

**SARS-CoV-2 SPIKE/S1 PROTEİNİ, NÖROPİLİN-1 VE
TOLL BENZERİ RESEPTÖR 4 İNHİBİTÖRLERİNİN
SİNİR SİSTEMİNDEKİ FARKLI FİZYOLOJİK
SÜREÇLERDE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SARS-CoV-2
SPIKE/S1 PROTEIN, NEUROPILIN-1 AND
TOLL-LIKE RECEPTOR 4 INHIBITORS
ON DIFFERENT PHYSIOLOGICAL PROCESSES
IN THE NERVOUS SYSTEM**

İBRAHİM KAMACI

DOÇ. DR. ESİN AKBAY ÇETİN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

SARS-CoV-2 SPIKE/S1 PROTEİNİ, NÖROPİLİN-1 VE TOLL BENZERİ RESEPTÖR 4 İNHİBİTÖRLERİNİN SİNİR SİSTEMİNDEKİ FARKLI FİZYOLOJİK SÜREÇLERDE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

İBRAHİM KAMACI

Yüksek Lisans, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Esin AKBAY ÇETİN

Mayıs 2024, 101 sayfa

2019 yılı itibariyle pandemiye neden olmuş olan Şiddetli Akut Solunum Sendromu-2 (SARS-CoV-2)'nin sinir sistemi işleyişinde bozukluklara sebep olduğu bildirilmiştir. Ek olarak, yapılan az sayıda çalışmada SARS-CoV-2 Spike proteininin alt birimlerinden biri olan S1 proteininin sinir sisteminde doğrudan ya da dolaylı olarak fizyolojik bozukluklar meydana getirdiği tespit edilmiştir. Yapılan bu tez çalışması kapsamında, SARS-CoV-2 Spike/S1 proteini ve hedef reseptörleri olduğu bildirilmiş olan Nöropilin-1 (Nrp-1) ve Toll-benzeri Reseptör 4 (TLR4) inhibitörlerinin nöronal hücreler üzerindeki fizyolojik etkileri araştırılarak tartışılmıştır. Bu amaçla, öncelikle L929 ve T98G hücre hatları üzerindeki sitotoksik deneylerle maddelerin uygun konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu aşamayı takiben maddelerin etkinliklerini araştırmak üzere, SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır. Maddelerin hem direkt hem de kombine bir şekilde uygulanmasının nöronal farklılaşma potansiyeli (nörojenez) üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bunun yanı sıra, maddelerin aksonal büyüme üzerindeki etkilerini tespit etmek üzere farklılaşma aşamasının 1, 3, 5 ve 7. günlerinde aksonal morfoloji incelenmiştir ve aksonal uzantılar ölçülerek karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda maddelerin nöronlara farklılaştırılmış SH-SY5Y hücrelerindeki nöroproteksiyon sürecine etkileri değerlendirilmiştir. Bunun yanında, maddelerin bir sinir hasarı sonrasındaki

iyileşmeye olan etkileri ve bir transwell sistemindeki nöronal göç sürecine etkileri incelenmiştir.

Elde edilen veriler, SARS-CoV-2 Spike/S1 proteininin Nrp-1'in fonksiyonlarında Nrp-1 inhibitörüne benzer etkiler yaptığını göstermiştir. S1 proteininin Nrp-1 inhibitörüyle benzer şekilde, nöronal farklılaşmayı olumsuz etkilediği, aksonal büyümeyi zamana bağlı olarak yavaşlattığı, nöroproteksiyonu zamanla doğru orantılı bir şekilde bozduğu ve apoptozu indüklediği, sinir hasarı iyileşmesi üzerinde olumsuz etkiye sebep olduğu, aynı zamanda hücre adezyonunu ve nöronal göçü olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir. Buna karşın, S1 proteininin diğer bir hedef reseptörü olan TLR4'ün TAK242 ile bloke edilmesinin bu süreçlerde S1 ve EG00229 ile benzer bir etkisi olmamıştır. Ek olarak, Nrp-1 ve TLR4 reseptörlerinin sinir sistemindeki bazı fizyolojik süreçlerde birbirleriyle doğrudan ya da dolaylı olarak ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Tüm bunlarla beraber, EG00229 zaman ve miktar parametrelerine bağlı olarak S1'in olumsuz etkilerini önlemiştir.

Tüm sonuçlar birlikte ele alındığında, SARS-CoV-2'nin ya da sinir sistemine sızan S1 proteininin, sinir sistemindeki patofizyolojik etkilere Nrp-1 fonksiyonunu bozarak **doğrudan** sebep olabileceği görülmüştür. Elde edilen bulgular, SARS-CoV-2'nin sinir sistemindeki hasarlarını önlemek için tasarlanabilecek ilaç ya da teröpatik ajan çalışmalarına ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: SARS-CoV-2, Spike proteini, Nöropilin-1, Toll Benzeri Reseptör 4, Nörojenez, Aksonal büyüme, Nöroproteksiyon, Nöronal göç

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SARS-CoV-2 SPIKE/S1 PROTEIN, NEUROPILIN-1 AND TOLL-LIKE RECEPTOR 4 INHIBITORS ON DIFFERENT PHYSIOLOGICAL PROCESSES IN THE NERVOUS SYSTEM

İBRAHİM KAMACI

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Esin AKBAY ÇETİN

May 2024, 101 pages

As of 2019, Severe Acute Respiratory Syndrome-2 (SARS-CoV-2), which caused the pandemic, has been reported to cause disorders in the functioning of the nervous system. In addition, a small number of studies have found that the S1 protein, one of the subunits of the SARS-CoV-2 Spike protein, directly or indirectly causes physiological disorders in the nervous system. Within the scope of the thesis study, the physiological effects of Neuropilin-1 (Nrp-1) and Toll-like Receptor 4 (TLR4) inhibitors, which have been reported to be one of the units of SARS-CoV-2 Spike/S1 protein and its target receptors, on neuronal cells were discussed. For this purpose, the appropriate concentrations of the substances were first determined by cytotoxic assays on L929 and T98G cell lines. Following this step, to investigate the effects of the substances on neuronal processes, appropriate experimental groups were established with the physiological identities of SH-SY5Y cells, both at the neuroblastoma stage, neuronal differentiation stage and after differentiation into neuronal cells.

The effects of both direct and combined administration of the substances on neuronal differentiation potential (neurogenesis) were examined. We also evaluated the effects of the substances on the neuroprotection process in SH-SY5Y cells differentiated into neurons. In

addition, the effects of the substances on the recovery after a nerve injury and on the neuronal migration process in a transwell system were analyzed.

The data obtained showed that the SARS-CoV-2 Spike/S1 protein exerts similar effects on the functions of Nrp-1 as the Nrp-1 inhibitor. Similar to Nrp-1 inhibitor, S1 protein was found to negatively affect neuronal differentiation, slow down axonal growth in a time-dependent manner, impair neuroprotection in a time-dependent manner, induce apoptosis, have a negative effect on nerve injury recovery, and negatively affect cell adhesion and neuronal migration. In contrast, blocking TLR4, another target receptor of S1 protein, with TAK242 did not have a similar effect on these processes as S1 and EG00229. In addition, Nrp-1 and TLR4 receptors have been found to be directly or indirectly related to each other in some physiological processes in the nervous system. Nevertheless, EG00229 prevented the negative effects of S1 depending on time and quantity parameters.

Taken together, the results suggest that SARS-CoV-2 or S1 protein infiltrating the nervous system may **directly** cause pathophysiological effects in the nervous system by disrupting Nrp-1 function. The findings will shed light on the studies of drugs or therapeutic agents that can be designed to prevent the damages of SARS-CoV-2 in the nervous system.

Keywords: SARS-CoV-2, Spike protein, Neuropilin-1, Toll-like receptor 4, Neurogenesis, Axonal growth, Neuroprotection, Neuronal migration

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, FHD-2023-20234 proje numarası ile Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca bana her zaman destek olan, bana inanan ve güvenen, beni motive eden, bilimsel araştırmalarımda yol gösteren ve yolumu aydınlatan, bilim disiplinini ve metodolojisini aşıl原因an, yaşamın mekanizmasına dair ufkumu açan, öğretileri sayesinde ilerlediğim çok değerli Sayın hocam Doç. Dr. Esin AKBAY ÇETİN'e,

Fizyoloji'yi ve mekanizmaları sevdiren, merakımı tetikleyen, desteklerini her zaman üzerimde hissettiğim çok değerli Sayın hocam Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR'a,

Her sorumu dinleyen ve cevaplarıyla farklı bakış açıları kazandıran, desteklerini her zaman üzerimde hissettiğim çok değerli Sayın hocam Doç. Dr. Aylin GÜRPINAR'a,

Bilimsel çalışmalarda desteğini aldığım ve öğretilerini kazandığım çok değerli Sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Handan SEVİM AKAN'a,

Desteklerini ve tecrübelerini her zaman üzerimde hissettiğim çok değerli Sayın hocam Doç. Dr. Güler Hanife TANIR DÖNMEZ'e,

Western blot çalışmalarımda bana yardımcı olan ve tecrübelerini benimle paylaşan çok değerli hocalarım Arş. Gör. Özbeyen ATALAY'a ve Dr. Öğr. Üyesi Beril ERDEM'e,

Her zaman yanımda olduklarını bildiğim, desteklerini hissettiğim, bana birçok anı bırakan arkadaşlarım; Elif Hatice AYTEN'e, Ömer SALİHİ'ye, Buse BEKAR'a, Yiğit Alp ÖZDEMİR'e, Şebnem ERFEN'e, Şefika ÖZCAN'a, Özgü Zuğa ÖRSOĞLU'na, Elçin TANK'a, Cihan Emin KONAN'a, Utku Teoman YEĞENOĞLU'na, Uğur YILMAZ'a, Okan ÇINAR'a,

Her türlü desteklerini aldığım, bu yolda beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, arkamda dağ olduklarımı bildiğim aileme,

Son olarak, stresimi azaltan, her zaman yanımda olan zeki evcil kemirgenlerime

Saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xviii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Sinir Sistemi.....	4
2.1.1. Nöronların Yapısı ve Fizyolojik Özellikleri.....	4
2.1.1.1. Nöronların Çalışma Mekanizması.....	5
2.1.2. Sinir Sistemindeki Fizyolojik Süreçler.....	6
2.1.2.1. Nörojenez.....	6
2.1.2.2. Nöronal Göç.....	7
2.1.2.3. Aksonal büyüme ve Aksonların modülasyonu.....	8
2.1.2.4. Nöroproteksiyon.....	10
2.2. SARS-CoV-2.....	10
2.2.1. SARS-CoV-2'nin Yapısı ve Genomu.....	10
2.2.2. SARS-CoV-2'nin Hücreye Giriş Mekanizması.....	12
2.2.3. SARS-CoV-2'nin Reseptörleri.....	14
2.2.3.1. Nöropilin-1'in Yapısı ve Fizyolojik Özellikleri.....	15
2.2.3.1.1. Nöropilin-1'in Sinir Sistemindeki Fizyolojik Etkileri.....	17
2.2.3.2. Toll Benzeri Reseptörlerin Yapısı ve Fizyolojik Özellikleri.....	18

2.2.3.2.1. Toll Benzeri Reseptör 4'ün Sinir Sistemindeki Fizyolojik Etkileri.....	19
2.2.4. Sinir Sisteminde SARS-CoV-2 ile İlişkili Patofizyolojik Bulgular.....	20
2.2.4.1. SARS-CoV-2'nin Merkezi Sinir Sistemine Olası Giriş Yolları.....	21
2.2.4.2. SARS-CoV-2 Spike Proteininin Sinir Sistemine Etkisi.....	22
2.3. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücreleri.....	23
2.3.1. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Nöronal Hücelere Farklılaştırılma Modelleri.....	24
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	26
3.1. Kimyasal Malzemeler.....	28
3.2. SH-SY5Y İnsan Nöroblastoma Hücrelerinin Proliferasyon Eğrisinin Çıkarılması, Nöronal Hücelere Farklılaştırılması ve Karakterizasyonu.....	29
3.2.1. Hücrelerin açılması ve çoğaltılması.....	29
3.2.1.1. Hücrelerin Pasajlanması.....	29
3.2.1.2. Hücrelerin Dondurulması.....	30
3.2.2. Hücre Proliferasyon Eğrisinin Çıkarılması.....	30
3.2.3. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Nöronal Hücelere Farklılaştırılması.....	30
3.2.4. Karakterizasyon.....	31
3.3. Konsantrasyon Tayinleri.....	31
3.3.1. Konsantrasyonların Hazırlanması.....	32
3.3.2. Deney Gruplarının Kurulması ve Konsantrasyonların Uygulanması.....	32
3.3.3. Hücre Canlılık Analizi.....	33
3.3.3.1. MTT Testi.....	33
3.3.3.2. AT/Pİ Boyaması.....	33
3.4. SH-SY5Y Deney Gruplarının Kurulması ve Konsantrasyonların Uygulanması.....	34
3.4.1. Optimizasyon Çalışmaları.....	34

3.4.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi (Nörojenez)..	35
3.4.2.1. Farklılaşma Potansiyelinin İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi ile İncelenmesi.....	36
3.4.2.2. Farklılaşma Potansiyelinin Western Blot Tekniği ile İncelenmesi.....	36
3.4.2.2.1. Protein İzolasyonu.....	37
3.4.2.2.2. Micro Bikinkonik Asit (BCA) Yöntemi ile Total Protein Miktarının Ölçülmesi.....	37
3.4.2.2.3. Western Blot Tekniği ile MAP-2 Seviyelerinin Ölçülmesi.....	38
3.4.3. Nöronal Farklılaşma Aşamasındaki SH-SY5Y Hücrelerinde Aksonal Büyüme ve Uzantıların İncelenmesi (Aksonal büyüme).....	39
3.4.3.1. Aksonal Büyümenin İverted Mikroskop ile İncelenmesi ve Aksonal Uzantıların Ölçülmesi.....	39
3.4.3.2. Aksonal Büyümenin Western Blot Tekniği ile İncelenmesi.....	40
3.4.3.2.1. Western Blot Tekniği ile GAP43 Seviyelerinin Ölçülmesi.....	40
3.4.4. Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinde Nöronal Sağkalımların İncelenmesi (Nöroproteksiyon).....	40
3.4.5. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Nöronal Göç Potansiyellerinin İncelenmesi (Nöronal Göç).....	40
3.4.5.1. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Yara Modelinde İncelenmesi.....	40
3.4.5.2. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Transwell Sisteminde Göç Potansiyellerinin İncelenmesi.....	42
3.5. İstatistiksel Analiz.....	42
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	43
4.1. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Proliferasyon Eğrisinin Çıkarılması.....	43
4.2. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Nöronal Hücelere Farklılaştırılması ve Karakterizasyonu.....	43
4.3. Konsantrasyon Tayinleri.....	45

4.3.1. Sitotoksosite ve Canlılık Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	45
4.3.1.1. EG00229 24, 48 ve 72 Saat Uygulamalarının Sitotoksosite Açısından Karşılaştırılması ve Apoptoz/Nekroz Yüzdelerinin İncelenmesi.....	45
4.3.1.2. TAK242 24, 48 ve 72 Saat Uygulamalarının Sitotoksosite Açısından Karşılaştırılması ve Apoptoz/Nekroz Yüzdelerinin İncelenmesi.....	47
4.3.1.3. S1 Proteini 24, 48 ve 72 Saat Uygulamalarının Sitotoksiste Açısından Karşılaştırılması ve Apoptoz/Nekroz Yüzdelerinin İncelenmesi.....	50
4.4. EG00229, TAK242 ve S1 Proteininin Nörojenez, Aksonal Büyüme, Nöroproteksiyon ve Nöronal Göç Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılarak İncelenmesi.....	53
4.4.1. Optimizasyon Çalışması.....	53
4.4.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi (Nörojenez)...	54
4.4.2.1. Farklılaşma Potansiyelinin İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi ile İncelenmesi.....	54
4.4.2.2. Farklılaşma Potansiyelinin Western Blot Tekniği ile İncelenmesi.....	58
4.4.2.2.1. BCA yöntemi ile Total Protein Miktarının Ölçülmesi.....	58
4.4.2.2.2. Western Blot Tekniği ile MAP-2 Seviyelerinin Ölçülmesi.....	59
4.4.3. Nöronal Farklılaşma Aşamasındaki SH-SY5Y Hücrelerinde Aksonal Büyüme ve Uzantıların İncelenmesi (Aksonal büyüme).....	63
4.4.3.1. Aksonal Büyümenin İverted Mikroskop ile İncelenmesi ve Aksonal Uzantıların Ölçülmesi.....	63
4.4.3.2. Aksonal Büyümenin Western Blot Tekniği ile İncelenmesi.....	67
4.4.3.2.1. Western Blot Tekniği ile GAP43 Seviyelerinin Ölçülmesi.....	67
4.4.4. Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinde Nöronal Sağkalımların İncelenmesi (Nöroproteksiyon)	71
4.4.4.1. Sitotoksosite ve Canlılık Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Apoptoz Yüzdelerinin İncelenmesi.....	71

4.4.5. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Nöronal Göç Potansiyellerinin İncelenmesi (Nöronal Göç).....	76
4.4.5.1. Yara Modeli Sonuçları.....	76
4.4.5.2. Hücre Adezyonunun İncelenmesi.....	79
4.4.5.3. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Transwell Sisteminde Göç Potansiyellerinin İncelenmesi.....	82
5. YORUM.....	85
6. KAYNAKLAR.....	90

EKLER

EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu

ÖZGEÇMİŞ

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bir nöronun genel yapısı.....	5
Şekil 2.2. Nöronal göç mekanizması (basit gösterim). A, Göç sürecine başlayan bir internörondaki yapıların; ilişkili hücre iskeleti ve organellerin şematik çizimi. B, Zamana bağlı göç döngüsünün şeması. C, Nükleokinez sırasında rol olan Aktin, Miyozin II, Tübülün, Golgi ve Sentrozomların şematik koordinatları. t, zaman [33].....	7
Şekil 2.3. Aksonal büyüme mekanizması [39]. ESM, Ekstrasellüler matriks.....	9
Şekil 2.4. SARS-CoV-2'nin yapısı ve genomunun şematik diyagramı. A, SARS-CoV-2'nin yapısı. SARS-CoV-2 dört yapısal protein içermektedir; Spike proteini (S), Membran proteini (M), Nükleokapsid proteini (N) ve Zarf proteini (Z). B, SARS-CoV-2'nin genomu. Genom, ORF1a-ORF1b-S-ORF3-E-M-ORF6-ORF7 (7a ve 7b)-ORF8-ORF9b-N şeklinde sıralanmaktadır. On altı yapısal olmayan protein (nsp1-11, 12-16) sırasıyla ORF1a ve ORF1b tarafından kodlanmaktadır ve altı yardımcı protein tanımlanmıştır. Plpro; Papain benzeri proteaz, 3CLPro; 3C benzeri Proteinaz, RdRp; RNA bağımlı RNA polimeraz, Hel, Helikaz. S kodları: NTD; N-terminal alan, RBD; Reseptör Bağlama Alanı, SD1; Alt Alan 1, SD2; Alt Alan 2, FL; füzyon bölgesi, HR1; Heptad Tekrar 1, HR2; Heptad Tekrar 2, TM; Transmembran alan. Noktalı çizgi Furin ve TMPRSS2 tarafından S1/S2 ve S2' bölmesini göstermektedir [47].....	11
Şekil 2.5. SARS-CoV-2 Spike proteininin yapısı. Spike proteini, S1 ve S2 olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır ve toplam 1273 aminoasit içermektedir. S1 alt birimi (mavi ok), N-terminal Alanı (NTD) [14-306 rezidü –aminoasit kalıntısı-], Reseptör bağlayıcı alan (RBD) [331-528 rezidü], C-terminal Alan 1 (CTD1) [528-591 rezidü], C-terminal Alan 2 (CTD2) [591-686 rezidü] içermektedir. S2 alt birimi (gri ok), Füzyon peptidi (FP) [788-834 rezidü], Füzyon Peptid Proksimal Bölgesi (FPPR), Heptad Tekrar 1 (HR1) [910-985 rezidü], Merkezi sarmal bölge (CH) [985-1035 rezidü], Konnektör alanı (CD) [1035-1068 rezidü], Heptad Tekrar 2 (HR2) [1163-1211 rezidü], Transmembrana alan (TM) [1211-1234 rezidü], Sitoplazmik kuyruk (CT) [1234-1273 rezidü] içermektedir [48, 49].....	12
Şekil 2.6. SARS-CoV-2'nin Hücreye Giriş Mekanizmaları.....	13

Şekil 2.7. SARS-CoV-2 ana reseptörler, potansiyel alternatif/yardımcı reseptörler veya kofaktörler. KREMEN1, Kringle İçeren Transmembran Protein 1; ASGR-1, Asyaloglikoprotein Reseptörü-1; ACE-2, Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim-2; NRP-1, Nöröpin-1; SR-B1, Çöpçü Reseptör Sınıf B tip 1; HSPG; Heparan Sülfat Proteoglikan; SR, Siyalik Reseptör; LR, Lektin Reseptör; CD147, Basigin; TMPRSS2, Transmembran Proteaz Serin 2; TLR4, Toll Benzeri Reseptör-4; AXL, Tirozin-protein kinaz reseptörü UFO [53, 54].....15

Şekil 2.8. Nrp'lerin yapısı, formları ve varyantları.....16

Şekil 2.9. TLR4'ün yapısı. TLR4, çoklu hücre dışı alanlarına (LRR) ve hücre içi sinyalizasyon alanlarına (TIR) sahip dimerik bir transmembran reseptörüdür. DAMP; Hasarla İlişkili Moleküler Kalıplar, PAMP; Patojenle İlişkili Moleküler Kalıplar, LRR; Lösin açısından zengin tekrar, TB; Transmembran bölgesi, TIR; Toll/İnterlökin-1 Reseptör.....19

Şekil 2.10. SARS-CoV-2'nin merkezi sinir sistemine olası giriş yolları. Diyagram, SARS-CoV-2'nin anterograd veya retrograd trans-sinaptik iletim yoluyla merkezi sinir sistemine girebileceği rotaları göstermektedir. İlk rotalar (1, 2, 3) virüsün tat alma yolunu kullanarak dile ve birçok organa bağlı olan kranial sinirlerden trans-sinaptik iletim yoluyla ulaşabildiği beyin sapı bölgesini (NTS; Nükleus traktus solitarius) ve buradan ilerleyebileceği diğer beyin bölgelerini göstermektedir. Diğer bir olası rota (4), SARS-CoV-2'nin solunum yollarıyla ilişkili C3-C5 motor nöronlarını hedef alarak omurilik soğanında bulunan ve solunum düzenlenmesinde rol onayan Bötzinger kompleksine ulaşabileceğini ve buradan ilişkili diğer beyin bölgelerine girebileceğini göstermektedir. 5. rota, koku alma sistemiyle ilerleyebileceğini göstermektedir. 6. rota, bağışıklık hücrelerini enfekte eden virüsün "Truva atı" adı verilen bir süreçle Kan Beyin Bariyerini (KBB) geçerek merkezi sinir sistemine girebileceğini göstermektedir [98]. (CN VII: Yüz siniri; dilin 2/3'ünü innerve eder. CN IX: Glossofarengeal sinir; boğaz, bademcikler ve farinksin ön kısmı ile bağlantılıdır. CN X: Vagal sinir; birçok organla afferent ve efferent bağlantıları olan bir sinir demetidir.).....22

Şekil 3.1. Deneysel çalışmaların özet şeması.....27

Şekil 3.2. Nörojenez deney grupları. Soldaki gruplarda Negatif kontrol grubu haricindeki tüm gruplara farklılaştırma besiyeri ve belirlenen konsantrasyonlar uygulanmıştır. Sağdaki

gruplarda ise maddelerin ve kombinasyonlarının uygulamasını takiben 30 dakika sonra ortam değiştirilmiştir. [RA; 10 µM, TAK242; 3 µM, S1; 25 ng, EG00229; 50 µM].....	35
Şekil 3.3. WB deney aşamaları. A, Kuyucuklara yüklenmiş protein örnekleri. B, Proteinlerin membrana geçirilmesi.....	39
Şekil 3.4. Yara boyutu ve alanının ölçülmesi. A, Yara boyutu ölçümü. Sarı çizgilerin başlangıç ve bitiş noktası arasındaki mesafe (µm) ölçülmüştür. B, Yara alanının ölçümü. Sarı ile içine alınan yara bölgesinin alanı (mm ²) ölçülmüştür.....	41
Şekil 4.1. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin proliferasyon eğrisi grafiği. Hücrelerin ikilenme zamanı $1 / [3.32 \times (\log T1 - \log T0) / 24]$ formülüyle 17 saat olarak tespit edilmiştir.....	43
Şekil 4.2. Farklılaştırma besiyeri uygulanmış Pozitif Kontrol (PK) ve besiyeri uygulanmış Negatif Kontrol (NK) hücrelerinin morfolojik görüntüleri. Siyah ok işaretleri aksonal uzantı veren hücreleri ve uzantısını göstermektedir (G; gün). [Büyütme: X10].....	44
Şekil 4.3. anti-MAP-2 ile immünohistokimyasal boyama fotoğrafları. Farklılaştırma besiyeri uygulanmış Pozitif Kontrol [PK] ve besiyeri uygulanmış Negatif Kontrol [NK] grubunda nöronal hücrelerin anti-MAP-2 ile boyanma yoğunluğu. [Primer antikor: anti-MAP-2; 1:2000. Sekonder Antikor: TR; 1:400 (545-580 nm)] [Büyütme: X20].....	45
Şekil 4.4. EG00229'un farklı konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72. saatteki hücre canlılığı üzerindeki etkisi. [* sembolü; Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı, + sembolü; DMSO grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.] [* , +; p ≤ 0.05, **, ++; p ≤ 0.005, ***, +++; p ≤ 0.0005, ****, ++++; p ≤ 0.0001].....	47
Şekil 4.5. EG00229'un farklı konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72. saatteki apoptotik ve nekrotik hücre oranı.....	47
Şekil 4.6. TAK242'nin farklı konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72. saatteki hücre canlılığı üzerindeki etkisi. [* sembolü; Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı, + sembolü; DMSO grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.] [* , +; p ≤ 0.05, **, ++; p ≤ 0.005, ***, +++; p ≤ 0.0005, ****, ++++; p ≤ 0.0001].....	49
Şekil 4.7. TAK242'nin farklı konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72. saatteki apoptotik ve nekrotik hücre oranı.....	50

- Şekil 4.8.** S1 proteininin farklı konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72. saatteki hücre canlılığı üzerindeki etkisi. [* sembolü; Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı, + sembolü; 25 ng ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.] [* , +; $p \leq 0.05$, **, ++; $p \leq 0.005$, ***, +++; $p \leq 0.0005$, ****, ++++; $p \leq 0.0001$].....52
- Şekil 4.9.** S1 proteininin farklı konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72. saatteki apoptotik ve nekrotik hücre oranı.....53
- Şekil 4.10.** EG00229, TAK242 ve S1 Proteinin konsantrasyonları ve kombinasyonlarının SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde birinci gün nöronal farklılaşmaya olan etkisi. [anti-MAP-2: kırmızı] [Primer antikor: anti-MAP-2; 1:2000. Sekonder Antikor: TR; 1:400 (545-580nm)] [Büyütme: X20].....56
- Şekil 4.11.** EG00229, TAK242 ve S1 Proteininin konsantrasyonları ve kombinasyonlarının SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde üçüncü, beşinci ve yedinci günlerdeki nöronal farklılaşmaya olan etkisi. anti-MAP-2 ile boyanmış SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri (X20 büyütme). [anti-MAP-2: kırmızı] [Primer antikor: anti-MAP-2; 1:2000. Sekonder Antikor: TR; 1:400 (545-580 nm)] Pozitif Kontrol; Farklılaştırma besiyeri uygulanmış, Negatif Kontrol; besiyeri uygulanmış. (30': 30 dakika, 2850': 2850 dakika, 2880': 2880 dakika, B; Besiyeri) [Büyütme: X20].....58
- Şekil 4.12.** A, 1. gün; B, 3. gün; C, 5. gün; D, 7. gün. a, WB membran görüntüleri. b, β -aktin seviyelerine göre MAP-2 seviyeleri. c, GAPDH seviyelerine göre MAP-2 seviyeleri. d, pozitif kontrole göre diğer grupların rölatif protein seviyeleri. kDa, kiloDalton.....62
- Şekil 4.13.** EG00229, TAK242 ve S1 Proteinin konsantrasyonları ve kombinasyonlarının aksonal büyüme üzerine etkisi. Farklılaştırma aşamasındaki SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde aksonal morfoloji görüntüleri. Siyah ok işaretleri aksonal uzantı veren hücreleri ve uzantısını göstermektedir. Pozitif Kontrol; farklılaştırma besiyeri uygulanmış grup, Negatif Kontrol; besiyeri uygulanmış grup. (30': 30 dakika, 2850': 2850 dakika, 2880': 2880 dakika, B; Besiyeri) [Büyütme: X10].....65
- Şekil 4.14.** Aksonal uzunlukların konsantrasyonlara ve kombinasyonlara bağlı karşılaştırılması. [* sembolü; Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı, + sembolü; TAK242 ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı, # sembolü; Negatif kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı, ^ sembolü; (EG00229 + S1) grubu ile

diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.]	
[*, #, +, ^; p ≤ 0.05, **, ++; p ≤ 0.005, ***, +++; p ≤ 0.0005, ****, ++++; p ≤ 0.0001].....	66
Şekil 4.15. Aksonal uzunlukların gruplar arasında zamana bağlı olarak karşılaştırılması.....	67
Şekil 4.16. A,1. gün; B, 3. gün; C, 5. gün; D, 7. gün. a, WB membran görüntüleri. b, β-aktin seviyelerine göre GAP43 seviyeleri. c, GAPDH seviyelerine göre GAP43 seviyeleri. d, pozitif kontrole göre diğer grupların rölatif protein seviyeleri. kDa, kiloDalton.....	70
Şekil 4.17. Nöroproteksiyon. 24, 48 ve 72. saat sonraki MTT sonuçları. [* sembolü; Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı, # sembolü; DMSO grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı, ^ sembolü; [EG00229 + S1] grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.] [* , #; p ≤ 0.05, **, ##, ^^; p ≤ 0.005, ***, ###, ^^; p ≤ 0.0005, ****, #####; p ≤ 0.0001].....	73
Şekil 4.18. TAK242'nin ve EG00229'un çözücüsü olarak kullanılan DMSO'nun 24, 48 ve 72. saat AT boyama görüntüsü. (DMSO oranı; 1:1000) [Büyütme: 10X].....	74
Şekil 4.19. Konsantrasyonların ve kombinasyonların uygulanmasından 24, 48 ve 72 saat sonrası AT boyama görüntüleri. Pozitif Kontrol; farklılaştırma besiyeri uygulanmış grup, Negatif Kontrol; besiyeri uygulanmış grup. [Büyütme X10].....	75
Şekil 4.20. 24, 48 ve 72. saatteki apoptotik hücre oranı. [*; p ≤ 0.05, **, p ≤ 0.005, ***, p ≤ 0.0005].....	76
Şekil 4.21. Konsantrasyon uygulamasını takiben 0, 12, 24 ve 36. saatteki yara açıklığı. [*; 0. saat ile diğer saatler arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.] [*; p ≤ 0.05, **, p ≤ 0.005, ***, p ≤ 0.0005, ****; p ≤ 0.0001].....	78
Şekil 4.22. Konsantrasyon uygulamasını takiben 0, 12, 24 ve 36. saatteki yara alanı. [* sembolü; 0. saat ile diğer saatler arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.] [*; p ≤ 0.05, **, p ≤ 0.005, ***, p ≤ 0.0005, ****; p ≤ 0.0001].....	78
Şekil 4.23. 4, 5 ve 6. saatteki hücre adezyonu fotoğrafları. [Siyah oklar, yüzeye tutunmuş olan hücreleri; kırmızı oklar, tutunmamış olan hücreleri göstermektedir.] [240'; 240 dakika, 300'; 300 dakika, 360'; 360 dakika] [Büyütme X10].....	81
Şekil 4.24. 4, 5 ve 6. saatteki % tutunmuş hücre oranı. [* sembolü; Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.].....	81

Şekil 4.25. 24 ve 48. saat nöronal göç fotoğrafları. [240'; 240 dakika, 300'; 300 dakika, 360'; 360 dakika] [Büyütme: 20X].....83

Şekil 4.26. 24 ve 48. saatlerdeki göç eden hücre sayısı. [* sembolü; Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.] [*; $p \leq 0.05$, **; $p \leq 0.005$, ***; $p \leq 0.0005$, ****; $p \leq 0.0001$].....84

ÇİZELGELER DİZİNİ

<i>Tablo 4.1.</i> Total protein seviyeleri.....	59
---	----

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

kDa	kiloDalton
nm	nanometre
ng	nanogram
μ g	mikrogram
μ m	mikrometre
μ L	mikrolitre
μ M	mikromolar
mL	mililitre
°	santigrat
β	beta
mm ²	milimetrekare
RPM	dakikadaki devir sayısı
mV	miliVolt
mA	miliAmper

Kısaltmalar

ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
AT/PI	Akridin Turuncusu/Propiyum İyodür
BCA	Bikinkoninik asit
DAPI	4'6-diamidino-2-fenilindol
dH ₂ O	Distile su

DMEM-F12	Dulbecco'nun Modifiye edilmiş Eagle Medyumu/ Besin Karışımı F-12
DMSO	Dimetil sülfoksit
EG00229	Trifloroasetat tuzu
FBS	Fetal Bovin Serum
GAP43	Büyüme ilişkili protein 43
GAPDH	Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz
IC50	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu
MAP-2	Mikrotübül ilişkili protein-2
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid
Nrp-1	Nöropilin-1
PBS	Fostat tamponlu salin
P/S	Penisilin/Streptomisin
PVDF	Polivinilidin florür
RA	Retinoik Asit
SARS-CoV-2	Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs-2
S1	Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs-2 S1 proteini
SEMA	Semaforin
SDS	Sodyum dodesilsülfat
TAK242	Resatorvid
TBS	Tris tamponlu salin
TLR4	Toll benzeri Resetör 4
TR	Teksas Red
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
WB	Western blot

1. GİRİŞ

Yaşamı elektrofizyolojik olarak algılayan, yorumlayan ve cevaplandıran sinir sistemi, karmaşık gelişim ve düzenleme süreçleri içermektedir. Sinir sistemi, organlardan ve çevreden aldığı bilgileri sıralayarak yorumlayan ve uygun şekilde elektrofizyolojik cevaplar oluşturan dinamik bir organizasyondur. Oluşturulan fizyolojik cevaplar, organizmanın çevreye en iyi şekilde uyum sağlamasını amaçlamaktadır [1].

Sinir sistemi, nöronlar ve gliyalar olmak üzere iki temel hücre tipinin organizasyonel ağlarından oluşmaktadır. Nöronlar, hassas bir şekilde haberleşmeyi sağlamak üzere geniş bir fizyolojik ağ oluşturan elektrofizyolojik hücreler olarak bilinirken gliyalar, nöronları ve nöronların mikroçevresini hem doğrudan hem de dolaylı olarak koruyan destek hücreler olarak bilinmektedir [2].

Sinir sisteminin kendi içinde ve diğer sistemlerle haberleşmesinde görev alan birçok reseptör tanımlanmıştır. Reseptörler, dışarıdan gelen uyarıyı, sinir sistemine uygun bir dile çevirmektedir ve ligand denilen biyokimyasal moleküllerle haberleşme sağlamaktadır [1]. Ligandı tarafından aktive olan bir reseptör, biyofiziksel ve biyokimyasal etkilerle diğer reseptörleri aktive ya da inaktive etmektedir [1, 2]. Bir reseptör birden fazla liganda sahip olabilmektedir ve bu ligandların fizyolojik dengesi (örneğin konsantrasyon dengesi), tek reseptör üzerinden bile farklı fizyolojik cevaplara sebep olabilmektedir [3, 4]. Sinir sistemindeki reseptörler iyon dengesi, nörojenez, apoptoz, nörotransmitter taşınımı, nöroproteksiyon, nöronal göç, aksonal büyüme ve onarım, miyelinasyon, sinaptogenez gibi birçok fonksiyonda görev almaktadır [1-2]. Çeşitli nedenlerle reseptör-ligand ilişkilerinin bozulması, nörofizyolojik bozukluklara ve nörodejeneratif hastalıklara neden olabilmektedir [5].

Canlılarda sinir sistemi gelişimi bir aşamaya kadar devam etse de yenilenme ve onarım, belli bir derecede yaşam boyu devam etmektedir [6-8]. Bu devamlılığın sağlanması, sinir sisteminin normal işleyişi için önem taşımaktadır.

2019 yılı itibariyle pandemiye neden olmuş olan Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs-2 (SARS-CoV-2)'nin, merkezi sinir sisteminin (MSS) normal işleyişinde bozukluklar meydana getirdiği bildirilmiştir [9-11]. Bu bağlamda SARS-CoV-2'nin

MSS'ne sızabileceği öne sürülmektedir. Bunun yanında, zoonotik bir koronavirüs türü olan SARS-CoV-2'nin çok sayıda reseptörle ilişki kurabileceği raporlanmıştır [12, 13]. Bu reseptörler arasında, nörojenez, nöroproteksiyon, aksonal büyüme ve modülasyon, nöronal göç gibi fizyolojik süreçlerde rol alan Nöröpilin-1 (Nrp-1) reseptörü, ayrıca Toll Benzeri Reseptör-4 (TLR4) gibi sinir sistemi immünitesinde rol oynayan reseptörler bulunmaktadır [14, 15].

Nrp-1, tüm omurgalılarda bulunan, birden fazla ligand bağlama alanına sahip bir transmembran reseptörüdür [16]. Yapılan az sayıda çalışma, Nrp-1 reseptörünün ligand bağlama alanı ile SARS-CoV-2 Spike proteinin birimlerinden biri olan S1 proteininin etkileşime girdiğini göstermiştir [14, 17]. Bunun yanında, literatürde yakın zamanda SARS-CoV-2 ve S1 proteini kaynaklı nöronal hasarları gösteren çalışmalar dikkat çekmektedir. Yapılan bir çalışmada, SARS-CoV-2'nin hipokampal nörojenez potansiyelinin kaybına neden olduğu; diğer bir çalışmada ise Spike proteininin hipokampal nöron yoğunluğunu azalttığı bildirilmiştir [18, 19]. Ayrıca, birbirini destekleyen iki çalışmadan birinde S1 proteini kaynaklı distrofik nöritler tespit edilmiş, diğerinde ise Spike varyantlarının dendritik uzunluğu ve uzantı sayılarını azaltarak nöronal morfolojiyi bozduğu bildirilmiştir [20, 21]. Öte yandan, SARS-CoV-2'nin potansiyel reseptörlerinden biri olan; özellikle immün sistemde hasar ve patojen bildiren bir reseptör olan TLR4'ün; Spike proteini kaynaklı sinaptik kayıplara ve bilişsel bozukluğa neden olduğu bildirilmiştir [22]. Ek olarak, TLR4 aracılığıyla nöroinflamasyonu arttırdığı tespit edilen S1 proteininin, bu nedenlerle merkezi sinir sistemine patolojisinde etkili olabileceği raporlanmıştır [23].

Yapılan bu tez çalışması kapsamında, SARS-CoV-2 Spike proteininin birimlerinden biri olan S1 proteininin ve hedef reseptörleri olduğu bildirilmiş olan Nrp-1 ve TLR4 inhibitörlerinin (sırasıyla EG00229 ve TAK242) nöronal hücreler üzerindeki etkileri araştırılmış ve bu etkiler karşılaştırılmıştır. Literatürde S1 proteini, Nrp-1 ve TLR4 inhibitörlerinin hem direkt hem de kombine bir şekilde sinir sistemindeki fizyolojik süreçlere olan etkilerini karşılaştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu doğrultuda, bu tez kapsamındaki çalışmalarda, bir insan hücre hattı olan SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri tercih edilmiştir. Hem nöroblastoma aşamasındaki hem farklılaşma aşamasındaki hem de farklılaşmayı tamamladıktan sonraki SH-SY5Y hücrelerine uygun konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda S1 proteini, Nrp-1 inhibitörü ve TLR4 inhibitörü uygulanmıştır ve elde edilen sonuçlar analiz edilmiştir. Bu kapsamda bu üç maddenin,

nörojenezdeki, aksonal büyümedeki, nöroproteksiyondaki, sinir hasarı sonrasındaki iyileşme üzerindeki etkileri, hücre adezyonu ve nöronal göç üzerindeki etkileri karşılaştırılarak incelenmiştir. Nrp-1 inhibitörünün SARS-CoV-2 enfeksiyonunu azalttığını gösteren çalışmalar bulunsa da bu çalışmalarda nöronal süreçler üzerindeki etkiler incelenmemiştir, yalnızca, Nrp-1'in SARS-CoV-2 enfeksiyonuna olan katkısı konu alınmıştır [14]. Bunun yanında, astrositlerin SARS-CoV-2'nin enfeksiyonuna aracılık ederek nöroinflamasyona ve nöronal işlevsel bozukluğa neden olduğu; Nrp-1 inhibitörünün ise bu enfeksiyonu azalttığı bildirilen başka bir çalışmada ise nöronlar üzerindeki **dolaylı** etkiler ele alınmıştır [24]. Benzer şekilde, TLR4'ün SARS-CoV-2 ile güçlü bir etkileşime girdiği ve çeşitli hasarlara neden olduğunu bildiren çalışmalar bulunsa da bu çalışmalarda nöronal süreçlerdeki dolaylı etkilere odaklanılmıştır [22, 23]. Spike ve S1 proteini kaynaklı nöritik yapıların bozulduğunu gösteren çalışmalarda ise Nrp-1 ve TLR4 konu alınmamıştır [20, 21]. Bu kapsamda, S1 proteini, EG00229 ve TAK242'nin farklı konsantrasyonlarının ve kombinasyonlarının nöronal hücreler ve fizyolojik süreçleri üzerindeki **doğrudan** etkilerinin benzerlik açısından incelenip karşılaştırılması *tezin özgün değerini* oluşturmaktadır.

