 8 (382), ra61-ra61.
- Medvedev, A. E., Flo, T., Ingalls, R. R., Golenbock, D. T., Teti, G., Vogel, S. N., Espevik, T. (1998). Involvement of CD14 and complement receptors CR3 and CR4 in nuclear factor- κ B activation and TNF production induced by lipopolysaccharide and group B streptococcal cell walls. *The Journal of Immunology*, 160(9), 4535-4542.
- Mehler, M. F. (2008). Epigenetic principles and mechanisms underlying nervous system functions in health and disease. *Progress in Neurobiology*, 86 (4), 305-341.
- Meylan, E., Tschopp, J., Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*, 442(7098), 39-44.
- Mielcarek, M., Zielonka, D., Carnemolla, A., Marcinkowski, J. T., Guidez, F. (2015). HDAC4 as a potential therapeutic target in neurodegenerative diseases: a summary of recent achievements, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 42.
- Milite, C., Feoli, A., Viviano, M., Rescigno, D., Cianciulli, A., Balzano, A. L., Sbardella, G. (2016). The emerging role of lysine methyltransferase SETD8 in human diseases. *Clinical Epigenetics*, 8(1), 102.
- Miner, J. J., Diamond, M. S. (2016). Mechanisms of restriction of viral neuroinvasion at the blood–brain barrier. *Current Opinion in Immunology*, 38, 18-23.
- Mitchell, T. W., Nissanov, J., Han, L. Y., Mufson, E. J., Schneider, J. A., Cochran, E. J., ... Arnold, S. E. (2000). Novel method to quantify neuropil threads in brains from elders

- with or without cognitive impairment. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 48 (12), 1627-1637.
- Mlambo, G., Sigola, L. B. (2003). Rifampicin and dexamethasone have similar effects on macrophage phagocytosis of zymosan, but differ in their effects on nitrite and TNF- α production, *International Immunopharmacology*, 3(4), 513-522.
- Moir, R. D., Lathe, R., Tanzi, R. E. (2018). The antimicrobial protection hypothesis of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 14 (12), 1602-1614.
- Mölsä, P. K., Marttila, R. J., Rinne, U. K. (1986). Survival and cause of death in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Acta Neurologica Scandinavica*, 74 (2), 103-107.
- Molteni, M., Marabella, D., Orlandi, C., Rossetti, C. (2006). Melanoma cell lines are responsive in vitro to lipopolysaccharide and express TLR-4. *Cancer Letters*, 235(1), 75-83.
- Montine, T. J., Neely, M. D., Quinn, J. F., Beal, M. F., Markesbery, W. R., Roberts II, L. J., Morrow, J. D. (2002). Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease 1, 2. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(5), 620-626.
- Moodley, K., Angel, C. E., Glass, M., Graham, E. S. (2011). Real-time profiling of NK cell killing of human astrocytes using xCELLigence technology. *Journal of Neuroscience Methods*, 200(2), 173-180.
- Morrison, A. J., Shen, X. (2009). Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10 (6), 373.
- Murata, M., Azuma, Y., Miura, K., Rahman, M. A., Matsutani, M., Aoyama, M., ... Shirai, M. (2007). Chlamydial SET domain protein functions as a histone methyltransferase. *Microbiology*, 153 (2), 585-592.
- Murphy, Á. C., Lallor, S. J., Lynch, M. A., Mills, K. H. (2010). Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(4), 641-651.
- Mustafa, A. M. Caprioli, G. Dikmen, M. Kaya, E. Maggi, F. Sagratini, G. Vittori, S. Öztürk, Y. (2015). Evaluation of neuritogenic activity of cultivated, wild and commercial roots of *Gentiana lutea* L.. *Journal of Functional Foods*, 19, 164-173.
- Mustafa, A. M., Maggi, F., Papa, F., Kaya, E., Dikmen, M., Öztürk, Y. (2016). Isofuranodiene: A neuritogenic compound isolated from wild celery (*Smyrniolusastrum* L., Apiaceae). *Food Chemistry*, 192, 782-787.
- Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., Okamura, H. (2001). Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 12(1), 53-72.
- Neher, J. J., Neniskyte, U., Brown, G. C. (2012). Primary phagocytosis of neurons by inflamed microglia: potential roles in neurodegeneration. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 27.