Tez çalışması sonucunda elde edilen veriler, SARS-CoV-2'nin ya da sinir sistemine sızan S1 proteininin, sinir sistemindeki patofizyolojik etkilere doğrudan Nrp-1 fonksiyonunu bozarak sebep olabileceğini göstermiştir. Buna karşın, TLR4 reseptörünün S1 proteini ile direkt etkileşmesinin bu etkiler üzerinde doğrudan bir rolü olmadığını göstererek bu doğrultuda yapılacak olan gelecek çalışmaların önünü açmıştır. SARS-CoV-2'nin hedefinde olan ve sinir sisteminde aktif rol oynayan bu iki reseptörden Nrp-1'in inhibisyonunun S1 proteininin etkilerini azalttığı görülürken, TLR4'ün inhibisyonunun doğrudan herhangi bir etkisi görülmemiştir. Bu bulgu, SARS-CoV-2'nin sinir sistemindeki hasarlarını önlemek için tasarlanabilecek ilaç ve teröpatik ajan çalışmalarına ışık tutacaktır. Tüm bu bulgulara ek olarak bu tez çalışması, Nrp-1 ve TLR4'ün doğrudan ya da dolaylı olarak ilişkili olabileceğini göstermiştir. Bu bulgu, bu iki reseptörün ilişkisi hakkında kapsamlı çalışmaların gerekliliğini göstermiştir. Tüm bunların yanında bu çalışma, sinir sistemini hedef alan virüslerin ve viral parçacıkların, nöronal kök hücrelerdeki ve nöronlardaki çeşitli fizyolojik süreçleri Nrp-1 ve ilgili reseptörlerin fonksiyonlarını bozarak **doğrudan** etkileyebileceği öngörüsünü kazandırmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sinir Sistemi

Canlılar, yaşamlarının devamı için kendi iç organizasyonu ve yaşadığı çevre hakkında her an bilgi almak zorundadır. Fizyolojik bir sistem tarafından alınan bu bilgiler; işlenir, depolanır, yorumlanır ve uygun şekillerde cevaplandırılır. Canlının yaşamsal ve çevresel farkındalığını oluşturan bu sisteme *sinir sistemi* adı verilmektedir. Sinir sistemi, işlevlerini impuls (uyartı) denilen “elektrofizyolojik bir dil” kullanarak yerine getirmektedir [1]. Canlının iç ortamından veya çevresinden alınarak uygun bölgelere taşınan uyarıların kombinasyonu ile organize yorumlar ve cevaplar (düşünce, kas kasılması, hormonal salgı vb. fonksiyonlar) oluşturulmaktadır.

Sinir sistemi, temel olarak nöronlar ve gliyalar olmak üzere iki tip hücreden oluşmaktadır. Nöronlar, elektrofizyolojik devreleri oluştururken, gliyalar ise bu devrelerin korunmasında görev almaktadır [2].

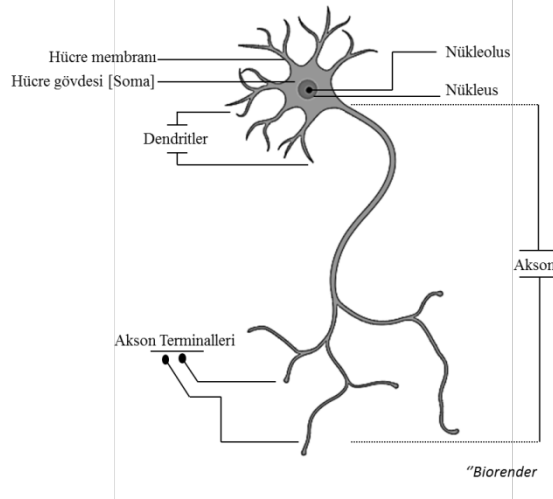
2.1.1. Nöronların Yapısı ve Fizyolojik Özellikleri

Nöronlar, canlının iç ortamından ve çevresinden gelen elektrofizyolojik uyarıları alan, taşıyan ve uygun şekilde işleyen hücrelerdir. Uyarıları ileten projeksiyon nöronları, getirici (afferent) ve götürücü (efferent) olarak isimlendirilmektedir. Merkezde gruplanmış olan nöronlara ise ara nöron (internöron) adı verilmektedir [25].

Nöronlar, nörofibril denilen iplikler içermektedir. Değişken yapıya sahip nörofibriller, nöron boyunca dağılım göstermektedir. Nörofibriller, hücre iskeleti yapısına katılarak hücrenin kararlı şeklinin oluşturulması ve korunması, sinapsların oluşturulması ve sinaptik cisimlerin sabitlenmesi, aksonal büyüme ve impuls iletimi gibi fizyolojik süreçlerde rol almaktadır. Aktin filamentleri (mikrofilamentler), ara filamentler (nörofilamentler), mikrotübüller ve ilişkili diğer proteinler başlıca nörofibriller yapıları oluşturmaktadır [26].

Nöronlar genel olarak bir somadan (hücre gövdesi), dendritlerden ve aksonlardan oluşmaktadır (*Şekil 2.1*). Soma, hücresel işlevler için gerekli olan çekirdek ve organelleri içermektedir. Genellikle dendritler uyarıtı alan ve aksonlara ileten yapılar iken, aksonlar sinir sisteminin çıkış kabloları olarak görev almakta ve uyarıtıyı diğer nöronlara ya da ilgili

hücrelere iletmektedir. İletim, sinaps denilen bağlantı noktaları boyunca yapılmaktadır [25]. Her durumda uyarının alınması, iletimi ve işlenmesi için bu temel yapıların bütünlüğü gerekmektedir.



Şekil 2.1. Bir nöronun genel yapısı.

Nöronlarda akson ve dendrit sayısının, uzunluğunun, çapının ve konumunun değişmesi, anatomik ve fizyolojik farklılıklar yaratmaktadır. Oluşan farklılıklar ise farklı sinir devreleri oluşturmaktadır. Bu doğrultuda nöronlar, işlevine ve bağlandığı anatomik yapılara göre aksonal ve dendritik farklılıklar gösterebilmektedir [1, 2]. Öte yandan, nöronların olağan morfolojisindeki bir hasar devrenin bütünlüğünde bozukluklar meydana getirebilmektedir. Somatik bir hasar ise geri dönüşü daha zor patofizyolojik sonuçlara neden olabilmektedir.

2.1.1.1. Nöronların Çalışma Mekanizması

Hücre zarı potansiyeli, hücrelerin çevresindeki iyonların yükü ve miktarına bağlı oluşan biyofiziksel bir parametredir [27]. Hücreler, değişen mikroçevre içeriği ve dolayısıyla artan entropiye karşı yapısını kararlı halde tutmak zorundadır. Bu fizyolojik zorunluluk, hücre zarında elektrofizyolojik bir potansiyel oluşturmaktadır. Zar potansiyelini, reseptörler ve iyon kanalları belirlemektedir.

Nöronlarda impuls oluşumu ve taşınımı reseptörler ve aracı moleküller olan nörotransmitterler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Sinapslara salınan nörotransmitterler, post-sinaptik (sinaps sonrası) nöronun nöronal uyarılabilirliğini belirlemektedir. Örneğin, bir nörotransmitterin uygun reseptör bölgesine bağlanması konformasyonel değişikliklere neden olarak iyon kanalının çapını değiştirmektedir [28]. Buna bağlı iyon dağılımı değişmektedir ve polarizasyon süreçleri başlamaktadır. Sonuç olarak, nöronların fizyolojik süreçlerinde reseptörler ve ilişkili proteinler, iyon kanalları, nörotransmitterler, lipitler, iyonlar gibi pek çok etmen etkili olmaktadır.

2.1.2. Sinir Sistemindeki Fizyolojik Süreçler

Fizyolojik süreçler; reseptörler, proteinler, sinyal molekülleri gibi biyokimyasal maddelerin etkileşimleriyle ortaya çıkan “cevapları” içeren fonksiyonlardır. Reseptörler, ligandları ve sinyal molekülleri ile aktifleşen, farklı reseptörleri ya da hücre-içi mekanizmaları aktive eden yapılardır [1]. Bir reseptör birden fazla liganda sahip olabilmektedir ve bu ligandların konsantrasyon dengesi, farklı fizyolojik etkilere sebep olabilmektedir [3, 4].

Böceklerden insanlara kadar tüm sinir sistemlerinde nöronlar ve nöronal devreler, embriyonik gelişimden itibaren onarım ve değişim süreçleri içermektedir. Bunun yanında, sinir sisteminde organize bir şekilde algılama ve cevaplandırma prensibi işlemektedir. Tüm bu süreçler, hücre adezyonu, nörojenez, nöronal göç, aksonal büyüme ve aksonların üç boyutlu modülasyonu, miyelinasyon, sinaptogenez, sinaptik budama, nöronal göç gibi fizyolojik süreçleri kapsamaktadır [1-3]. Bu kapsamda, sinir sisteminin genel işleyişinde reseptörler, indükleyicileri ve ilişkili aktivasyon-inaktivasyon yolları rol almaktadır.

2.1.2.1. Nörojenez

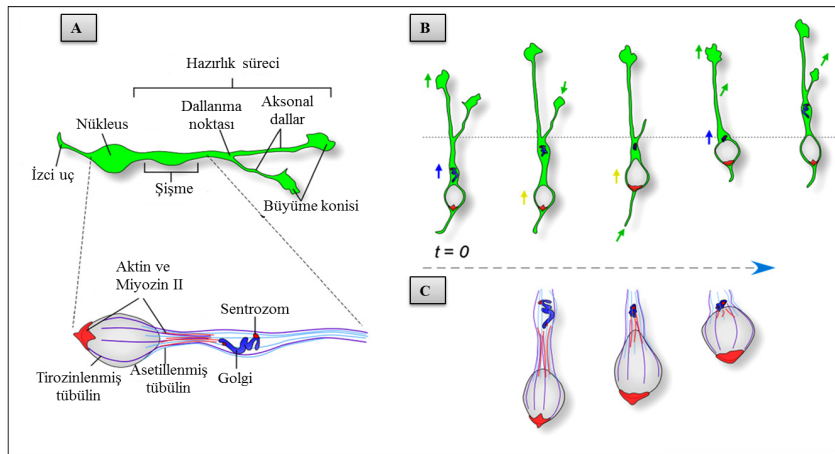
Nöral kök hücrelerin ve progenitör hücrelerin nöronlara farklılaşmasına *nörojenez* adı verilmektedir. Nörojenezin, gelişimini tamamlamış (yetişkin) bir sinir sisteminde daha kısıtlı olsa da yaşam boyu devam ettiği ileri sürülmektedir [6-8, 29]. Bunun yanında, yetişkin bir beyinde yeni nöronların oluşumunun devam edip etmediği literatürde sıkça

tartılmaktadır. Yetişkinlikte nörojenezin subependimal bölgede ve hipokampal dentat girusun subgranüler bölgesinde devam ettiği öne sürülmektedir [30, 31].

Sinir sistemindeki nöral farklılaşmayı programlı spesifik genlerin aktivasyonu ya da inaktivasyonu başlatmaktadır. Sinyal molekülleri, reseptörler aracılığıyla gen ekspresyonunun modülasyonuna etki etmektedir. Kök hücrenin hangi nöron tipine farklılaşacağı sinyal moleküllerinin çeşidine, konsantrasyonuna ve ekspresyon genliğine bağlı olmaktadır [32].

2.1.2.2. Nöronal Göç

Sinir sisteminde gelişim ve farklılaşma devam ettikçe progenitör hücrelerin belirli nörotopografik yapıya ve çeşitli göç faktörlerine uygun göç süreçleri başlamaktadır. Nöronal göç döngüsü ve modülasyonu, aktin ve miyozin-II'nin çekirdeğin arka kısmında yoğunlaşmasıyla başlayarak izci bir aksonal dalın büyüme konisi noktalarından uzamasını takiben golgi ile sentrozom'un rol aldığı perinükleer dilatasyon ve bölgesel hücre şişmesinin ileri hareketiyle devam etmektedir. Farklı izci aksonların dallarının uzaması veya geri çekilmesi, göçün yönünü belirlemektedir. İzci aksonal yapılardan bazılarının geri çekilmesi, bazılarının ise uzatılması göç döngüsü ve sürecini şekillendirmektedir (Şekil 2.2) [33].



Şekil 2.2. Nöronal göç mekanizması (basit gösterim). *A*, Göç sürecine başlayan bir internörondaki yapıların; ilişkili hücre iskeleti ve organellerin şematik çizimi. *B*, Zamana bağlı göç döngüsünün şeması. *C*, Nükleokinez sırasında rol olan Aktin, Miyozin II, Tübülin, Golgi ve Sentrozomların şematik koordinatları. *t*, zaman [33].

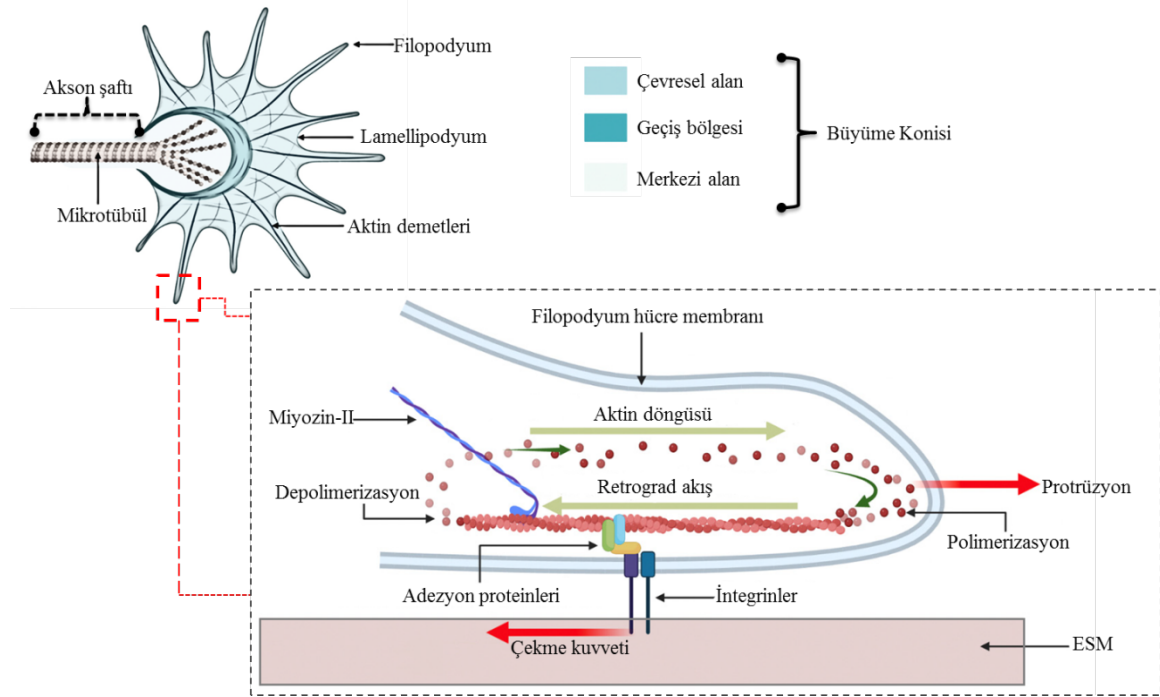
Ek olarak hem nörojenezin hem de nöronal göçün senkronizasyonu önem taşımaktadır. Yetişkin nörojenezi, nöroblast adı verilen olgunlaşmamış nöronların göçleri, olgunlaşması, nöroproteksiyonu ve uygun şekilde entegrasyonu ile devam etmektedir [34]. Bir beyin hasarı sonrası nöroblastlar, kemoatraktanların rehberliğinde hasarlı bölgeye göç ederek nöronlara farklılaşmaktadır. Oluşan nöronların, hasarlı sinir devrelerini telafi edip etmeyeceği ise açık değildir ancak büyüme ilişkili ve nörotrofik faktörlerin büyük ölçüde rejenerasyona katkıda bulunabileceği ileri sürülmektedir [34, 35]. Öte yandan, yapılan bir çalışmada, göç eden nöroblastların mikroçevrelerini keşfetme sürecinin uzun ve zor olduğu tespit edilmiştir. Lezyona doğru bu düşük göç etkinliğinin, yetişkin beyninin kendini yenileme kapasitesinin düşük olma nedenlerinden biri olduğu iddia edilmektedir [35].

2.1.2.3. Aksonal Büyüme ve Aksonların Modülasyonu

Hem farklılaşma aşamasındaki hem de farklılaşmasını tamamlamış olan nöronlar, işlevsel bir sinir devresi oluşturmak zorundadır. Bu sebeple aksonal büyümeyle birlikte uygun dendritik ve aksonal projeksiyon süreçlerine girmektedir. Aksonların çıktığı ve uzadığı noktaya “büyüme konisi” adı verilmektedir [36]. Büyüme konisinde, kalsiyum konsantrasyonu, kinaz, GTPaz aktivitelerine ve çevreden gelen sinyallere bağlı olarak hücre iskeleti düzenlenmektedir [36, 37]. Bu süreçlerde, örneğin aktin modülasyonunda rol alan Büyüme İlişkili Protein 43 (GAP43) gibi modülatör proteinler rol almaktadır [38].

Aksonal büyüme, büyüme konisindeki merkezi çekirdekten uzatılmış çıkıntı boyunca mikrotübüllerin ileri akışı prensibine dayanmaktadır (*Şekil 2.3*). Büyüme konisi, çevredeki moleküler, mekanik ve topografik ipuçlarını reseptörler aracılığıyla algılamaktadır ve aksonal büyümenin yönünü ve hızını kontrol etmektedir. Büyüme konisinden çıkan ve protrüzyon olarak tanımlanan çıkıntı, iki süreç tarafından yönetilmektedir: Aktin döngüsü ve aktin retrograd akışı. Aktin döngüsü; çevresel alanın ön ucundaki aktin polimerizasyonu ile oluşmaktadır ve membranın ileri doğru itilmesine sebep olmaktadır. Retrograd akış; aktinin geriye doğru akışını ifade etmektedir. Aktinlerin akışında Miyozin-II olarak adlandırılan motor protein görev almaktadır. Protrüzyon sürecinde, aktinler adezyon proteinleri aracılığıyla hücre dışı matrikse bağlanmaktadır. Bu bağlanma ile retrograd akış zayıflamaktadır ve akış momentumu substrata iletilmektedir. İletilen momentum; substrat üzerinde çekme kuvveti oluşturmaktadır. Aynı zamanda en ön uçta

aktinlerin akışı ve polimerizasyonu membranı ileri doğru itmektedir. Tüm bu fizyolojik olaylar, büyüme konisinin “Brownian ratchet” mekanizması aracılığıyla ilerlemesine neden olmaktadır [39, 40].



Şekil 2.3. Aksonal büyüme mekanizması [39]. ESM, Ekstrasellüler matriks.

Tüm bunlarla beraber, aksonların varacağı mesafeler kısa veya uzun olabilmektedir. Bu sebeple hassas ve kararlı bir sinyal dengesi gerekmektedir. Denge, aksonları teşvik eden pozitif ve aksonların dönmesine veya durmasına sebep olan negatif fizyolojik belirteçlerin kombinasyonlarıyla sağlanmaktadır [41]. Bu belirteçlere genel adıyla akson kılavuz molekülleri (tanıma molekülleri) adı verilmektedir.

Ayrıca, yetişkin sinir sisteminde aksonal yaralanmalar (aksotomi) meydana gelebilmektedir [42]. Gelişmekte olan sinir sisteminde olduğu gibi bu durumda da aksonal büyüme, onarım ve uygun şekilde aksonal projeksiyon gerekmektedir.

2.1.2.4. Nöroproteksiyon

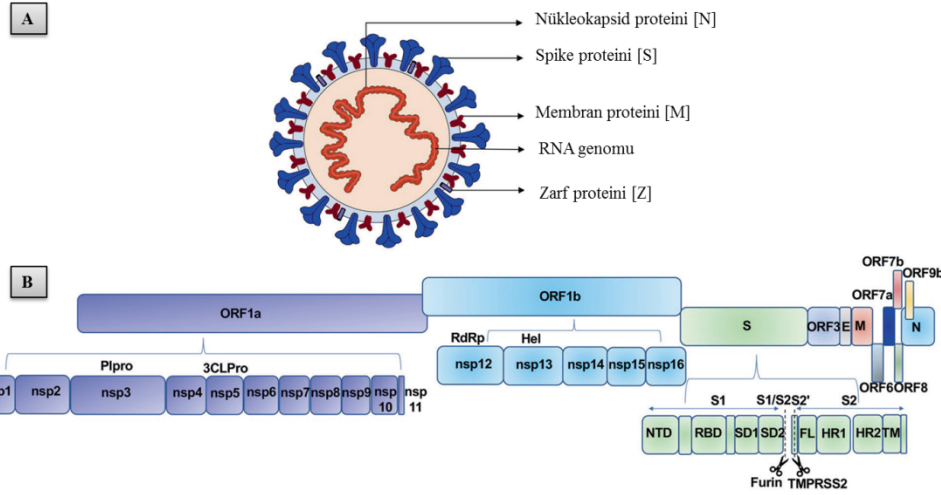
Nörojenez sonucu oluşan nöronun, nörona özgü proteinleri ifade etmesi ve elektrofizyolojik işlevlerini doğru bir şekilde yerine getirmesi gerekmektedir. Farklılaşma sonrası oluşan hatalı ve istenmeyen nöronal hücreler, apoptoz gibi programlı hücre ölüm mekanizmalarıyla ortadan kaldırılmaktadır [43]. Sağlıklı nöronların ise yaşam boyunca *nöroproteksiyon (nöronal sağkalım)* denilen bir süreçle hayatta kalması sağlanmaktadır. Tüm bu süreçlerde, beyin mikro ortamından gelen dış sinyallerle nöronal iç sinyallerin etkileşimleri rol oynamaktadır. Bu sinyalleşmeler, nöronal hayatta kalma ya da nöronal ölüm yanlısı yolları meydana getirmektedir. Sinyallere aracılık eden birçok faktör tanımlanmıştır. Örneğin nöron büyüme faktörü, beyin kaynaklı nörotrofik faktör, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü-A (VEGF-A) gibi faktörler apoptozu baskılayarak doğal nöroproteksiyonu teşvik etmektedir [43, 44].

2.2. SARS-CoV-2

2019 yılı itibariyle pandemiye neden olmuş olan SARS-CoV-2, koronavirüslerin betakoronavirüs alt dalında yer almaktadır. Koronavirüsler, çoğunlukla akciğer hücrelerini hedef alan, zarflı ve tek sarmallı RNA virüsleridir [45, 46]. SARS-CoV-2'nin genom düzeyinde SARS-CoV-1 ile yaklaşık %82 nükleotit benzerliği gösterdiği bildirilmiştir [46].

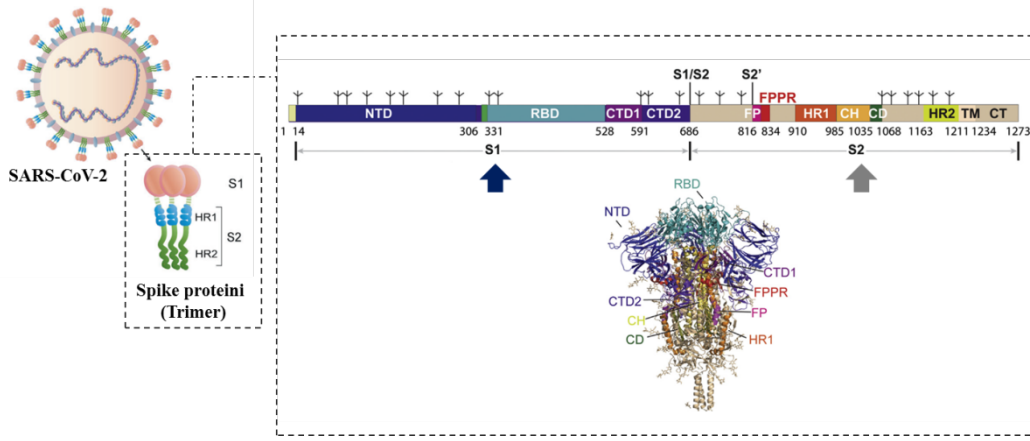
2.2.1. SARS-CoV-2'nin yapısı ve genomu

SARS-CoV-2, dört yapısal protein ve 16 yapısal olmayan proteine sahiptir. Dış yüzeyi membran proteinleriyle ilişkili lipit bir zarfla çevrelenmektedir. Genomu tek sarmallı bir Ribonükleik asit (RNA)'ten oluşmaktadır. RNA'sının yaklaşık üçte biri yapısal proteinleri, büyük bir bölümü ise yapısal olmayan proteinleri kodlamaktadır (*Şekil 2.4*) [47].



Şekil 2.4. SARS-CoV-2'nin yapısı ve genomunun şematik diyagramı. **A**, SARS-CoV-2'nin yapısı. SARS-CoV-2 dört yapısal protein içermektedir; Spike proteini (S), Membran proteini (M), Nükleokapsid proteini (N) ve Zarf proteini (Z). **B**, SARS-CoV-2'nin genomu. Genom, ORF1a-ORF1b-S-ORF3-E-M-ORF6-ORF7 (7a ve 7b)-ORF8-ORF9b-N şeklinde sıralanmaktadır. On altı yapısal olmayan protein (nsp1-11, 12-16) sırasıyla ORF1a ve ORF1b tarafından kodlanmaktadır ve altı yardımcı protein tanımlanmıştır. Plpro; Papain benzeri proteaz, 3CLPro; 3C benzeri proteinaz, RdRp; RNA bağımlı RNA polimeraz, Hel, Helikaz. S kodları: NTD; N-terminal alan, RBD; Reseptör Bağlama Alanı, SD1; Alt Alan 1, SD2; Alt Alan 2, FL; füzyon bölgesi, HR1; Heptad Tekrar 1, HR2; Heptad Tekrar 2, TM; Transmembran alan. Noktalı çizgi Furin ve TMPRSS2 tarafından açığa çıkan S1/S2 ve S2' bölmesini göstermektedir [47].

Konakçı hücreye girişe aracılık eden S proteini, S1 ve S2 alt birimlerinden oluşmaktadır ve viral yüzeyden çıkıntı yapan homotrimerleri oluşturmaktadır (Şekil 2.5) [48, 49]. S1 alt birimi, N-terminal alanı, reseptör bağlama alanı, C-terminal alanı denilen bölgeleri içermektedir. S1, konakçı hücre yüzeyindeki uygun reseptörlere bağlanmaktadır. S2 alt biriminde ise çok çeşitli bölgeler tanımlanmıştır ve konakçı hücre ile virüs zarının kaynaşmasında rol oynadığı bildirilmiştir [49]. Nsp'lerin RNA replikasyonuna aracılık etme, konakçı hücrede hayatta kalma yanlısı sinyal yollarına katılma, bağışıklık sinyal yollarının manipülasyonu gibi çok çeşitli görevleri olan proteinlerden oluştuğu bildirilmektedir [50, 51].

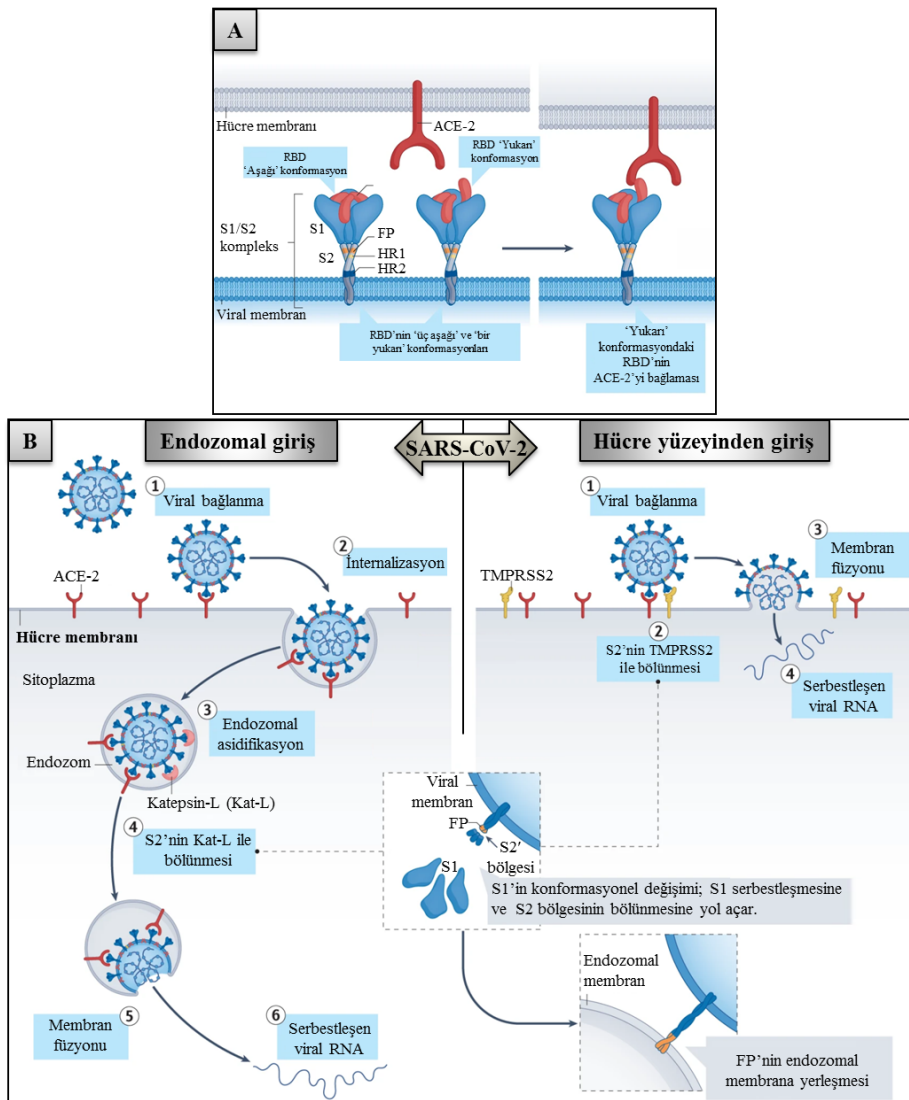


Şekil 2.5. SARS-CoV-2 Spike proteininin yapısı. Spike proteini, S1 ve S2 olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır ve toplam 1273 aminoasit içermektedir. S1 alt birimi (mavi ok), N-terminal Alanı (NTD) [14-306 rezidü –aminoasit kalıntısı-], Reseptör bağlayıcı alan (RBD) [331-528 rezidü], C-terminal Alan 1 (CTD1) [528-591 rezidü], C-terminal Alan 2 (CTD2) [591-686 rezidü] içermektedir. S2 alt birimi (gri ok), Füzyon peptidi (FP) [788-834 rezidü], Füzyon peptid proksimal bölgesi (FPPR), Heptad tekrar 1 (HR1) [910-985 rezidü], Merkezi sarmal bölge (CH) [985-1035 rezidü], Konnektör alanı (CD) [1035-1068 rezidü], Heptad tekrar 2 (HR2) [1163-1211 rezidü], Transmembran alanı (TM) [1211-1234 rezidü], Stoplazmik kuyruk (CT) [1234-1273 rezidü] içermektedir [48, 49].

2.2.2. SARS-CoV-2'nin Hücreye Giriş Mekanizması

Şekil 2.6 A'da gösterildiği gibi, SARS-CoV-2 Spike proteini RBD'nin konformasyonel pozisyonları ve Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim-2 (ACE-2) ile etkileşimi ile hücreye giriş yapabilmektedir [52]. Aynı zamanda Şekil 2.6 B'de gösterildiği gibi de SARS-CoV-2'nin hücreye iki farklı giriş yolu mevcuttur. Viral giriş için Spike proteininin bölünmesi gerekmektedir. Bu bölünmeler S1 ve S2 alt birimlerinin birleştiği yerde ve S2 alt biriminin içindeki S2' bölgesinde gerçekleşmektedir. Virüsün ACE-2'ye bağlanması [adım 1], S1 alt biriminde konformasyonel değişikliklere neden olarak S2 alt birimindeki S2' bölünme bölgesini açığa çıkarmaktadır. SARS-CoV-2 tarafından izlenen giriş yoluna bağlı olarak, S2' bölgesi farklı proteazlar tarafından parçalanmaktadır. Endozomal giriş: Hedef hücrede Transmembran Proteaz Serin 2 (TMPRSS2) ifadesi düşükse, virüs-ACE-2 kompleksi,

Klatrin aracılı endositoz yoluyla endozomlara alınmaktadır [adım 2] ve S2' bölgesi asidik ortamda aktivasyon gösteren Katepsin-L tarafından bölünmektedir [adım 3, 4]. Hücre yüzeyinden giriş: TMPRSS2 varlığında, S2 bölünmesi hücre yüzeyinde gerçekleşmektedir [adım 2]. Her iki giriş yolunda da S2' bölgesinin bölünmesi füzyon peptidini (FP) açığa çıkarmaktadır ve S1'in S2'den ayrılması, S2 alt biriminde konformasyonel değişikliklere yol açarak FP'yi membrana doğru itmektir. Viral ve hücrel membranlar arasındaki füzyonel etkileşim, füzyon poru meydana getirmektedir [adım 3]. Serbestleşen viral RNA, replike olmak üzere füzyon porundan hücre sitoplazmasına salınmaktadır [endozomal giriş –adım 5, 6; hücre yüzeyinden giriş –adım 4] [52].



Şekil 2.6. SARS-CoV-2'nin Hücreye Giriş Mekanizmaları [52].

2.2.3. SARS-CoV-2'nin Reseptörleri

SARS-CoV-2'nin hücreye girişinde temel olarak hücre zarındaki tip I integral proteinlerden biri olan ACE-2 ve hücre yüzeyi proteazlarından biri olan TMPRSS2 rol oynamaktadır [52]. Yapılan çalışmalar, viral girişte bu iki temel yapının haricinde başka reseptörlerin de rol oynadığını göstermektedir (*Şekil 2.7*) [53, 54]. Spike proteininin yapısal ve fizyolojik kapasitesi, çok çeşitli konakçı reseptörleri ve proteinleriyle etkileşime girmesine olanak sağlamaktadır.

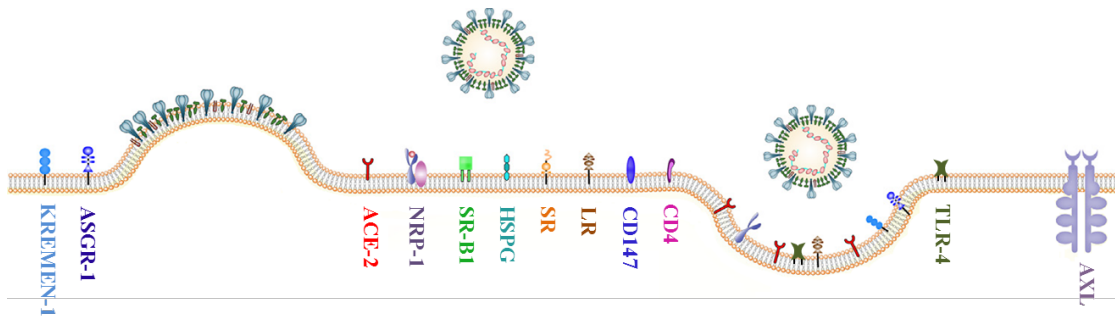
AXL reseptörünün S proteininin N-terminal alanı ile etkileşime girdiği bildirilmektedir [55]. H1299 akciğer hücrelerinde ve insan primer akciğer epitel hücrelerinde AXL'nin baskılanmasının, viral enfeksiyonu önemli ölçüde azalttığı görülmüştür [55]. Öte yandan, CD147'nin de viral girişte ve enfeksiyonda rol oynadığı öne sürülmektedir ancak birbirinden farklı bulgular bulunmaktadır [56]. Ayrıca, patojenlerin tanınmasında ve hücreler arası stabilizasyonda görev alan C tipi lektinlerin; bunun yanı sıra bir hücre iskeleti proteini olan Vimentin'in, S proteini ile ACE-2 bağlantısında yardımcı bağlanma faktörleri olduğu ve viral girişi arttırdıkları iddia edilmektedir [57, 58]. Ek olarak, bazı TLR'lerin hücre dışındaki alanlarıyla S proteini arasındaki afinitenin yüksek olduğuna dikkat çekilmektedir [59]. Bunun yanında, bir çalışmada ASGR1'in ve KREMEN1'in ACE-2 varlığında viral girişi desteklediği, ACE-2 yokluğunda da viral girişe aracılık ettiği; buna ek olarak ASGR1'in, S proteininin hem NTD hem de RBD alanlarıyla etkileşime girdiği, KREMEN1'in ise NTD ve RBD'ye ek olarak S2 alanlarıyla etkileşime girdiği bildirilmektedir [60].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda viral girişe aracılık ettiği tespit edilen Nrp-1 dikkat çekmektedir. Bir çalışmada Nrp-1'in, transforme edilmiş bir hücre hattı olan insan embriyonik böbrek hücrelerinde enfeksiyona aracılık ettiği gösterilmiştir [61]. Destekler nitelikte, *in vitro* ortamda Nrp-1'in bloke edilmesinin SARS-CoV-2 enfeksiyonunu azalttığı bildirilmiştir [14]. Ek olarak, Nrp-1'in Spike proteininin S1/S2 ayrılmasına aracılık ettiği öne sürülmektedir [62]. Tüm bunların yanında hem vasküler sistemde hem sinir sisteminde çeşitli görevlere sahip bir transmembran reseptörü olan Nrp-1'in, Spike proteininin proteolitik işleminden sonra açığa çıkan S1 proteininin C terminalindeki CendR olarak tanımlanan bölgesine ait RRAR adlı peptid ile etkileşime girdiği bildirilmektedir

[63-65]. ACE-2'den farklı olarak, Nrp-1 ile viral proteinin bağlantısı için S1'in açığa çıkması gerekmektedir [63].

Nrp-1'in sinir sistemi fonksiyonlarında görev aldığı göz önüne alındığında tüm bu sonuçlar, SARS-CoV-2 Spike/S1 proteininin Nrp-1'e bağlanarak Nrp-1'in rol oynadığı fizyolojik fonksiyonları bozabileceğini ve SARS-CoV-2 ile ilişkili sinir sistemi bozukluklarının nedenlerinden biri olabileceğini düşündürmektedir.

Tüm bunların yanında, SARS-CoV-2'nin çok sayıda protein ve reseptörle etkileşime girebilmesi güçlü ve yüksek bulaşıcılığının nedeni olarak gösterilmektedir.

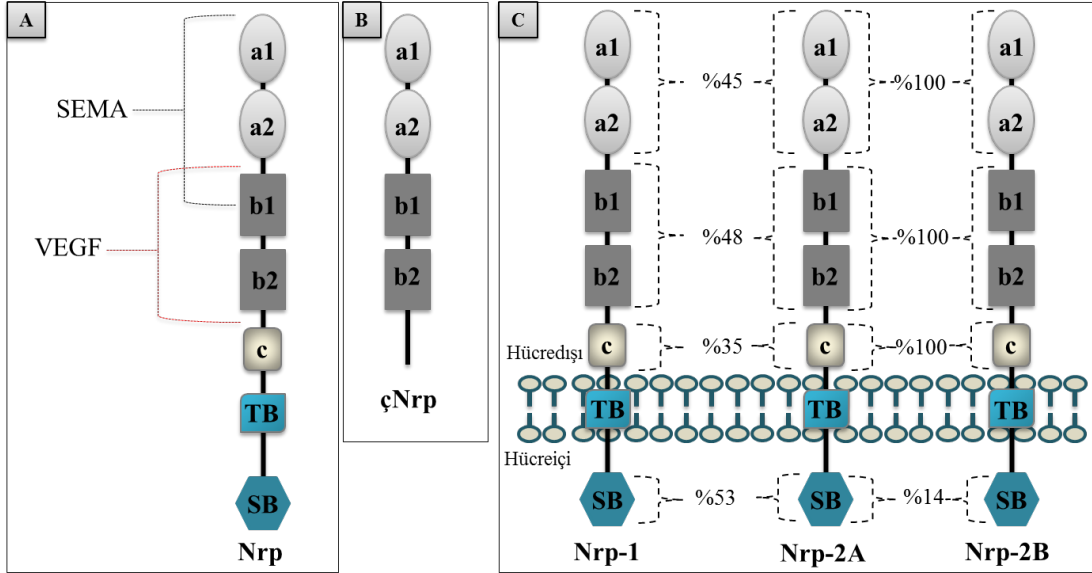


Şekil 2.7. SARS-CoV-2 ana reseptörler, potansiyel alternatif/yardımcı reseptörler veya kofaktörler. *KREMEN1*, Kringle İçeren Transmembran Protein 1; *ASGR-1*, Asyaloglikoprotein Reseptörü-1; *ACE-2*, Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim-2; *NRP-1*, Nöropilin-1; *SR-B1*, Çöpçü Reseptör Sınıf B tip 1; *HSPG*; Heparan Sülfat Proteoglikan; *SR*, Sialik Reseptör; *LR*, Lektin Reseptör; *CD147*, Basigin; *TMPRSS2*, Transmembran Proteaz Serin 2; *TLR4*, Toll Benzeri Reseptör 4; *AXL*, Tirozin-protein kinaz reseptörü UFO [53, 54].

2.2.3.1 Nöropilin-1'in Yapısı ve Fizyolojik Özellikleri

Nrp-1, tüm omurgalılarda korunmuş olan bir transmembran reseptörü olarak tanımlanmaktadır. Homoloğu olan Nrp-2'lerle yaklaşık %40 benzerlik taşımaktadır [66]. Hüresel sinyal aktivasyonuna aracılık etmek için diğer reseptörlerle ko-reseptör oluşturabilme yeteneğine sahip olan Nrp'ler (Nrp-1 ve Nrp-2), ekstrasellüler alanlarının yapısı sebebiyle birden fazla ligandla etkileşime girebilmektedir [67, 68]. Nrp'ler genel olarak, a1-a2 (CUB), b1-b2 (pıhtılaşma faktörü V / VIII) ve c (MAM) olmak üzere üç

ekstrasellüler alan; tek geçişli bir transmembran bölgesi ve hücre içi proteinlerle etkileşime girdiği düşünülen bir sitoplazmik bölge içermektedirler (Şekil 2.8) [69, 70].



Şekil 2.8. Nrp'lerin yapısı, formları ve varyantları.

Şekil 2.8 A'da gösterilen, Nrp'nin genel yapısında, Nrp, a1 ve a2 olmak üzere iki kompleman alan (CUB), b1 ve b2 olmak üzere iki koagülasyon faktörü alanı (FV/FIII), bir c alanı (MAM), bir transmembran bölgesi (TB) ve PDZ (protein etkileşim bölge) alanı bulunduran bir sitoplazmik bölge (SB) bulunmaktadır. B'de gösterildiği üzere, çözünür Nrp (çNrp)'ler a ve b alanları içerirken, transmembran ve sitoplazmik bölge içermemektedir. çNrp'lerin hücrelerde "tuzak reseptör" görevi görerek ortamda bulunan fazla ligandı ve aktifleşmeyi önlediği öne sürülmektedir. C'de, Nrp-1 ve Nrp-2 varyantlarının (Nrp-2A ve Nrp-2B) % aminoasit özdeşliği gösterilmiştir. Nrp-1 ve Nrp-2A/B a, b ve c alanlarının aminoasit dizileri sırasıyla %45, %48 ve %35 oranında benzerlik göstermektedir. Nrp-1 ile Nrp-2A %53 oranında aminoasit özdeşliği göstermektedir. Öte yandan, Nrp-1 SB'si SEA (Serin-Glutamin-Alanin) adı verilen motife sahipken Nrp-2A'da bu motif bulunmamaktadır. Bu nedenle Nrp-2A'nın PDZ alanı içeren proteinlerle etkileşime giremediği öne sürülmektedir. Nrp-2A ve Nrp-2B aynı a, b ve c alanları içerirken, sitoplazmik alanları %86 oranında aminoasit farklılığı göstermektedir (SEMA; Semaforinler, VEGF; Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü) [71].

Başlangıçta Sınıf III Semaforinlerin reseptörü olarak tanımlanan Nrp-1'in, artan çalışmalarla Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) üyelerini de bağladığı gösterilmiştir [71]. Nrp-1'in çok çeşitli ligandları bağlayabilme ve farklı reseptörlerle ko-reseptör oluşturabilme yeteneği, farklı sinyal yollarının aktivasyonuna veya inaktivasyonuna sebep olmaktadır. Sonuçta farklı fizyolojik yanıtlar ortaya çıkmaktadır. Örneğin liganlarından biri olan VEGF-A, damar büyümesine aracılık ederken, Sema3A büyümeyi engellemektedir. Benzer şekilde, VEGF-A aksonal büyümeyi indüklerken, Sema3A büyümeyi durdurarak aksonal rehberlikte negatif etki yapmaktadır [72]. VEGF-A ve Sema3A'nın birbirleriyle rekabet edip etmediği ise açık değildir. Ancak reseptör aracılı endositoz gibi mekanizmalar ve birbirlerine zıt etkiler göz önüne alındığında teorik olarak zamana bağlı bağlantısal bir rekabetin oluşabileceğini düşündürmektedir. Öte yandan, herhangi bir rekabetin olmadığını, her iki ligandın da nöronal davranışın farklı yönlerini yönlendirdiğini iddia eden raporlar da bulunmaktadır [73].

2.2.3.1.1. Nrp-1'in Sinir Sistemindeki Fizyolojik Etkileri

Nrp-1 ilk olarak, *Xenopus* iribaşının optik tektumunda keşfedilmiş ve aksonal filizlenmenin en erken aşaması için gerekli bir aksonal kılavuz molekül reseptörü olarak tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalar, Nrp-1'in vasküler ve nöral fenotipleri etkilediğini göstermektedir. Nrp-1'i devre dışı bırakılmış farelerde, vasküler desenler kusurlu bir dağılım göstermektedir [74]. Buna karşın, Nrp-1'in aşırı ekspresyonu ise afferent sinirlerin MSS'ye kusurlu bir şekilde yönelmesine ve kardiyovasküler bozukluklara sebep olmaktadır [75]. Zebra balığı embriyolarındaki genetik çalışmalar VEGF'in Nrp-1 yoluyla akson büyümesini düzenlediğini göstermiş; Nrp-1'in susturulmasının, motor aksonların anormal dallanmasına ve motor nöronlarda göç kusurlarına neden olduğu bildirilmiştir [76]. Ek olarak, Nrp ekspresyonu devre dışı bırakılan farelerle yapılan bir çalışmada, Nrp yokluğunun gelişmekte olan ön beyinde proliferasyonu olumsuz etkilediği ve internöron sayısını azalttığı bildirilmiştir [77]. Bunun yanı sıra, Nrp-1 reseptörünün, komissural akson sıralamasını destekleyen bir akson kılavuz reseptörü olarak doğrudan retinal gangliyonik nöronlara etki ettiği ve dolaylı olarak nörovasküler ko-desenlemeyi sağlayarak optik yol gelişiminin düzenlenmesinde ikili bir rolü olduğu gösterilmiştir [78]. Tüm bunlara ek olarak, Nrp'lerin hücre adezyonunda rol oynadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

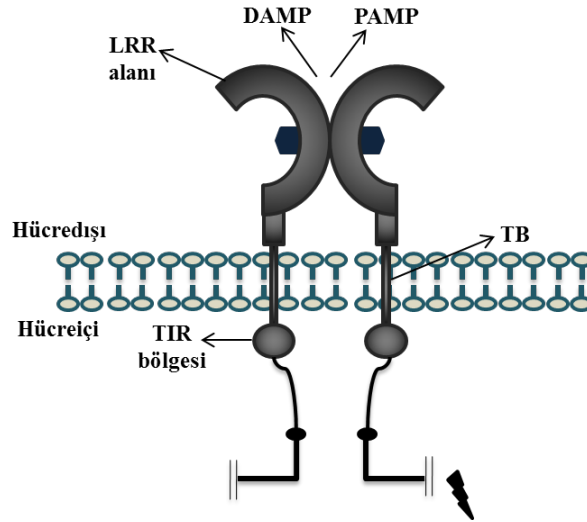
Yapılan bir çalışmada Nrp-1'in VEGFR-1 ile etkileşiminin endotelial hücrelerin hücre dışı matrise yapışmasında rol oynadığı bildirilmiştir [79]. Eski bir *in vivo* çalışmada ise, Nrp'lerin nöronal devrelerin oluşumu sırasında hücre yapışma molekülü olarak işlev gördüğü gösterilmiştir [80].

Yapılan çalışmalar ve son kanıtlar Nrp-1'in; hücre adezyonu, nörojenez, nöroproteksiyon, nöronal fenotipin oluşturulması, aksonların üç boyutlu büyümesi ve düzenlenmesi, nöronal göç gibi fizyolojik fonksiyonlarda rol oynadığını göstermektedir. Tüm bunların yanında Nrp'lerin bu rollerde tam olarak hangi yolları aktive ettiği henüz aydınlatılamamıştır.

2.2.3.2 TLR'lerin Yapısı ve Fizyolojik Özellikleri

TLR'ler, özellikle immün yanıtlarda ve patojenlerin tanınmasında hayati rolleri olduğu bildirilen bir reseptör ailesidir. İnflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde, doğuştan gelen veya adaptif immün yanıtların aktivasyonunda doğrudan rol oynadıkları bildirilmiştir [81]. Bunun yanında embriyonik gelişimde, MSS otoimmünitesinde, nörodejenerasyonda, aksonal ve nöronal kayıplarda rolleri olduğu bildirilmektedir [81, 82].

TLR'lerin keşfi, *Drosophila*'da toll geninin ve proteininin tanımlanması ve işlevsel karakterizasyonuna dayandırılmaktadır [81]. Tip I integral transmembran proteinler olarak kategorize edilen TLR'ler genel itibariyle üç alandan oluşmaktadır: membranın dışında yer alan çoklu hücre dışı alanları, membranı geçen bir orta tek sarmal transmembran bölgesi ve hücre içi sinyalizasyon alanları (*Şekil 2.9*) [83]. Hücre dışı alanları, patojenle ilişkili moleküller için tanıma bölgeleri olarak işlev görürken; hücre içi alanları, hücre içindeki çeşitli adaptör sinyal molekülleriyle etkileşime girmektedir.



Şekil 2.9. TLR4'ün yapısı. TLR4, çoklu hücre dışı alanlarına (LRR) ve hücre içi sinyalizasyon alanlarına (TIR) sahip dimerik bir transmembran reseptörüdür. DAMP; Hasarla İlişkili Moleküler Kalıplar, PAMP; Patojenle İlişkili Moleküler Kalıplar, LRR; Lösin Açısından Zengin Tekrar, TB; Transmembran bölgesi, TIR; Toll/İnterlökin-1 reseptör.

Günümüzde, omurgasız hayvanlarda 222 TLR, omurgalılarda ise 28 TLR tanımlanmıştır. Memelilerde toplam 13 çeşit TLR [TLR1-13] bulunduğu bildirilmiş, insanların bu reseptörlerden sadece 10 tanesine sahip olduğu raporlanmıştır [84]. Ek olarak, TLR1-9 ve 11'in ligandlarının ve sinyal yollarının çoğunun bilindiği, TLR10, 12 ve 13'ün biyolojik rolünün halen net olmadığı öne sürülmüştür.

TLR'ler genel olarak yabancı madde tanıma sensörü ve immün yanıt tetikleyici olarak işlev görmektedir [84].

2.2.3.2.1. TLR4'ün Sinir Sistemindeki Fizyolojik Etkileri

MSS'ndeki immün savunmada görev alan mikroglia, astrosit gibi hücrelerde ve nöral hücrelerde TLR'lerin ifade olduğu bildirilmiştir. Ek olarak TLR'lerin nöroinflamasyonun indüklenmesi ve sürdürülmesinde rol aldığı gösterilmiştir [84, 86].

MSS ile ilgili birçok hastalığın patogenezinde TLR'ler için "iki ucu keskin kılıç" benzetmesi yapılmıştır [86].

Genellikle motor koordinasyon bozukluğu şeklinde kendini gösteren ve nörodejeneratif bir hastalık olan Parkinson hastalığını konu alan bir çalışmada, Parkinson hastalarının beyinlerindeki substantia nigra ve putamen gibi bazı bölgelerde TLR4 ve adaptör proteininin ekspresyon artışı bildirilmiştir [86]. Aynı çalışmadaki *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, TLR4'ün Parkinson hastalığında etkin bir rolü olduğunu desteklemektedir. Buna karşın, literatürde TLR4'ün nöroprotektif etkileri olduğunu gösteren çalışmalar tartışma yaratmaktadır. BV2 fare mikroglial hücre hattıyla yapılan bir çalışmada, TLR4'ün bloke edilmesi alfa-sinüklein fagositozunun baskılanması ile sonuçlanmıştır. Aynı çalışmada fare beyininde TLR'ün *in vivo* olarak inhibe edilmesi alfa-sinüklein birikmesine yol açmıştır [87]. Bu sonuçlar, nöronlar için toksik olan alfa-sinükleinin mikroglialar tarafından ortadan kaldırılmasında TLR4'ün rolü olduğunu göstermektedir. Yapılan başka bir çalışmada, sıçanlarda beyin hasarından kısa bir süre sonra TLR4 sinyalinin *in vivo* olarak bloke edilmesiyle epileptik nöbete yatkınlığın azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca, yaralanmamış kontrol gruplarında TLR4 sinyalinin blokasyonunun hem ağ uyarılabilirliğini hem de nöbete yatkınlığı arttırdığı bildirilmiştir [88]. Sıçanlarda aksonal yaralanma sonrası ikincil hasarın TLR4 sebebi olduğuna dikkat çeken bir çalışmada, TLR4'ün TAK242 ile inhibisyonunun apoptozu, nöronal ve aksonal hasarı azalttığı bunun yanında gliyal yanıtları düşürdüğü gösterilmiştir [89].

Sonuçlar birlikte ele alındığında, TLR4'ün hem zamana hem de nörofizyolojik hastalıkların mekanizmasına bağlı olarak hem zararlı hem de protektif etkilerinin olduğu görülmektedir.

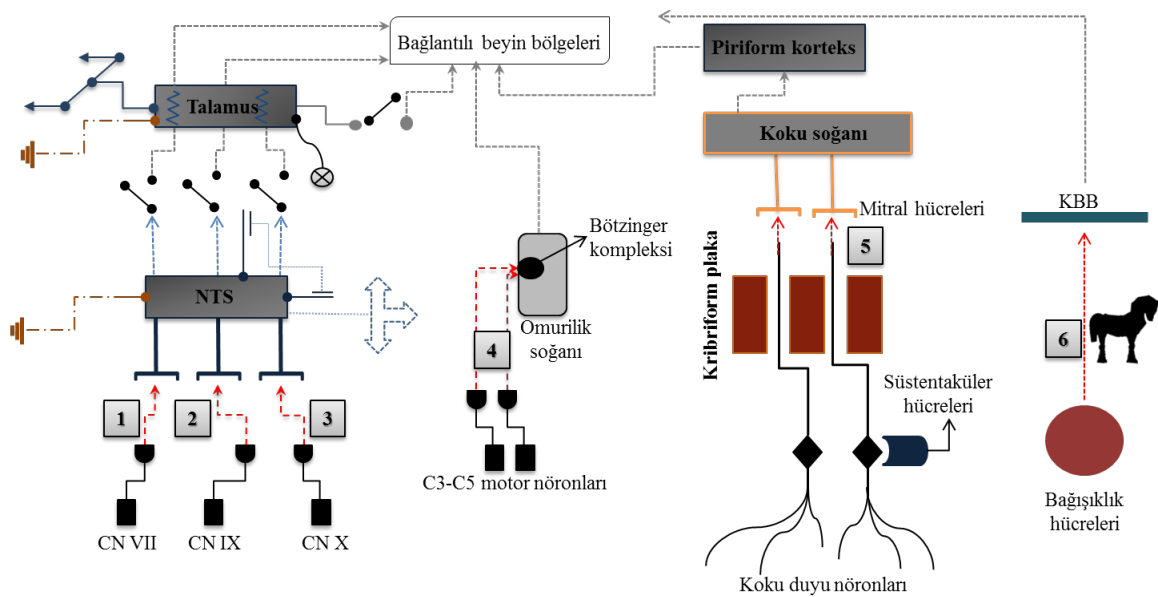
2.2.4. Sinir Sisteminde SARS-CoV-2 ile İlişkili Patofizyolojik Bulgular

SARS-CoV-2'nin, çevresel ve merkezi sinir sisteminde birçok bozukluğa neden olduğu bildirilmiştir [90]. Bunlar arasında baş ağrısı, anosmi, aguzi, menenjit, ensefalit, epilepsi, inme, ensefalopati, akut nekrotizan ensefalopati, görme kaybı, Guillain-Barre Sendromu gibi çevresel ve merkezi sinir sistemi bozuklukları bulunmaktadır [91]. Bu bozukluklar, SARS-CoV-2'nin, dolaylı olarak sinir sistemini etkilediğini ya da doğrudan sinir sistemine sızdığını ve patofizyolojik etkilere sebep olduğunu göstermektedir.

2.2.4.1. SARS-CoV-2'nin MSS'ne Olası Giriş Yolları

Genellikle akciğerleri hedef alan SARS-CoV-2'nin, çevresel ve merkezi sinir sistemine nasıl giriş yaptığı ile ilgili birçok hipotez öne sürülmüştür. Genel olarak virüsün, koku duyuusal nöronlar yoluyla koku ampülünden, trigeminal/vagal sinirlerden veya kan beyin bariyerinden MSS'ne girdiği iddia edilmektedir [92]. Bir çalışmada koku ampülü ile ilişkili olan koku duyuusal nöronların çevresindeki destek hücreler olan süstantaküler hücrelerin SARS-CoV-2 ile enfekte olduğu bildirilmiştir [93]. Yakın tarihli bir çalışmada ise SARS-CoV-2'nin varyantlarının destek hücrelerine ek olarak koku duyuusal nöronlarını enfekte ettiği gösterilmiştir [94]. Ayrıca tat duyuusuna aracılık eden iki kranial sinirde SARS-CoV-2 konakçı reseptörleri olan ACE-2, TMPRSS2 ve Nrp-1 ifadeleri gösterilmiştir [95]. Tüm bunlarla beraber, SARS-CoV-2'nin Spike proteininin insan endotel hücrelerinden oluşturulmuş in-vitro kan beyin bariyeri modelinde, sıkı bağlantıları bozduğu bildirilmiş, farklı bir çalışmada ise farelere intravenöz olarak verilen S1 proteininin kan beyin bariyerini geçebildiği gösterilmiştir [96, 97].

Tüm bu bilgiler ışığında SARS-CoV-2'nin ya da S1 proteininin, sinir sistemine nasıl sızabileceğini gösteren bir diyagram oluşturulmuştur (Şekil 2.10). Bu diyagram, S1 proteininin nöronal hücrelere dolaylı yoldan (örneğin yüksek seviyede inflamasyon ve sitokin fırtınası gibi patofizyolojik etkilerle) zarar verme ihtimalinin dışında, **doğrudan** nöronal hücrelere ulaşarak patofizyolojik etkilere sebep olabileceğini göstermektedir.



Şekil 2.10. SARS-CoV-2'nin merkezi sinir sistemine olası giriş yolları. Diyagram, SARS-CoV-2'nin anterograd veya retrograd trans-sinaptik iletim yoluyla merkezi sinir sistemine girebileceği rotaları göstermektedir. İlk rotalar (1, 2, 3) virüsün tat alma yolunu kullanarak dile ve birçok organa bağlı olan kraniyal sinirlerden trans-sinaptik iletim yoluyla ulaşabildiği beyin sapı bölgesini (NTS; Nükleus traktus solitarius) ve buradan ilerleyebileceği diğer beyin bölgelerini göstermektedir. Diğer bir olası rota (4), SARS-CoV-2'nin solunum yollarıyla ilişkili C3-C5 motor nöronlarını hedef alarak omurilik soğanında bulunan ve solunum düzenlenmesinde rol onayan Bötzinger kompleksine ulaşabileceğini ve buradan ilişkili diğer beyin bölgelerine girebileceğini göstermektedir. 5. rota, koku alma sistemiyle ilerleyebileceğini göstermektedir. 6. rota, bağışıklık hücrelerini enfekte eden virüsün "Truva atı" adı verilen bir süreçle Kan Beyin Bariyerini (KBB) geçerek merkezi sinir sistemine girebileceğini göstermektedir [98]. (CN VII: Yüz siniri; dilin 2/3'ünü innerve eder. CN IX: Glossofarengeal sinir; boğaz, bademcikler ve farinksin ön kısmı ile bağlantılıdır. CN X: Vagal sinir; birçok organla afferent ve efferent bağlantıları olan bir sinir demetidir.)

2.2.4.2. SARS-CoV-2 Spike Proteininin Sinir Sistemine Etkisi

Tek bir SARS-CoV-2'nin yaklaşık 300 monomerik Spike proteini saçabildiği bildirilmektedir [99]. Yapılan çalışmalar, SARS-CoV-2 Spike/S1 proteininin nöronal ve gliyal hücreler üzerinde patofizyolojik etkilere sebep olduğunu göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, SARS-CoV-2'nin hem Trimer hem de S1 proteininin, insan beynindeki endotelial hücrelerde mitokondriyal solunumu azalttığı gösterilmiştir [100]. Diğer bir çalışmada S1 proteininin Nrp-1 inhibitörü gibi davranarak dorsal kök gangliyonlarında ağrı oluşumunu sönmülediği bildirilmiştir [17]. Bunun yanında, Spike proteininin, hipokampal nörojenez potansiyelinin kaybına ve farelerde anksiyetik davranışlara sebep olduğu raporlanırken, yakın tarihli başka bir çalışmada ise Spike proteininin hipokampal nöron yoğunluğunu azalttığı görülmektedir [18, 19]. BV-2 fare mikrogliyal hücre hattıyla yapılan bir çalışmada, S1 proteininin proinflamatuvar sitokinlerin salınımını arttırdığı bildirilmiştir [101]. Ayrıca S1 proteininin nörodejeneratif hastalıklara sebep olan Amiloid beta, α -sinüklein, tau ve prion gibi agregasyona eğilimli proteinlere afinitesinin yüksek olduğu ve bu bağlanmanın nörodejeneratif hastalığa yatkınlık oluşturabilme potansiyeline dikkat

çekilmektedir [102]. Ayrıca, birbirini destekleyen iki çalışmadan birinde S1 proteini kaynaklı distrofik nöritler tespit edilmiş, diğerinde ise Spike varyantlarının dendritik uzunluğu ve uzantı sayılarını azaltarak nöronal morfolojiyi bozduğu bildirilmiştir [20, 21].

Tüm bunlarla beraber, SARS-CoV-2'nin neden olduğu nöronal bozuklukları konu alan az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunun yanında, bu bozuklukların reseptör ve yolak ilişkili nedenlerinin aydınlatılması önem taşımaktadır. ***Bu bağlamda, yapısı ve reseptörleri itibarıyla sinir sistemine potansiyel bir tehdit oluşturan Spike proteini ve alt birimlerinin, sinir hücrelerindeki ve sinir sistemindeki etkilerine dair yeterince kapsamlı çalışma bulunmamaktadır.***

2.3. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücreleri

Nörobiyolojik çalışmalarda birçok *in vitro* deneysel model tanımlanmıştır. Bu modeller için yaygın kullanılan hücre hatlarının bazılarını, primer nöron kültürleri ile B35 ve Nöro2A gibi nöroblastoma hücre hatları oluşturmaktadır [103]. Bu hücre hatları nörofizyolojik çalışmalarda her ne kadar aydınlatıcı olsalar da, bazı çalışmalar için yetersiz kalmaktadır. Özellikle türe özgü olması gereken çalışmalar için yalnızca insan nöron ve gliya hatlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun geçerli sebebi ise türe özgü sinyaller ve reseptörleri içeren bir *in vitro* koşul gereksinimidir. Öte yandan, bir insan hücre hattı olan insan teratokarsinom hücre hattının farklılaştırma faktörleriyle farklılaştırılması, heterojen bir hücre popülasyonu (nöron, bazı gliyalar ve astrosit popülasyonu) oluşturmaktadır [104]. Bu da tek bir hücre tipinin gerektiği çalışmaları kısıtlamaktadır. Buna paralel olarak son zamanlarda, bir insan nöroblastoma hücre hattı olan ve homojen bir nöronal kültür sunan SH-SY5Y hücre hattının kullanımı yaygınlaşmıştır [105].

SH-SY5Y, SK-N-SH denilen hücre hattının üçüncü hattını oluşturmaktadır. SK-N-SH, metastatik bir kemik iliği biyopsisinden elde edilmiştir. SK-N-SH hücre hattından ikinci hücre hattı olan SH-SY hücre hattı türetilmiş ve ardından SH-SY5Y hücre hattı oluşturulmuştur [106].

Heterojen hücre popülasyonlarına sahip SK-N-SH hücrelerinde, N tipi (nöroblastik), I tipi (N ve S ara tipi) ve S tipi (nöronal fenotip göstermeyen tip) olmak üzere üç tip morfoloji tanımlanmaktadır. Ayrıca bu hücre tipleri farklı fizyolojik süreçler içermektedir. N tipi

hücreler, yuvarlak bir görünüm, gevşek yapışma davranışı ve nöritik süreçlerle nöronal bir morfoloji göstermektedir. S tipi hücreler ise daha düz ve büyük olmakla birlikte sıkı bir yapışma davranışı ile schwann ve epitelyal bir görünüme sahiptir. I tipi hücreler, yuvarlak olmakla birlikte fizyolojik davranışları hem N tipine hem de S tipine benzerlik göstermektedir. Hücre kültürü çalışmalarında bir hücre tipinden diğerine geçişin kısa sürede gerçekleşebileceği ve hücre tipi popülasyonlarının kararsız olduğu bildirilmektedir [105, 106].

SH-SY5Y hücrelerinde N tipi hücrelerin nöronlardaki biyokimyasal ve fonksiyonel özelliklere sahip olduğu gösterilmiş, S tipi hücrelerin ise bu fizyolojik süreçleri göstermediği bildirilmiştir. Ayrıca N tipi hücrelerde, katekolaminerjik nöronlarda karakterize bir fizyolojik özellik olan tirozin hidroksilaz ve dopamin- β -hidroksilaz enzim aktivitesi görülürken, S tipi hücrelerin bu aktivitelere sahip olmadığı gösterilmiştir. Dahası N tipi hücreler, olgun bir nöronal hücreye farklılaşabilmektedir [107].

2.3.1. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Nöronal Hücrelere Farklılaştırılma Modelleri

SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin, kültürde olgun nöronal hücrelere farklılaşması için birçok protokol bulunmaktadır. Farklı metodlar ve farklılaştırma faktörü kombinasyonları, dopaminerjik, kolinerjik, adrenerjik gibi spesifik özellikteki nöronları meydana getirmektedir [107].

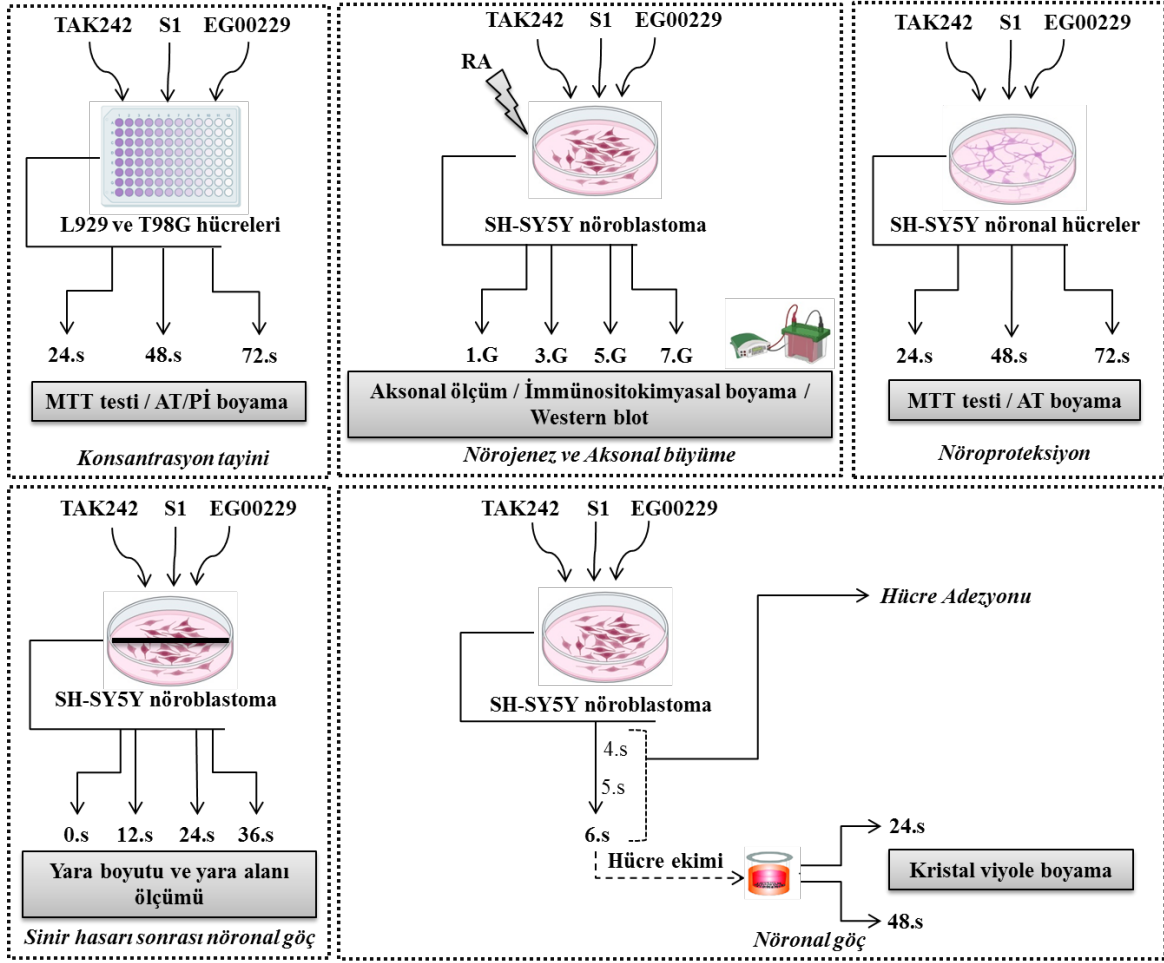
SH-SY5Y farklılaştırma yöntemlerinde yaygın olarak RA kullanılmaktadır [108]. Bunun yanında, kolesterol ile kombinasyon halinde RA, forbol esterleri (örneğin; 12-O-tetradekanoil-forbol-13 asetat), dibütiril siklik adenozin mono fosfat, staurosporin ve çeşitli nörotrofinler (örneğin; Beyin kaynaklı nörotrofik faktör) gibi farklılaştırma ajanları bulunmaktadır. Aynı zamanda farklılaşma, hücrelerin bulunduğu ortamın topografik yapısı ve içeriğine bağlı olarak desteklenebilmekte ve değişebilmektedir [108].

Farklılaşan SH-SY5Y hücreleri, olgun nöronlara özgü olan β III-tübülin, Nörona özgü nükleer protein, sinaptofizin, GAP43, MAP-2, Sinaptik ilişkili protein-97 ve Nörona özgü enolaz gibi nöronal belirteçleri ifade etmektedir [108, 109]. Öte yandan, Gliyal fibriler asidik protein gibi gliyal proteinlerin ifadesi bulunmamaktadır [103].

Tüm bu bilgiler ışığında yapılan tez çalışması kapsamında, S1 proteininin sinir hücrelerinin fizyolojik süreçlerinde Nrp-1 fonksiyonlarını bozarak *doğrudan* olumsuz etki yapıp yapmadığı tartışılmıştır. Bu doğrultuda, S1 proteininin diğer bir hedef reseptörü olan TLR4'ün de bu etkilerde tek başına veya Nrp-1 ile birlikte rolünün olup olmadığı incelenmiştir. Her üç etkenin nörojenez, aksonal büyüme, nöroproteksiyon, nöronal yara hasarı iyileşmesi, hücre adezyonu ve nöronal göç üzerindeki etkileri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, tez çalışması kapsamında yapılan deneysel çalışmalar özetlenmiştir (*Şekil 3.1*). Çalışmada öncelikle SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin ikilenme zamanları tespit edilmiştir. Bu aşamayı takiben SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri RA ile nöronal hücrelere farklılaştırılmıştır. Hücrelerin nöronal bir fenotipe ve fizyolojiye farklılaştığı immünohistokimyasal metod kullanılarak doğrulanmıştır. Devam eden süreçte, hücrelere uygulanacak olan maddelerin uygun konsantrasyonları saptanmıştır. Bu doğrultuda, öncelikle L929 ve T98G hücrelerine SARS-CoV-2 Spike/S1 proteininin (S1), Nrp-1 inhibitörü (EG00229)'nün ve TLR4 inhibitörü (TAK242)'nün belirlenen konsantrasyonları uygulanmıştır. Konsantrasyon aralıkları önceden yapılan çalışmalar doğrultusunda belirlenmiştir [17, 20, 23, 110]. Konsantrasyonların uygulanması ile sitotoksik olmayan konsantrasyonlar tespit edilmiştir. Sonrasında SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerine RA ile birlikte deney grupları uygulanmış ve grupların *nörojenez* üzerine etkileri MAP-2 immünohistokimyasal boyaması yapılarak ve protein seviyesi ölçülerek incelenmiştir. Aynı zamanda nöritik morfoloji incelenmiş, *aksonal uzantıların* uzunluk ölçümü yapılmış ve GAP43 seviyesi tespit edilmiştir. Diğer bir aşamada, maddelerin SH-SY5Y nöronal hücrelerinde *nöronal sağkalım* üzerindeki etkileri MTT ve AT/Pİ ikili boyama yöntemi ile analiz edilmiştir. Diğer deney aşamasında, nöroblastoma hücreleri ile monolayer ortamda yara hasarı oluşturulmuş ve maddelerin *yara iyileşmesi* üzerindeki etkileri incelenmiştir. Ek olarak, *hücre adezyonu* üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır ve benzer şekilde bu maddelerin *nöronal göç* üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.



Şekil 3.1. Deneysel çalışmaların özet şeması (s; saat, G; gün).

3.1. Kimyasal Malzemeler

Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) (P4417- 50TAB, SigmaAldrich, Almanya), Penisilin/ Streptomisin (P/S) (Katalog no: 3810-74-0 SigmaAldrich, Almanya), Fetal Sığır Serumumu (FBS) (Katalog no: S1810- 500, Biowest ABD), Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Nutrient Mixture F-12 (DMEM- F12) (Katalog no :L0092-500, Biowest,ABD), %0.25 Tripsin-EDTA (Katalog no: 9002-07-7, SigmaAldrich, Almanya), Dimetil sülfoksit (DMSO) (Katalog no: D2650, SigmaAldrich, Almanya), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Katalog no: 298-93-1, SigmaAldrich, Almanya), İzopropil alkol (Katalog no: 109634, Merck Milipore), Akridin Turuncusu (AT) (Katalog no: 65-61-2, SigmaAldrich, Almanya), Propidyum İyodür (PI) (Katalog no: 25535-16-4, SigmaAldrich, Almanya), Paraformaldehit (Katalog no: 30525-89-4, Merck Milipore), Tripan mavisi (Katalog no: L 6323, Biochrom AG, Almanya), all-trans Retinoik asit (RA) (Katalog no: 302-79-4, Cayman, ABD), anti-MAP-2 Antikoru (Katalog no: ab11268, Abcam, Birleşik Krallık), Goat anti-Mouse IgG Texas Red (Katalog no: sc-2781, Santa Cruz, ABD), Büyüme İlişkili Protein 43 (GAP43) (Katalog no: PA5-7929, Thermo Scientific, ABD), Triton X-100 (CAS Number: 9002-93-1, SigmaAldrich Almanya), SARS-CoV-2 Spike/S1 protein (S1, His Tag) (Katalog no: Z03485, GenScript, New Jersey, ABD), Trifluoroasetat tuzu (EG00229) (Katalog no: 1210945-69-9, Cayman, ABD). Resatorvid (TAK242) (Katalog no: 243984-11-4, Cayman, ABD), Western Blot deney seti (Bio-Rad, ABD), Glisin, Amonyum persülfat, Sodyum dodesilsülfat (Sigma Aldrich, Almanya), Opti-Protein XL Marker (Katalog no: G266, abm, Kanada)

3.2. SH-SY5Y İnsan Nöroblastoma Hücrelerinin Proliferasyon Eğrisinin Çıkarılması, Nöronal Hücelere Farklılaştırılması ve Karakterizasyonu

3.2.1. Hücrelerin açılması ve çoğaltılması

**SH-SY5Y hücre hattı (ATCC), 8. pasajda Türkiye Şap Enstitüsü'nden dondurulmuş olarak satın alınmış ve laboratuvarımızda sıvı azot içinde (-197°C) saklanmıştır. Kriyo tüp içinde dondurulmuş olan SH-SY5Y hücreleri, steril sıcak su banyosunda (37°C'de) çözündürülmüştür. Çözülen hücre süspansiyonu 800 RPM'de 5 dakika santrifüj edilerek %10 FBS ve %1 P/S içeren %50 DMEM ve %50 DMEM / Ham's F12 ile T75 kültür kabına alınarak standart kültür koşullarını sağlayan etüvde (37°C, %5 CO₂, %95 O₂) inkübe edilmiştir. %80-90 yoğunluğa ulaşan hücreler pasajlanmıştır.*

****%10 FBS ve %1 P/S içeren %50 DMEM ve %50 DMEM / Ham's F12 besiyeri bundan sonraki kısımlarda, "besiyeri"; buna ek olarak 10 µM RA eklenen besiyeri ise "farklılaştırma besiyeri" olarak adlandırılacaktır.****

3.2.1.1 Hücrelerin Pasajlanması

%80-90 yoğunluğa ulaşan hücreler üzerinden besiyeri uzaklaştırılmıştır ve bir kez PBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkamayı takiben 1.5 mL %0.25 Tripsin-EDTA eklenerek standart kültür koşullarını sağlayan etüvde (37°C, %5 CO₂, %95 O₂) 3-5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Kültür kabının yüzeyinden ayrılan hücreler üzerine 2 mL %10 FBS içeren besiyeri eklenerek tripsinin inhibisyonu sağlanmıştır. Elde edilen serumlu besiyeri ile tripsin karışımındaki hücre süspansiyonu tüpe alınarak 800 RPM'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Yoğunluk farkıyla dibe çöken hücre peleti üzerindeki süpernatant uzaklaştırılmıştır ve pelet üzerine %10 FBS içeren besiyeri eklenerek homojenize edilmiştir. Hücreler yoğunluklarına göre iki ya da üç flaska pasajlanıp, standart kültür koşullarını sağlayan etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

Hücrelerin bir kısmı daha sonra kullanılmak üzere dondurulmuştur.

3.2.1.2 Hücrelerin Dondurulması

Dondurma işlemi için pasajlama işlemindeki aynı protokol tekrar edilmiş, pelet halde elde edilen hücreler %95 FBS / %5 DMSO ile süspanse edilerek kriyo tüpe alınmıştır. Bu aşamayı takiben hücreler kademeli olacak şekilde soğutularak sıvı azota kaldırılmıştır. Yeteri kadar hücrenin elde edilmesi ve hücrelerin yedeklenmesi amacıyla belirli aralıklarda aynı işlemler tekrarlanarak hücrelerin çoğaltılması ve stoklanması sağlanmıştır.

3.2.2. Hücre Proliferasyon Eğrisinin Çıkarılması

%80-90 konfluent hale gelen hücreler tripsinizasyon ile kaldırılarak Neubayer lamı ile sayılmıştır. Sayımı takiben altı kuyucuklu kültür kaplarına başlangıç sayısı 5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde %10 FBS içeren besiyeri ile ekim yapılmıştır. Ekim yapılan saat 0. saat olarak kabul edilmiştir. Her kuyucuktaki hücreler 24 saat sonrasında takiben 10 gün boyunca tripan mavisi boyama yöntemi kullanılarak Neubayer lamı üzerinde 6 tekrar olacak şekilde sayılmıştır. 10 gün boyunca %10 FBS içeren besiyeri ile iki günde bir besiyeri değişikliği yapılmıştır. Hücrelerin ikilenme zamanı: $1 / [3.32 \times (\log T1 - \log T0) / 24]$ formülüyle hesaplanmıştır ve büyüme eğrisi grafiği çıkarılmıştır. Tripan mavisi sadece membran bütünlüğü bozulmuş olan ölü hücreleri mavi renkte boyamaktadır. Bu bağlamda mavi renk alan hücreler sayıma dahil edilmemiştir.

3.2.3. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Nöronal Hücrelere Farklılaştırılması

Farklılaştırma besiyeri hazırlamak için 10 mg RA stoğundan 0.0015 g tartılarak 1000 µL DMSO içinde çözdürülmüştür ve uygun şekilde alikvatlanmıştır. Stoktan 4 µL çekilmiştir ve üzerine 196 µL %3 FBS içeren besiyeri eklenerek 100 µM RA stoğu elde edilmiştir. Bu aşamayı takiben uygulamalar için her seferinde taze olarak 10 µM RA ve %3 FBS içeren besiyeri (farklılaştırma besiyeri) hazırlanmıştır.

%80-90 konfluent hale gelen hücreler tripsinizasyon ile kaldırılarak Neubayer lamı ile sayılmıştır ve 96 kuyucuklu kültür kabına 8×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ekimi takiben hücrelere farklılaştırma besiyeri ile yedi gün boyunca muamele edilmiştir. İkinci ve beşinci gün besiyeri yenilenmiştir. Besiyeri tazeleme işleminde kuyulardan 85 μL besiyeri alınmış ve üzerine 100 μL RA içeren besiyeri eklenmiştir.

Yedinci günün sonunda karakterizasyon basamağına geçilmiştir.