- Netea, M. G., Kullberg, B. J., Jacobs, L. E., Verver-Jansen, T. J., Van der Ven-Jongekrijg, J., Galama, J. M., Van der Meer, J. W. (2004). Chlamydia pneumoniae stimulates IFN- γ synthesis through MyD88-dependent, TLR2-and TLR4-independent induction of IL-18 release. *The Journal of Immunology*, 173(2), 1477-1482.
- Netea, M. G., Selzman, C. H., Kullberg, B. J., Galama, J. M., Weinberg, A., Stalenhoef, A. F., Dinarello, C. A. (2000). Acellular components of Chlamydia pneumoniae stimulate cytokine production in human blood mononuclear cells. *European Journal of Immunology*, 30(2), 541-549.
- Nikolakopoulou, A. M., Dutta, R., Chen, Z., Miller, R. H., Trapp, B. D. (2013). Activated microglia enhance neurogenesis via trypsinogen secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(21), 8714-8719.
- Nikolic, M. (2004). The molecular mystery of neuronal migration: FAK and Cdk5. *Trends Cell Biol*, 14(1):1–5.
- Noristani, H. N., Sabourin, J. C., Gerber, Y. N., Teigell, M., Sommacal, A., dM Vivanco, M., Perrin, F. E. (2015). Brca1 is expressed in human microglia and is dysregulated in human and animal model of ALS. *Molecular Neurodegeneration*, 10(1), 34.
- Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E. K., Chiba, S. (2001). Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 60(8), 759-767.
- Oehme, I., Linke, J. P., Böck, B. C., Milde, T., Lodrini, M., Hartenstein, B., Kaden, S. (2013). Histone deacetylase 10 promotes autophagy-mediated cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(28), E2592-E2601.
- Oh, Y. S., Jeong, S. G., Cho, G. W. (2015). Anti-senescence effects of DNA methyltransferase inhibitor RG108 in human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 62 (5), 583-590.
- Oh, Y. S., Kim, S. H., Cho, G. W. (2016). Functional restoration of amyotrophic lateral sclerosis patient-derived mesenchymal stromal cells through inhibition of DNA methyltransferase. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36 (4), 613-620.
- Oida, Y., Kitaichi, K., Nakayama, H., Ito, Y., Fujimoto, Y., Shimazawa, M., Hara, H. (2006). Rifampicin attenuates the MPTP-induced neurotoxicity in mouse brain. *Brain Research*, 1082(1), 196-204.
- Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C., Haanen, C. (1998). Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, 3(2), 115-121.
- Overk, C. R., Masliah, E. (2014). Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease. *Biochemical Pharmacology*, 88 (4), 508-516.
- Özdemir, A., Ark, M. (2013). xCELLigence real time cell analysis system: a new method for cell proliferation and cytotoxicity. *Niche*, 2(2).

- Påhlman, S., Hoehner, J. C., Nånberg, E., Hedborg, F., Fagerström, S., Gestblom, C., Johansson, I., Larsson, U., Lavenius, E., Örtoft, E., Söderholm, H. (1995). Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. *European Journal of Cancer*, 31(4), 453-458.
- Pan, C., Chen, H., Wang, L., Yang, S., Fu, H., Zheng, Y., Jiao, B. (2012). Down-regulation of MiR-127 facilitates hepatocyte proliferation during rat liver regeneration. *PloS One*, 7(6).
- Pandur, E., Tamási, K., Pap, R., Varga, E., Miseta, A., Sipos, K. (2019). Fractalkine Induces Hepcidin Expression of BV-2 Microglia and Causes Iron Accumulation in SH-SY5Y Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 39(7), 985-1001.
- Paresce, D. M., Ghosh, R. N., Maxfield, F. R. (1996). Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid β -protein via a scavenger receptor. *Neuron*, 17 (3), 553-565.
- Park, S. E., Sapkota, K., Kim, S., Kim, H., Kim, S. J. (2011). Kaempferol acts through mitogen-activated protein kinases and protein kinase B/AKT to elicit protection in a model of neuroinflammation in BV2 microglial cells. *British Journal of Pharmacology*, 164 (3), 1008-1025.
- Patapoutian, A., Reichardt, L. F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(3), 272-280.
- Perl, D. P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*, 77 (1), 32-42.
- Perry, V. H., Nicoll, J. A. R., Holmes, C. (2010). Microglia in neurodegenerative disease. *Nature Reviews*, 6, 193–201.
- Perry, G., Kawai, M., Tabaton, M., Onorato, M., Mulvihill, P., Richey, P., ... Gambetti, P. (1991). Neuropil threads of Alzheimer's disease show a marked alteration of the normal cytoskeleton. *Journal of Neuroscience*, 11 (6), 1748-1755.
- Peterson, C. L., and Laniel, M. A. (2004). Histones and histone modifications. *Current Biology*, 14, R546–R551.
- Pinto, G., Shtaif, B., Phillip, M., Gat-Yablonski, G. (2016). Growth attenuation is associated with histone deacetylase 10-induced autophagy in the liver. *The Journal Of Nutritional Biochemistry*, 27, 171-180.
- Pittenger, C., Kandel, E. R. (2003). In search of general mechanisms for long-lasting plasticity: Aplysia and the hippocampus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 358 (1432), 757-763.
- Porritt, R. A., Crother, T. R. (2016). Chlamydia pneumoniae infection and inflammatory diseases. In *Forum on Immunopathological Diseases and Therapeutics* (Vol. 7, No. 3-4). Begel House Inc..