3.2.4. Karakterizasyon

Ortamdan besiyeri uzaklaştırılmasını takiben kuyucuklar PBS ile yıkanmıştır. Hücreler soğuk metanol ile 5 dakika fikse edilmiştir. Ardından PBS'te hazırlanmış %0.1 Triton-X-100 ile üç dakika muamele edilmiştir. PBS ile yıkama sonrası %10 Animal Free Blocker ile 20 dakika bloklama yapılmıştır. PBS ile tekrar yıkama sonrası kuyucuklara 100'er μL 1:2000 oranında dilüe edilmiş anti-MAP-2 antikoruna eklenerek $+4^\circ\text{C}$ 'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra PBS ile yıkamayı takiben 1:400 oranında dilüe edilmiş "Goat anti-mouse IgG Texas Red" sekonder antikoruna ile oda sıcaklığında bir saat inkübasyona bırakılmıştır. Ayrıca 4',6 diaminidino-2-fenilindol (DAPI) ile çekirdek boyaması yapılmıştır. 460-490 ile 545-580 nm dalga boylarındaki ışık altında inverted mikroskopta (Olympus IX70, Japonya) hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

3.3 Konsantrasyon tayinleri

** Tez çalışması kapsamında kullanılacak malzemelerin konsantrasyonlarının tayininde, sitotoksosite deneylerinde sıkça tercih edilen hücre hattı olan L929 fare fibroblast hücre hattı (ATCC) ve insan gliablastoma hücre hattı olan T98G (ATCC) hücre hattı kullanılmıştır.*

3.3.1. Konsantrasyonların Hazırlanması

250 µL PBS ile %10 gliserol karışımı içinde bulunan 100 µg S1 proteini oda sıcaklığında çözdürülmüştür ve 10'ar µL olacak şekilde kriyo tüplere aliatlanmıştır. 10 mg stok EG00229'dan 2.1 g tartılmıştır ve 343 µL DMSO'da çözdürülerek 10 mM'lık stok elde edilmiştir. 5 mg stok TAK242 ise, 1398.98 µL DMSO içinde çözdürülmüş ve 10 mM stok elde edilmiştir. Çözelti içinden 10 µL alınmıştır ve üzerine 90 µL besiyeri eklenerek 1 mM'lık stok elde edilmiştir. Kalan stok, 50'şer µL olacak şekilde aliatlanmıştır.

S1 proteini, EG00229 ve TAK242 konsantrasyon aralıkları daha önce yapılan çalışmalarda kullanılan konsantrasyonlar referans alınarak belirlenmiştir [17, 20, 23, 110]. Tüm konsantrasyonlar %10 FBS ve %1 P/S içeren DMEM/F12 içinde hazırlanmıştır. S1 proteini için 25, 50, 100 ve 200 ng, EG00229 için 20, 50, 100, 200, 300 ve 400 µM ve TAK242 için 3, 5, 10, 15 ve 30 µM olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.3.2. Deney Gruplarının Kurulması ve Konsantrasyonların Uygulanması

L929 ve T98G hücreleri %10 FBS ve %1 P/S içeren DMEM/F12 ile aynı protokollerle çoğaltılmıştır. %80-90 yoğunluğa gelen hücreler tripsinizasyon ile kaldırılarak Neubayer lamı ile sayılmıştır. Sayımı takiben her iki hücre hattı için 96 kuyucuklu kültür kaplarına 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ekim sonrası hücreler kontrol edilmiştir ve hazırlanan konsantrasyonlar her bir grup için altı tekrarlı olacak şekilde uygulanmıştır.

EG00229 ve TAK242 deney gruplarında pozitif kontrol gruplarına ek olarak DMSO grupları oluşturulmuştur. Pozitif kontrol grubunda %10 FBS, %1 P/S içeren DMEM/F12 uygulanmıştır. DMSO grubuna ise %10 FBS, %1 P/S içeren DMEM/F12'ye ek olarak 1/1000 oranında DMSO uygulanmıştır.

3.3.3. Hücre Canlılık Analizi

3.3.3.1. MTT Testi

MTT reaktifi, monotezolyum tuzu olarak bilinmektedir. Temel olarak canlı hücrelerdeki dehidrogenazlar tarafından MTT'nin indirgenmesi, MTT halkasının bozulmasına ve formazan adı verilen ve suda çözünmeyen menekşe mavisi renge bir molekülün oluşmasına neden olmaktadır [111]. Bu kapsamda MTT testi, hücre canlılık analizlerinin ve metabolik aktivite ölçümlerinin temelini oluşturmaktadır.

Konsantasyonların uygulanmasından sonra 24, 48 ve 72. saatlerde MTT testleri yapılmıştır. L929 ve T98G hücrelerinden farklı konsantrasyonlar içeren besiyeri uzaklaştırılmış ve %10 oranında MTT solüsyonu içeren serumsuz besiyeri kuyucuklara eklenerek 2-4 saat boyunca 37°C, %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda hücrelerin üzerinden MTT solüsyonu uzaklaştırılmış ve izopropil alkol kullanılarak formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. 570 nm'de ELİSA okuyucu (µQuant™, BiotekW Instruments Inc, ABD) cihazında absorbans okutulmuştur.

3.3.3.2. AT/Pİ Boyaması

AT, hidrofobik bir boya olarak bilinmektedir. Hücre zarını hızlı bir şekilde geçebilmektedir ve lizozomda birikebilmektedir. Aynı zamanda DNA ve RNA'ya bağlanmaktadır ve yeşil ışık yaymaktadır. Propidyum iyodür ise sağlam hücre membranlarından geçememektedir ve membran bütünlüğünü kaybeden hücrelerde DNA'yı interkalize ederek kırmızı veya turuncu ışığa neden olmaktadır. Hücrelerin AT ve Pİ ile birlikte boyanması nükleer morfoloji (perinükleer kromatin yoğunlaşması, nükleer çökme ve nihai parçalanma) hakkında bilgi sağlamaktadır [112]. Organize bir kromatin yapısına sahip tek tip yeşil çekirdekli hücreler *canlı hücre*; membran bütünlüğünün kaybına bağlı olarak organize yapıya sahip tek tip turuncu veya kırmızı çekirdekli hücreler *nekrotik*; düzensiz yapılı, parçalı bir morfolojideki yeşil çekirdekli hücreler *erken apoptotik*; aşırı derecede yoğunlaşmış veya parçalanmış kromatine sahip turuncu veya kırmızı çekirdekli hücreler ise *geç apoptotik* olarak kabul edilmektedir.

Konsantasyonların uygulanmasını takiben 24, 48 ve 72. saatlerde AT/Pİ boyaması yapılmıştır. Hücreler üzerinden besiyeri uzaklaştırılmıştır. PBS ile yıkamayı tabiken yüzeyi kaplayacak kadar 1:1 oranında hazırlanmış olan AT/Pİ boyası eklenmiştir. 1-2 dakika beklendikten sonra boya ortamdan uzaklaştırılmıştır. Sonraki aşamada PBS ile iki kez yıkamayı takiben 460-490 nm ve 490-630 nm dalga boyundaki ışık altında inverted Mikroskop (Olympus IX70, Japonya) ile 4X ve 10X objektiflerde incelenerek fotoğraflanmıştır.

Her deney grubu fotoğraflarından beş adet seçilmiş ve her birinden rastgele beş alan belirlenmiştir (belirlenen 5 alan her grup için aynı bölgeyi gösterecek şekilde konumlandırılmıştır). Belirlenen alanlar içindeki erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücreler sayılmıştır. [%Apoptotik hücre = $\frac{\text{Toplam Apoptotik Hücre sayısı (Erken + Geç)}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100$] ve [%Nekrotik hücre = $\frac{\text{Toplam Nekrotik Hücre sayısı (Erken + Geç)}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100$] formülleri kullanılarak % apoptoz ve % nekroz oranları hesaplanmıştır.

3.4. SH-SY5Y Deney Gruplarının Kurulması ve Konsantrasyonların Uygulanması

3.4.1. Optimizasyon Çalışmaları

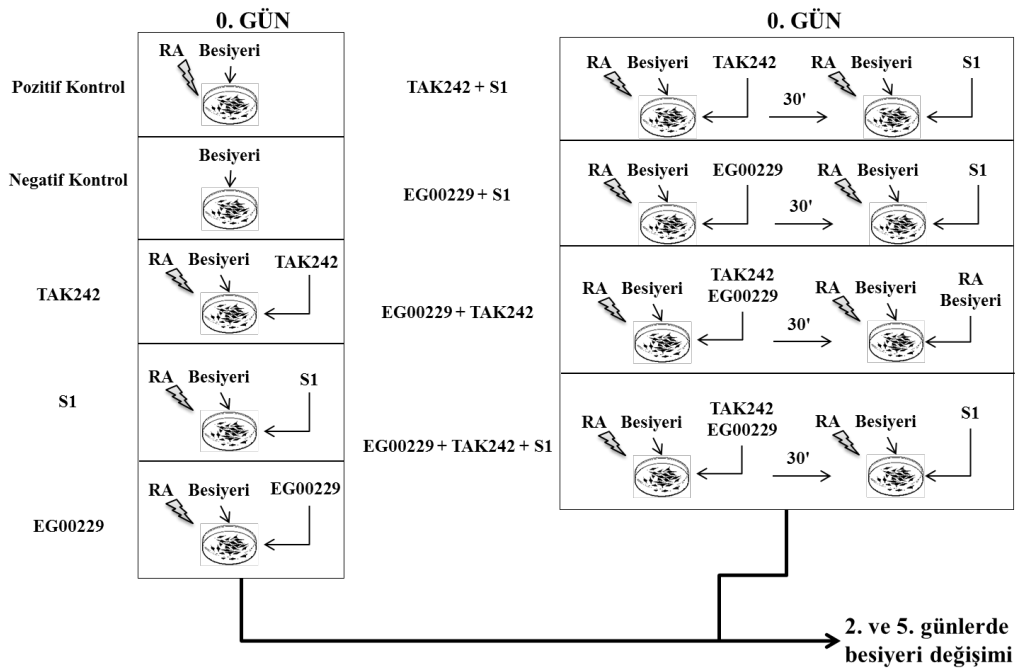
Literatürde SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin 96 kuyucuklu kültür kabına ekim sayıları değişebilmektedir. Bunun yanında, nöronal hücrelere farklılaştırmak ve en verimli nöronal görüntüyü almak için ise farklı ekim sayıları ile farklı yüzdelerdeki FBS konsantrasyonları önerilmiştir [113]. Bu çalışma kapsamında en uygun hücre sayısı ve FBS yüzdesi tespiti için 96 kuyucuklu kültür kabına sırasıyla 2.5×10^3 , 5×10^3 ve 8×10^3 hücre/kuyucuk ekim yapılmıştır. Ek olarak, %1, %3 ve %5 FBS içeren iki farklı besiyeri değişkeniyle optimizasyon deneyleri tasarlanmıştır.

Hücreler 96 kuyucuklu kültür kabına %1, %3 ve %5 FBS içeren besiyeri ile 2.5×10^3 , 5×10^3 ve 8×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekimleri yapılmıştır. 24 saat inkübasyonu takiben belirlenen deney gruplarının ortamları %1, %3 ve %5 FBS içeren farklılaştırma besiyeri ile değiştirilmiştir. İkinci ve beşinci günlerde besiyeri tazelenmiştir. Hücrelerin morfolojileri yedi gün boyunca inverted Mikroskop (Olympus IX70, Japonya) ile farklı objektiflerde incelenmiştir.

Deneyler üç tekrarlı olacak şekilde tasarlanarak yapılmıştır ($n = 3$).

3.4.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi (Nörojenez)

Hücreler 96 kuyucuklu kültür kabı içine 2.5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde %3 FBS içeren besiyeri ile ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyonu takiben pozitif kontrol ve deney grupları için ortam belirlenen konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda madde içeren farklılaştırma besiyeri ile değiştirilmiştir. Negatif kontrole ise yalnızca %3 FBS içeren besiyeri eklenmiştir. Madde ve kombinasyonların uygulanma biçimi Şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.2. Nörojenez deney grupları. Soldaki gruplarda Negatif kontrol grubu haricindeki tüm gruplara farklılaştırma besiyeri ve belirlenen konsantrasyonlar uygulanmıştır. Sağdaki gruplarda ise maddelerin ve kombinasyonlarının uygulamasını takiben 30 dakika sonra ortam değiştirilmiştir. [RA; 10 µM, TAK242; 3 µM, S1; 25 ng, EG00229; 50 µM, 30'; 30 dakika].

[S1], [TAK242] ve [EG00229] gruplarına farklılaştırma besiyeri içinde maddeler saf olarak eklenmiştir. [TAK242 + S1] ve [EG00229 + S1] gruplarında sırasıyla 3 µM TAK242 ve 50 µM EG00229 ile yarım saat ön inkübasyon yapılmıştır.

İnkübasyonu takiben ortam uzaklaştırılmıştır ve ortama 25 ng S1 proteini içeren farklılaştırma besiyeri eklenmiştir. [EG00229 + TAK242] grubunda 3 µM TAK242 ve 50 µM EG00229 birlikte eklenmiştir. Yarım saat inkübasyonu takiben ortam uzaklaştırılmıştır ve ortama yalnızca farklılaştırma besiyeri eklenmiştir. [EG00229 + S1 + TAK242] grubunda ise her iki inhibitörün ön inkübasyonu (30 dakika) sonrası farklılaştırma besiyeri içinde 25 ng S1 proteini eklenmiştir.

İnkübasyonu takiben ikinci gün tüm gruplarda ortamdan 85 µL uzaklaştırılmış ve yerine 100 µL farklılaştırma besiyeri eklenmiştir. Negatif kontrol grubunda ise ortam sadece %3 FBS içeren besiyeri ile değişim sağlanmıştır. Beşinci gün aynı işlemler tekrarlanmıştır.

Deneyler üç tekrarlı olacak şekilde tasarlanarak yapılmıştır ($n = 3$).

3.4.2.1. Farklılaşma Potansiyelinin İmmünositokimyasal Boyama Yöntemi ile İncelenmesi

Şekil 3.2'de açıklandığı üzere gruplar oluşturulduktan sonraki 1, 3, 5 ve 7. günlerde anti-MAP-2 ile immünositokimyasal boyama yöntemi kullanılarak hücrelerin farklılaşma potansiyelleri incelenmiştir. Bunun için 3.2.4. başlığında açıklandığı gibi karakterizasyon işlemi yapılmıştır. Boyama sonrası 460-490 nm ve 545-580 nm dalga boylarındaki ışık altında inverted mikroskopta (Olympus IX70, Japonya) hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

3.4.2.2. Farklılaşma Potansiyelinin Western blot Tekniği ile İncelenmesi

Hücreler altı kuyucuklu kültür kaplarına 2.5×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde %3 FBS içeren besiyeri ile ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyonu takiben deney grupları Şekil 3.2'de gösterildiği gibi oluşturulmuştur. Takiben 1, 3, 5 ve 7. günlerde protein izolasyonu yapılmıştır. Proteinlerdeki MAP-2 seviyeleri WB tekniği kullanılarak aşağıda anlatıldığı gibi ölçülmüştür.

3.4.2.2.1. Protein İzolasyonu

Proteinlerin izolasyonu için, hücreler içerdikleri besiyeri ile mekanik olarak kuyulardan kaldırılmıştır. Toplanan hücre süspansiyonu 1000 RPM'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen pelet üzerinden besiyeri uzaklaştırılmıştır ve PBS eklenerek aynı devir ve süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatan rengi kontrol edilmiştir ve besiyeri kaynaklı pembemsi renk kalmayana kadar aynı santrifüj işlemleri tekrarlanmıştır. Hücrelerin lizisi için etkili bir tampon olan Radyoimmünopresipitasyon deney tamponu (RİPA) içerisine proteinlerdeki disülfid bağlarını kıran bir indirgeyici ajan olarak kullanılan Diklorodifeniltrikloroetan (DTT) ve Proteaz İnhibitörü (PI) eklenmiştir (1 mL RİPA'ya 1 µL DTT ve 15 µL PI). RİPA ile muamele edilen hücre peletleri vorteksledikten sonra buz içerisinde sonike edilmiştir. Süspansiyonlar buz üzerinde toplam 30 dakika olacak şekilde sonike edildikten sonra bekletilmiştir. 13000 RPM'de +4°C'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemini takiben pelet üzerindeki süpernatanlar BCA ve WB testlerinde kullanılmak üzere ayrı ayrı ependorflara alınarak -80°C'ye kaldırılmıştır. 1, 3, 5 ve 7. günlerde aynı işlemler tekrar edilmiştir.

3.4.2.2.2. BCA Yöntemi ile Total Protein Miktarının Ölçülmesi

Saflaştırılan proteinlerin toplam miktarının tespit edilmesi amacıyla BCA yöntemi kullanılmıştır. Bu doğrultuda, BCA için ayrılan örnekler %0.5 Sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid ile 1:40 oranında seyreltilmiştir. 96 kuyucuklu kültür kabına her grup örneğinden üç tekrar ve her kuyucukta 100 µL olacak şekilde ölçüm yapmak üzere hacimler hazırlanmıştır. %0.1 SDS ve 2 mg/mL konsantrasyonlu Albumin ile standart gruplar oluşturulmuştur. 25k MA reaktifi, 24k MB reaktifi ve 1k MC reaktifi oranlarını içerecek şekilde Working Reagent (WR) hazırlanmıştır. Hazırlanan WR solüsyonunun hacmi [(standart sayısı + örnek sayısı) x 3 x 100 µL] formülü uygulanarak hesaplanmıştır. 96 kuyucuklu kültür kabına her gruptan üç tekrar olacak şekilde 100 µL örnek + 100 µL WR yüklenmiştir. Yalnızca 100 µL SDS içeren blank gruplarının üzerine 100 µL WR eklenmiştir. Takiben 37°C'de 120 dakika inkübe edilmiştir. The SpectraMax M2 cihazı kullanılarak 560 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Her bir grup için absorbans değerlerine göre Bradford hesaplama yöntemi kullanılarak protein miktarları hesaplanmıştır. Ölçüm 3 kez tekrarlanmıştır.

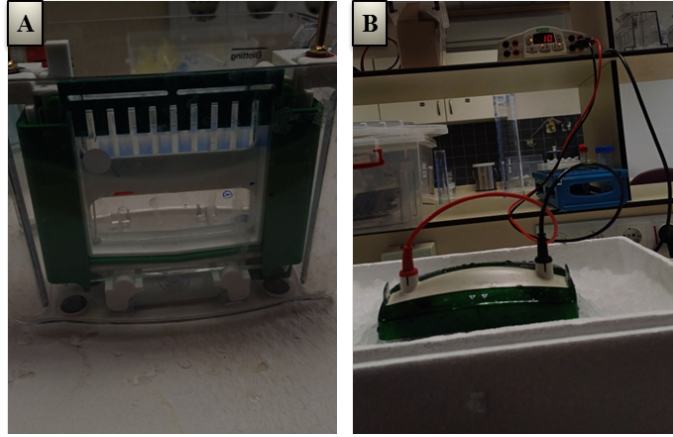
3.4.2.2.3. Western Blot Tekniği ile MAP-2 Seviyelerinin Ölçülmesi

Total protein miktarı tespit edildikten sonra, jel yüklemelerinde her kuyucuğa aynı oranda protein miktarının yüklenmesi amacıyla; her grup için 0.5 mg/mL protein olacak şekilde PBS ile sulandırma yapılmıştır. Bu işlemi takiben deney düzeneğinin kurulması ve jellerin hazırlanması aşamasına geçilmiştir. pH farkı oluşturmak için ‘‘stacking –biriktirme-’’ ve ‘‘separating –ayırma-’’ olmak üzere sırasıyla %4 ve %10 oranlarında iki farklı jel dökülmüştür. Jeller belli oranlarda distile su, Tris-hidroklorid, SDS, akrilamid-bisakrilamid, amonyum persülfat ve tetrametilendiamin karışımı ile hazırlanmıştır. Polimerleşmeyi takiben camlar arasına, ‘‘running buffer -yürütücü tampon- (15 g Tris + 72 g Glisin + 5 g SDS + 800 ml dH₂O)’’ eklenmiştir. Bu işlemi takiben 20 µL 2-merkaptoetanol + 180 µL 4x Laemli Buffer karışımı hazırlanmıştır ve her bir protein örneğine 8 µL eklenmiştir (*Şekil 3.3-A*). Laemli buffer içeren protein örnekleri 3-5 dakika kaynar suda kaynatılmıştır. Ardından her bir kuyucuğa 20 µL protein örneği yüklenmiştir. Ek olarak, proteinlerin hangi aşamaya geldiğini takip edebilmek ve moleküler kütle ayrımı yapabilmek için 5 µL Leadder (Opti-protein XL marker) yüklenmiştir. Bu aşamadan sonra 50 mV ile yürütme işlemine başlanmıştır. Proteinler ayırma jeline geldiğinde voltaj 80 mV’a çıkarılmıştır. İstenen protein aralığına gelindiğinde akım kesilmiştir. Bu işlemi takiben jeller, transfer tamponu (6.04 g Tris + 28.8 Glisin + 200 mL Metanol + 1.6 L dH₂O) içine alınmıştır. Transwell buffer içine alınan jellerin, PVDF membrana sahip olan ve bu sayede tüm proteinlerin yapışmasını sağlayan özel membranlara yapıştırılarak buz üzerinde yerleşimi sağlanmıştır ve gece boyu +4°C’de 10 mA akımda bekletilmiştir (*Şekil 3.3-B*).

İkinci gün primer antikor uygulamasına geçilmiştir. İlk olarak, Tris tamponlu Salin (TBS) 10X + Tween 20 (TBST) [24 g Tris-HCl + 5.6 g Tris-base + 88 g + 900 ml dH₂O] hazırlanmıştır. 100 mL TBST stoğuna 900 mL dH₂O ve 1 mL Tween20 eklenmiştir. Ardından %5’lik Goat serum içeren TBST (bloklama tamponu) ile 60 dakika bloklama yapılmıştır. Bloklama işleminden sonra 3x5 dakika TBST ile yıkama yapılmıştır. Yıkama işleminden sonra bloklama tamponu içinde 1:1000 oranında MAP-2 primer antikor hazırlanmıştır. Primer antikor membran üzerinde bir gece +4°C’de bekletilmiştir.

Üçüncü gün sekonder antikor ve görüntüleme aşamasına geçilmiştir. Membranlar 3x5 dakika TBST ile yıkanmıştır. Bloklama tamponu içinde 1:2000 oranında sekonder antikor

hazırlanmıştır. Sekonder antikor ile bir saat muameleyi takiben 3x5 dakika TBST ile yıkama yapılarak görüntülemeye geçilmiştir. Karanlık ortamda 1:1 oranında western substrat buffer hazırlanmıştır. Membran, hazırlanan solüsyon ile yıkandıktan sonra Odyssey Fc Imaging System (LI-COR) cihazı ile görüntüleme yapılmıştır. Sonuçlar Image J programı ile ölçülmüştür ve analizleri yapılmıştır. Deney tekrarı yapılamamıştır.



Şekil 3.3. WB deney aşamaları. *A*, Kuyucuklara yüklenmiş protein örnekleri. *B*, Proteinlerin membrana geçirilmesi.

3.4.3. Nöronal Farklılaşma Aşamasındaki SH-SY5Y Hücrelerinde Aksonal Büyüme ve Uzantıların İncelenmesi (Aksonal büyüme)

Hücreler sayımı takiben 96 kuyucuklu kültür kabı içine 2.5×10^3 hücre/kuyucuk ve 6 kuyucuklu kültür kabına 2×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde %3 FBS içeren besiyeri ile ekimi yapılmıştır. Deney grupları ve konsantrasyon uygulama işlemleri Şekil 3.2'de gösterildiği yapılmıştır. Deney üç farklı zamanda tekrarlanmıştır ($n = 3$).

3.4.3.1. Aksonal Büyümenin İverted Mikroskop ile İncelenmesi ve Aksonal Uzantıların Ölçülmesi

Deney grupları oluşturulduktan sonraki 1, 3, 5 ve 7. günlerde hücreler inverted mikroskopta (Olympus IX70, Japonya) incelenmiştir. Aksonların 4X, 10X ve 20X objektiflerde fotoğraf çekimi yapılmıştır. Her bir grup için altı farklı fotoğraf görüntüsü

incelenerek seçilen alanlardaki tüm aksonal uzantılar ImageJ programı ile ölçülmüştür. Ölçümlerin ortalaması alınmış ve gruplar arasında karşılaştırma yapılmıştır.

3.4.3.2. Aksonal Büyümenin Western Blot Tekniği ile İncelenmesi

Altı kuyucuklu kültür kabındaki protein izolasyonu ve BCA işlemleri 3.4.2.2.1 başlığında açıklandığı gibi yapılmıştır.

3.4.3.2.1. Western Blot Tekniği ile GAP43 Seviyelerinin Ölçülmesi

Protein izolasyonunu takiben 1, 3, 5. ve 7. günlerde GAP43 seviyeleri WB tekniği ile ölçülmüştür. WB, 3.4.2.2.3 başlığında açıklandığı gibi yapılmıştır. (GAP43, bloklama tamponu içinde 1:1000 oranında hazırlanmıştır.) Deney bir kez tekrarlanmıştır ($n = 1$).

3.4.4. Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinde Nöronal Sağkalımların İncelenmesi (Nöroproteksiyon)

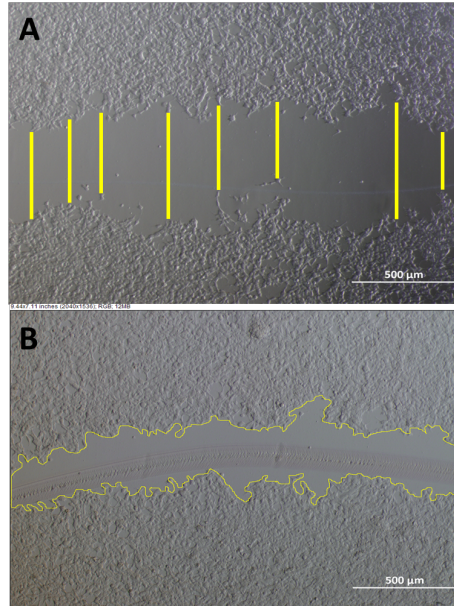
Hücreler sayımı takiben 96 kuyucuklu kültür kabı içine 2.5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde %3 FBS içeren besiyeri ile ekilmiştir. 24 saat inkübasyonu takiben besi ortamı farklılaştırma besiyeri ile değiştirilmiştir. 2. ve 5. günlerde besiyerleri yenilenmiştir. 7. günün sonunda konsantrasyonlar Şekil 3.2'de gösterildiği gibi uygulanmıştır. 24, 48 ve 72. saatlerde MTT testi ve AT boyaması yapılmıştır. Boyama sonrası hücreler 460-490 nm dalga boyundaki ışık altında inverted Mikroskop (Olympus IX70, Japonya) ile 4X ve 10X objektiflerde incelenerek fotoğraflanmıştır. Deney üç farklı zamanda tekrarlanmıştır ($n = 3$).

3.4.5. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Nöronal Göç Potansiyellerinin İncelenmesi (Nöronal Göç)

3.4.5.1. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Yara Modelinde İncelenmesi

Hücreler sayımı takiben 24 kuyucuklu kültür kabı içine 2×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde %3 FBS içeren besiyeri ile ekilmiştir. Ekimi takip eden 24. saatte sarı pipet ucu ile

yaralar (çizikler) oluşturulmuştur. Yara oluşturma aşamasından hemen sonra deney grupları serumsuz besiyeri içerisinde kuyucuklara uygulanmıştır. Negatif kontrol olarak sadece serumsuz besiyeri kullanılmıştır. Pozitif kontrol grubunda ise %3 FBS içeren besiyeri kullanılmıştır. Konsantrasyonlar uygulandıktan hemen sonra (0. saat), 12, 24 ve 36. saatlerde hücrelerin göç potansiyelleri inverted mikroskopta (Olympus IX70, Japonya) incelenmiştir. 4X objektifte fotoğraf çekimleri yapılmıştır. Belirtilen tüm saatlerdeki yara boyutları (μm) ve yara açıklığı alanı (mm^2) ImageJ programı ile ölçülmüştür. *Şekil 3.4-A*'da ölçümün yapıldığı yara boyutu ve *Şekil 3.4-B*'de yara alanının nasıl seçildiği gösterilmiştir. Her grup için 0. saatte oluşturulan çiziklerin ve dolayısıyla yara boyutlarının farklı olacağı dikkate alınarak, 0. saat ile 12, 24 ve 36. saatler arasındaki istatistiksel farklar hesaplanmıştır.



Şekil 3.4. Yara boyutu ve alanının ölçülmesi. **A**, Yara boyutu ölçümü. Sarı çizgilerin başlangıç ve bitiş noktası arasındaki mesafe (μm) ölçülmüştür. **B**, Yara alanının ölçümü. Sarı ile içine alınan yara bölgesinin alanı (mm^2) ölçülmüştür.

3.4.5.2. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Transwell Sisteminde Göç Potansiyellerinin İncelenmesi

Hücreler sayımı takiben 6 kuyucuklu kültür kaplarına %10 FBS ve konsantrasyonları içeren besiyeriyle 1×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Ekimi takiben hücre adezyonunu incelemek üzere 4, 5 ve 6. saatlerde inverted mikroskopla 10X büyütmede fotoğraf çekilmiştir. 6. saatin sonunda hücreler herhangi bir kimyasal uygulanmadan mekanik olarak kaldırılmış ve 800 RPM'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Konsantrasyonları içeren süpernatant atıldıktan sonra pelet serumsuz besiyeri ile süspanse edilmiştir. Her grup için transwell ekim öncesinde Neubauer lamında hücre sayımı yapılmıştır. Bu aşamadan sonra 24 kuyucuklu kültür kabına yerleştirilen 8.0 μm por aralıklarına sahip transwellin iç kısmına 5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 200 μL serumsuz besiyeriyle ekim yapılmıştır. Transwellin dış kısmına ise 600 μL serumsuz besiyeri eklenmiştir. Pozitif kontrol grubunda ise 600 μL %10 FBS içeren besiyeri eklenmiştir. 24 ve 48. saatlerde transwellin alt kısmına göç eden hücreler kristal viyole boyama yöntemi kullanılarak sayılmıştır. Boyama yapmak üzere, transwell filtreleri dikkatlice bistüri yardımıyla çıkarılarak 6 kuyucuklu kültür kabına alınmıştır. Filtrelerin üzerine yüzeyi kaplayacak kadar %10 paraformaldehit eklenerek 20 dakika fiksasyon gerçekleştirilmiştir. Fiksatifin uzaklaştırılmasından sonra yüzeyi kaplayacak kadar kristal viyole (150 μL) eklenmiş ve 20 dakika beklenmiştir. Bu işlemden sonra ortam PBS ile yıkanmış ve hücreler inverted mikroskopta (Olympus IX70, Japonya) incelenmiştir. Deneysel planda gruplar birer kez denenmiştir ($n = 1$).

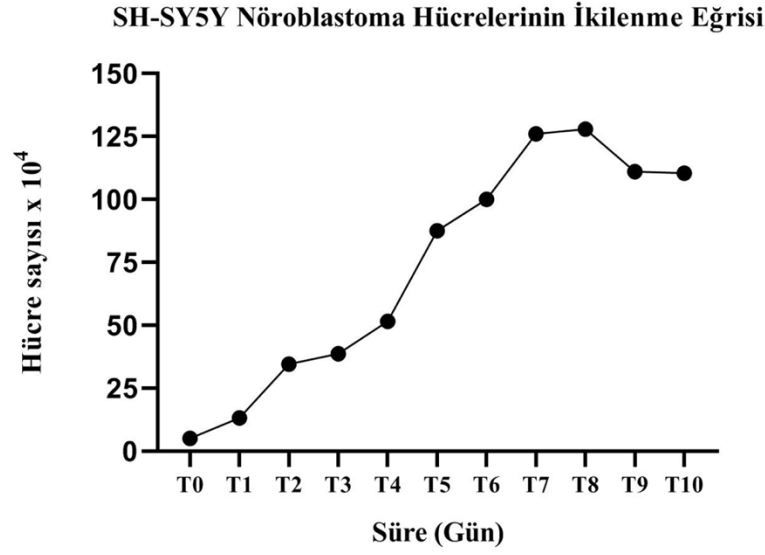
3.5. İstatistiksel Analiz

Tez çalışması kapsamında yürütülen deneysel çalışmalardan elde edilen tüm veriler GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) kullanılarak değerlendirilmiştir. Farklı gruplar arasındaki anlamlılık düzeyleri Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile belirlenmiş olup p değerleri 0.05'ten daha az olan durumlar istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. SH-SY5Y İnsan Nöroblastoma Hücrelerinin Proliferasyon (İkilenme) Eğrisinin Çıkarılması

Tez çalışması kapsamında SH-SY5Y hücrelerinin ikilenme zamanı 17 saat olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Literatürde, SH-SY5Y'nin ikilenme sürelerinin yakın olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalarda ikilenme süresinin 27 ile 55 saat arasında değiştiği bildirilmiştir [114].

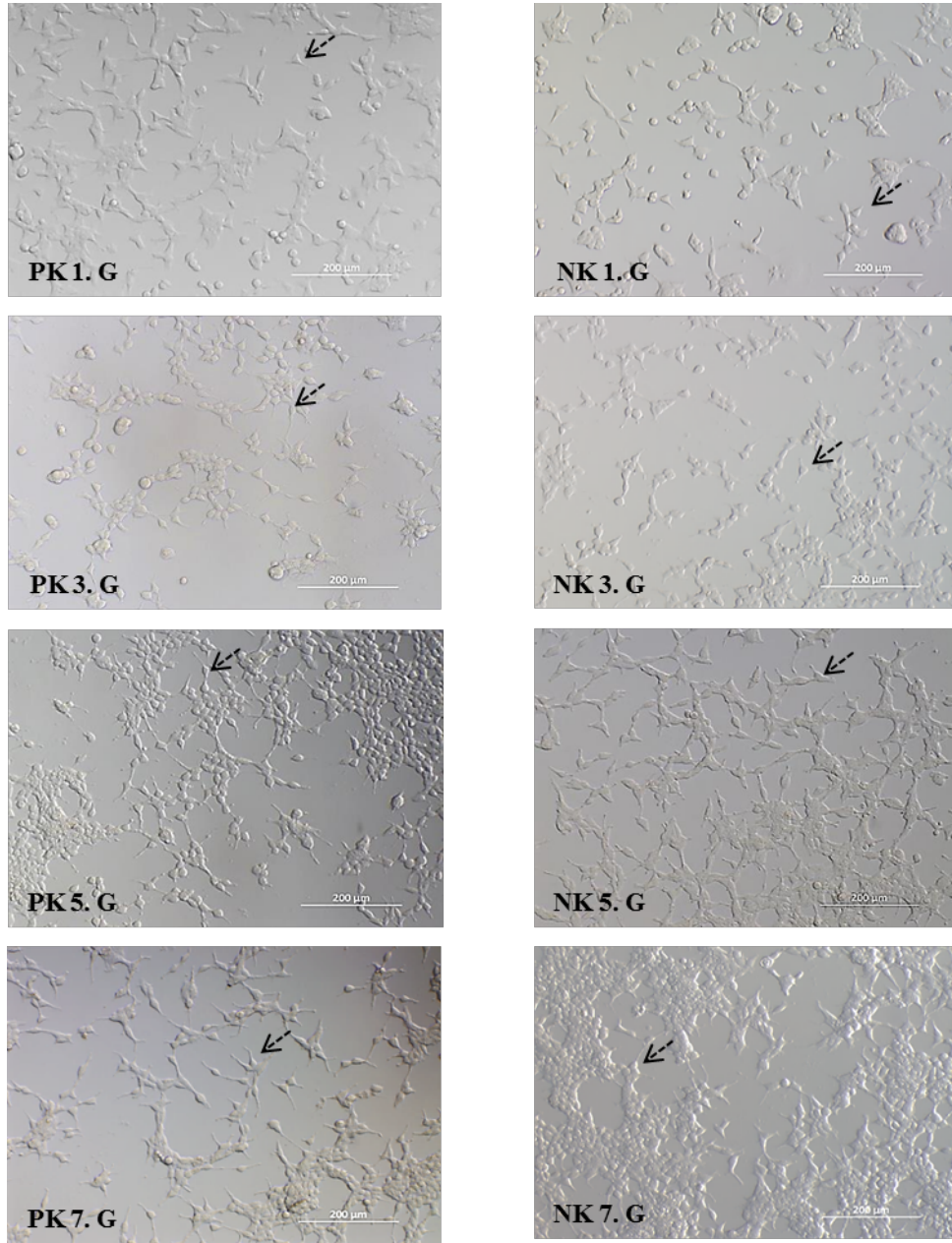


Şekil 4.1. SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin proliferasyon eğrisi grafiği. Hücrelerin ikilenme zamanı $1 / [3.32 \times (\log T1 - \log T0) / 24]$ formülüyle 17 saat olarak tespit edilmiştir.

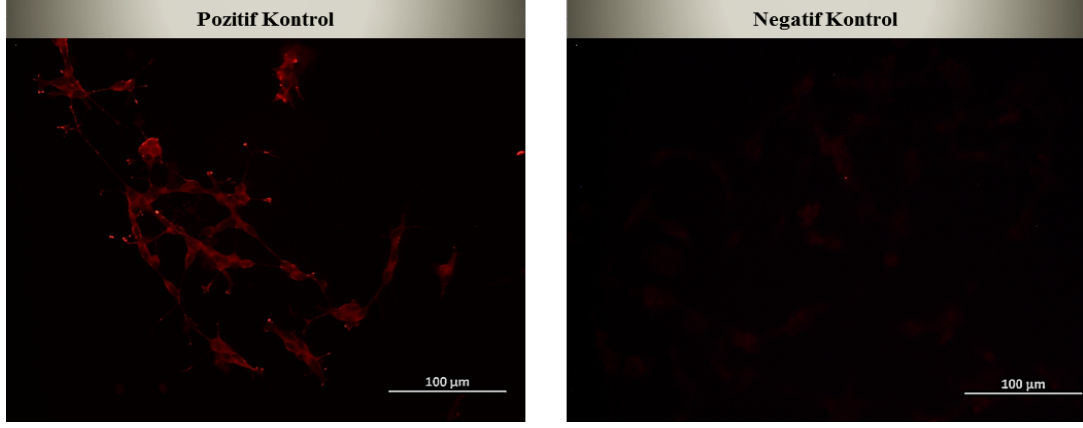
4.2. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Nöronal Hücelere Farklılaştırılması ve Karakterizasyonu

Farklılaştırmayı takiben yapılan morfolojik incelemeler ve immünohistokimyasal boyama, SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin nöronal fenotipe ve fizyolojiye farklılaştığını göstermiştir (Şekil 4.2 ve 4.3). Farklılaştırma protokolü uygulanmayan negatif kontrol gruplarında boyanma gözlenmemiştir (Şekil 4.3). Çalışmalarda farklılaştırma besiyeri olarak çoğunlukla %1 FBS içeren DMEM ortamına ek olarak 10 µM RA kullanılmaktadır [115]. Bunun yanında bazı çalışmalarda %3 oranında FBS'nin de başarılı sonuçlar verdiği

gösterilmiştir [116]. Destekler nitelikte, yapılan tez çalışması kapsamında da %3 FBS'nin nöronal farklılaşmada başarılı sonuç verdiği görülmüştür.



Şekil 4.2. Farklılaştırma besiyeri uygulanmış Pozitif Kontrol (PK) ve besiyeri uygulanmış Negatif Kontrol (NK) hücrelerinin morfolojik görüntüleri. Siyah ok işaretleri aksonal uzantı veren hücreleri ve uzantısını göstermektedir (G; gün).[Büyütme: X10]



Şekil 4.3. anti-MAP-2 ile immünohistokimyasal boyama fotoğrafları. Farklılaştırma besiyeri uygulanmış Pozitif Kontrol [PK] ve besiyeri uygulanmış Negatif Kontrol [NK] grubunda nöronal hücrelerin anti-MAP-2 ile boyanma yoğunluğu. [Primer antikor: anti-MAP-2; 1:2000. Sekonder Antikor: TR; 1:400 (545-580 nm)][Büyütme: X20]

4.3. Konsantrasyon Tayinleri

4.3.1. Sitotoksisite ve Canlılık Sonuçlarının Değerlendirilmesi

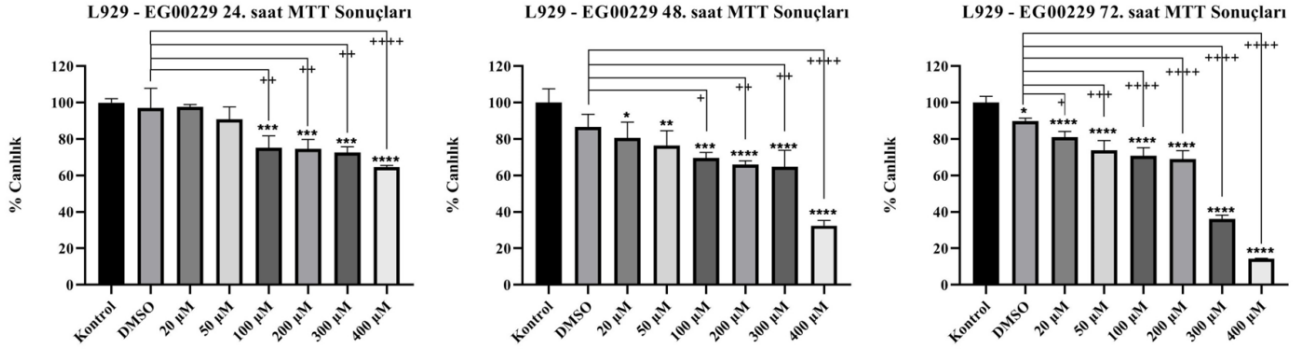
L929 ve T98G hücre hatlarına konsantrasyonların uygulanmasını takiben yapılan MTT testi ve AT/Pİ boyama sonuçları aşağıda başlıklandırıldığı üzere verilmiştir.