- Procaccini, C., Pucino, V., De Rosa, V., Marone, G., Matarese, G. (2014). Neuro-endocrine networks controlling immune system in health and disease. *Frontiers in Immunology*, 5, 143.
- Qin, W., Haroutunian, V., Katsel, P., Cardozo, C. P., Ho, L., Buxbaum, J. D., Pasinetti, G. M. (2009). PGC-1 α expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia. *Archives of Neurology*, 66(3), 352-361.
- Qosa, H., Abuznait, A. H., Hill, R. A., Kaddoumi, A. (2012). Enhanced brain amyloid- β clearance by rifampicin and caffeine as a possible protective mechanism against Alzheimer's disease, *Journal of Alzheimer's Disease*, 31(1), 151-165.
- Quayle, A. J. (2002). The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *Journal of Reproductive Immunology*, 57 (1-2), 61-79.
- Querfurth, H. W., LaFerla, F. M. (2010). Mechanisms of disease. *New England Journal of Medicine*, 362 (4), 329-344.
- Raber, J., Huang, Y., Ashford, J. W. (2004). ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiology of Aging*, 25 (5), 641-650.
- Rajalakshmy, A. R., Malathi, J., Madhavan, H. N. (2015). Hepatitis C virus NS3 mediated microglial inflammation via TLR2/TLR6 MyD88/NF- κ B pathway and toll like receptor ligand treatment furnished immune tolerance. *PLoS One*, 10(5).
- Rando, O. J., Winston, F. (2012). Chromatin and transcription in yeast. *Genetics*, 190 (2), 351-387.
- Rasmussen, S. J., Eckmann, L., Quayle, A. J., Shen, L., Zhang, Y. X., Anderson, D. J., Fierer, J., Stephens, R. S., Kagnoff, M. F. (1997). Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 99 (1), 77-87.
- Reed-Geaghan, E. G., Reed, Q. W., Cramer, P. E., Landreth, G. E. (2010). Deletion of CD14 attenuates Alzheimer's disease pathology by influencing the brain's inflammatory milieu. *Journal of Neuroscience*, 30 (46), 15369-15373.
- Reiss, A. B., Arain, H. A., Stecker, M. M., Siegert, N. M., Kasselmann, L. J. (2018). Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Reviews in the Neurosciences*, 29(6), 613-627.
- Ricobaraza, A., Cuadrado-Tejedor, M., Pérez-Mediavilla, A., Frechilla, D., Del Río, J., García-Osta, A. (2009). Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuropsychopharmacology*, 34 (7), 1721-1732.
- Roberts, T. C., Morris, K. V., Weinberg, M. S. (2014). Perspectives on the mechanism of transcriptional regulation by long non-coding RNAs. *Epigenetics*, 9 (1), 13-20.
- Roblin, P. M., Dumornay, W. I. L. S. O. N., Hammerschlag, M. R. (1992). Use of HEp-2 cells for improved isolation and passage of Chlamydia pneumoniae. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(8), 1968-1971.

- Rock, R. B., Gekker, G., Hu, S., Sheng, W. S., Cheeran, M., Lokensgard, J. R., Peterson, P. K. (2004). Role of microglia in central nervous system infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 942-964.
- Rodrigues, H. F., Souza, T. A., Ghiraldini, F. G., Mello, M. L., Moraes, A. S. (2014). Increased age is associated with epigenetic and structural changes in chromatin from neuronal nuclei. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115, 659-665.
- Rogers, G. B., Marsh, P., Stressmann, A. F., Allen, C. E., Daniels, T. V. W., Carroll, M. P., Bruce, K. D. (2010). The exclusion of dead bacterial cells is essential for accurate molecular analysis of clinical samples. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(11), 1656-1658.
- Rouaux, C., Jokic, N., Mbebi, C., Boutillier, S., Loeffler, J. P., Boutillier, A. L. (2003). Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration. *The EMBO Journal*, 22 (24), 6537-6549.
- Roy, A., Fung, Y. K., Liu, X., Pahan, K. (2006). Up-regulation of microglial CD11b expression by nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 281(21), 14971-14980.
- Russo, C. D., Cappoli, N., Coletta, I., Mezzogori, D., Paciello, F., Pozzoli, G., Navarra, P., Battaglia, A. (2018). The human microglial HMC3 cell line: where do we stand? A systematic literature review. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 259.
- Ryan, N. S., Rossor, M. N., Fox, N. C. (2015). Alzheimer's disease in the 100 years since Alzheimer's death. *Brain*, 138 (12), 3816-3821.
- Ryu, H., Lee, J., Olofsson, B. A., Mwidau, A., Deodoglu, A., Escudero, M., Ratan, R. R. (2003). Histone deacetylase inhibitors prevent oxidative neuronal death independent of expanded polyglutamine repeats via an Sp1-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 4281-4286.
- Saha, R. N., Pahan, K. (2006). HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death & Differentiation*, 13 (4), 539-550.
- Sales, A. J., Joca, S. R. L. (2016). Effects of DNA methylation inhibitors and conventional antidepressants on mice behaviour and brain DNA methylation levels. *Acta Neuropsychiatrica*, 28 (1), 11-22.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (2010). Monocytes join the dendritic cell family. *Cell*, 143(3), 339-340.
- Schamberger, C. J., Gerner, C., Cerni, C. (2005). Caspase-9 plays a marginal role in serum starvation-induced apoptosis. *Experimental Cell Research*, 302(1), 115-128.
- Scheff, S. W., Price, D. A., Schmitt, F. A., Mufson, E. J. (2006). Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*, 27 (10), 1372-1384.