4.3.1.1. EG00229 24, 48 ve 72. Saat Uygulamalarının Sitotoksisite Açısından Karşılaştırılması ve Apoptoz/Nekroz Yüzdelerinin İncelenmesi

EG00229'un artan konsantrasyonları L929 hücreleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir toksisiteye neden olmuştur. 24. saatte 100, 200, 300 ve 400 µM konsantrasyonlar hem kontrol hem de DMSO grubuna göre anlamlı sitotoksisite göstermiştir (**; $p \leq 0.005$, ***; $p \leq 0.0005$, ****; $p \leq 0.0001$) (Şekil 4.4). 48. saatte bu konsantrasyonlara ek olarak 20 ve 50 µM konsantrasyonların da diğer gruplara göre istatistiksel olarak daha düşük bir değerde anlamlı bir sitotoksisiteye sebep olduğu görülmüştür (*; $p \leq 0.05$, **; $p \leq 0.005$). Ek olarak, 48. saatte 400 µM'in hücre canlılığını %68 oranında düşürdüğü görülmüştür. 72. saatte ise tüm gruplarda kontrol grubuna göre sitotoksisite istatistiksel olarak anlamlıdır. 72. saatte 300 µM ve 400 µM konsantrasyonlar hücre canlılığını sırasıyla %64 ve %86 oranlarında düşürerek IC50 değeri göstermiştir. Negatif kontrol olan DMSO'nun 24 ve 48. saatlerdeki hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir olumsuz etkisi görülmemiştir. Bu

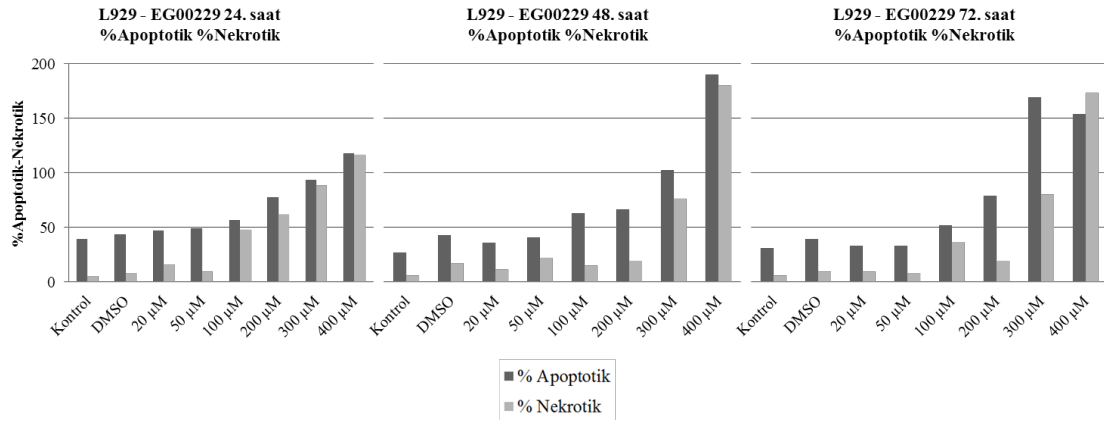
sonuç, EG00229 ve TAK242 maddelerinin çözünmesinde ve ana stok hazırlanmasında kullanılan DMSO'nun bu maddelerin etkilerinde rol oynamadığını göstermektedir. 72. saatte ise negatif yönlü bir istatistiksel fark göstermiştir. Yapılan çalışmalarda EG00229'un 10, 30, 100, 200 µM konsantrasyonları kullanılmıştır [117-119]. Bir çalışmada, Nrp1'in b1 alanındaki hedeflenen cebe bağlandığını göstermek için mutajenez, X-ışını kristalografisi ve Nükleer Manyetik Rezonans spektroskopisi kullanılan diğer bir çalışmada, VEGF-A165'in Nrp-1'e bağlanmasının inhibisyonu ile tutarlı aktivite gösterdiği ve VEGFR2 fosforilasyonunu ve hücre göçünü in vitro olarak azattığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada EG00229'un insan göbek damarı endotel hücrelerinde VEGF-A ile indüklenen VEGFR2 tirozin fosforilasyonunu doza bağlı bir şekilde azalttığı ve maksimum inhibisyonu 100 µM'da gösterdiği raporlanmıştır [120]. Öte yandan, Hep3B ve Huh-7 hücre hatlarıyla yapılan bir çalışmada EG00229'un 50 µM konsantrasyonunun hücre canlılığını neredeyse yarıya düşürdüğü görülmüştür [121].

Bu tez çalışmasında ise 48. saatte 400 µM'ın ve 72. saatte 300 µM ve 400 µM'un, hücre canlılığını %50'den daha fazla azalttığı görülmüştür (*Şekil 4.4*). Ek olarak, 200 µM'un zamana bağlı olarak morfolojik bozukluklar meydana getirdiği tespit edilmiştir. Bu kapsamda, sonuçlarımız literatürde seçilmiş olan konsantrasyonlarla uyumludur. Literatürde EG00229'un sıklıkla 100 µM konsantrasyonu kullanılmaktadır. Sonuçlarımız kapsamında, 24 ve 48. saatlerde 100 µM'ın kontrol ve DMSO gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı sitotoksositeye neden olduğu görülmüştür. 20 µM'ın ise etkisiz olduğu tespit edilmiştir. Bu doğrultuda, yapılacak deneyler için EG00229'un etkili ancak en az toksik konsantrasyonu olan **50 µM konsantrasyonu** seçilmiştir.



Şekil 4.4. EG00229'un farklı konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72. saatteki hücre canlılığı üzerindeki etkisi. [* sembolü; Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı, + sembolü; DMSO grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.] [* , +; $p \leq 0.05$, **, ++; $p \leq 0.005$, ***, +++; $p \leq 0.0005$, ****, ++++; $p \leq 0.0001$]

EG00229'un konsantrasyonlara bağlı apoptotik ve nekrotik hücre sayısında artışa neden olduğu görülmüştür. Her üç zaman diliminde de 200, 300 ve 400 µM konsantrasyonların apoptotik ve nekrotik yolakları arttırdığı görülmektedir (Şekil 4.5). Bu bulgu, MTT sonuçlarıyla uyumludur.

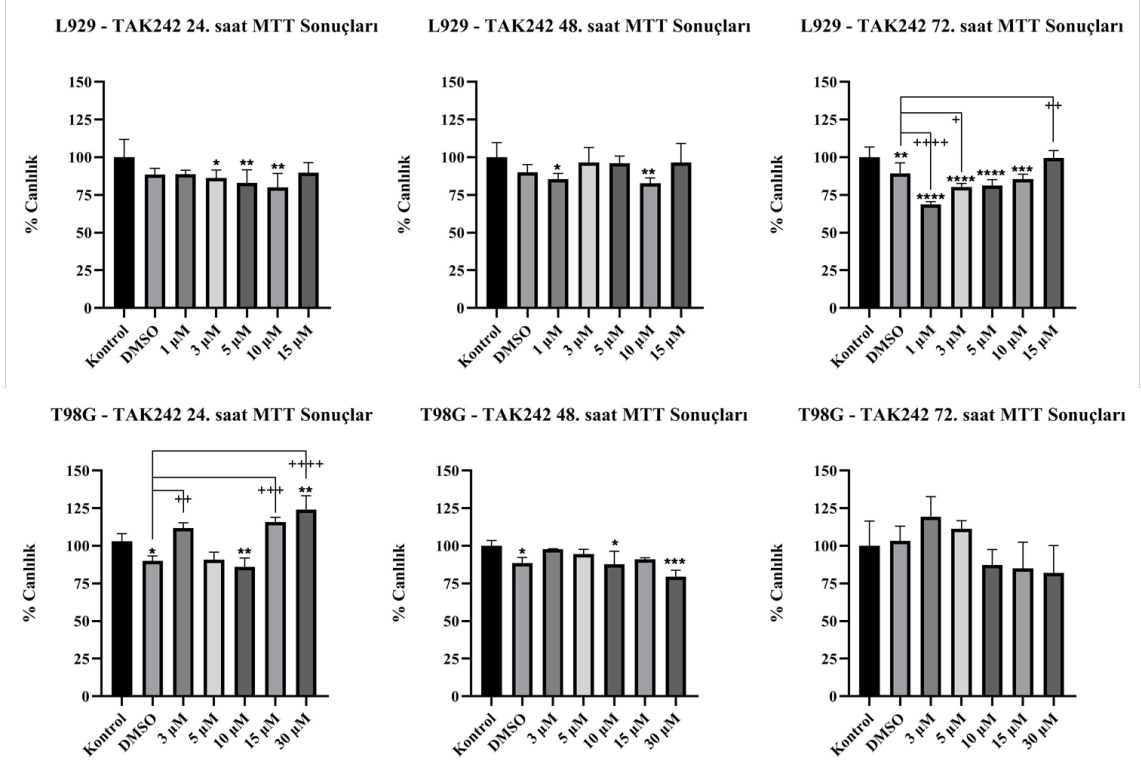


Şekil 4.5. EG00229'un farklı konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72. saatteki apoptotik ve nekrotik hücre oranı.

4.3.1.2. TAK242 24, 48 ve 72 Saat Uygulamalarının Sitotoksosite Açısından Karşılaştırılması ve Apoptoz/Nekroz Yüzdelerinin İncelenmesi

TAK242'nin artan konsantrasyonları her iki hücre hattı üzerinde de IC50 değerinde sitotoksositeye neden olmamıştır. L929 hücrelerinde 24. saatte 3, 5 ve 10 µM konsantrasyonlar kontrole göre istatistiksel olarak negatif yönde anlamlı fark gösterirken, 48. saatte negatif yönlü istatistiksel fark 1 µM ve 10 µM olarak devam etmiştir (*; $p \leq 0.05$, **; $p \leq 0.005$) (Şekil 4.6). 72. saatte ise özellikle 1 µM TAK242 hem kontrole göre hem de DMSO grubuna göre hücre canlılığını %32 oranında anlamlı bir şekilde düşürmüştür (****; $p \leq 0.0001$). Ek olarak, 72. saat hücre canlılığında 15 µM'ın DMSO grubuna göre pozitif yönde anlamlı bir etkisi olmuştur ve proliferasyonu desteklediği görülmüştür. Öte yandan, T98G hücrelerinde 24. saatte 3, 5 ve 15 µM konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı bir etki görülmezken, 10 µM konsantrasyonda kontrol grubuna göre negatif (**; $p \leq 0.005$), 30 µM konsantrasyonda ise pozitif yönlü (**; $p \leq 0.005$) istatistiksel fark görülmüştür (Şekil 4.6). DMSO grubuna göre istatistiksel farklılıklara bakıldığında ise 3, 15 ve 30 µM konsantrasyonlar pozitif yönde istatistiksel fark göstermiştir (++; $p \leq 0.005$, +++; $p \leq 0.0005$, ++++; $p \leq 0.0001$). Buna karşın, 48. saatte 10 ve 30 µM'ın anlamlı bir şekilde hücre canlılığını azalttığı görülmüştür (*; $p \leq 0.05$, ***; $p \leq 0.0005$). 72. saatte TAK242'nin artan konsantrasyonları ise anlamlı bir sitotoksik etkiye neden olmamıştır.

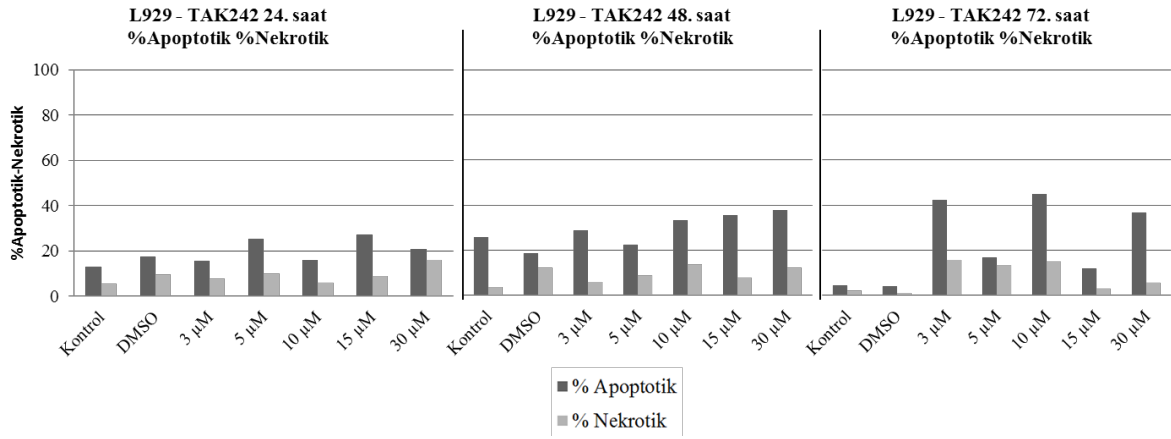
Her iki hücre hattında da ortak olarak TAK242'nin 10 µM konsantrasyonu hücreler üzerinde anlamlı bir sitotoksik etki göstermiştir.



Şekil 4.6. TAK242'nin farklı konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72. saatteki hücre canlılığı üzerindeki etkisi. [* sembolü; Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı, + sembolü; DMSO grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir. [* , + ; $p \leq 0.05$, ** , ++ ; $p \leq 0.005$, *** , +++ ; $p \leq 0.0005$, **** , ++++ ; $p \leq 0.0001$]

Sonuçlar, literatürde yapılan çalışmalarındaki bulgularla uyumludur. Fibroblast-benzeri sinaviyositlerle yapılan diğer bir çalışmada TAK242'nin 32 µM konsantrasyonunun 24. saatinde sitotoksik etki görülmediği; 48 µM'da ise canlılığın kontrole göre yarıya düştüğü görülmüştür [122]. Öte yandan, Oral skuamöz hücreli karsinom-4 hücrelerine TAK242'nin 11 farklı konsantrasyonunun (40-240 µM arası) uygulandığı bir çalışmada, IC50 48 saat sonra 120 µM olarak tespit edilmiştir [123]. Çalışmada yumurtalık ve meme kanseri hücre hatlarında TAK242'nin 200 µM'dan daha yüksek bir IC50 gösterdiği bulgusu dikkat çekmektedir. Buna karşın, literatürde daha düşük konsantrasyonların etkilerine de bakılmıştır. BV2 Mikroglia hücre hattı üzerinde 5 ve 800 nM arasındaki TAK242 konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerinde önemli bir etki yapmadığı bildirilmiştir [124]. Ek olarak bu çalışmada, 800 nM'ın hücre canlılığını bir derece azalttığı görülmüştür. Sonuçlar birlikte ele alındığında, TAK242'nin etkilerinin hem hücre tipine hem diğer

fizyolojik parametrelere hem de zamana bağılı olarak değişebildiği görülmektedir. L929 hücrelerinde 24. saatte TAK242'nin 5 ve 15 μ M konsantrasyonlarının apoptozu arttırdığı görülmüştür. 48. saatte kontrole göre apoptoz en fazla %13 oranında 15 μ M konsantrasyonda arttırmıştır. 72. saatte ise 3, 10 ve 30 μ M konsantrasyonların apoptotik hücre sayısını arttırdığı görülmüştür (Şekil 4.7). 15 μ M konsantrasyonda ise apoptotik oran düşmüştür. Birlikte ele alındığında, TLR4'ün blokasyonunun apoptotik ve nekrotik yollardaki etkisi hem zamana hem de konsantrasyona bağılı olarak değişmektedir. Ayrıca her iki hücre hattında da konsantrasyonun artmasıyla ya da azalmasıyla doğru orantılı bir sonuç görülmemektedir.



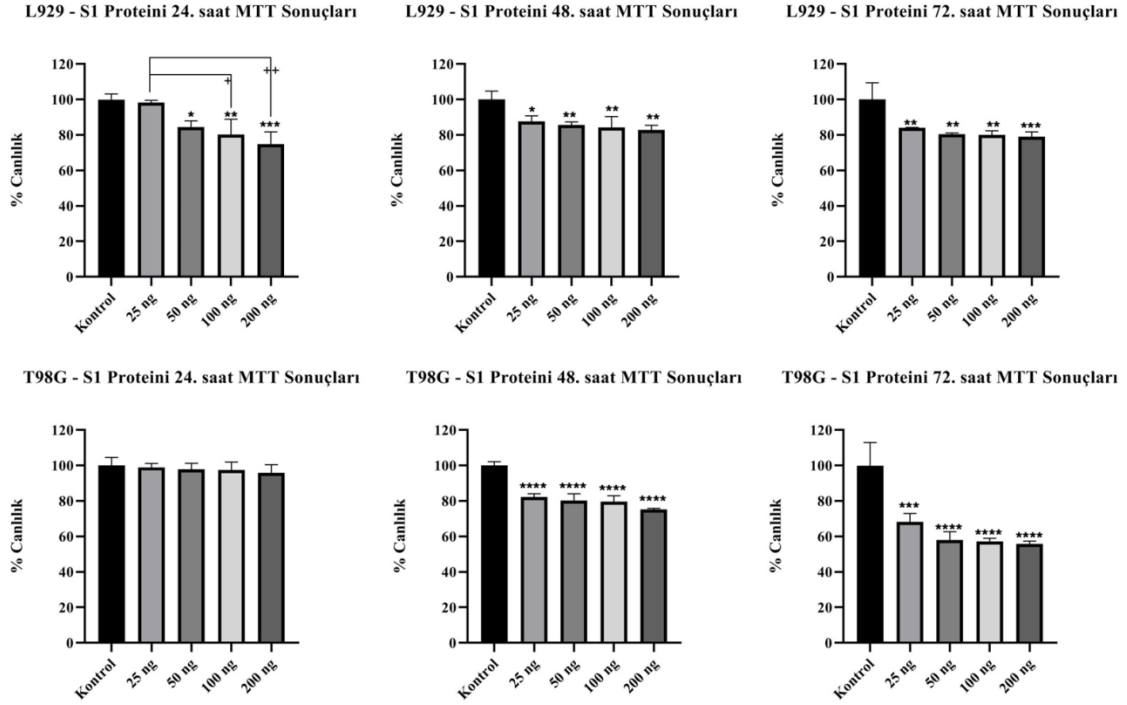
Şekil 4.7. TAK242'nin farklı konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72. saatteki apoptotik ve nekrotik hücre oranı.

Tüm bu sonuçlar ve yapılan çalışmalar birlikte ele alındığında, tez deneyleri için kullanılacak konsantrasyon, deneyler kapsamında sitotoksik olmayan ve daha önceki çalışmalarda en sık kullanılan konsantrasyon olan 3 μ M olarak seçilmiştir.

4.3.1.3. S1 Proteini 24, 48 ve 72 Saat Uygulamalarının Sitotoksosite Açısından Karşılaştırılması ve Apoptoz/Nekroz Yüzdelerinin İncelenmesi

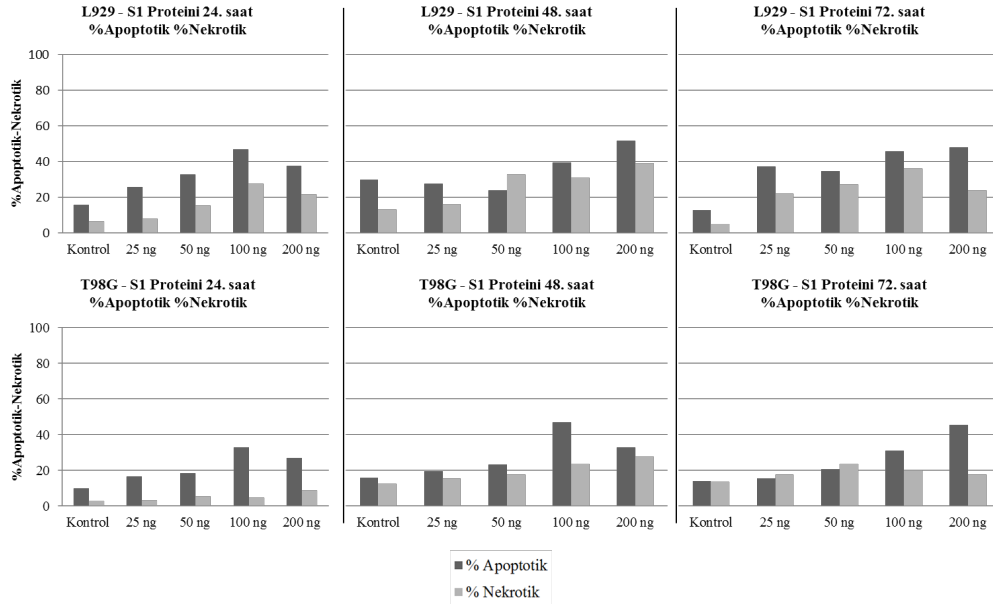
S1 proteininin artan konsantrasyonları her iki hücre hattı üzerinde de IC50 değerinde bir toksisiteye neden olmamıştır. L929 hücrelerinde 24. saatte 50, 100 ve 200 ng konsantrasyonlar kontrole göre anlamlı sitotoksosite (*; $p \leq 0.05$, **; $p \leq 0.005$, ***; $p \leq 0.0005$) (Şekil 4.8). Ek olarak 25 ng konsantrasyona göre 100 ve 200 ng konsantrasyonlar anlamlı sitotoksosite göstermiştir (+; $p \leq 0.05$, ++; $p \leq 0.005$). Bunun yanında, 48 ve 72. saatteki hücre canlılığında tüm konsantrasyonların kontrole göre anlamlı sitotoksosite gösterdiği tespit edilmiştir. Öte yandan, konsantrasyonların 48 ve 72. saatteki etkileri birbirlerine göre anlamlı bir istatistiksel fark göstermemiştir. T98G hücrelerinde 24. saatte anlamlı bir etki yokken, 48 ve 72. saatte tüm gruplarda kontrole göre negatif yönde anlamlı etki görülmüştür (***; $p \leq 0.0005$, ****; $p \leq 0.0001$) (Şekil 4.8). Özellikle 72. saatte 25, 50, 100 ve 200 ng konsantrasyonlar hücre canlılığını sırasıyla %32, %42, %43 ve %45 oranında anlamlı bir şekilde azaltmıştır. T98G hücrelerinde L929 hücrelerine göre daha yüksek oranda sitotoksosite göstermiştir. Bu sonucun nedeni olarak, hücre tiplerinin farklı olması; ayrıca L929 hücrelerinin fare kökenli; T98G hücrelerinin ise insan kökenli olması öne sürülebilir. Solunum yolları virüslerinin farklı hayvanlarda farklı etkiler gösterdiği bilinmektedir [125]. Ek olarak, memelilerde aynı reseptörün farklı varyantları bulunabilmektedir ve viral bağlanmaya uygunluğu değişebilmektedir [126]. Bunun yanında hücre tipinin, içerdiği reseptör çeşidi ve miktarının ve görevinin farklı olması farklı sonuçlar verebilmektedir. Örneğin fare primer hipokampal nöronlarına 5000 ng S1 proteini ile 12 saat muamelenin anlamlı bir sitotoksik etki yapmadığı görülmüştür. Aynı çalışmada farklı bir sinir hücresi olan gliya kültürü, aynı konsantrasyon ve süreyle S1 proteinine maruz bırakılmış ve hücre ortamı hipokampal nöron ortamına eklenmiştir. Bu uygulamadan sonra hipokampal nöron sayısının azaldığı görülmüştür [22]. Mikroglialarla yapılan başka bir çalışmada, 10, 50, 100, 500 ve 1000 ng/mL S1 proteini ile muamele sonrası 1, 3, 6, 12 ve 24. saatlerde Tümör Nekroz Faktör-alfa (TNF- α) seviyeleri ölçülmüştür. Zamana ve konsantrasyona bağlı bir şekilde S1 proteini kaynaklı TNF- α artışının maksimuma ulaştığı görülmüştür. Buna ek olarak, 500 ve 1000 ng/mL konsantrasyonlarda 100 ng/mL'ye göre, TNF- α seviyesinde anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür [23]. Hücre tipleri farklı olsa da bu sonuç, MTT sonucumuzdaki konsantrasyona bağlı hücre canlılığında daha fazla azalma olmadığı sonucuyla ve

konsantrasyonların birbirleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemesiyle örtüşmektedir.



Şekil 4.8. S1 proteininin farklı konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72. saatteki hücre canlılığı üzerindeki etkisi. [* sembolü; Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı, + sembolü; 25 ng ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.] [* , + ; $p \leq 0.05$, ** , ++ ; $p \leq 0.005$, ***, +++ ; $p \leq 0.0005$, ****, ++++ ; $p \leq 0.0001$]

Her iki hücre hattında da 100 ve 200 ng S1 proteini konsantrasyonları apoptotik ve nekrotik hücre sayısını arttırmıştır (Şekil 4.9). Bu sonuç, MTT sonuçlarıyla örtüşmektedir. Farklı olarak, T98G 24. saatte 100 ve 200 ng konsantrasyonların hücre canlılığında olumsuz bir etkisi yokken, apoptotik hücre sayısını kontrol grubuna göre sırasıyla %23.03 ve %17.17 oranında arttırdığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. S1 proteininin farklı konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72. saatteki apoptotik ve nekrotik hücre oranı.

Genel olarak S1 proteininin her iki hücre hattındaki etkisi literatürde bilinenlerle uyumludur. Yapılan tez çalışmasında deneyler için kullanılacak olan S1 proteini konsantrasyonu **25 ng** olarak seçilmiştir.

4.4. EG00229, TAK242 ve S1 Proteininin Nörojenez, Aksonal Büyüme, Nöroproteksiyon ve Nöronal Göç Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılarak İncelenmesi

Maddelerin ve kombinasyonlarının uygulanması ve nöronal fizyolojiye etkilerinin sonuçları başlıklandırıldığı üzere verilmiştir.

4.4.1. Optimizasyon Çalışması

Optimizasyon çalışmasında en iyi nöronal fenotipin ve morfolojik kararlılığın 2.5×10^3 hücre/kuyucuk ekim sayısında ve %3 FBS içeren farklılaştırma besiyerinde olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuç, literatürde %3 FBS oranının optimum farklılaşma sağladığını bildiren çalışma ile uyumludur [108].

4.4.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi (Nörojenez)

4.4.2.1. Farklılaşma Potansiyelinin İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi ile İncelenmesi

Konsantrasyon uygulanmasını takiben 1, 3, 5 ve 7. günlerde yapılan immünohistokimyasal boyama sonuçları *Şekil 4.10* ve *Şekil 4.11*'de gösterilmiştir.

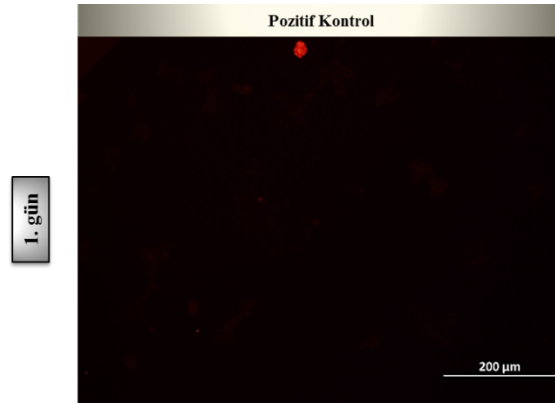
1. ve 3. günlerde anti-MAP-2 boyanma yoğunluğu oldukça düşüktür. 5. ve 7. günlerde ise aksonal uzunluklar ve boyanmalar artmıştır. Pozitif kontrol gruplarında beklendiği üzere zamana bağlı olarak boyanma oranı ve aksonal uzantılar artmıştır. S1 proteininin iki gün boyunca muamelesi boyanma yoğunluğunu azaltmıştır. Ayrıca morfolojik bozukluklara ve aksonal çekilmelere neden olmuştur. TAK242 ile iki gün boyunca muamele sonucu herhangi bir olumsuz etki görülmezken EG00229'un iki gün muamelesi, S1 proteiniyle benzer sonuçlara sebep olmuştur. Negatif kontrolde ise [S1] ve [EG00229] gruplarına benzer şekilde boyanma yoğunluğu ve aksonal uzunluk düşüktür. 30 dakika EG00229 ile ön muameleyi takiben ortamın uzaklaştırıldığı ve yerine S1 proteinin verildiği grupta ([EG00229 + S1]) boyanma oranının ve aksonal uzantıların arttığı görülmüştür. [S1] grubuyla kıyaslandığında, EG00229 ile yarım saat ön inkübasyon, S1'in etkilerini azaltmıştır. Buna karşın, TAK242 ile 30 dakika ön inkübasyon S1 proteininin olumsuz etkilerini önleyememiştir. EG00229 ve TAK242'nin kombine bir şekilde 30 dakika ön inkübasyonu sonrası besiyeri eklenen grupta ([EG00229 + TAK242]) boyanma yoğunluğu düşüktür ve aksonal morfolojinin bozulduğu görülmektedir. Bunun yanında EG00229 ve TAK242'nin kombine bir şekilde 30 dakika ön inkübasyonu sonrası S1 eklenen grupta ([EG00229 + S1 + TAK242]) da düşük boyanma yoğunluğu görülmektedir. Birlikte ele alındığında bu iki sonuç, TAK242 ile EG00229'un aynı anda ortama eklenmesinin olumsuz etkiye sebep olduğunu düşündürmektedir. EG00229'un 30 dakika ön inkübasyonu sonrası S1 proteini verilen grupta benzer olumsuz etki görülmemesi bu çıkarımı desteklemektedir. Çünkü EG00229'un tek başına 30 dakika inkübasyonunda benzer sonuçlar görülmemiştir. Ek olarak; TAK242'nin tek başına olumsuz etkisinin olmaması, EG00229'un ise S1 proteininin etkilerini azaltması; [EG00229 + S1 + TAK242] grubunda olumsuz etki görülmesi, aynı anda Nrp-1 ve TLR4 blokasyonunun nörojenezini olumsuz etkilediğini göstermektedir. Literatürde Nrp-1 ile TLR4'ün doğrudan ilişkisini konu alan az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmalardan birinde, TLR4'ün siRNA ile

azaltılmasının, lipopolisakkarit aracılı azalmış olan Nrp-1 ifadesini tersine çevirdiği görülmüştür [127]. Ek olarak, VEGF varlığında Nrp-1'in TLR4 ile etkileşime girerek proinflamatuvar yanıtları azalttığı bildirilmiştir [128]. Bunun yanında, SEMAP3A/Nrp-1 sinyalinin TLR4 indüksiyonunda ve SemaP3A/NRP1 sinyalizasyonunun COVID-19 ve Akut İskemik Felç'teki olumsuz olayların ilerlemesinde rol oynadığı öne sürülmüştür [129]. Deney gruplarımızda, S1 proteini Nrp-1'i bloke etmiş ve Nrp-1-VEGF bağlantısını engelleyerek inflamatuvar yanıtların modülasyonunu bozmuş olabilir. Ek olarak, TAK242'nin TLR4'ü bloke etmesi bu süreçlerde rol alan biyokimyasal yolların etkilenmesine sebep olmuş olabilir. Tüm bu fizyolojik ihtimallerin, Nrp-1/TLR4 etkileşiminin ve S1 proteininin bu etkileşimi nasıl etkileyeceğinin aydınlatılması gerekmektedir.

Tüm bunlarla beraber deney gruplarında süre parametresinin değiştiği göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin EG00229'un ortamda 30 dakika bulunması nörojenez üzerinde olumsuz bir etki göstermezken, iki gün boyunca bulunması olumsuz etkilere yol açmıştır. Bunu destekler nitelikte, yapılan çalışmalarda EG00229'un zamanla doğru orantılı olarak Nrp-1 üzerindeki blokasyonu ve dolayısıyla bağlanma miktarının arttığı gösterilmiştir [17]. Literatürde EG00229'un spesifik olarak Nrp-1 reseptörünün b1 alanına bağlandığı ve Nrp-1'in ilgili fonksiyonlarını bozduğu bilinmekle beraber bu deney kapsamında, bilinenin ve beklenenin aksine EG00229'un yarım saat inkübasyonu S1'in hedefinde olan Nrp-1 için kalkan görevi görmüştür [120]. İlk bakışta, EG00229 ile yarım saat bloke olan Nrp-1 miktarına ek olarak ortama S1'in de verilmesiyle daha fazla Nrp-1 blokasyonunun meydana gelmesi beklenmektedir. Ancak, burada bu iki maddenin ortama aynı anda verilmemesi önem taşımaktadır. S1'in sonradan ortama verilmesi daha az Nrp-1 inhibisyonu ile sonuçlanmış olabileceğini akla getirmektedir. Çünkü S1 proteini yalnızca Nrp-1 reseptörüne bağlanmamaktadır. Hücreler üzerinde S1'in bağlandığı ve bağlanma potansiyelinin olduğu birçok reseptör ve kofaktör tanımlanmıştır (*Şekil 2.7*). Ortamda Nrp-1 inhibitörü bulunmadığında S1 hem Nrp-1'e hem de diğer potansiyel reseptörlere bağlanabilir. Ancak başlangıçta Nrp-1'lerin 30 dakika bloke edilmesi S1'in Nrp-1 bağlantısının önüne geçmektedir ve total Nrp-1/S1 bağlantısı azalmaktadır. Dolayısıyla, Nrp-1'e bağlanamayan **serbest** S1 proteinleri ortamdaki başka bir reseptöre veya kofaktöre bağlanmış olabilir. Bu da S1 proteininin total olarak etkileşime girdiği Nrp-1 miktarının düşmesine neden olacaktır. S1'in diğer reseptör veya kofaktörlere bağlanmasının ise,

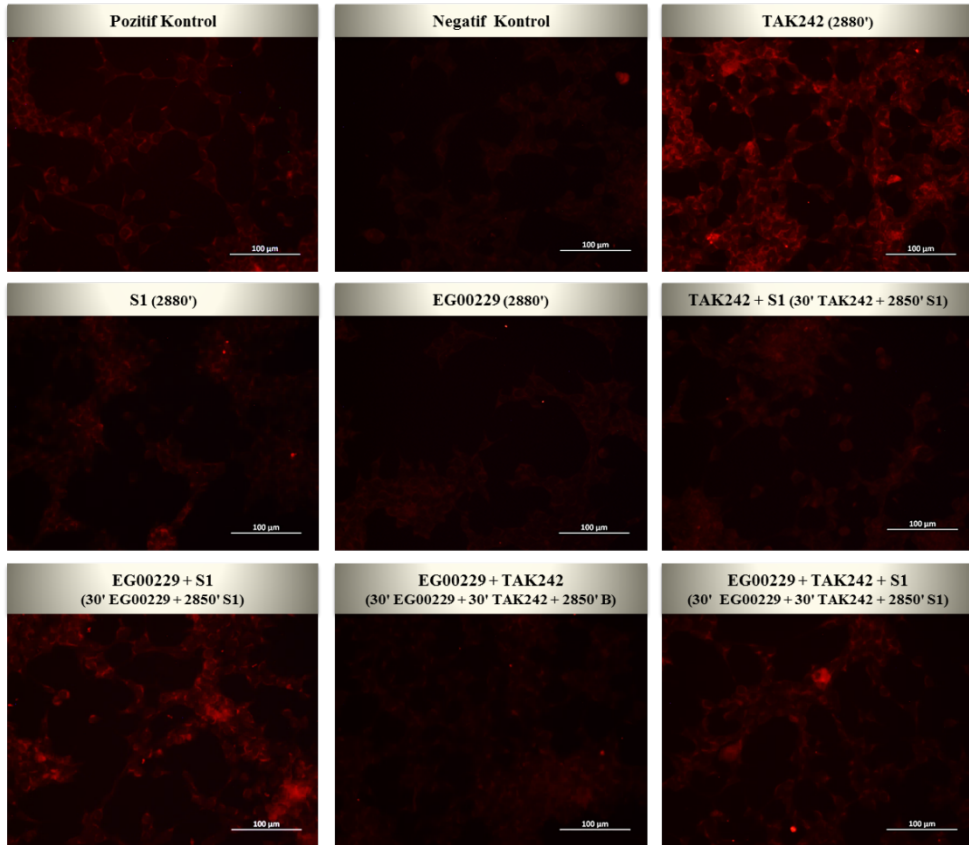
deney sonucumuza göre nörojenez üzerinde olumsuz bir etkisi olmamıştır. Ek olarak, hücrelerde çözünür bir şekilde bulunan ve istenmeyen miktardaki ligand ve benzeri moleküllerin zararlı etkilerine karşı koruyucu görevleri olduğu bildirilen ç-Nrp'ler (Şekil 2.8) ile birlikte S1'in etkisi daha fazla azaltılmış olabilir. Ayrıca, hücrelerdeki reseptör ekspresyon düzenlemesi de bu süreçlerde rol oynamış başka bir etmen olarak göz önünde bulundurulmalıdır [130]. Bu doğrultuda tüm bu ihtimaller ve açıklamalar için daha kapsamlı çalışmaların yapılması önerilmektedir.

Sonuç olarak, S1 ve EG00229'un nörojenez üzerinde benzer olumsuz etkilere sebep olduğu görülmüştür. Destekler nitelikte yapılan bir çalışmada SARS-CoV-2'nin hipokampal nörojenez potansiyelini azalttığı bildirilmiştir [18]. Ek olarak, EG00229'un kısa süreli muamelesinin nörojenez üzerinde olumsuz etki yapmadığı, tam tersine S1'in etkilerini azalttığı gösterilmiştir. Tüm bunların yanında, S1'in nörojenez üzerindeki bozukluklarının TLR4 ile doğrudan ilişkili olmadığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda, Nrp-1 ile TLR4'ün dolaylı yoldan ilişkili olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

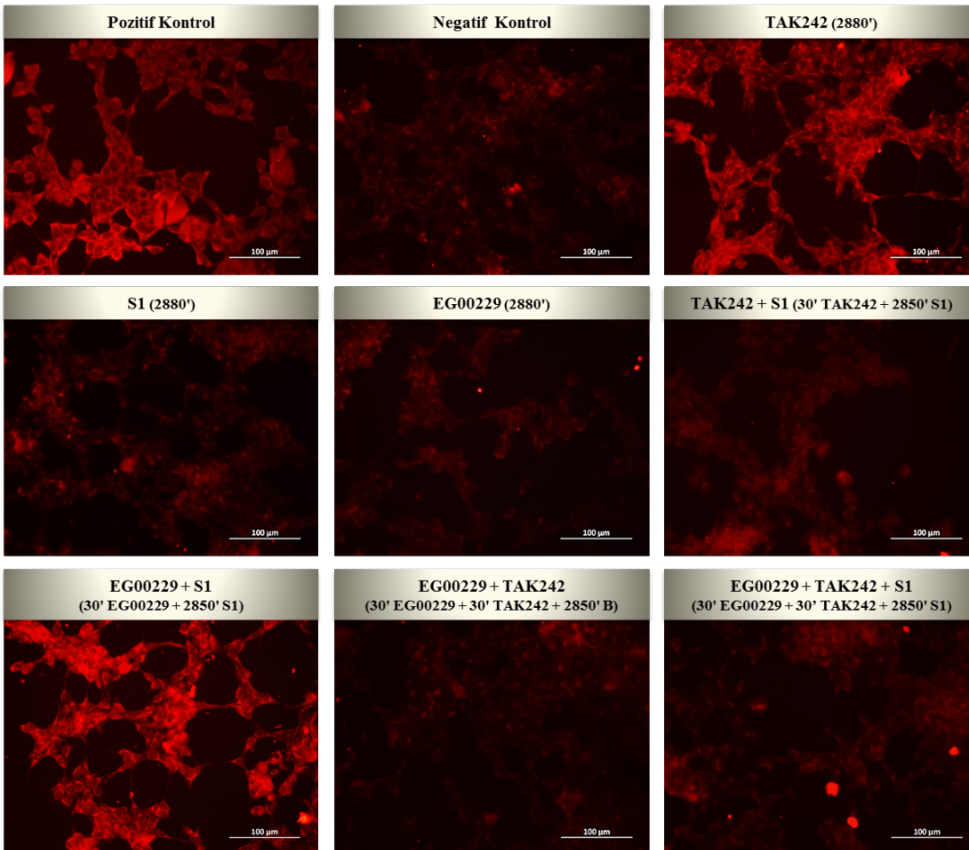


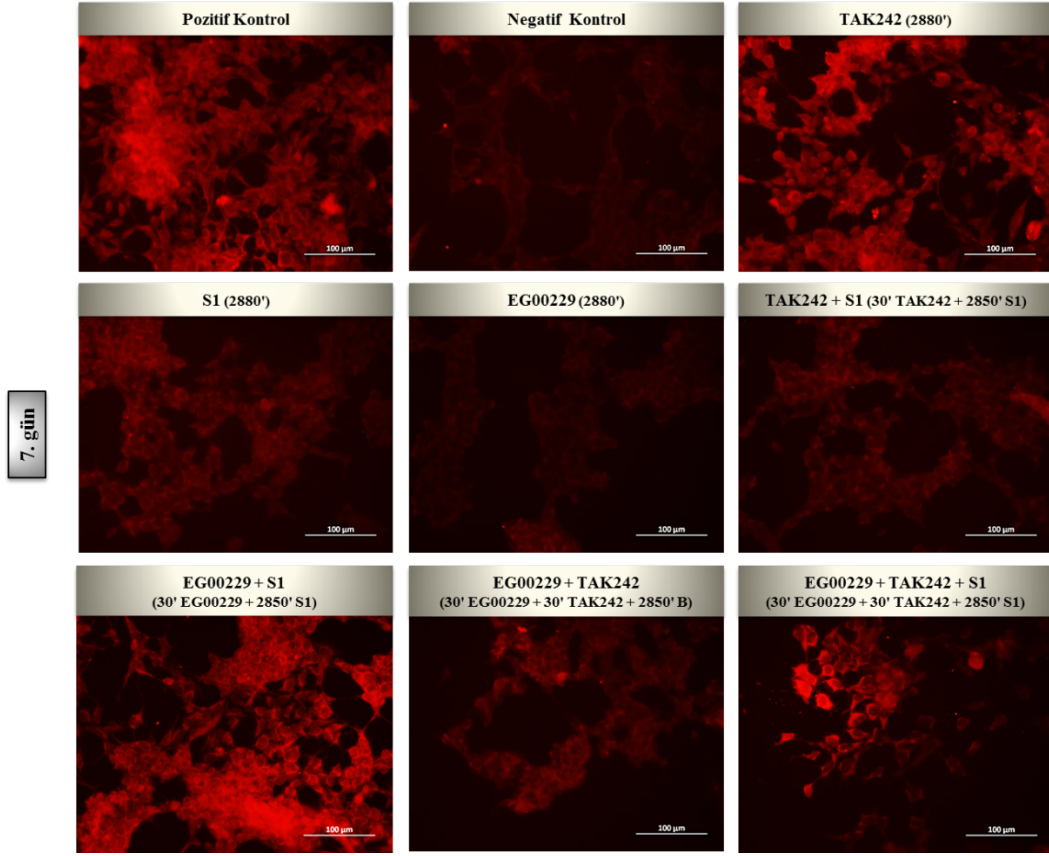
Şekil 4.10. EG00229, TAK242 ve S1 Proteinin konsantrasyonları ve kombinasyonlarının SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde birinci gün nöronal farklılaşmaya olan etkisi. [anti-MAP-2: kırmızı] [Primer antikor: anti-MAP-2; 1:2000. Sekonder Antikor: TR; 1:400 (545-580 nm)] [Büyütme: X20].

3. gln



5. gln





Şekil 4.11. EG00229, TAK242 ve S1 Proteininin konsantrasyonları ve kombinasyonlarının SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde üçüncü, beşinci ve yedinci günlerdeki nöronal farklılaşmaya olan etkisi. anti-MAP-2 ile boyanmış SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri (X20 büyütme). [anti-MAP-2: kırmızı] [Primer antikor: anti-MAP-2; 1:2000. Sekonder Antikor: TR; 1:400 (545-580 nm)] Pozitif Kontrol; Farklılaştırma besiyeri uygulanmış grup, Negatif Kontrol; besiyeri uygulanmış grup. (30': 30 dakika, 2850': 2850 dakika, 2880': 2880 dakika, B; Besiyeri) [Büyütme: X20]

4.4.2.2. Farklılaşma Potansiyelinin Western Blot Tekniği ile İncelenmesi

4.4.2.2.1 BCA Yöntemi ile Total Protein Miktarının Ölçülmesi

Tablo 4.1'de tüm gruptaki 1, 3, 5 ve 7. günlerdeki üç verinin ortalaması alınmıştır. Protein ölçüm sonuçları aşağıda verilmiştir.

Deney grupları	1. gün mg/mL	3. gün mg/mL	5. gün mg/mL	7. gün mg/mL
Pozitif Kontrol	5,17	9,97	7,10	4,53
Negatif Kontrol	4,24	10,73	8,57	4,48
TAK242	5,12	9,29	8,64	4,72
S1	3,01	26,50	11,41	3,09
EG0229	2,69	9,34	7,95	1,90
TAK242 + S1	5,31	9,60	11,26	0,77
EG00229 + S1	4,61	9,64	11,69	3,27
EG00229 + TAK242	5,09	8,28	12,65	3,49
EG00229 + S1 + TAK242	7,54	4,52	9,82	4,25

Tablo 4.1. Total protein seviyeleri.

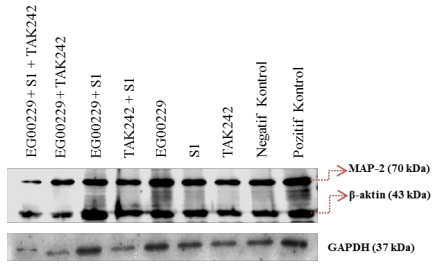
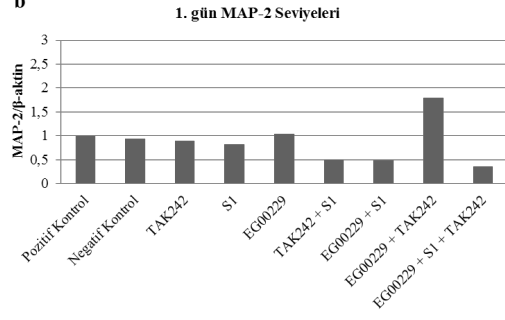
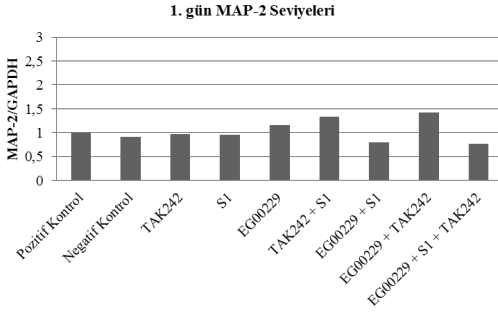
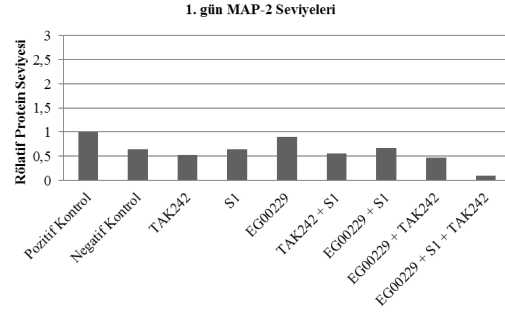
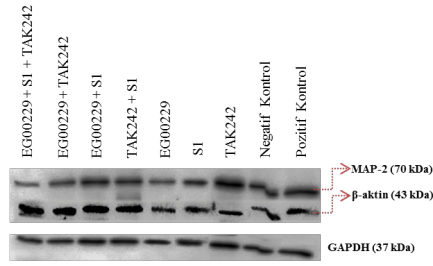
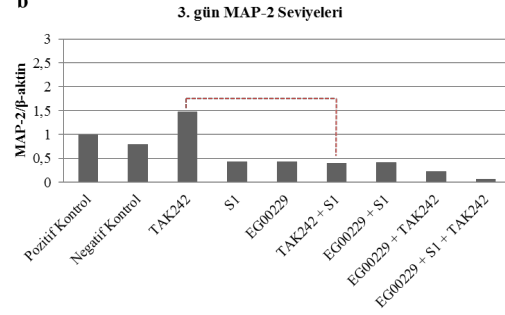
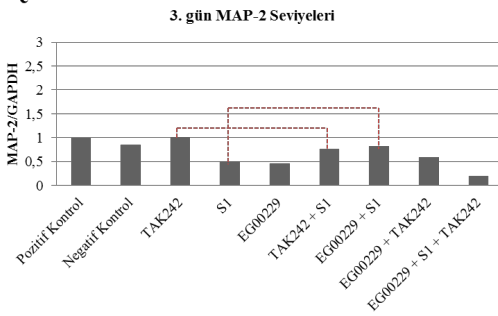
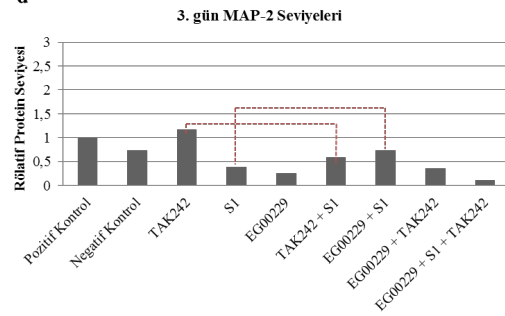
4.4.2.2.2. Western Blot Tekniği ile MAP-2 Seviyelerinin Ölçülmesi

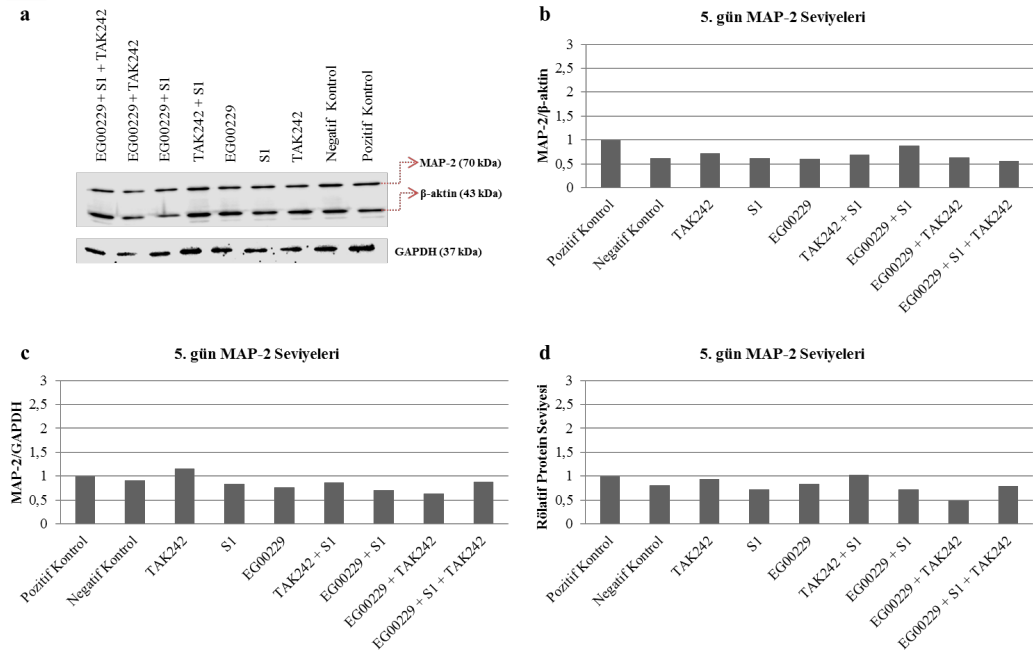
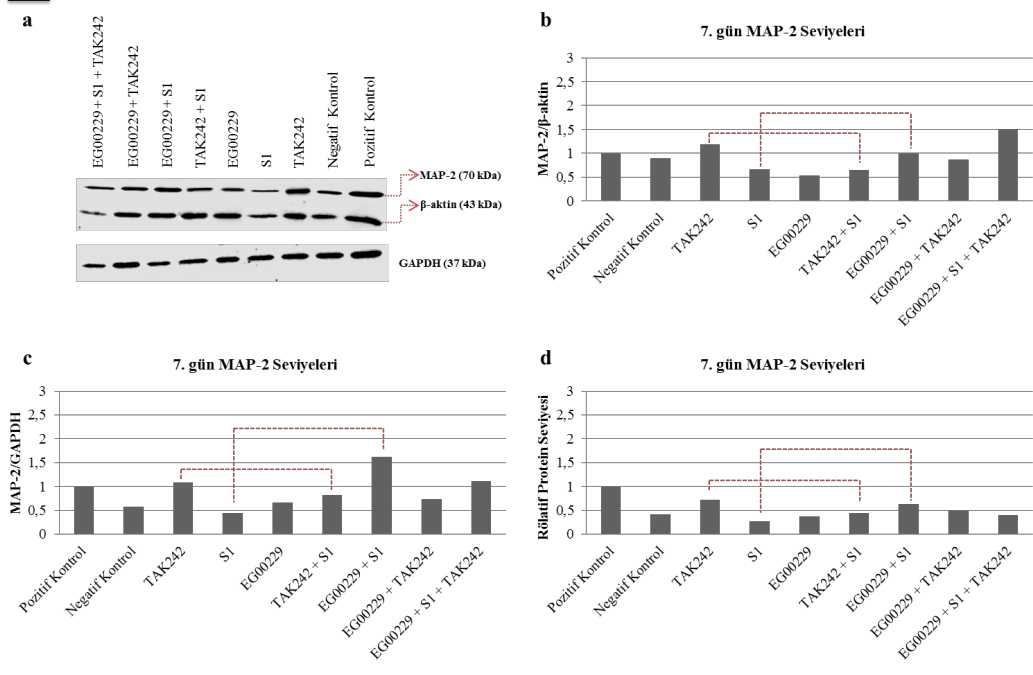
WB tekniğinde protein normalizasyonu için çoğunlukla “ β -aktin” kullanılmaktadır [88]. Bu sebeple, yapılan tez çalışmasında da aynı protein kullanılmıştır ancak β -aktin seviyelerinin deney grupları arasında değiştiği gözlenmiştir (*Şekil 4.12-a*). Literatür incelendiğinde aynı problemi bildiren çalışmalarla karşılaşılmıştır [131]. Tez kapsamında yaşanan problem sebebi ile normalizasyon için sıkça kullanılan başka bir protein olan Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) da kullanılmıştır. Ancak bu proteinin de miktarlarının değiştiği görülmüştür. Her ne kadar BCA metodu ile total protein seviyeleri belirlenmiş ve her grup için aynı mg/mL seviyesinde protein örnekleri hazırlanmış olsa da, kuyucuklara yüklenen total protein miktarlarının da eşit olmayabileceği düşünölmüştür. Literatür de göz önünde bulundurularak normalizasyon, hem β -aktin’e göre, hem GAPDH’e göre hem de pozitif kontrol grubuna göre (rölatif protein seviyesi tespit edilerek) yapılmıştır. *Şekil 4.12*’de membran görüntüleri ve grafikler verilmiştir.

ImageJ ile yapılan analizler sonucunda 3. gün MAP-2 seviyesinde β -aktin’e göre [TAK242] ve [TAK242 + S1] grupları arasında önemli sayılabilecek seviyede oransal fark (*1.074*) görülmüştür (*Şekil 4.12-B; b*). GAPDH’e göre normalizasyon sonuçlarına göre ise [TAK242] ve [TAK242 + S1] grupları arasında *0.250*; [S1] ve [EG00229 + S1] grupları arasında *0.319* oranında fark görülmüştür (*Şekil 4.12-B; c*). Benzer şekilde, pozitif kontrol grubuna göre [TAK242] ve [TAK242 + S1] grupları arasında *0.593*; [S1] ve [EG00229 +

S1] grupları arasında 0.350 değerinde oransal fark tespit edilmiştir (*Şekil 4.12-B; d*). Her üç normalizasyonda da en düşük MAP-2 seviyesi [S1], [EG00229], [TAK242 + S1], [EG00229 + TAK242] ve [EG00229 + S1 + TAK242] gruplarında görülmüştür (*Şekil 4.12*). 5. gün MAP-2 seviyesinde [TAK242] haricinde tüm gruplar 1'den düşük değer göstermiştir (*Şekil 4.12-C*). 7. gün MAP-2 seviyelerinde ise 3. güne benzer şekilde; β -aktin'e göre [TAK242] ve [TAK242 + S1] grupları arasında 0.535, [S1] ve [EG00229 + S1] grupları arasında 0.332 değerinde oransal fark görülmüştür (*Şekil 4.12-D; b*). GAPDH'e göre normalizasyon sonuçlarına göre ise [TAK242] ve [TAK242 + S1] grupları arasında 0.256; [S1] ve [EG00229 + S1] grupları arasında ise 1.179 değerinde oransal fark tespit edilmiştir (*Şekil 4.12-D; c*). Her iki normalizasyon sonucuna benzer şekilde, pozitif kontrol grubuna göre [TAK242] ve [TAK242 + S1] grupları arasında 0.268; [S1] ve [EG00229 + S1] grupları arasında 0.364 oranında fark görülmüştür (*Şekil 4.12-D; d*).

Literatürde SH-SY5Y hücrelerinin RA ile farklılaştırılma sürecinde MAP-2 seviyelerinin ve nörit uzunluklarının zamana bağlı arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır [132]. Ek olarak, çalışmalarda farklılaşmanın tamamlanmış kabul edildiği günler değişebilmektedir [109]. Bunun yanında, yapılan çalışmalarda SH-SY5Y hücrelerinin 3. günden itibaren farklılaşma belirteçleri gösterdiği görülmektedir [109, 132]. Literatürdeki bu bulgular doğrultusunda, 1. gün MAP-2 seviyelerine göre bir değerlendirme yapılmamıştır. 3. gün S1 proteininin ve EG00229'un pozitif kontrole göre hücrelerde MAP-2 seviyesini düşürdüğü görülmüştür. Bunun yanında EG00229'un yarım saat inkübasyonunun S1'in olumsuz etkisini önlediği ve MAP-2 seviyesinde artışa neden olduğu görülürken, TAK-242'nin benzer bir etkisi görülmemiştir. 5. gün protein seviyelerinde normalizasyon proteinlere bağlı değişiklikler görülmüştür. Bunun nedeni olarak izolasyon sürecindeki işlemlerin ekspresyon genliğinde ani değişikliklere neden olabileceği düşünülmektedir. Ek olarak, literatürdeki SH-SY5Y hücrelerinin farklılaşmış sayıldığı günlerin farklı olduğu göz önüne alındığında, çalışmamızda kullanılan SH-SY5Y'nin ekspresyon seviyesindeki davranışının farklı olabileceği de düşünülmüştür. 7. gün MAP-2 seviyeleri ise 7. gün immünohistokimyasal boyama sonuçlarımızla (*Şekil 4.11*) uyumludur ve sonuçlarımızı desteklemektedir.

A**a****b****c****d****B****a****b****c****d**

C**D**

Şekil 4.12. A, 1. gün; B, 3. gün; C, 5. gün; D, 7. gün. a, WB membran görüntüleri. b, β -aktin seviyelerine göre MAP-2 seviyeleri. c, GAPDH seviyelerine göre MAP-2 seviyeleri. d, pozitif kontrole göre diğer grupların rölatif protein seviyeleri. kDa, kiloDalton.

4.4.3. Nöronal Farklılaşma Aşamasındaki SH-SY5Y Hücrelerinde Aksonal Büyüme ve Uzantıların İncelenmesi

Farklılaştırma besiyeri ve konsantrasyon uygulanan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinin 1, 3, 5 ve 7. günlerde aksonal morfolojilerinin fotoğrafları (Şekil 4.13) ve aksonal uzunluk grafikleri (Şekil 4.14) başlıklandırıldığı üzere verilmiştir.

4.4.3.1. Aksonal Büyümenin İverted Mikroskop ile İncelenmesi ve Aksonal Uzantıların Ölçülmesi

Konsantrasyonların uygulamasını takiben birinci gün ölçülen akson uzunlukları arasında anlamlı bir istatistiksel fark bulunamamıştır. Üçüncü gün ise [TAK242] ve [EG00229 + S1] grupları haricindeki tüm gruplarda aksonal uzunluklarda pozitif kontrole göre anlamlı bir azalma görülmüştür (**; $p \leq 0.005$, ***; $p \leq 0.0005$, ****; $p \leq 0.0001$) (Şekil 4.14). Ek olarak [TAK242] ile [EG00229] ve [TAK242 + S1] grubu arasında anlamlı fark tespit edilmiştir (+; $p \leq 0.05$, ++; $p \leq 0.005$). S1 proteininin ve EG00229'un aksonal uzantı boyutlarında benzer etkiler yaptığı görülmüştür. TAK242'de ise herhangi bir olumsuz etki görülmemiştir. Öte yandan, EG00229 ile yarım saat ön inkübasyonun S1 proteinin aksonlardaki olumsuz etkisini azalttığı görülürken aynı işlemlerin yapıldığı TAK242'nin S1'in etkileri üzerinde herhangi bir etkisi görülmemiştir. Diğer iki kombinasyon grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Ek olarak, tüm gruplarda aksonal uzunluklar, negatif kontrole göre anlamlı bir fark göstermemiştir.

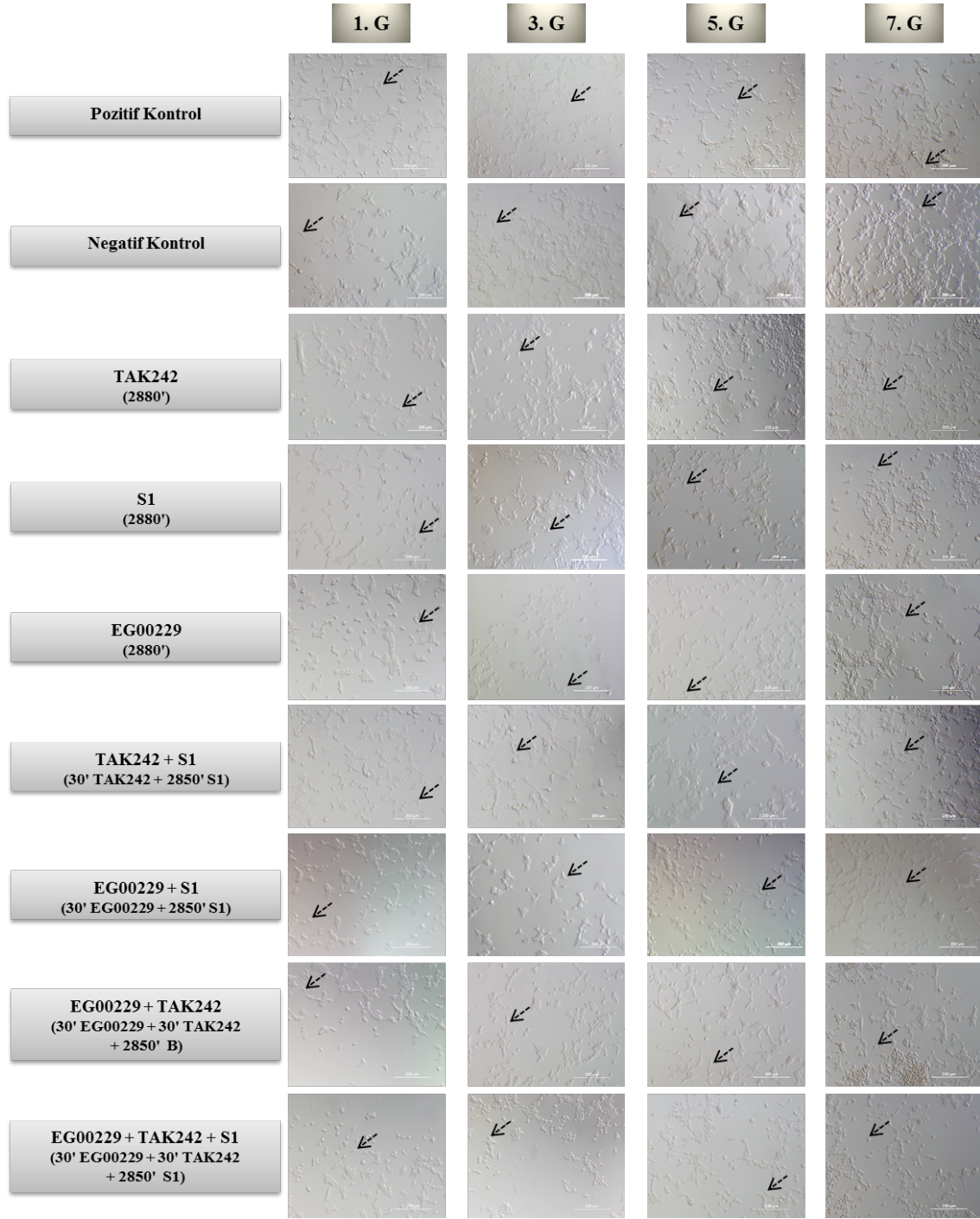
5. gün aksonal uzantılarında ise [TAK242] ve [EG00229+S1] haricinde tüm gruplarda pozitif kontrole göre anlamlı farklar görülmüştür (**; $p \leq 0.005$, ***; $p \leq 0.0005$). Negatif kontrol ile yalnızca [TAK242] grubu arasında anlamlı fark bulunmuştur (#; $p \leq 0.05$). [S1], [EG00229] ve [TAK242 + S1] gruplarında aksonal uzunluklar pozitif kontrole göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (***) ($p \leq 0.0005$, ****; $p \leq 0.0001$). Benzer şekilde [EG00229 + TAK242] ve [EG00229 + S1 + TAK242] gruplarında da pozitif kontrole göre negatif yönde etki görülmüştür (**; $p \leq 0.005$). Nörojenez sonuçlarına benzer şekilde, EG00229'un yarım saat inkübasyonu S1 proteininin aksonal büyüme üzerindeki olumsuz etkisini engellemiştir. [EG00229 + S1] grubu ile [S1], [EG00229] ve [TAK242 + S1] grupları arasında istatistiksel fark bulunmuştur (^; $p \leq 0.05$). Öte yandan, [EG00229 + TAK242] ve [EG00229 + S1 + TAK242] grupları arasında istatistiksel bir fark

görülmemesi, EG00229 ile TAK242'nin ortama aynı anda verilmesinin aksonal büyüme üzerinde de etkili olduğunu göstermiştir.

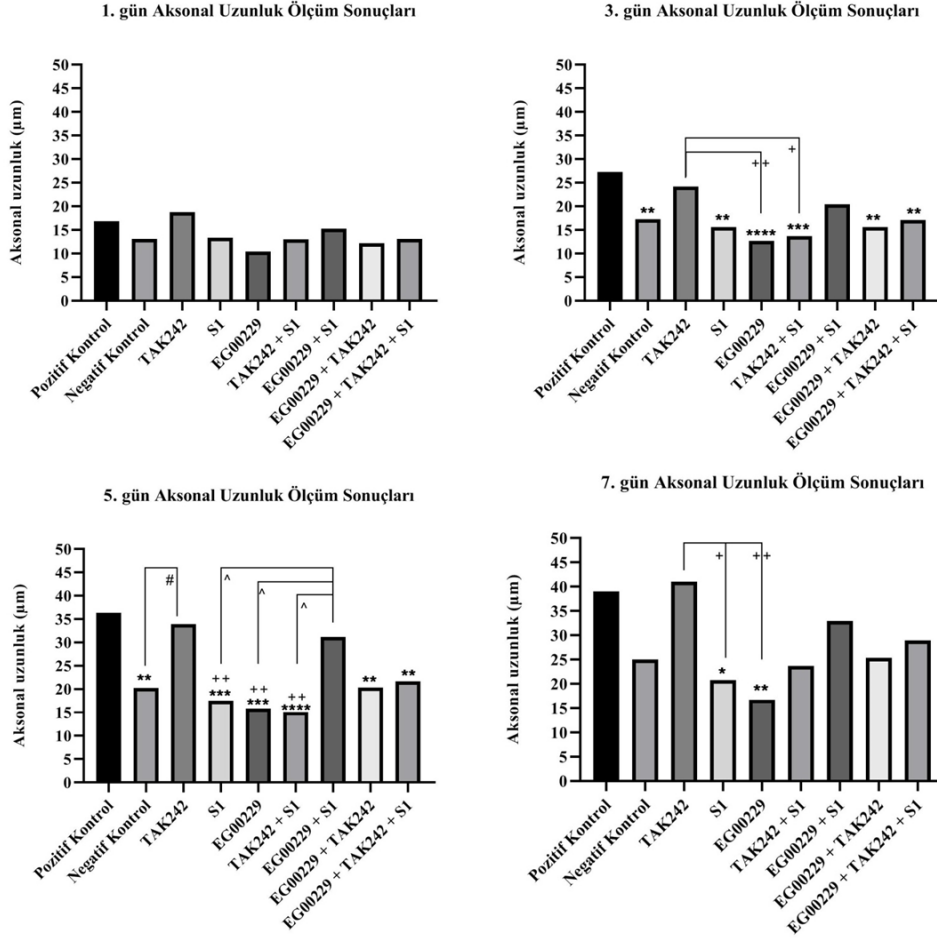
7. gün aksonal uzantılarında ise kontrol grubuna göre yalnızca [S1] ve [EG00229] gruplarında istatistiksel fark görülmüştür (*; $p \leq 0.05$, **; $p \leq 0.005$). Aynı gruplar [TAK242] ile de istatistiksel fark göstermiştir (+; $p \leq 0.05$, ++; $p \leq 0.005$). Diğer gruplar hem kendi aralarında hem de hem kontrol grubuna göre istatistiksel fark göstermemiştir.

Tüm bulgular birlikte ele alındığında, nörojenez bulgularıyla örtüştüğü görülmektedir. 7. günde [S1] ve [EG00229] harici diğer grupların aksonal uzunluklarında pozitif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir negatif farkın olmaması, uzun süreli büyüme blokasyonunun ya da kalıcı bir hasarın meydana gelmediğini göstermektedir. Özellikle [EG00229 + TAK242] ve [EG00229 + S1 + TAK242] gruplarında pozitif kontrole göre anlamlı bir olumsuz etkinin görülmemesi zamanla Nrp-1 ve TLR4 ekspresyon seviyelerinin normale dönebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte [EG00229] ve [S1] gruplarında aksonal büyümenin daha yavaş ilerlemesi, literatürde 50 ng S1 proteininin nöritik distrofilere neden olduğunu bildiren çalışma ile uyumludur [20]. Tez kapsamında, 25 ng S1 proteini konsantrasyonunun EG00229'a benzer şekilde aksonal büyümeyi yavaşlattığı görülmüştür.

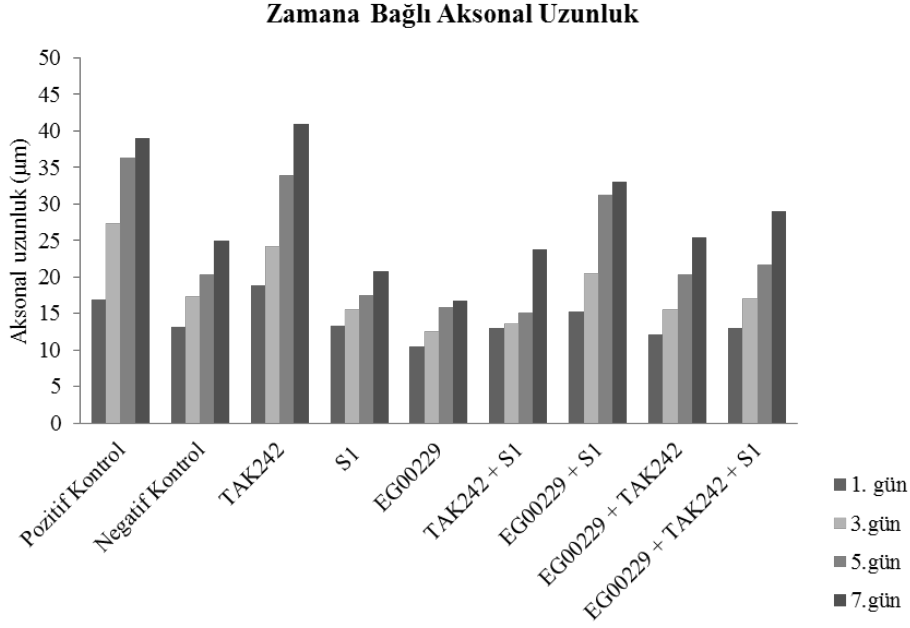
Aksonal büyüme, hasar alan olgun bir nöronun aksonal yenilenme ve dolayısıyla büyüme sürecini de kapsamaktadır. Aksonal büyümenin S1 kaynaklı yavaşlaması, SARS-CoV-2 ile ilişkili bozulan koku ve tat duyusu, kronik ağrı, bilişsel bozukluk gibi semptomların geç düzelmesinin nedenini açıklayabilir [133]. Yapılan çalışmalarda SARS-CoV-2'nin ya da S1 proteininin doğrudan veya dolaylı olarak nöronal morfolojiyi ve nörojenez yeteneğini bozduğu, sinaptik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir [18-20, 22]. Literatür ve bulgularımız kapsamında, örneğin koku duyusal nöronlarda aksotomiye neden olmuş olan SARS-CoV-2'nin, S1 proteini ile de aksonal yenilenme ve büyüme süreçlerinde olumsuz etki yapması, hem koku kaybıyla hem de iyileşmenin geç meydana gelmesiyle ilişkilendirilebilir. Bu kapsamda, sinir sisteminde SARS-CoV-2 ile ilişkili kalıcı ya da geçici bozukluklarla ilgili Nrp-1 ve potansiyel diğer reseptörlere odaklanılarak yapılabilecek ileri çalışmalar önerilmektedir.



Şekil 4.13. EG00229, TAK242 ve S1 Proteinin konsantrasyonları ve kombinasyonlarının aksonal büyüme üzerine etkisi. Farklılaşma aşamasındaki SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde aksonal morfoloji görüntüleri. Siyah ok işaretleri aksonal uzantı veren hücreleri ve uzantısını göstermektedir. Pozitif Kontrol; farklılaştırma besiyeri uygulanmış grup, Negatif Kontrol; besiyeri uygulanmış grup. (30': 30 dakika, 2850': 2850 dakika, 2880': 2880 dakika, B; Besiyeri) [Büyütme: X10]



Şekil 4.14. Aksonal uzunlukların konsantrasyonlara ve kombinasyonlara bağlı karşılaştırılması. [* sembolü; Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı, + sembolü; TAK242 ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı, # sembolü; Negatif kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı, ^ sembolü [EG00229 + S1] grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.] [* , # , + , ^ ; $p \leq 0.05$, ** , ++ ; $p \leq 0.005$, *** , +++ ; $p \leq 0.0005$, **** , +++++ ; $p \leq 0.0001$]



Şekil 4.15. Aksonal uzunlukların gruplar arasında zamana bağlı olarak karşılaştırılması.

4.4.3.2. Aksonal Büyümenin Western Blot Tekniği ile İncelenmesi

4.4.3.2.1. Western Blot Tekniği ile GAP43 Seviyelerinin Ölçülmesi

4.4.2.2.3 başlığında açıklandığı üzere β -aktin seviyelerinin deney grupları arasında değiştiği gözlenmiştir (Şekil 4.16-b). Ek olarak GAPDH normalizasyonu yapılmıştır ve pozitif kontrole göre rölatif protein seviyeleri tespit edilmiştir. Şekil 4.16'da membran görüntüleri ve grafikler verilmiştir.

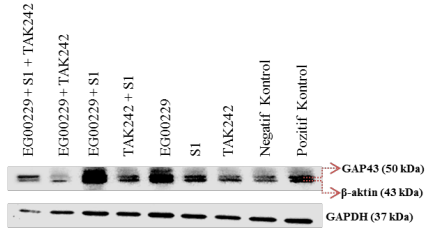
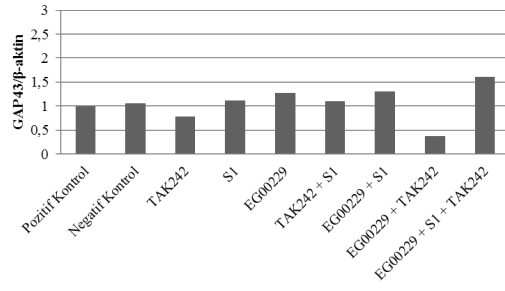
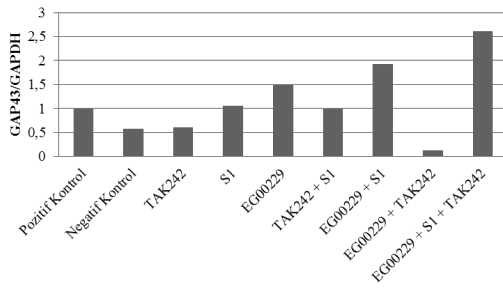
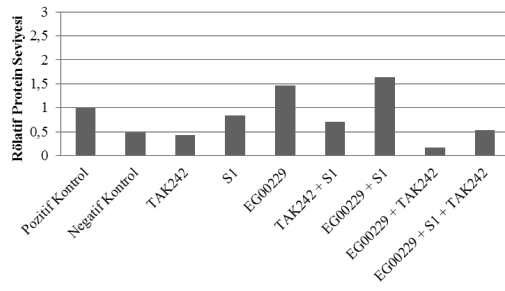
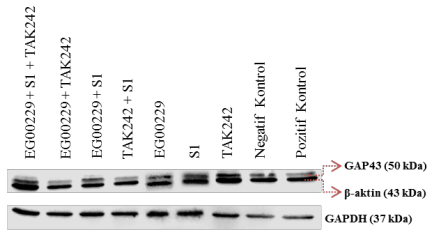
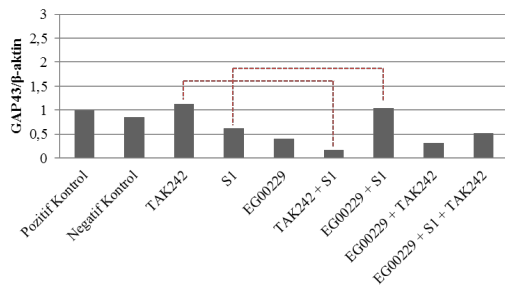
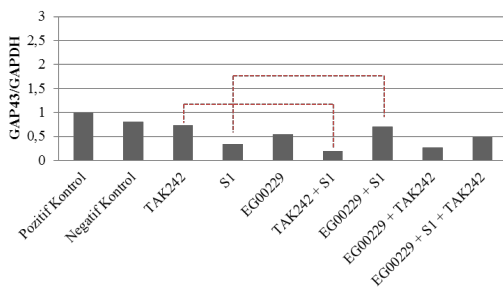
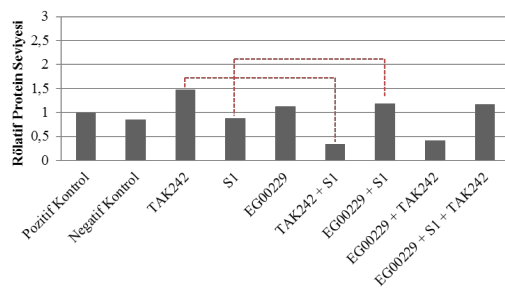
ImageJ ile yapılan analizler sonucunda 3. gün GAP43 seviyesinde β -aktin'e göre [TAK242] ve [TAK242 + S1] grupları arasında önemli sayılabilecek seviyede oransal fark (0.957) görülmüştür (Şekil 4.16-B; b). [S1] ve [EG00229 + S1] grupları arasında ise 0.420 değerinde oransal fark tespit edilmiştir. Destekler şekilde, GAPDH'e göre normalizasyon sonuçlarına göre [TAK242] ve [TAK242 + S1] grupları arasında 0.531; [S1] ve [EG00229 + S1] grupları arasında 0.366 oranında fark görülmüştür (Şekil 4.16-B; c). Benzer şekilde, pozitif kontrol grubuna göre [TAK242] ve [TAK242 + S1] grupları arasında 1.141; [S1] ve [EG00229 + S1] grupları arasında 0.309 değerinde oransal fark tespit edilmiştir (Şekil 4.16-B; d). Her üç normalizasyonda da MAP-2 seviyesinde de görüldüğü gibi (Şekil 4.12-

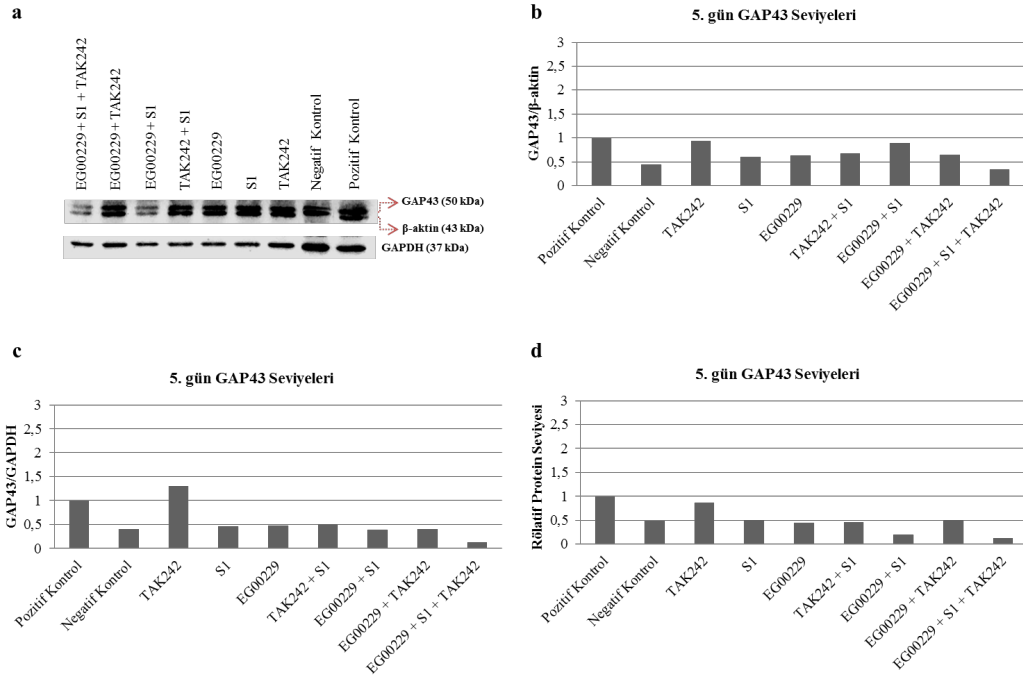
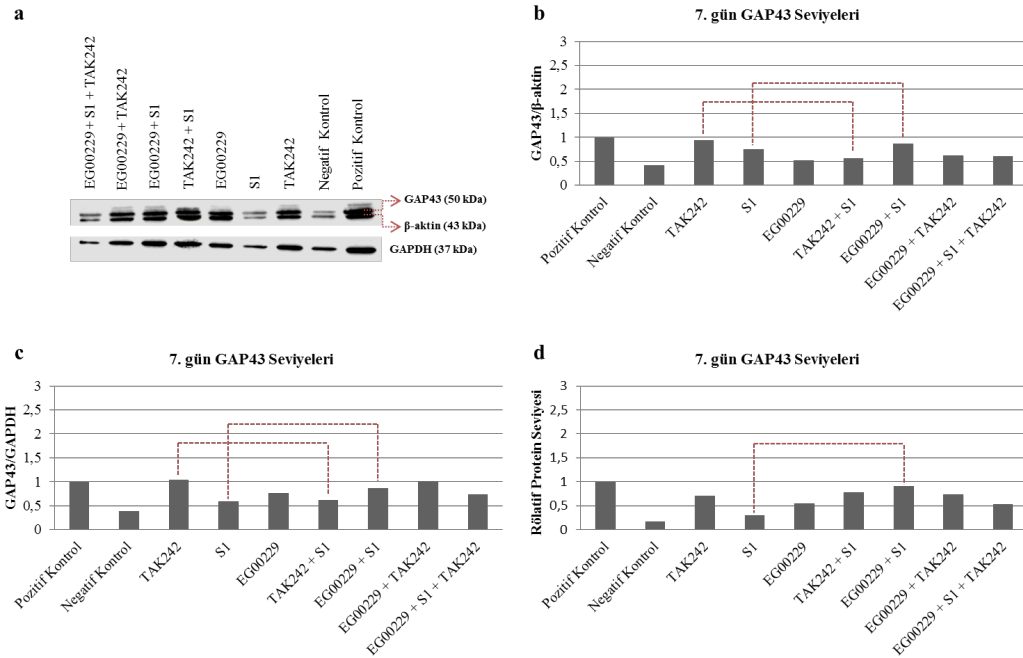
B) en düşük GAP43 seviyeleri [S1], [EG00229], [TAK242 + S1], [EG00229 + TAK242] ve [EG00229 + S1 + TAK242] gruplarında görülmüştür (*Şekil 4.16-B*).