- Scheff, S. W., Price, D. A., Schmitt, F. A., Scheff, M. A., Mufson, E. J. (2011). Synaptic loss in the inferior temporal gyrus in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 24 (3), 547-557.
- Schmid, J. A., Birbach, A. (2008). I κ B kinase β (IKK β /IKK2/IKBKB)—A key molecule in signaling to the transcription factor NF- κ B, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 19(2), 157-165.
- Schmidt, A. M., Sahagan, B., Nelson, R. B., Selmer, J., Rothlein, R., Bell, J. M. (2009). The role of RAGE in amyloid-beta peptide-mediated pathology in Alzheimer's disease. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 10(7), 672-680.
- Schwechter, B. R., Millet, L. E., Levin, L. A. (2007). Histone Deacetylase Inhibition—Mediated Differentiation of RGC-5 Cells and Interaction with Survival. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48 (6), 2845-2857.
- Sellami, H., Said-Sadier, N., Znazen, A., Gdoura, R., Ojcius, D. M., Hammami, A. (2014). Chlamydia trachomatis infection increases the expression of inflammatory tumorigenic cytokines and chemokines as well as components of the Toll-like receptor and NF- κ B pathways in human prostate epithelial cells. *Molecular and Cellular Probes*, 28 (4), 147-154.
- Seo, J., Jo, S. A., Hwang, S., Byun, C. J., Lee, H. J., Cho, D. H., Jo, I. (2013). Trichostatin A epigenetically increases calpastatin expression and inhibits calpain activity and calcium-induced SH-SY 5 Y neuronal cell toxicity. *The FEBS Journal*, 280(24), 6691-6701.
- Seo, Y. J., Muench, L., Reid, A., Chen, J., Kang, Y., Hooker, J. M., Volkow, N. D., Fowler, J. S., Kim, S. W. (2013). Radionuclide labeling and evaluation of candidate radioligands for PET imaging of histone deacetylase in the brain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23 (24), 6700-6705.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1 (1), a006189.
- Serrano-Pozo, A., Mielke, M. L., Gómez-Isla, T., Betensky, R. A., Growdon, J. H., Frosch, M. P., Hyman, B. T. (2011). Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*, 179 (3), 1373-1384.
- Seto, E., Yoshida, M. (2014). Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6 (4), a018713.
- Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., Mohan, G. (2017). Neuroinflammation pathways: a general review. *International Journal of Neuroscience*, 127 (7), 624-633.

- Shakya, R., Chongthammakun, S. (2019). 17 β -Estradiol attenuates the influence of chronic activated microglia on SH-SY5Y cell proliferation via canonical WNT signaling pathway. *Neuroscience Letters*, 692, 174-180.
- Sheedy, F. J., Grebe, A., Rayner, K. J., Kalantari, P., Ramkhelawon, B., Carpenter, S. B., Becker, C. E., Ediriweera, H. N., Mullick, A. E., Golenbock, D. T., Stuart, L. M., Latz, E., Fitzgerald, K. A., Moore, K. J. (2013). CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nature Immunology*, 14 (8), 812.
- Shein, N. A. A., Grigoriadis, N., Alexandrovich, A. G., Simeonidou, C., Lourdopoulos, A., Polyzoidou, E., Trembovler, V., Mascagni, P., Dinarello, C. A., Shohami, E. (2009). Histone deacetylase inhibitor ITF2357 is neuroprotective, improves functional recovery, and induces glial apoptosis following experimental traumatic brain injury. *The FASEB Journal*, 23 (12), 4266-4275.
- Shih, Y. T., Chen, I. J., Wu, Y. C., Lo, Y. C. (2011). San-Huang-Xie-Xin-Tang protects against activated microglia-and 6-OHDA-induced toxicity in neuronal SH-SY5Y cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
- Shima, K., Kuhlenbäumer, G., Rupp, J. (2010). *Chlamydia pneumoniae* infection and Alzheimer's disease: a connection to remember?. *Medical Microbiology and Immunology*, 199 (4), 283-289.
- Shimada, K., Crother, T. R., Karlin, J., Chen, S., Chiba, N., Ramanujan, V. K., Arditi, M. (2011). Caspase-1 dependent IL-1 β secretion is critical for host defense in a mouse model of *Chlamydia pneumoniae* lung infection, *PloS One*, 6(6), e21477.
- Shimazu, T., Hirschey, M. D., Newman, J., He, W., Shirakawa, K., Le Moan, N., Newgard, C. B. (2013). Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science*, 339(6116), 211-214.
- Shipley, M. M., Mangold, C. A., Szpara, M. L. (2016). Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (108), e53193.
- Shipley, M. M., Mangold, C. A., Kuny, C. V., Szpara, M. L. (2017). Differentiated human SH-SY5Y cells provide a reductionist model of herpes simplex virus 1 neurotropism. *Journal of Virology*, 91(23), e00958-17.
- Sigalotti, L., Covre, A., Fratta, E., Parisi, G., Colizzi, F., Rizzo, A., Danielli, R., Nicolay, H. J. M., Coral, S., Maio, M. (2010). Epigenetics of human cutaneous melanoma: setting the stage for new therapeutic strategies. *Journal of Translational Medicine*, 8(1), 56.
- Singh, B. N., Zhang, G., Hwa, Y. L., Li, J., Dowdy, S. C., Jiang, S. W. (2010). Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 10 (6), 935-954.
- Sipe, J. D., Cohen, A. S. (2000). Review: history of the amyloid fibril. *Journal of Structural Biology*. 130, 88–98.