5. gün GAP43 seviyesinde [TAK242] haricinde tüm gruplar 1'den düşük değer göstermiştir (*Şekil 4.16-C*). Benzer sonuç, 5. gün MAP-2 seviyelerinde de görülmüştür (*Şekil 4.12-C*). 7. gün GAP43 seviyelerinde ise 3. güne benzer şekilde; β -aktin'e göre [TAK242] ve [TAK242 + S1] grupları arasında 0.375, [S1] ve [EG00229 + S1] grupları arasında 0.105 değerinde oransal fark görülmüştür (*Şekil 4.16-D; b*). GAPDH'e göre normalizasyon sonuçlarına göre ise [TAK242] ve [TAK242 + S1] grupları arasında 0.418; [S1] ve [EG00229 + S1] grupları arasında ise 0.277 değerinde oransal fark tespit edilmiştir (*Şekil 4.16-D; c*). Her iki normalizasyon sonucuna benzer şekilde, pozitif kontrol grubuna göre [S1] ve [EG00229 + S1] grupları arasında 0.612 oranında fark görülmüştür (*Şekil 4.16-D; d*).

Literatürde SH-SY5Y hücrelerinin RA ile farklılaştırılma sürecinde nörit uzunluklarının zamana bağlı arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır [132]. Bunun yanında, yapılan çalışmalarda SH-SY5Y hücrelerinin 3. ve 5. günden itibaren GAP43 seviyelerinin arttığı gösterilmiştir [134, 135]. Literatürdeki bu bulgular doğrultusunda, 1. gün GAP43 seviyelerine göre bir değerlendirme yapılmamıştır. 3. gün S1 proteininin ve EG00229'un pozitif kontrole GAP43 seviyesini düşürdüğü görülmüştür. Bunun yanında EG00229'un yarım saat inkübasyonunun S1'in olumsuz etkisini önlediği ve GAP43 protein seviyesinde artışa neden olduğu görülürken, TAK242'nin benzer bir etkisi görülmemiştir. 5. gün protein seviyelerinde [TAK242] harici tüm gruplarda pozitif kontrole göre düşük GAP43 seviyesi görülmüştür. 5. gün için aynı problem MAP-2 seviyelerinde de görülmüştür (*Şekil 4.12-C*).

7. gün GAP43 seviyeleri ise 7. gün aksonal büyüme ölçümlerimizle (*Şekil 4.14*) uyumludur ve sonuçlarımızı desteklemektedir.

A**a****b****1. gün GAP43 Seviyeleri****c****1. gün GAP43 Seviyeleri****d****1. gün GAP43 Seviyeleri****B****a****b****3. gün GAP43 Seviyeleri****c****3. gün GAP43 Seviyeleri****d****3. gün GAP43 Seviyeleri**

C**D**

Şekil 4.16. A, 1. gün; B, 3. gün; C, 5. gün; D, 7. gün. a, WB membran görüntüleri. b, β-aktin seviyelerine göre GAP43 seviyeleri. c, GAPDH seviyelerine göre GAP43 seviyeleri. d, pozitif kontrole göre diğer grupların rölatif protein seviyeleri. kDa, kiloDalton.

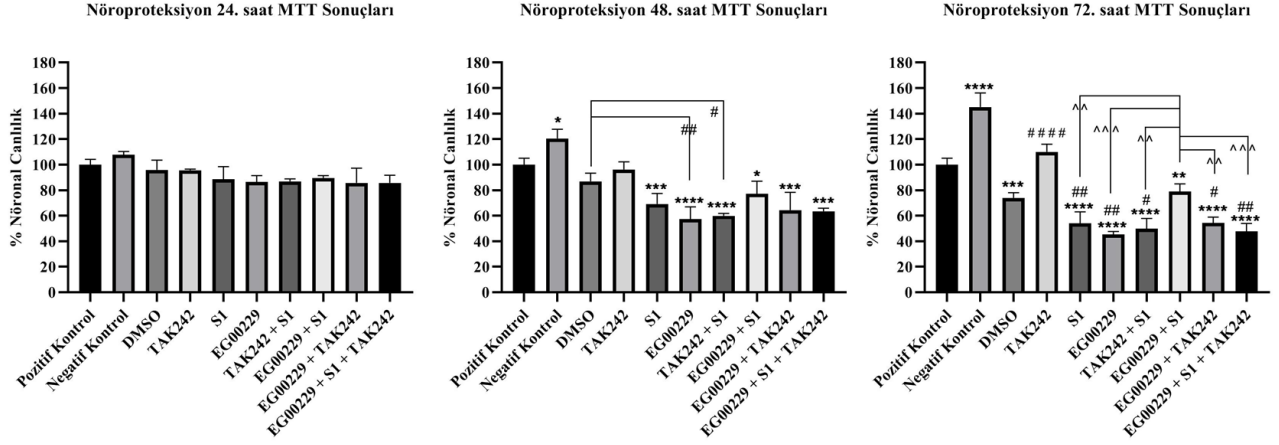
4.4.4. Farklılaştırılmış SH-SY5Y Hücrelerinde Nöronal Sağkalımların İncelenmesi (Nöroproteksiyon)

Farklılaşmış SH-SY5Y nöronal hücrelerine maddelerin direkt ve kombine şekilde uygulanmasından 24, 48 ve 72. saat sonraki MTT testi (Şekil 4.17) ve AT fotoğrafları (Şekil 4.18-19) ve apoptotik grafikler (Şekil 4.20) başlıklandırıldığı üzere verilmiştir.

4.4.4.1. Sitotoksosite ve Canlılık Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Apoptoz Yüzdelerinin İncelenmesi

Konsantrasyon uygulamalarından 24 saat sonra istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksosite görülmemiştir. 48. saate kadar ise IC50 oranında bir sitotoksosite görülmemiştir. **Bu sonuçlar, diğer deneyler için seçilen konsantrasyonların ve bu konsantrasyonlar ile muamele sürelerinin uygun olduğunu göstermektedir.** 48. saatte negatif kontrol, [DMSO] ve [TAK242] grupları haricindeki tüm gruplarda pozitif kontrole göre anlamlı bir sitotoksosite görülmüştür (*; $p \leq 0.05$, ***; $p \leq 0.0005$, ****; $p \leq 0.0001$). Hücre canlılığı [S1] grubunda %69.22 oranına, [EG00229] grubunda %57.27 oranına, [TAK242 + S1] grubunda %59.87 oranına, [EG00229 + TAK242] grubunda %64.42 oranına ve [EG00229 + S1 + TAK242] grubunda ise %63.54 oranına düşmüştür. Ek olarak DMSO grubu ile [EG00229] ve [TAK242 + S1] grupları arasında negatif yönlü istatistiksel fark tespit edilmiştir (#; $p \leq 0.05$, ##; $p \leq 0.005$). Buna karşın [TAK242] ile [EG00229 + S1] arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.17). Ek olarak pozitif kontrol ile negatif kontrol arasında pozitif yönde anlamlı fark tespit edilmiştir (*; $p \leq 0.05$). Negatif kontrolün zamana bağlı artışı hücre proliferasyonu ile canlılığın artışından kaynaklanmaktadır. Çünkü, negatif kontrol grubunda RA uygulaması yapılmamıştır. RA'nın in vitro çalışmalarda hücre döngüsünü G1/G0 fazında durdurduğunu ve hücre bölünmesini bir derece azalttığı bildirilmiştir [109]. Benzer şekilde, zamanla doğru orantılı olarak 72. saatte pozitif kontrol ile negatif kontrol arasında pozitif yönde anlamlı fark görülmüştür (****; $p \leq 0.0001$). Öte yandan, [TAK242] ve [EG00229 + S1] grupları haricinde tüm gruplarda negatif yönlü istatistiksel farklar tespit edilmiştir (*; $p \leq 0.05$, ***; $p \leq 0.0005$, ****; $p \leq 0.0001$). DMSO grubu ile negatif kontrol ve [EG00229 + S1] grupları haricindeki tüm gruplarda istatistiksel fark görülmesi; çözücü olarak DMSO'nun kullanıldığı EG00229'un ve TAK242'nin etkilerinde DMSO'nun istatistiksel olarak

anlamli herhangi bir rolünün olmadığını göstermiştir (#; $p \leq 0.05$, ##; $p \leq 0.005$, ####; $p \leq 0.0001$). [TAK242] ile pozitif kontrol arasında anlamli bir etkinin görülmemesi, TAK242'nin üç gün boyunca ortamda bulunmasının nöroproteksiyonu etkilemediğini göstermiştir. Öte yandan, EG00229'un üç günlük etkisi IC50 değerinden daha büyük (%45.23 oranında) bir sitotoksositeye neden olmuştur. Benzer şekilde, S1 proteinini ortamdaki üç gün varlığı, nöronal canlılığı %45.92 oranında düşürmüştür. Aynı şekilde [TAK242 + S1] grubunda canlılık %50.06 oranında düşmüştür. Buna karşın, [EG00229 + S1] grubu ile [S1], [EG00229], [TAK242 + S1], [EG00229 + TAK242], [EG00229 + S1 + TAK242] grupları arasında istatistiksel fark görülmüştür (^; $p \leq 0.05$, ^^; $p \leq 0.005$, ^^; 0.0005 , ^^; $p \leq 0.0001$). Tüm bu sonuçlar, zamanla doğru orantılı olarak S1 ve EG00229'un *in vitro* ortamda doğal seyrinde ilerleyen nöroproteksiyonu benzer oranlarda bozduğunu; TAK242'nin ise benzer bir etkisi olmadığını, TLR4'ün blokasyonunun S1 proteininin etkisini azaltmadığını, Nrp-1 blokasyonunun S1'e karşı ise nöroprotektif etki sağladığını göstermiştir. Bunun yanında, EG00229 ile TAK242'nin aynı anda ortama verilmesinin de nöroproteksiyon üzerinde olumsuz etkisi olduğu görülmüştür. Bu bulgu önceki bulgularımızla benzer şekilde, Nrp-1 ve TLR4'ün aynı anda blokasyonunun olumsuz etkilere sebep olduğunu bir kez daha doğrulamıştır. Yapılan çalışmalarda S1 proteininin dolaylı olarak nöronal ölüme sebep olduğu bildirilmiştir [18, 19]. Tez çalışması kapsamındaki bulgumuz ise, S1 proteininin, nöronal sağ kalımı Nrp-1 üzerinden doğrudan etkileyebildiğini göstermiştir. Destekler nitelikte, Nrp-1 ekspresyonunun devre dışı bırakıldığı bir çalışmada internöron sayısının azaldığı görülmüştür [77]. Ek olarak VEGF'in Nrp-1 ile ilişkisinin nöronal sağkalımı desteklediği bilinmektedir [76]. Bu bağlamda EG00229 ve S1'in Nrp-1/VEGF-A gibi bağlatıları bozarak nöronal sağkalım modülasyonlarına etki ettiği düşünölmektedir.



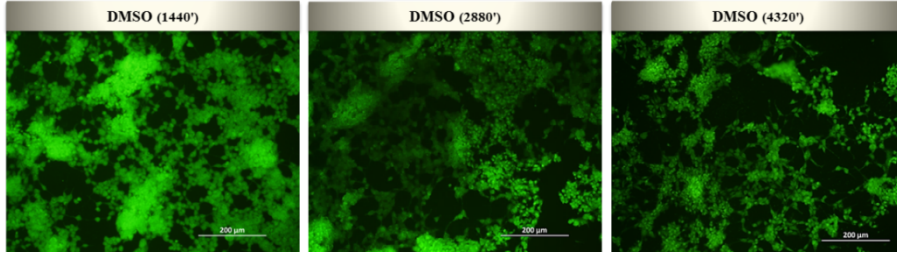
Şekil 4.17. Nöroproteksiyon. 24, 48 ve 72. saat sonraki MTT sonuçları. [* sembolü; Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı, # sembolü; DMSO grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel fark, ^ sembolü; [EG00229 + S1] grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.] [* , #; $p \leq 0.05$, **, ###, ^^; $p \leq 0.005$, ***, ###, ^^; $p \leq 0.0005$, ****, #####; $p \leq 0.0001$]

Apoptotik nöron oranlarında, 24. saatte hem pozitif kontrole göre hem de grupların kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Buna karşın, 48. saatte [S1] ve [EG00229] gruplarında pozitif kontrole göre negatif yönde anlamlı fark tespit edilmiştir (*; $p \leq 0.05$, **; $p \leq 0.005$) (Şekil 4.20).

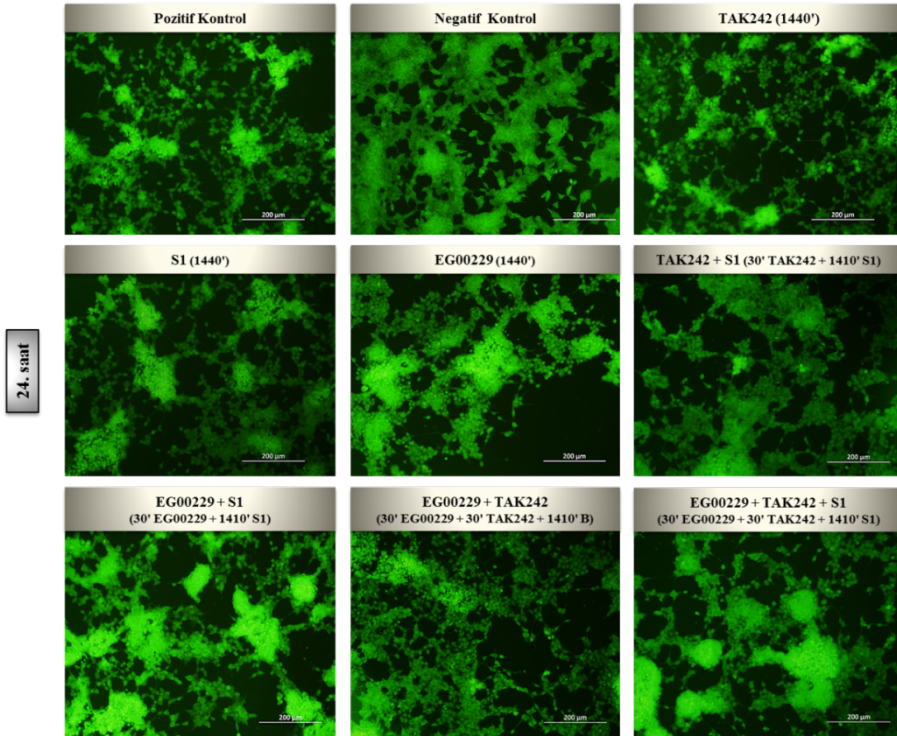
72. saatte ise pozitif kontrole göre anlamlı fark yalnızca [EG00229] grubunda görülmüştür. Bunun yanında, en yüksek apoptotik oran, [S1], [EG00229] ve [TAK242 + S1] gruplarında görülmüştür (sırasıyla; %40.7; %48.49; %37.66). Ek olarak, [EG00229 + TAK242] ve [EG00229 + S1 + TAK242] grupları pozitif kontrole göre apoptotik hücre sayısını sırasıyla %18.21 ve %13.29 oranlarında arttırmıştır. Öte yandan, pozitif kontrol ile [EG00229 + S1] grupları arasında anlamlı bir fark bulunamasa da EG00229'un yarım saat ön inkübasyonu, S1 proteininin apoptotik oranını %13.59 oranında azaltmıştır. Birlikte ele alındığında bu sonuçlar, MTT sonuçlarıyla uyumludur ve S1 proteininin EG00229'a benzer şekilde Nrp-1 üzerinden apoptotik yolları tetiklediğini ve nöronların nöronal sağkalım mekanizmalarını etkilediğini düşündürmektedir.

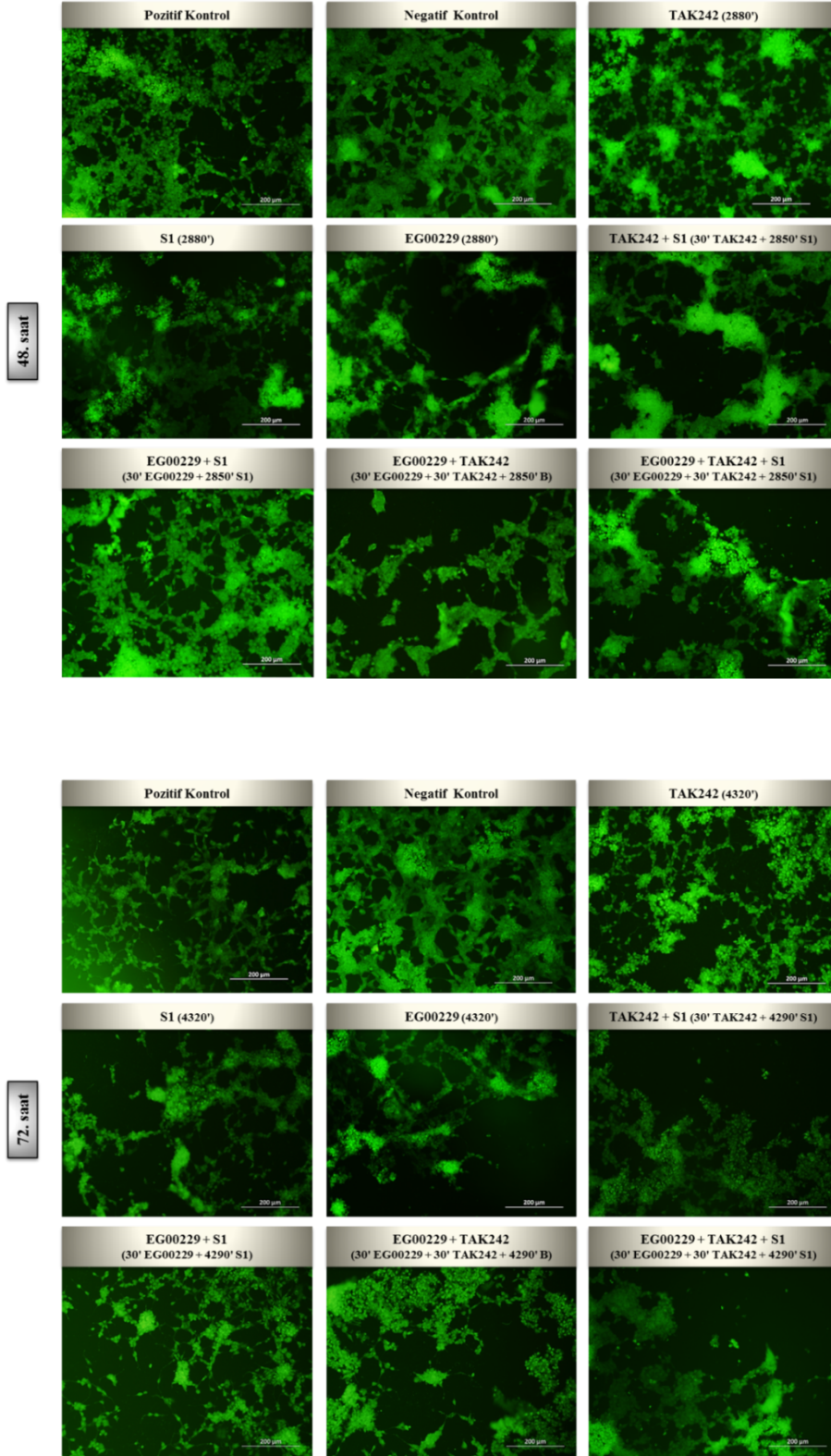
Yapılan bir çalışmada SARS-CoV-2'nin insan kortikal nöronlarında reaktif oksijen türlerini artırarak apoptozu indüklediği bildirilmiştir [136]. Bu bulgu, S1 proteininin

apoptotik nöron oranını arttırdığı bulgumuzla örtüşmektedir. Bunun yanında, [EG00229 + TAK242] ve [EG00229 + S1 + TAK242] gruplarında da benzer apoptotik oranların görülmesi Nrp-1 ile TLR4'ün nöronal apoptotik yollarda birbirleriyle ilişkili olabileceğini göstermektedir. **Tüm bunlara ek olarak bu deney aşamasında, direkt verilen maddeler ortamda iki gün değil üç gün kalmıştır.**

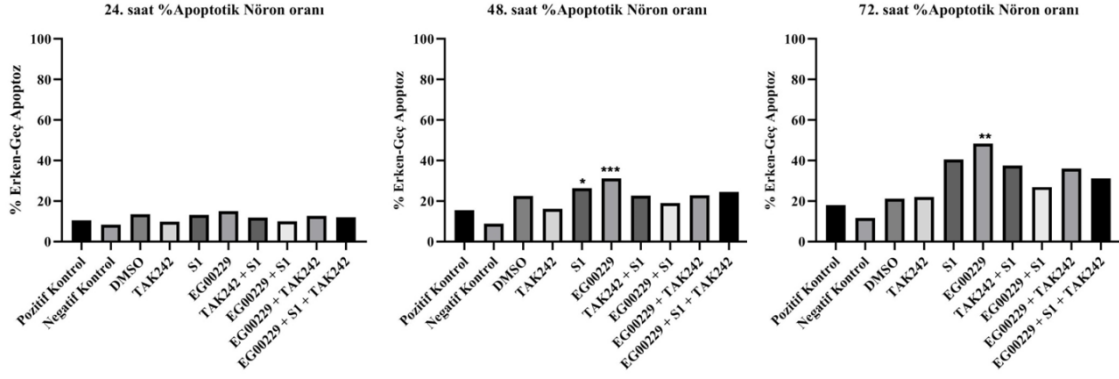


Şekil 4.18. TAK242'nin ve EG00229'un çözücüsü olarak kullanılan DMSO'nun 24, 48 ve 72. saat AT boyama görüntüsü. (DMSO oranı; 1:1000) [Büyütme: X10]





Şekil 4.19. Konsantrasyonların ve kombinasyonların uygulanmasından 24, 48 ve 72 saat sonrası AT boyama görüntüleri. Pozitif Kontrol; farklılaştırma besiyeri uygulanmış grup, Negatif Kontrol; besiyeri uygulanmış grup. [Büyütme X10].



Şekil 4.20. 24, 48 ve 72. saatteki apoptotik hücre oranı.

[*; $p \leq 0.05$, **; $p \leq 0.005$, ***; $p \leq 0.0005$]

4.4.5. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Nöronal Göç Potansiyellerinin İncelenmesi (Nöronal Göç)

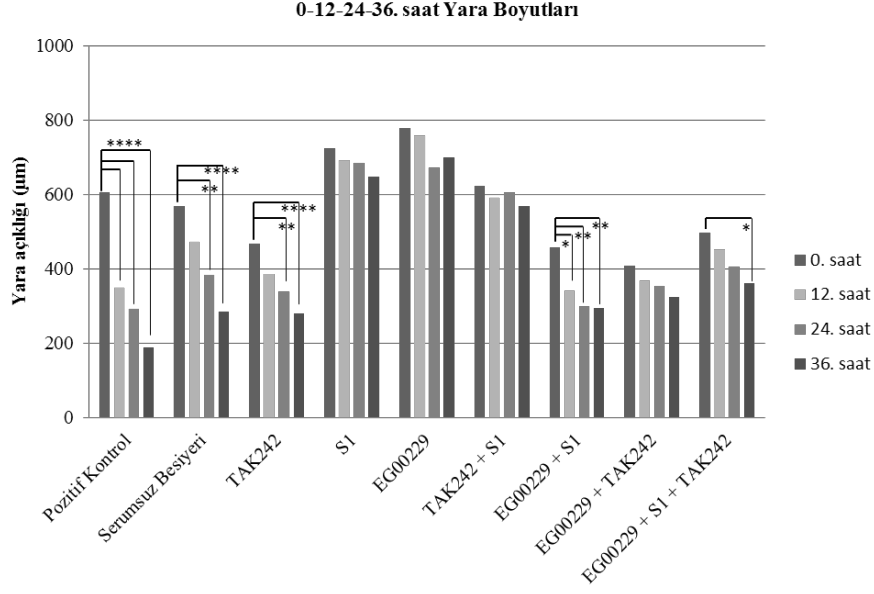
4.4.5.1. Yara Modeli Sonuçları

Konsantrasyon uygulamasını takiben 0, 12, 24 ve 36. saatlerdeki yara boyutu uzunluk ölçümleri *Şekil 4.21*'de ve yara alanı ölçümleri *Şekil 4.22*'de verilmiştir. Hem yara boyutu hem de yara alanı analizleri birbirini ve önceki deney sonuçlarını desteklemektedir.

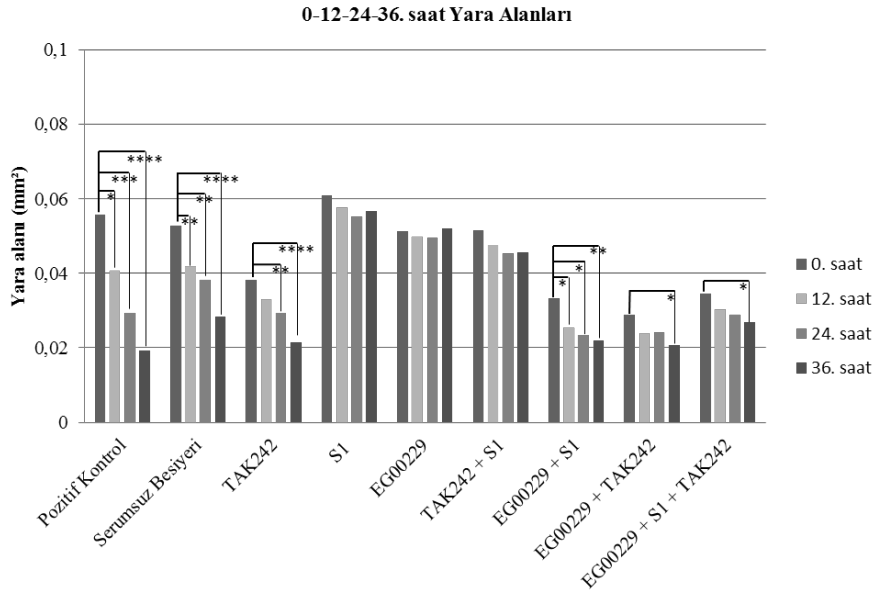
Pozitif kontrol grubunda yara boyutu ve yara alanları zamanla doğru orantılı olarak 0. saate göre istatistiksel olarak anlamlı bir farkla azalmıştır (*; $p \leq 0.05$, **; $p \leq 0.005$, ***; $p \leq 0.0005$, ****; $p \leq 0.0001$). Proliferasyonun ve dolayısıyla yara kapanmasının, pozitif kontrol grubunda diğer gruplara göre oransal olarak daha fazla olduğu görülmüştür. Bu sonuç, ortamda bulunan FBS'nin nöronal göçü arttırdığını göstermiştir. Benzer şekilde, serumsuz besiyeri, [TAK242] ve [EG00229 + S1] gruplarında zamanla doğru orantılı olarak 0. saate göre pozitif yönde anlamlı farklar görülmüştür (*; $p \leq 0.05$, **; $p \leq 0.005$, ***; $p \leq 0.0005$, ****; $p \leq 0.0001$). Öte yandan, [S1], [EG00229] ve [TAK242 + S1] gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir yara kapanması görülmemiştir (*Şekil 4.21*, *Şekil 4.22*). Bu sonuçlar, EG00229 ve S1 proteininin nöronal sinir hasarı sonrasında iyileşme üzerinde benzer olumsuz etkiyi yaptığını, ek olarak TAK242'nin S1 proteininin olumsuz etkilerini önleyemediğini, EG00229'un yarım saat önceden hücrelere verilmesi ise S1 proteininin olumsuz etkilerini önlediğini göstermiştir. Bunun yanında, [EG00229 + TAK242] ve [EG00229 + S1 + TAK242] gruplarında 12 ve 24. saatlerde anlamlı bir yara

kapanması görülmemiştir. Önceki deneysel sonuçlara benzer şekilde EG00229 ve TAK242'nin aynı anda ortamda bulunması olumsuz etkiye neden olmuştur. 36. saatte ise her iki grupta da sinir hasarının, serumsuz besiyeri, [TAK242] ve [EG00229] gruplarına göre daha düşük bir istatistiksel farkla iyileştiği görülmüştür (*; $p \leq 0.05$). Bu sonuç, zamana bağlı olarak Nrp-1 ve TLR4 reseptör ifadelerinin veya ilişkili yolların değiştiğini ya da telafi edildiğini düşündürmektedir. Benzer sonuç aksonal büyümenin 7. gününde de görülmüştür (*Şekil 4.14*).

Sonuçlar, S1 proteinin, nöroblastoma hücrelerindeki bir yara hasarının zamana bağlı iyileşme ve kapanma sürecini bozduğunu ve bu etkiye Nrp-1 üzerinden sebep olduğunu göstermektedir. Literatürde SARS-CoV-2/S1 proteininin nöronal göç üzerindeki doğrudan etkilerini konu alan bir çalışmaya rastlanmamıştır ancak Nrp-1 blokasyonunun nöronal göç kusurlarına neden olduğu bilinmektedir [76]. Öte yandan, TLR4'ün devre dışı bırakılmasının omurilik hasarından sonra ikincil bir hasarı azalttığı ve fonksiyonel iyileşmeyi desteklediği bildirilmiştir [137]. Buna karşın, yapılan başka bir çalışmada TLR4'ün, serebral iskemi sonrası nöroblast göçünü teşvik ederek yeni kortikal nöronların sayısında artışa neden olduğu da görülmüştür [138]. Çalışmamızda ise nöroblastoma hücrelerinde bir yara hasarı sonrası TLR4'ün bloke edilmesinin iyileşme üzerinde olumsuz bir etkisi görülmemiştir. Bunun yanında, bu blokasyon S1'in olumsuz etkilerini önleyememiştir. Buna karşın, Nrp-1'in blokasyonu, yara iyileşmesi üzerindeki S1 kaynaklı olumsuz etkinin önüne geçmiştir.



Şekil 4.21. Konsantrasyon uygulamasını takiben 0, 12, 24 ve 36. saatteki yara açıklığı. [*** sembolü; 0. saat ile diğer saatler arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.] [***; $p \leq 0.05$, ****; $p \leq 0.005$, *****; $p \leq 0.0005$, ******; $p \leq 0.0001$]



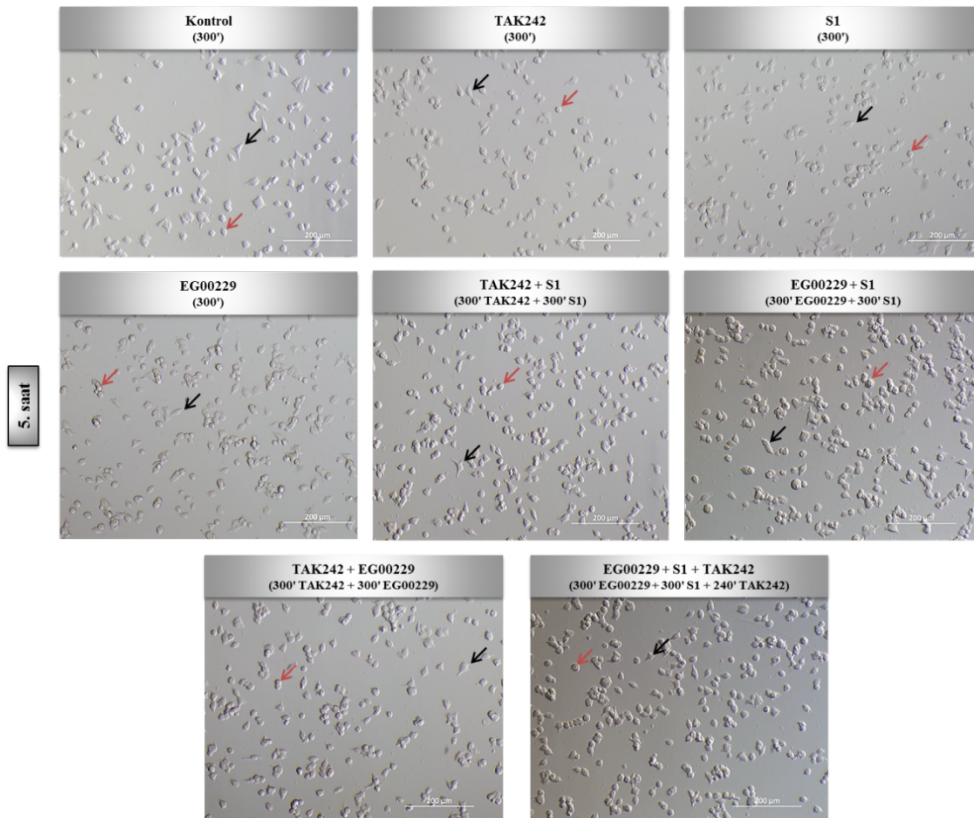
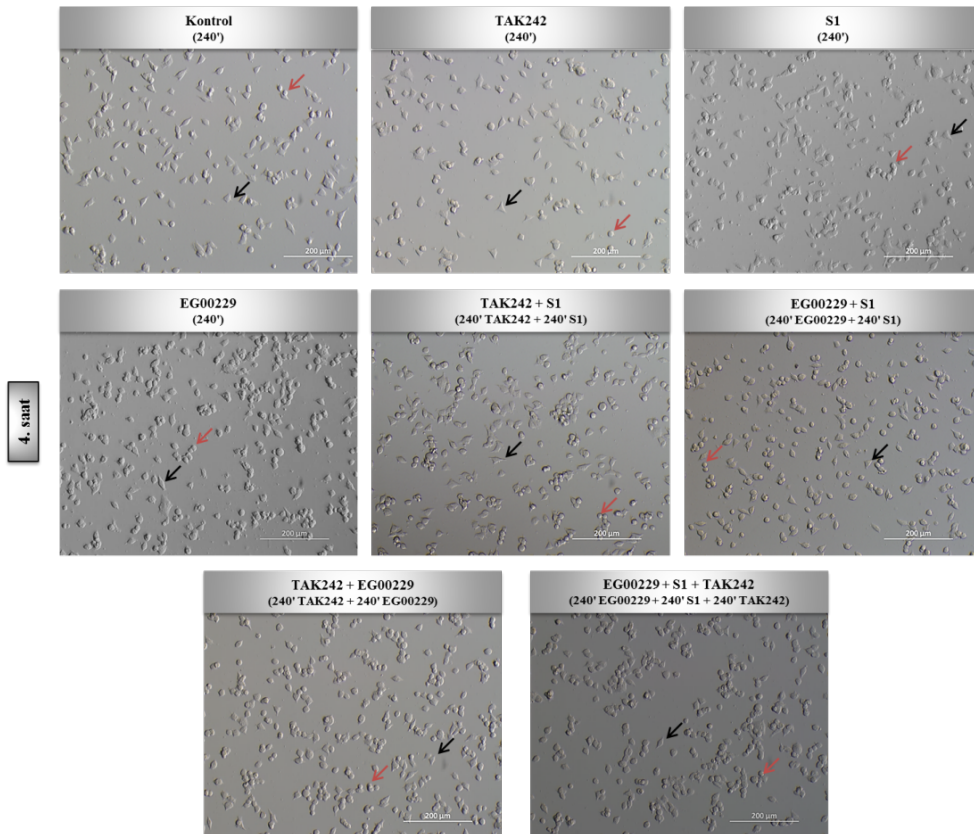
Şekil 4.22. Konsantrasyon uygulamasını takiben 0, 12, 24 ve 36. saatteki yara alanı. [*** sembolü; 0. saat ile diğer saatler arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.] [***; $p \leq 0.05$, ****; $p \leq 0.005$, *****; $p \leq 0.0005$, ******; $p \leq 0.0001$]

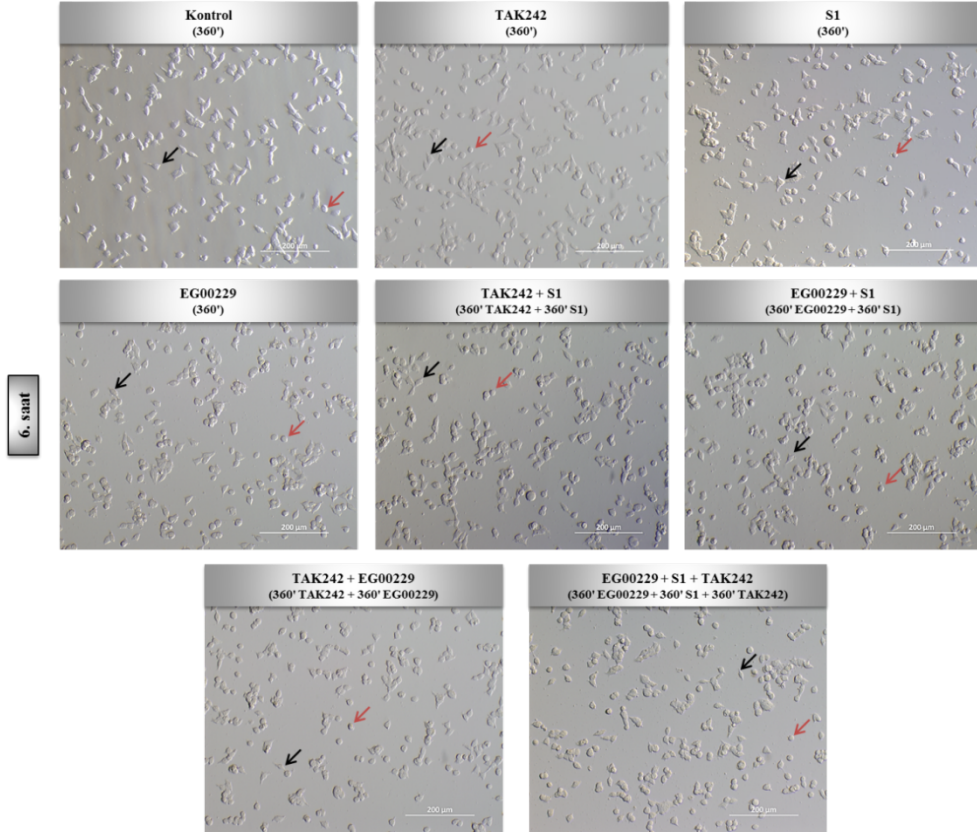
4.4.5.2. Hücre Adezyonunun İncelenmesi

Konsantrasyonların uygulanmasını takiben 4, 5 ve 6. saatlerdeki hücre fotoğrafları *Şekil 4.23* ve % tutunmuş hücre oranı *Şekil 4.24*'te verilmiştir.