- Smith, C. L., Peterson, C. L. (2005). 4 ATP-Dependent Chromatin Remodeling. *Current Topics in Developmental Biology*, 65 (65), 115-148.
- Smith, P. Y., Hernandez-Rapp, J., Jolivet, F., Lecours, C., Bisht, K., Goupil, C., Dorval, V., Parsi, S., Morin, F., Planel, E., Bennett, D. A., Fernandez-Gomez, F. J., Sergeant, N., Buée, L., Tremblay, M. E., Calon, F., Hebert, S. S. (2015). miR-132/212 deficiency impairs tau metabolism and promotes pathological aggregation in vivo. *Human Molecular Genetics*, 24 (23), 6721-6735.
- Solomos, A. C., Rall, G. F. (2016). Get it through your thick head: emerging principles in neuroimmunology and neurovirology redefine central nervous system “immune privilege”. *ACS Chemical Neuroscience*, 7 (4), 435-441.
- Solorzano-Vargas, R. S., Vasilevko, V., Acero, G., Ugen, K. E., Martinez, R., Govezensky, T., Vazquez-Ramirez, R., Kubli-Garfias, C., Manoutcharian, K., Gevorkian, G. (2008). Epitope mapping and neuroprotective properties of a human single chain FV antibody that binds an internal epitope of amyloid-beta 1-42. *Molecular Immunology*, 45(4), 881-886.
- Sönmez, A., Göl, M. F., Erdoğan, F. F., Liman, N., Sönmez, A. (2018). İmmatür ve Matür Sıçanlarda Status Epileptikus Sonrası Apoptoz, Nöronal Hasar, GABA-A Alfa-1 Reseptör Miktarı ile Davranış, Öğrenme ve Hafızanın Değerlendirilmesi. *Türk Nöroloji Dergisi*, 24(4), 313.
- Soscia, S. J., Kirby, J. E., Washicosky, K. J., Tucker, S. M., Ingelsson, M. (2010). The Alzheimer's Disease-Associated Amyloid b-Protein Is an Antimicrobial, *PLoS ONE*, 5 (3), e9505.
- Stammler, D., Eigenbrod, T., Menz, S., Frick, J. S., Sweet, M. J., Shakespear, M. R., Oehme, I. (2015). Inhibition of Histone Deacetylases Permits Lipopolysaccharide-Mediated Secretion of Bioactive IL-1 β via a Caspase-1–Independent Mechanism. *The Journal of Immunology*, 195(11), 5421-5431.
- Steensma, D. P., Baer, M. R., Slack, J. L., Buckstein, R., Godley, L. A., Garcia-Manero, G., Albitar, M., Larsen, J. S., Arora, S., Cullen, M. T., Kantarjian, H. (2009). Multicenter study of decitabine administered daily for 5 days every 4 weeks to adults with myelodysplastic syndromes: the alternative dosing for outpatient treatment (ADOPT) trial. *Journal of Clinical Oncology*, 27 (23), 3842.
- Stenzig, J., Hirt, M. N., Löser, A., Bartholdt, L. M., Hensel, J. T., Werner, T. R., Riemenschneider, M., Indenbirken, D., Guenther, T., Müller, C., Hübner, N., Stoll, M., Eschenhagen, T. (2016). DNA methylation in an engineered heart tissue model of cardiac hypertrophy: common signatures and effects of DNA methylation inhibitors. *Basic Research in Cardiology*, 111 (1), 9.
- Stephens, A. J., Aubuchon, M., Schust, D. J. (2011). Antichlamydial antibodies, human fertility, and pregnancy wastage. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2011.

- Stewart, C. R., Stuart, L. M., Wilkinson, K., Van Gils, J. M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K. J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W. A., Lacy-Hulbert, A., El Khoury, J., Golenbock, D. T., Moore, K. J. (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nature Immunology*, 11 (2), 155.
- Stresemann, C., Brueckner, B., Musch, T., Stopper, H., Lyko, F. (2006). Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Research*, 66 (5), 2794-2800.
- Subramaniam, D., Thombre, R., Dhar, A., Anant, S. (2014). DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Frontiers in Oncology*, 4, 80.
- Subramanian, C., Jarzembowski, J. A., Opipari Jr, A. W., Castle, V. P., Kwok, R. P. (2007). CREB-binding protein is a mediator of neuroblastoma cell death induced by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *Neoplasia (New York, NY)*, 9(6), 495.
- Sun, Z., Feng, D., Fang, B., Mullican, S. E., You, S. H., Lim, H. W., Everett, L. J., Nabel, C. S., Li, Y., Selvakumaran, V., Won, K. J., Lazar, M. A. (2013). Deacetylase-independent function of HDAC3 in transcription and metabolism requires nuclear receptor corepressor. *Molecular Cell*, 52 (6), 769-782.
- Szulwach, K. E., Jin, P. (2014). Integrating DNA methylation dynamics into a framework for understanding epigenetic codes. *Bioessays*, 36 (1), 107-117.
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L. A., Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 30 (4), 572-580.
- Tesarik, J., Greco, E., Cohen-Bacrie, P., Mendoza, C. (1998) Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Molecular Human Reproduction*, 4(8), 757-762.
- Thakur, A., Wang, X., Siedlak, S. L., Perry, G., Smith, M. A., Zhu, X. (2007). c-Jun phosphorylation in Alzheimer disease. *Journal of Neuroscience Research*, 85 (8), 1668-1673.
- Thal, D. R., Capetillo-Zarate, E., Del Tredici, K., Braak, H. (2006). The development of amyloid beta protein deposits in the aged brain. *Science of Aging Knowledge Environment*, 2006 (6), re1.
- Thal, D. R., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Yamaguchi, H., Del Tredici, K., Braak, H. (2002). Two types of sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 61 (3), 282-293.
- Thibeault, A. A. H., Deroy, K., Vaillancourt, C., Sanderson, J. T. (2014). A unique co-culture model for fundamental and applied studies of human fetoplacental steroidogenesis and interference by environmental chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 122(4), 371-377.

- Timmerman, R., Burm, S. M., Bajramovic, J. J. (2018). An overview of in vitro methods to study microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 242.
- Togo, T., Akiyama, H., Iseki, E., Kondo, H., Ikeda, K., Kato, M., Kosaka, K. (2002). Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *Journal of Neuroimmunology*, 124(1-2), 83-92.
- Tokarz, P., Kaarniranta, K., Blasiak, J. (2016). Inhibition of DNA methyltransferase or histone deacetylase protects retinal pigment epithelial cells from DNA damage induced by oxidative stress by the stimulation of antioxidant enzymes. *European Journal of Pharmacology*, 776, 167-175.
- Tomiyama, T., Shoji, A., Kataoka, K. I., Suwa, Y., Asano, S., Kaneko, H., Endo, N. (1996). Inhibition of amyloid protein aggregation and neurotoxicity by rifampicin its possible function as a hydroxyl radical scavenger. *Journal of Biological Chemistry*, 271(12), 6839-6844.
- Tong, J. J., Liu, J., Bertos, N. R., Yang, X. J. (2002). Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain. *Nucleic Acids Research*, 30(5), 1114-1123.
- Trakhtenberg, E. F., Goldberg, J. L. (2011). Neuroimmune communication. *Science*, 334 (6052), 47-48.
- Tulloch, J., Leong, L., Chen, S., Keene, C. D., Millard, S. P., Shutes-David, A., Lopez, O. L., Kofler, J., Kaye, J. A., Woltjer, R., Nelson, P. T., Neltner, J. H., Jicha, G. A., Galasko, D., Masliah, E., Leverenz, J. B., Yu, C. E., Tsuang, D. (2018a). APOE DNA methylation is altered in Lewy body dementia. *Alzheimer's & Dementia*, 14 (7), 889-894.
- Tulloch, J., Leong, L., Thomson, Z., Chen, S., Lee, E. G., Keene, C. D., Millard, S. P., Yu, C. E. (2018b). Glia-specific APOE epigenetic changes in the Alzheimer's disease brain. *Brain Research*, 1698, 179-186.
- Ubhi, K., Rockenstein, E., Mante, M., Patrick, C., Adame, A., Thukral, M., Shults, C., Masliah, E. (2008). Rifampicin reduces α -synuclein in a transgenic mouse model of multiple system atrophy. *Neuroreport*, 19 (13), 1271.
- Ucla, C., Roux-Lombard, P., Fey, S., Dayer, J. M., Mach, B. (1990). Interferon gamma drastically modifies the regulation of interleukin 1 genes by endotoxin in U937 cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 85(1), 185-191.
- Ueda, K., Shinohara, S., Yagami, T., Asakura, K., Kawasaki, K. (1997). Amyloid β protein potentiates Ca^{2+} influx through L-type voltage-sensitive Ca^{2+} channels: a possible involvement of free radicals. *Journal of Neurochemistry*, 68(1), 265-271.
- Umeda, T., Ono, K., Sakai, A., Yamashita, M., Mizuguchi, M., Klein, W. L., Tomiyama, T. (2016). Rifampicin is a candidate preventive medicine against amyloid- β and tau oligomers, *Brain*, 139(5), 1568-1586.

- Uruma, T., Yamaguchi, H., Fukuda, M., Kawakami, H., Goto, H., Kishimoto, T., Yamamoto, Y., Tomodo, A., Kamiya, S. (2005). *Chlamydia pneumoniae* growth inhibition in human monocytic THP-1 cells and human epithelial HEP-2 cells by a novel phenoxazine derivative. *Journal of Medical Microbiology*, 54 (12), 1143-1149.
- Van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., Reutelingsperger, C. P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 31(1), 1-9.
- Vanhaecke, T., Papeleu, P., Elaut, G., Rogiers, V. (2004). Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view. *Current Medicinal Chemistry*, 11 (12), 1629-1643.
- Verghese, P. B., Castellano, J. M., Holtzman, D. M. (2011). Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *The Lancet Neurology*, 10 (3), 241-252.
- Vidoni, E. D., Yeh, H. W., Morris, J. K., Newell, K. L., Alqahtani, A., Burns, N. C., Burns, J. M., Billinger, S. A. (2016). Cerebral β -amyloid angiopathy is associated with earlier dementia onset in Alzheimer's disease. *Neurodegenerative Diseases*, 16 (3-4), 218-224.
- Vigushin, D. M., Ali, S., Pace, P. E., Mirsaidi, N., Ito, K., Adcock, I., Coombes, R. C. (2001). Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo. *Clinical Cancer Research*, 7(4), 971-976.
- Vilardo, E., Barbato, C., Ciotti, M., Cogoni, C., Ruberti, F. (2010). MicroRNA-101 regulates amyloid precursor protein expression in hippocampal neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (24), 18344-18351.
- Vojinovic, J., Dinarello, C. A., Damjanov, N., Oldoni, T. 2008. Safety and efficacy of oral ITF 2357 in patients with active systemic onset juvenile idiopathic arthritis (SOJIA)-Results of a phase II, open label, international, Multicentre clinical trial. *Arthritis and Rheumatism*, 58 (9), S943-S943.
- Waddington, C. H. (2012). The epigenotype. *International Journal of Epidemiology*, 41(1), 10-13.
- Wake, H., Moorhouse, A. J., Jinno, S., Kohsaka, S., Nabekura, J. (2009). Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *Journal of Neuroscience*, 29 (13), 3974-3980.
- Walton, E. L. (2016). The inflammasome: Friend or foe in *Chlamydia* infection?, *Biomedical Journal*, 39(5), 299-303.
- Wang, H. C., Chiang, W. F., Huang, H. H., Huang, S. K., Chiang, H. C. (2013). Promoter hypermethylation of the gene encoding heat shock protein B1 in oral squamous carcinoma cells. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 115 (3), 376-384.

- Wang, J. S., Wu, D., Huang, D. Y., Lin, W. W. (2015). TAK1 inhibition-induced RIP1-dependent apoptosis in murine macrophages relies on constitutive TNF- α signaling and ROS production. *Journal of Biomedical Science*, 22(1), 76.
- Wang, L. K., Chen, X. F., He, D. D., Li, Y., Fu, J. (2017). Dissection of functional lncRNAs in Alzheimer's disease by construction and analysis of lncRNA–mRNA networks based on competitive endogenous RNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 485 (3), 569-576.
- Wang, L., Zheng, S., Zhang, L., Xiao, H., Gan, H., Chen, H., Li, Y. (2020). HDAC10 alleviates inflammation after intracerebral hemorrhage via the PTPN22/NLRP3 pathway in rats. *Neuroscience*, 2020.
- Wang, S. C., Oelze, B., Schumacher, A. (2008). Age-specific epigenetic drift in late-onset Alzheimer's disease. *PloS One*, 3 (7).
- Wang, Y., Wang, X., Liu, L., Wang, X. (2009). HDAC inhibitor trichostatin A-inhibited survival of dopaminergic neuronal cells. *Neuroscience Letters*, 467(3), 212-216.
- Wang, Z., Zhao, Y., Xu, N., Zhang, S., Wang, S., Mao, Y., Zhu, Y., Li, B., Jiang, Y., Tan, Y., Xie, W., Yang, B. B., Zhang, Y. (2019). NEAT1 regulates neuroglial cell mediating A β clearance via the epigenetic regulation of endocytosis-related genes expression. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76 (15), 3005-3018.
- White, M. R., Kandel, R., Tripathi, S., Condon, D., Qi, L., Taubenberger, J., Hartshorn, K. L. (2014). Alzheimer's associated β -amyloid protein inhibits influenza A virus and modulates viral interactions with phagocytes. *PloS One*, 9 (7).
- Wolf, K., Fields, K. A. (2013). Chlamydia pneumoniae impairs the innate immune response in infected epithelial cells by targeting TRAF3. *The Journal of Immunology*, 190 (4), 1695-1701.
- Wu, J., Chen, L., Zheng, C., Xu, S., Gao, Y., Wang, J. (2019). Co-expression Network Analysis Revealing the Potential Regulatory Roles of lncRNAs in Alzheimer's Disease. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 11 (4), 645-654.
- Wu, X., Liang, Y., Jing, X., Lin, D., Chen, Y., Zhou, T., Huang, K. (2018). Rifampicin prevents SH-SY5Y cells from rotenone-induced apoptosis via the PI3K/Akt/GSK-3 β /CREB signaling pathway. *Neurochemical Research*, 43(4), 886-893.
- Wu, Y., Hou, F., Wang, X., Kong, Q., Han, X., Bai, B. (2016). Aberrant expression of histone deacetylases 4 in cognitive disorders: molecular mechanisms and a potential target, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9, 114.
- Xie, H., Hu, L., Li, G. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*, 123(8), 1086–1092.
- Xie, Z., Sanada, K., Samuels, B.A., Shih, H., Tsai, L. H. (2003) Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration. *Cell*, 114(4):469–482.

- Xin, Y. J., Yuan, B., Yu, B., Wang, Y. Q., Wu, J. J., Zhou, W. H., Qiu, Z. (2015). Tet1-mediated DNA demethylation regulates neuronal cell death induced by oxidative stress. *Scientific Reports*, 5, 7645.
- Xu, J., Wei, C., Xu, C., Bennett, M. C., Zhang, G., Li, F., Tao, E. (2007). Rifampicin protects PC12 cells against MPP⁺-induced apoptosis and inhibits the expression of an α -Synuclein multimer. *Brain Research*, 1139, 220-225.
- Xu, K., Dai, X. L., Huang, H. C., Jiang, Z. F. (2011). Targeting HDACs: a promising therapy for Alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011.
- Xu, M., Shibayama, H., Kobayashi, H., Yamada, K., Ishihara, R., Zhao, P., Takeuchi, T., Yoshida, K., Inagaki, T., Nokura, K. (1992). Granulovacuolar degeneration in the hippocampal cortex of aging and demented patients—a quantitative study. *Acta Neuropathologica*, 85 (1), 1-9.
- Xu, W. S., Parmigiani, R. B., Marks, P. A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, 26 (37), 5541-5552.
- Xu, W., Li, Z., Yu, B., He, X., Shi, J., Zhou, R., Liu, D., Wu, Z. (2013). Effects of DNMT1 and HDAC inhibitors on gene-specific methylation reprogramming during porcine somatic cell nuclear transfer. *PloS One*, 8 (5).
- Xu, W., Tan, L., Wang, H. F., Jiang, T., Tan, M. S., Tan, L., Zhao, Q. F., Li, J. Q., Wang, J., Yu, J. T. (2015). Meta-analysis of modifiable risk factors for Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 86 (12), 1299-1306.
- Yamauchi, J., Miyamoto, Y., Murabe, M., Fujiwara, Y., Sanbe, A., Fujita, Y., Murase, S., Tanoue, A. (2007). Gadd45a, the gene induced by the mood stabilizer valproic acid, regulates neurite outgrowth through JNK and the substrate paxillin in N1E-115 neuroblastoma cells. *Experimental Cell Research*, 313 (9), 1886-1896.
- Yamazaki, Y., Takahashi, T., Hiji, M., Kurashige, T., Izumi, Y., Yamawaki, T., Matsumoto, M. (2010). Immunopositivity for ESCRT-III subunit CHMP2B in granulovacuolar degeneration of neurons in the Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroscience Letters*, 477 (2), 86-90.
- Yan, M. S. C., Matouk, C. C., Marsden, P. A. (2010). Epigenetics of the vascular endothelium. *Journal of Applied Physiology*, 109 (3), 916-926.
- Yang, G., Song, Y., Zhou, X., Deng, Y., Liu, T., Weng, G., Yu, D., Pan, S. (2015). MicroRNA-29c targets β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and has a neuroprotective role *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Medicine Reports*, 12 (2), 3081-3088.
- Yang, L., Hou, J., Cui, X. H., Suo, L. N., Lv, Y. W. (2017). RG108 induces the apoptosis of endometrial cancer Ishikawa cell lines by inhibiting the expression of DNMT3B and demethylation of HMLH1. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 21, 5056-5064.

- Yang, W., Chauhan, A., Mehta, S., Mehta, P., Gu, F., Chauhan, V. (2014). Trichostatin A increases the levels of plasma gelsolin and amyloid beta-protein in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Life Sciences*, 99(1-2), 31-36.
- Yang, X., Yue, Y., Xiong, S. (2019). Dpep2 emerging as a modulator of macrophage inflammation confers protection against CVB3-induced viral myocarditis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 57.
- Yeung, S. C. J. (2006). Preclinical studies of chemotherapy for undifferentiated thyroid carcinoma. *Advances in Molecular and Cellular Endocrinology*, 4, 117-144.
- Yilmaz, G., Arumugam, T. V., Stokes, K. Y., Granger, D. N. (2006). Role of T lymphocytes and interferon-in ischemic stroke. *Circulation*, 113(17), 2105-2112.
- Yu, M. S., Leung, S. K. Y., Lai, S. W., Che, C. M., Zee, S. Y., So, K. F., Yuen, W. H., Chang, R. C. C. (2005). Neuroprotective effects of anti-aging oriental medicine *Lycium barbarum* against β -amyloid peptide neurotoxicity. *Experimental Gerontology*, 40(8-9), 716-727.
- Yulug, B., Hanoglu, L., Ozansoy, M., Isik, D., Kilic, U., Kilic, E., Schabitz, W. R. (2018). Therapeutic role of rifampicin in Alzheimer's disease. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 72 (3), 152-159.
- Zhang, B., Chen, C. F., Wang, A. H., Lin, Q. F. (2015). MiR-16 regulates cell death in Alzheimer's disease by targeting amyloid precursor protein. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19 (21), 4020-4027.
- Zhang, B., Gaiteri, C., Bodea, L. G., Wang, Z., McElwee, J., Podtelezchnikov, A. A., Zhang, C., Xie, T., Tran, L., Dobrin, R., Fluder, E., Clurman, B., Melquist, S., Narayanan, M., Suver, C., Shah, H., Mahajan, M., Gillis, T., Mysore, J., MacDonald, M. E., Lamb, J. R., Bennett, D. A., Molony, C., Stone, D. J., Gudnason, V., Myers, A. J., Schadt, E. E., Neumann, H., Zhu, J., Emilsson, V. (2013). Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. *Cell*, 153 (3), 707-720.
- Zhang, K., Schrag, M., Crofton, A., Trivedi, R., Vinters, H., Kirsch, W. (2012). Targeted proteomics for quantification of histone acetylation in Alzheimer's disease. *Proteomics*, 12 (8), 1261-1268.
- Zhang, Z., Wu, Z., Zhu, X., Hui, X., Pan, J., Xu, Y. (2014). Hydroxy-safflor yellow A inhibits neuroinflammation mediated by A β 1-42 in BV-2 cells. *Neuroscience Letters*, 562, 39-44.
- Zhao, Y. Q., Jordan, I. K., Lunyak, V. V. (2013). Epigenetics components of aging in the central nervous system. *Neurotherapeutics*, 10, 647-663.
- Zheng, J., Ding, T., Chen, Z., Fang, H., Li, H., Lu, H., Wu, Y. (2015). Preparation and evaluation of monoclonal antibodies against chlamydial protease-like activity factor to detect *Chlamydia pneumoniae* antigen in early pediatric pneumonia. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34 (7), 1319-1326.

- Zhou, T., Huang, Z., Sun, X., Zhu, X., Zhou, L., Li, M., He, C. (2017). Microglia polarization with M1/M2 phenotype changes in rd1 mouse model of retinal degeneration. *Frontiers in Neuroanatomy*, 11, 77.
- Zhu, L., Bi, W., Lu, D., Zhang, C., Shu, X., Lu, D. (2014). Luteolin inhibits SH-SY5Y cell apoptosis through suppression of the nuclear transcription factor- κ B, mitogen-activated protein kinase and protein kinase B pathways in lipopolysaccharide-stimulated cocultured BV2 cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7(5), 1065-1070.
- Zhu, M., Wang, X., Hjorth, E., Colas, R. A., Schroeder, L., Granholm, A. C., Schultzberg, M. (2016). Pro-resolving lipid mediators improve neuronal survival and increase A β 42 phagocytosis. *Molecular Neurobiology*, 53(4), 2733-2749.
- Zhu, Q. B., Unmehopa, U., Bossers, K., Hu, Y. T., Verwer, R., Balesar, R., Zhao, J., Bao, A. M., Swaab, D. (2016). MicroRNA-132 and early growth response-1 in nucleus basalis of Meynert during the course of Alzheimer's disease. *Brain*, 139 (3), 908-921.
- Zong, Y., Wang, H., Dong, W., Quan, X., Zhu, H., Xu, Y., Huang, L., Ma, C., Qin, C. (2011). miR-29c regulates BACE1 protein expression. *Brain Research*, 1395, 108-115.