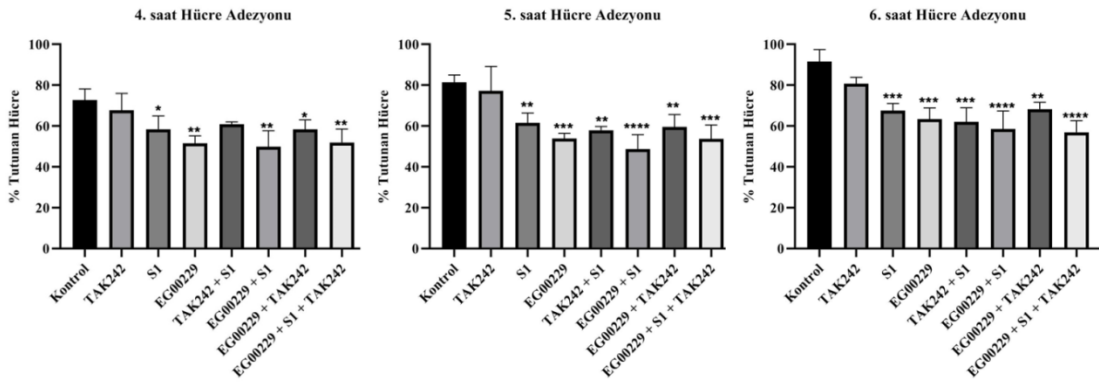
4, 5 ve 6. saatlerde [TAK242] grubu haricindeki tüm gruplar kontrol grubuna göre negatif yönde anlamlı fark göstermiştir (*; $p \leq 0.05$, **; $p \leq 0.005$, ***; $p \leq 0.0005$, ****; $p \leq 0.0001$) (*Şekil 4.24*). 6. saatin sonunda en yüksek istatistiksel fark [EG00229 + S1] ve [EG00229 + S1 + TAK242] gruplarında görülmüştür. Bu sonuç, önceki deneysel sonuçlardan elde edilen sonuçlar ve açıklamalarla uyusmaktadır. Önceki deney aşamalarından farklı olarak bu deneyde maddeler ve kombinasyonların hepsi **aynı anda** ortama eklenmiştir ve 6 saat boyunca ortamda kalmıştır. Hücre adezyonu birçok parametreye sahip olsa da madde ve kombinasyonlardan etkilenen biyokimyasal yolları bir kenara bırakarak tamamen mekanik düşünüldüğünde (hücre adezyonunun da biyomekanik bir reseptör-transmembran protein-matriks yapışma süreci olduğu göz önüne alındığında) bu sonuçlar EG00229 ve S1 proteininin Nrp-1'e bağlanma miktarının zamana bağlı olarak arttığını ve hücre adezyonunu azalttığını göstermektedir [79]. Destekler nitelikte Nrp-1'in nöronal adezyonda rol oynadığı bilinmektedir [80]. Ek olarak, yapılan çalışmalarda TLR4'ün de çeşitli hücre tiplerinin adezyonunda rol aldığı gösterilmiştir [139]. Tez çalışmasında ise TLR4'ün blokasyonunun adezyon üzerinde herhangi bir etkisi gözlenmemiştir. Buna karşın, 5. ve 6. saatlerde [TAK242] grubu hariç tüm gruplarda hücre adezyonunun pozitif kontrole göre negatif yönlü fark göstermesi, ortamda bulunan EG00229 veya S1'den kaynaklandığı sonucuna ulaşılmıştır.

Önceki deneylerde EG00229 tek başına Nrp-1 blokasyonu yaparken, burada S1 proteiniyle beraber Nrp-1 blokasyonuna neden olmuştur. Dolayısıyla daha fazla Nrp-1 bloke olmuştur ve hücre adezyonunda rol oynayan bu reseptörün işlevi belli bir oranda bozulmuştur. Tez çalışması kapsamında S1'in 4, 5 ve 6. saatlerdeki hücre adezyonunu sırasıyla %14.2, %19.85, %24.09 oranlarında bozduğu görülmüştür. **Elde edilen sonuçlar, Nrp-1'in reseptör ve inhibisyon ilişkilerinde zaman ve etkilenen reseptör miktarı parametrelerinin önemini bir kez daha vurgulamaktadır.**





Şekil 4.23. 4, 5 ve 6. saatteki hücre adezyonu fotoğrafları. [Siyah oklar, yüzeye tutunmuş olan hücreleri; kırmızı oklar, tutunmamış hücreleri göstermektedir.] [240'; 240 dakika, 300'; 300 dakika, 360'; 360 dakika][Büyütme X10]



Şekil 4.24. 4, 5 ve 6. saatteki % tutunmuş hücre oranı. [* sembolü; Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.] [*; $p \leq 0.05$, **; $p \leq 0.005$, ***; $p \leq 0.0005$, ****; $p \leq 0.0001$]

4.4.5.3. SH-SY5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Transwell Sisteminde Göç Potansiyellerinin İncelenmesi

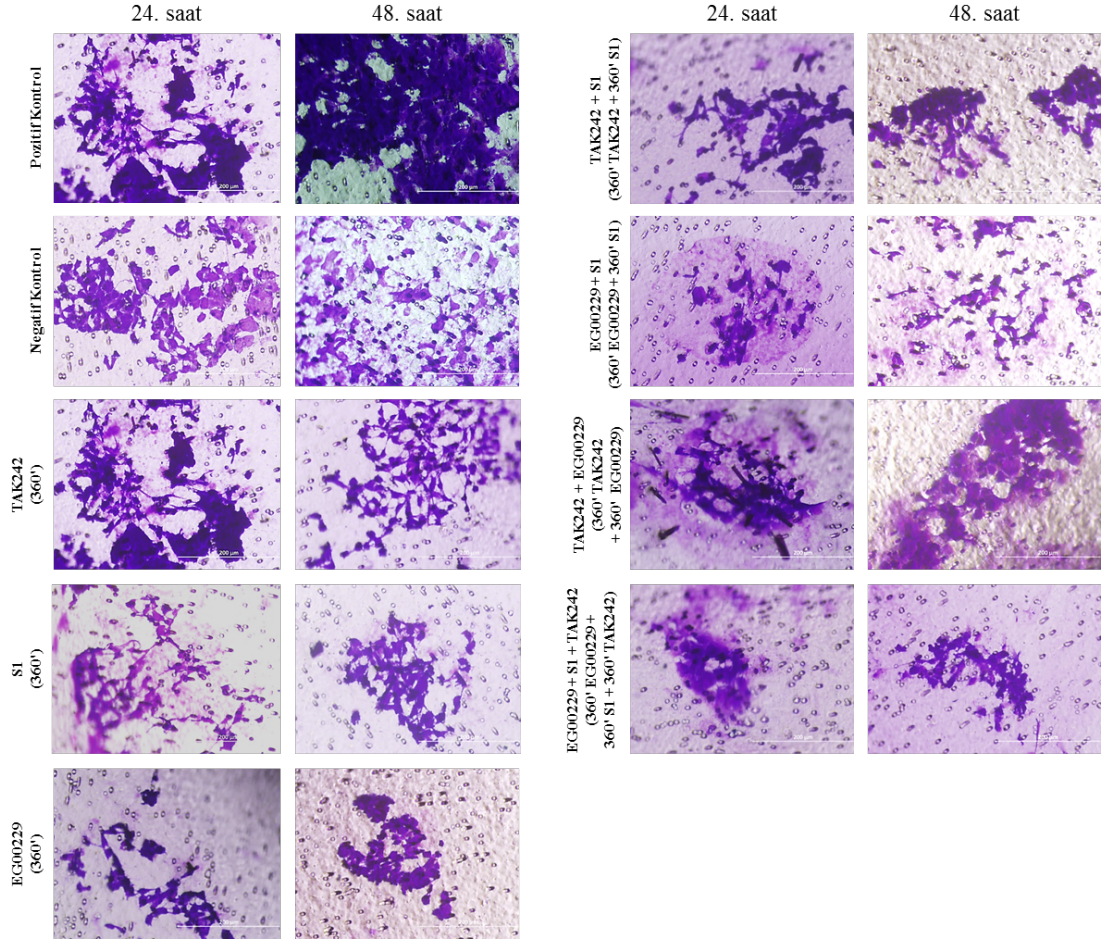
Transwell sistemine hücre ekiminden 24 ve 48. saatteki göç eden hücre fotoğrafları *Şekil 4.25*'te ve göç eden hücre sayıları *Şekil 4.26*'da verilmiştir.

24. saat nöronal göçte pozitif kontrol grubuna göre negatif kontrol ve [TAK242] gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Diğer tüm gruplarda ise nöronal göç pozitif kontrole göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (**; $p \leq 0.005$, ***; $p \leq 0.0005$, ****; $p \leq 0.0001$). Pozitif kontrole göre istatistiksel olarak en yüksek nöronal göç düşüşü [EG00229], [EG0029 + S1] ve [EG00229 + S1 + TAK242] gruplarında görülmüştür (****; $p \leq 0.0001$) (*Şekil 4.26*). Grupların kendi aralarında istatistiksel bir fark bulunamamıştır. Nöronal göç, [TAK242] grubu haricindeki tüm gruplarda negatif kontrole göre sayısal olarak düşüş göstermiştir. Bu sonuç, hücre adezyonunda da görülmüştür. Bu etkinin, tüm grupların EG00229 veya S1 proteini içermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. **Bu bağlamda, nöronal hücrelere EG00229 ve S1 proteininin aynı anda altı saat muamelesi hücre yüzeyindeki aktif Nrp-1 miktarını azalttığı ve dolayısıyla Nrp-1'in nöronal göçteki sinyalizasyonlarının azaldığı düşünülmüştür.**

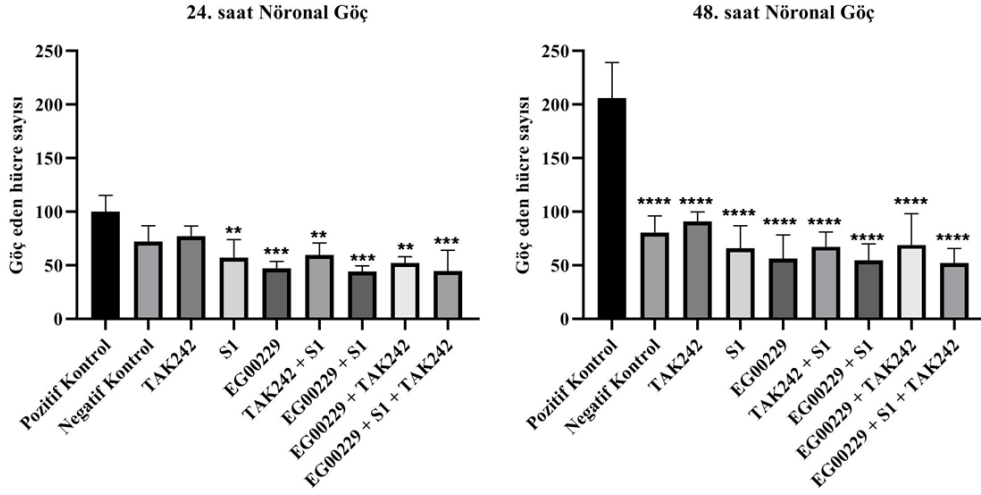
48. saatte pozitif kontrolde nöronal göç iki katına çıkarken diğer gruplarda nöronal göç ortalama 10.28 hücre kadar artış göstermiştir. Tüm gruplarda pozitif kontrole göre negatif yönde anlamlı fark tespit edilmiştir. Negatif kontrole göre ise istatistiksel olarak anlamlı bir göç farkı görülmemiştir (*Şekil 4.26*).

Tüm sonuçlar birlikte ele alındığında, Nrp-1'in EG00229 ve S1 ile bloke edilmesi nöronal göç potansiyelini düşürmüştür. Literatürde hem Nrp1'in hem de TLR4'ün nöronal göç sürecinde rol oynadığı bildirilmiştir [76, 138]. Sonuçlarımız kapsamında, TLR4'ün baskılanması 24. saat sonraki göç üzerinde negatif yönlü anlamlı bir etki göstermemiştir. Öte yandan, 48. saatteki en düşük nöronal göç oranı [EG00229 + S1] ve [EG00229 + S1 + TAK242] gruplarında (sırasıyla; 54.43 ve 51.87 oranlarında) görülmüştür. Bu bulgu, tüm sonuçlarımızı destekler nitelikte olup, ortamdaki EG00229'un ve S1'in daha fazla Nrp-1 blokasyonuna neden olduğunu düşündürmektedir. Ek olarak, negatif kontrol ve [TAK242] gruplarında da nöronal göç potansiyelinin düşük olduğu görülmüştür. Ancak bu iki gruptan elde edilen sonuçlarda, 24. saatte kontrol grubuna göre istatistiksel fark göstermemiştir. Genel itibariyle nöronal göçün pozitif kontrolden çok daha düşük olmasının sebebi olarak

ise, transwellin alt bölümünün serumsuz besiyeri içermesinden kaynaklandığı düşünülmüştür.



Şekil 4.25. 24 ve 48. saat nöronal göç fotoğrafları. [240'; 240 dakika, 300'; 300 dakika, 360'; 360 dakika] [Büyütme X20]



Şekil 4.26. 24 ve 48. saatlerdeki göç eden hücre sayısı. [* sembolü; Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir.] [*; $p \leq 0.05$, **; $p \leq 0.005$, ***; $p \leq 0.0005$, ****; $p \leq 0.0001$]

5. YORUM

Sonuç olarak, yapılan bu tez çalışmasında; SARS-CoV-2 Spike proteininin birimlerinden biri olan S1 proteininin, Nrp-1 inhibitörü olan EG00229 ile benzer etkiler yaparak; nörojenezi, aksonal büyümeyi, nöroproteksiyonu, nöronal adezyonu ve göçü olumsuz etkilediği tespit edilmiştir. Bu bağlamda, SARS-CoV-2'nin sinir sistemi ile ilişkili patofizyolojik etkilerine Nrp-1 disfonksiyonlarına sebep olarak **doğrudan** sebep olabileceği görülmüştür. Ek olarak SARS-CoV-2'nin hedef reseptörü olan TLR4'ün, bu fizyolojik süreçlerde **doğrudan** rol almadığı görülmüştür. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, Spike proteininin İsviçre farelerinden izole edilmiş primer kortikal nöronları üzerinde **doğrudan** olumsuz bir etkisi olmadığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, Spike proteininin nöroinflamasyon ve hipokampal mikroglioz yoluyla sinaptik kayıplara ve hafıza bozukluğuna aracılık ettiği bulunmuştur [22]. Aynı çalışmada, TLR4 sinyalinin bloke edilmesinin Spike proteininin neden olduğu sinaps eliminasyonuna ve hafıza fonksiyon bozukluğuna karşı koruduğu bulgusu ise çalışmamız kapsamındaki sonuçlarla zıt görünmektedir. Ancak bu çalışmada fare primer nöronları ve fare mikrogliyal hücre hatları kullanılırken, tez çalışmamız kapsamında insan hücre hattı üzerindeki etkiler incelenmiştir. Sonuçlarımızı destekler nitelikte, insan primer kortikal nöronlarıyla yapılan başka bir çalışmada S1 proteini **doğrudan** nöritik bozukluklara sebep olmuştur [20]. Tüm bunlarla beraber, yapılan her iki çalışmada da olgun nöronal morfoloji üzerindeki doğrudan etkilere bakılmıştır, tez çalışmasında ise aksonal büyüme ve dolayısıyla yenilenmeyi de içerecek fizyolojik süreç üzerindeki doğrudan etkilere odaklanılmıştır.

Genel olarak literatürde, SARS-CoV-2 Spike/S1 proteininin nöronlar üzerinde **hem dolaylı hem de doğrudan** hasarlar verdiği görülmektedir. Tez çalışmamız kapsamında ise, S1 proteininin nöronal hasara Nrp-1 fonksiyonlarını etkileyerek doğrudan sebep olduğu; Nrp-1'in ön blokasyonunun bu hasarları önlediği görülmüştür. TLR4'ün ön blokasyonunun ise S1 proteininin etkilerini önleyemediği tespit edilmiştir. TLR4'ün S1 proteini kaynaklı bozukluklarda rol oynadığını bildiren çalışmalar olsa da, çalışmamız kapsamında, SH-SY5Y nöronal hücreler üzerinde böyle bir bulguya rastlanmamıştır. Tüm literatür ve bulgularımız birlikte ele alındığında, S1 proteininin sinir sistemindeki fizyolojik bozukluklara hem doğrudan (Nrp-1 gibi reseptörleri hedefleyerek) hem de dolaylı olarak (TLR4 gibi reseptörleri hedefleyerek) sebep olabileceği görülmektedir. Ek olarak,

çalışmamız kapsamında Nrp-1 ve TLR4'ün birbirleriyle ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu sonuç, S1 proteininin bu etkileşime de müdahale edebileceğini düşündürmektedir.

Tüm bunlarla beraber elde edilen sonuçlar, Nrp-1 reseptörünün inhibisyon ilişkilerinde zaman ve dolayısıyla etkilenen reseptör miktarı parametrelerinin önemini vurgularken, aynı zaman ve miktar parametresinin en azından bu nöronal çalışma kapsamında TLR4 için geçerli olmadığı tespit edilmiştir. Birbiriyle zıt bu iki yoruma birçok nedensel açıklama getirilebilir ve kanıtlamak üzere kapsamlı çalışmalar yapılabilir. Ayrıca, SH-SY5Y nöroblastoma ve nöronal hücrelerinde Nrp-1 ve TLR4'ün ifade olduğu bilirse de birbirleriyle kıyaslamalı reseptör miktarları bilinmemektedir. Tez çalışmasında nihai amaç olan, S1'in, nöronal süreçler üzerindeki etkilerini Nrp-1 ile etkileşerek **doğrudan** etkileyebileceği ve bozabileceği gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlar ve yorumları maddeler halinde kısaca verilmiştir:

- 1) Çok çeşitli görevleri olan Nrp-1 reseptörünün spesifik olarak b1 alanına bağlanıp fonksiyonlarını engelleyen EG00229 maddesinin 200, 300 ve 400 µM konsantrasyonları, fare fibroblast hücrelerinde zamanla doğru orantılı olarak IC50 değerinde sitotoksositeye neden olmuştur ve apoptotik/nekrotik hücre oranını arttırmıştır. Bu sonuç, EG00229'un hem konsantrasyona hem de zamana bağlı olarak toksisiteye neden olduğunu göstermektedir.
- 2) TLR4'ün TAK242 ile baskılanması, fare fibroblast hücrelerinde ve insan gliyoblastoma hücrelerinde IC50 değerinde sitotoksik etkiye neden olmamıştır. Bunun yanında, zamanla ve konsantrasyonla doğru orantılı bir etki göstermemiştir. Bu sonuç, TLR4 ile Nrp-1'in farklı dinamiklere ve parametrelere sahip olduğunu düşündürmüştür.
- 3) SARS-CoV-2 Spike/S1 proteininin fare fibroblast ve insan gliyoblastoma hücreleri üzerinde IC50 değerinde sitotoksik etkiye neden olmamıştır. Bunun yanında, EG00229'a benzer şekilde zamanla doğru orantılı bir sitotoksik etki göstermiştir.

Sonuç olarak nöronal deneylerde kullanılmak üzere; toksik olmayan konsantrasyonlar olarak EG00229'un 50 µM, TAK242'nin 3 µM, S1'in ise 25 ng konsantrasyonu seçilmiştir.

4) SARS-CoV-2 S1 proteini, nörojenezi ve aksonal büyümeyi bozmuş ve yavaşlatmıştır. Benzer bozukluk EG00229'da da görülürken TAK242 aynı etkilere sebep olmamıştır. Bunun yanında, hücrelerin EG00229 ile 30 dakika muamelesi, S1 proteininin olumsuz etkilerini azaltmıştır. TLR4'ün 30 dakika inhibisyonu ise S1 proteininin etkilerini engelleyemiştir. Her iki deneysel çalışmada da, EG00229'un hücre ortamında iki gün bulunması olumsuz etkilere sebep olurken, yarım saat bulunması; ortama sonradan eklenen S1'in olumsuz etkilerine karşı koruyucu olmuştur. Buna karşın, EG00229 ile birlikte ortamda TAK242'nin inkübasyonu olumsuz etkilere sebep olmuştur. Bu sonuç, Nrp-1 ile TLR4'ün aynı anda baskılanmasının nörojenez ve aksonal büyümeyi olumsuz etkilediğini göstermiştir. Dolayısıyla bu sonuç, Nrp-1 ve TLR4'ün dolaylı olarak ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Yapılan az sayıda çalışma da bu çıkarımı desteklemektedir. Ayrıca, destekler nitelikte EG00229 ve TAK242 sonrası S1 verilen grupta da benzer olumsuz etki görülmüştür. Eğer TAK242'nin dolayısıyla da TLR4'ün burada herhangi bir etkisi olmasaydı, [EG00229 + S1] grubunda görülen olumlu sonucun bu grupta da görülmesi beklenirdi. Ancak sonuç bu şekilde değildir. Tüm bunlara ek olarak, aksonal büyümenin 7. gününde pozitif kontrol ile sadece [EG00229] ve [S1] grupları istatistiksel fark göstermiştir. Diğer gruplarda istatistiksel fark görülmemesi, zamana bağlı olarak Nrp-1 ve TLR4 reseptör ifadelerinin veya ilişkili yolların değiştiğini ya da telafi edildiğini düşündürmektedir. Tüm bunlara ek olarak, 3. ve 7. gün MAP-2 ve GAP43 seviyeleri sonuçlarımızı desteklemektedir.

5) Direkt ve kombine halde uygulanan maddeler nöronal sağ kalım üzerinde 24. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etki göstermemiştir. 48. saatte ise [TAK242] ve [DMSO] grupları haricindeki tüm gruplarda nöroproteksiyonun bozulduğu görülmüştür. 72. saatte ise [TAK242] grubu haricindeki tüm gruplar, [EG00229 + S1] grubuna göre negatif yönde istatistiksel fark göstermiştir. Bu sonuç, nörojenez ve aksonal büyüme sonuçlarıyla uyumlu olarak, EG00229'un S1 proteininin olumsuz etkilerini azalttığını göstermiştir. Ek olarak bu grupta da pozitif kontrole göre nöronal sağ kalımın azaldığı görülmüştür. Ancak aynı sonuç DMSO grubunda da görülmüştür. Ayrıca bu deneysel çalışmada, maddeler iki gün değil üç gün ortamda kalmışlardır. Birlikte ele alındığında, kültürel koşullarda nöronal sağ kalımın zamanla kendiliğinden bozulması da bu sonuçlarda etkilidir. Aynı zamanda [S1], [EG00229] ve [TAK242 + S1] gruplarının benzer şekilde apoptotik nöron oranını arttırması, MTT sonuçlarıyla örtüşmektedir.

6) Yara iyileşme deneylerinde [S1], [EG00229] ve [EG00229 + S1 + TAK242] gruplarında göç etme potansiyelinin bozulduğu görülmüştür. Bu sonuç, S1 proteininin göç ve proliferasyonu Nrp-1 fonksiyonlarını bozarak azalttığını bir kez daha göstermiştir.

7) Hücre adezyonu ve nöronal göçteki etkilere bakıldığında, maddelerin ortamda daha uzun süre bulunması, önceki sonuçlara karşıt bir sonuç vermiştir. Ancak bu sonuç, S1'in Nrp-1 fonksiyonlarını bozarak nöronal süreçleri olumsuz etkilediği iddiamızı desteklemektedir. Çünkü bu deneysel aşamada diğer deneysel aşamalardan farklı olarak uygulanan maddeler ortamdan uzaklaştırılmamıştır ve daha da önemlisi **aynı anda** ortama verilmiştir. Önceki çalışmalarda [EG00229 + S1] grubunda S1'in olumsuz etkilerinin önlenildiği görülmüştür. Bu deneysel aşamada ise tam tersi etki görülmüştür. [EG00229 + S1] grubunda, ilk bakışta, EG00229 ile yarım saat bloke olan Nrp-1 miktarına ek olarak ortama S1'in de verilmesiyle daha fazla Nrp-1 blokasyonunun meydana gelmesi beklenmektedir. Ancak, önceki deneylerde bu iki maddenin ortama aynı anda verilmemesi önem taşımaktadır. S1'in sonradan ortama verilmesinin daha az Nrp-1 inhibisyonu ile sonuçlanmış olabileceği düşünülmektedir (*Şekil 2.7'* de özetlendiği gibi, S1 proteini yalnızca Nrp-1'e bağlanmamaktadır; S1'in bağlandığı ve bağlanma potansiyelinin olduğu birçok reseptör ve kofaktör tanımlanmıştır). Nrp-1'e bağlanamayan serbest S1 proteinleri ortamdaki başka bir reseptöre veya kofaktöre bağlanmış olabilir. Bu da S1 proteininin total olarak etkileşime girdiği Nrp-1 miktarının düşmesine neden olacaktır. Hücre ortamına aynı anda verilen ve ortamda altı saat bulunan EG00229 ve S1 ise daha fazla Nrp-1 blokasyonuna neden olmuştur. Hücre adezyonunu oransal olarak en fazla bozan gruplar [EG00229], [EG00229 + S1] ve [EG00229 + S1 + TAK242]'dir. Altı saati takiben nöronal göç potansiyeli incelendiğinde oransal olarak en düşük göç aynı üç grupta görülmüştür.

Özetle, tüm bu sonuçlar, SARS-CoV-2'nin, sinir sistemine bir tehdit oluşturduğunu; sinir sistemindeki fizyolojik süreçlerde Nrp-1'i hedefleyerek bozukluklar meydana getirdiğini ve getirebileceğini göstermiştir.

Tüm bunlara karşın, tez çalışmasında kullanılan hücre hattının bir kanser hücre hattı olduğu ve S1 proteininin bu hücrelerin fizyolojik süreçlerine müdahale edebildiği göz ardı edilmemelidir. Bu kapsamda, S1 proteininin ya da uygun parçacığının anti-kanserojenik bir ajan olarak kullanım ihtimali doğmaktadır. Ek olarak şizofreni, bipolar bozukluk, hiperaktivite gibi nörofizyolojik ve bilişsel bozukluklar üzerindeki teröpatik potansiyeli de değerlendirilebilir gözükmektedir.

Sinir sisteminde SARS-CoV-2 ile ilişkili semptomların altında yatan fizyolojik nedenler halen araştırılmaktadır. Ayrıca SARS-CoV-2'nin uzun vadeli etkileri bilinmemektedir. Hem yapılan çalışmaların hem de tez çalışmamızın bulguları birlikte ele alındığında SARS-CoV-2'nin ve S1 proteininin patofizyolojik etkilerine hem dolaylı (TLR4 gibi reseptörler üzerinden) hem de doğrudan (Nrp-1 gibi reseptörler üzerinden) sebep olabileceği görülmüştür. Bu kapsamda, sinir sisteminde SARS-CoV-2 ile ilişkili kalıcı ya da geçici bozukluklarla ilgili Nrp-1 ve potansiyel diğer reseptörlere odaklanılarak yapılabilecek ileri çalışmalar önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Brodal, P. (2010). *The Central Nervous System*. Oxford university Press.
- [2] Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S., Hudspeth, A. J., & Mack, S. (Eds.). (2000). *Principles of Neural Science* (Vol. 4, pp. 1227-1246). New York: McGraw-hill.
- [3] Duke, T., & Graham, I. (2009). Equilibrium Mechanisms of Receptor Clustering. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 100(1-3), 18-24.
- [4] Bagnard, D., Vaillant, C., Khuth, S. T., Dufay, N., Lohrum, M., Püschel, A. W., ... & Thomasset, N. (2001). Semaphorin 3A –vascular endothelial growth factor-165 Balance Mediates Migration and Apoptosis of Neural Progenitor Cells by the Recruitment of Shared Receptor. *Journal of Neuroscience*, 21(10), 3332-3341.
- [5] Azam, S., Haque, M. E., Jakaria, M., Jo, S. H., Kim, I. S., & Choi, D. K. (2020). G-protein-coupled receptors in CNS: a potential therapeutic target for intervention in neurodegenerative disorders and associated cognitive deficits. *Cells*, 9(2), 506.
- [6] Ming, G. L., & Song, H. (2005). Adult Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System. *Annual Review of Neuroscience*, 28, 223-250.
- [7] Cooke, P., Janowitz, H., & Dougherty, S. E. (2022). Neuronal Redevelopment and the Regeneration of Neuromodulatory Axons in the Adult Mammalian Central Nervous System. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16, 872501.
- [8] Uyeda, A., & Muramatsu, R. (2020). Molecular Mechanisms of Central Nervous System Axonal Regeneration and Remyelination: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8116.
- [9] Whittaker, A., Anson, M., & Harky, A. (2020). Neurological Manifestations of COVID-19: a systematic review and current update. *Acta Neurologica Scandinavica*, 142(1), 14-22.
- [10] Wan, D., Du, T., Hong, W., Chen, L., Que, H., Lu, S., & Peng, X. (2021). Neurological Complications and Infection Mechanism of SARS-CoV-2. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 406.
- [11] Yu, H., Sun, T., & Feng, J. (2020). Complications and Pathophysiology of COVID-19 in the Nervous System. *Frontiers in neurology*, 11, 573421.
- [12] Kyrou, I., Randeve, H. S., Spandidos, D. A., & Karteris, E. (2021). Not only ACE2—the quest for additional host cell mediators of SARS-CoV-2 infection: Neuropilin-1 (NRP1) as a novel SARS-CoV-2 host cell entry mediator implicated in COVID-19. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 21.

- [13] Gu, Y., Cao, J., Zhang, X., Gao, H., Wang, Y., Wang, J., ... & Lu, Z. (2022). Receptome Profiling Identifies KREMEN1 and ASGR1 as Alternative Functional Receptors of SARS-CoV-2. *Cell Research*, 32(1), 24-37.
- [14] Daly, J. L., Simonetti, B., Klein, K., Chen, K. E., Williamson, M. K., Antón-Plágaro, C., ... & Yamauchi, Y. (2020). Neuropilin-1 is a Host Factor for SARS-CoV-2 Infection. *Science*, 370(6518), 861-865.
- [15] Katopodis, P., Randeve, H. S., Spandidos, D. A., Saravi, S., Kyrou, I., & Karteris, E. (2022). Host Cell Entry Mediators Implicated in the Cellular Tropism of SARS-CoV-2, the Pathophysiology of COVID-19 and the Identification of microRNAs that can Modulate the Expression of these Mediators. *International Journal of Molecular Medicine*, 49(2), 1-12.
- [16] Guo, H. F., & Vander Kooi, C. W. (2015). Neuropilin Functions as an Essential Cell Surface Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 290(49), 29120-29126.
- [17] Moutal, A., Martin, L. F., Boiron, L., Gomez, K., Ran, D., Zhou, Y., ... & Khanna, R. (2021). SARS-CoV-2 Spike Protein co-opts VEGF-A/neuropilin-1 Receptor Signaling to Induce Analgesia. *Pain*, 162(1), 243-252.
- [18] Klein, R., Soung, A., Sissoko, C., Nordvig, A., Canoll, P., Mariani, M., ... & Boldrini, M. (2021). COVID-19 Induces Neuroinflammation and Loss of Hippocampal Neurogenesis. *Research Square*.
- [19] Oh, J., Cho, W. H., Barcelon, E., Kim, K. H., Hong, J., & Lee, S. J. (2022). SARS-CoV-2 Spike Protein Induces Cognitive Deficit and Anxiety-like Behavior in Mouse via Non-cell Autonomous Hippocampal Neuronal Death. *Scientific Reports*, 12(1), 5496.
- [20] Datta, G., Miller, N. M., Halcrow, P. W., Khan, N., Colwell, T., Geiger, J. D., & Chen, X. (2021). SARS-CoV-2 S1 Protein Induces Endolysosome Dysfunction and Neuritic Dystrophy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 777738.
- [21] Chen, C. Y., Chou, Y. C., & Hsueh, Y. P. (2020). SARS-CoV-2 D614 and G614 Spike Variants Impair Neuronal Synapses and Exhibit Differential Fusion Ability. *BioRxiv*, 2020-12.
- [22] Fontes-Dantas, F. L., Fernandes, G. G., Gutman, E. G., De Lima, E. V., Antonio, L. S., Hammerle, M. B., ... & Figueiredo, C. P. (2023). SARS-CoV-2 Spike Protein Induces TLR4-mediated Long-term Cognitive Dysfunction Recapitulating post-COVID-19 Syndrome in Mice. *Cell Reports*, 42(3).
- [23] Olajide, O. A., Iwuanyanwu, V. U., Adegbola, O. D., & Al-Hindawi, A. A. (2022). SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein S1 Induces Neuroinflammation in BV-2 Microglia. *Molecular Neurobiology*, 1-14.

- [24] Kong, W., Montano, M., Corley, M. J., Helmy, E., Kobayashi, H., Kinisu, M., ... & Greene, W. C. (2022). Neuropilin-1 Mediates SARS-CoV-2 Infection of Astrocytes in Brain organoids, Inducing Inflammation Leading to Dysfunction and Death of Neurons. *Mbio*, 13(6), e02308-22.
- [25] Haines, D. E. (2004). *Neuroanatomy: an atlas of structures, sections, and systems* (Vol. 153, No. 2004). Lippincott Williams & Wilkins.
- [26] Ramachandran, V. S. (2002). *Encyclopedia of the human brain*. Elsevier.
- [27] Daroff, R. B., & Aminoff, M. J. (2014). *Encyclopedia of the neurological sciences*. Academic press.
- [28] Keramidis, A., Moorhouse, A. J., Schofield, P. R., & Barry, P. H. (2004). Ligand-gated Ion Channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 86(2), 161-204.
- [29] Kumar, A., Pareek, V., Faiq, M. A., Ghosh, S. K., & Kumari, C. (2019). Adult Neurogenesis in Humans: a review of basic concepts, history, current research, and clinical implications. *Innovations in Clinical Neuroscience*, 16(5-6), 30.
- [30] Kempermann, G. (2022). *Adult neurogenesis. In Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical* (pp. 321-339). Cham: Springer International Publishing.
- [31] Ribeiro, F. F., & Xapelli, S. (2021). An Overview of Adult Neurogenesis. *Recent Advances in NGF and Related Molecules: The Continuum of the NGF "Saga"*, 77-94.
- [32] Gurok, U., Steinhoff, C., Lipkowitz, B., Ropers, H. H., Scharff, C., & Nuber, U. A. (2004). Gene Expression Changes in the Course of Neural Progenitor Cell Differentiation. *Journal of Neuroscience*, 24(26), 5982-6002.
- [33] Valiente, M., & Marín, O. (2010). Neuronal Migration Mechanisms in Development and Disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 20(1), 68-78.
- [34] Sahota, P., & Savitz, S. I. (2011). Investigational Therapies for Ischemic Stroke: Neuroprotection and Neurorecovery. *Neurotherapeutics*, 8(3), 434-451.
- [35] Kaneko, N., Sawada, M., & Sawamoto, K. (2017). Mechanisms of Neuronal Migration in the Adult Brain. *Journal of Neurochemistry*, 141(6), 835-847.
- [36] Maeder, C. I., Shen, K., & Hoogenraad, C. C. (2014). Axon and Dendritic Trafficking. *Current Opinion in Neurobiology*, 27, 165-170.
- [37] Conde, C., & Cáceres, A. (2009). Microtubule Assembly, Organization and Dynamics in Axons and Dendrites. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(5), 319-332.

- [38] He, Q., Dent, E. W., & Meiri, K. F. (1997). Modulation of Actin Filament Behavior by GAP-43 (neuromodulin) is Dependent on the Phosphorylation Status of Serine 41, the Protein kinase C site. *Journal of Neuroscience*, 17(10), 3515-3524.
- [39] Kumarasinghe, U., Fox, L. N., & Staii, C. (2022). Combined Traction Force–atomic Force Microscopy Measurements of Neuronal Cells. *Biomimetics*, 7(4), 157.
- [40] Athamneh, A. I., & Suter, D. M. (2015). Quantifying Mechanical Force in Axonal Growth and Guidance. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 359.
- [41] Padmanabhan, P., & Goodhill, G. J. (2018). Axon Growth Regulation by a Bistable Molecular Switch. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1877), 20172618.
- [42] Geoffroy, C. G., Hilton, B. J., Tetzlaff, W., & Zheng, B. (2016). Evidence for an Age-dependent Decline in Axon Regeneration in the Adult Mammalian Central Nervous System. *Cell Reports*, 15(2), 238-246.
- [43] Pfisterer, U., & Khodosevich, K. (2017). Neuronal Survival in the Brain: Neuron type-specific Mechanisms. *Cell Death & Disease*, 8(3), e2643-e2643.
- [44] Zachary, I. (2005). Neuroprotective Role of Vascular Endothelial Growth Factor: Signalling Mechanisms, Biological Function, and Therapeutic Potential. *Neurosignals*, 14(5), 207-221.
- [45] Helmy, Y. A., Fawzy, M., Elasad, A., Sobieh, A., Kenney, S. P., & Shehata, A. A. (2020). The COVID-19 Pandemic: a comprehensive review of taxonomy, genetics, epidemiology, diagnosis, treatment, and control. *Journal of Clinical Medicine*, 9(4), 1225.
- [46] Naqvi, A. A. T., Fatima, K., Mohammad, T., Fatima, U., Singh, I. K., Singh, A., ... & Hassan, M. I. (2020). Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural Genomics Approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1866(10), 165878.
- [47] Zhang, Q., Xiang, R., Huo, S., Zhou, Y., Jiang, S., Wang, Q., & Yu, F. (2021). Molecular Mechanism of Interaction between SARS-CoV-2 and Host Cells and Interventional Therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 233.
- [48] Zhang, J., Xiao, T., Cai, Y., & Chen, B. (2021). Structure of SARS-CoV-2 Spike Protein. *Current Opinion in Virology*, 50, 173-182.
- [49] Huang, Y., Yang, C., Xu, X. F., Xu, W., & Liu, S. W. (2020). Structural and Functional Properties of SARS-CoV-2 Spike Protein: Potential Antivirus Drug Development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(9), 1141-1149.

- [50] Lu, Y., Michel, H. A., Wang, P. H., & Smith, G. L. (2022). Manipulation of Innate Immune Signaling Pathways by SARS-CoV-2 non-structural Proteins. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1027015.
- [51] Gorkhali, R., Koirala, P., Rijal, S., Mainali, A., Baral, A., & Bhattarai, H. K. (2021). Structure and Function of Major SARS-CoV-2 and SARS-CoV Proteins. *Bioinformatics and Biology Insights*, 15, 11779322211025876.
- [52] Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., & Choe, H. (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 Entry into Cells. *Nature Reviews Molecular Cell biology*, 23(1), 3-20.
- [53] Peng, R., Wu, L. A., Wang, Q., Qi, J., & Gao, G. F. (2021). Cell Entry by SARS-CoV-2. *Trends in Biochemical Sciences*, 46(10), 848-860.
- [54] Katopodis, P., Randeva, H. S., Spandidos, D. A., Saravi, S., Kyrou, I., & Karteris, E. (2022). Host Cell Entry Mediators Implicated in the Cellular Tropism of SARS-CoV-2, the Pathophysiology of COVID19 and the Identification of microRNAs that can Modulate the Expression of these Mediators. *International Journal of Molecular Medicine*, 49(2), 1-12.
- [55] Wang, S., Qiu, Z., Hou, Y., Deng, X., Xu, W., Zheng, T., ... & Li, X. (2021). AXL is a Candidate Receptor for SARS-CoV-2 that Promotes Infection of Pulmonary and Bronchial Epithelial Cells. *Cell Research*, 31(2), 126-140.
- [56] Badeti, S., Jiang, Q., Naghizadeh, A., Tseng, H. C., Bushkin, Y., Marras, S. A., ... & Liu, D. (2022). Development of a Novel Human CD147 knock-in NSG Mouse Model to test SARS-CoV-2 Viral Infection. *Cell & Bioscience*, 12(1), 88.
- [57] Lim, S., Zhang, M., & Chang, T. L. (2022). ACE2-independent Alternative Receptors for SARS-CoV-2. *Viruses*, 14(11), 2535.
- [58] Arrindell, J., Abou Atmeh, P., Jayet, L., Sereme, Y., Mege, J. L., & Desnues, B. (2022). Vimentin is an Important ACE2 co-receptor for SARS-CoV-2 in Epithelial Cells. *Iscience*, 25(11).
- [59] Choudhury, A., & Mukherjee, S. (2020). In Silico Studies on the Comparative Characterization of the Interactions of SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein with ACE-2 Receptor Homologs and Human TLRs. *Journal of Medical Virology*, 92(10), 2105-2113.
- [60] Hoffmann, M., & Pöhlmann, S. (2022). Novel SARS-CoV-2 Receptors: ASGR1 and KREMEN1. *Cell Research*, 32(1), 1-2.
- [61] Cantuti-Castelvetri, L., Ojha, R., Pedro, L. D., Djannatian, M., Franz, J., Kuivanen, S., ... & Simons, M. (2020). Neuropilin-1 Facilitates SARS-CoV-2 Cell Entry and Infectivity. *Science*, 370(6518), 856-860.

- [62] Li, Z. L., & Buck, M. (2021). Neuropilin-1 Assists SARS-CoV-2 Infection by Stimulating the Separation of Spike Protein S1 and S2. *Biophysical Journal*, 120(14), 2828-2837.
- [63] Perez-Miller, S., Patek, M., Moutal, A., Cabel, C. R., Thorne, C. A., Campos, S. K., & Khanna, R. (2020). In Silico Identification and Validation of Inhibitors of the Interaction Between Neuropilin Receptor 1 and SARS-CoV-2 Spike protein. *Biorxiv*.
- [64] Kolarič, A., Jukič, M., & Bren, U. (2022). Novel Small-molecule Inhibitors of the SARS-CoV-2 Spike Protein Binding to Neuropilin 1. *Pharmaceuticals*, 15(2), 165.
- [65] Moutal, A., Martin, L. F., Boinon, L., Gomez, K., Ran, D., Zhou, Y., ... & Khanna, R. (2021). SARS-CoV-2 Spike Protein co-opts VEGF-A/neuropilin-1 Receptor Signaling to Induce Analgesia. *Pain*, 162(1), 243-252.
- [66] Guo, H. F., & Vander Kooi, C. W. (2015). Neuropilin Functions as an Essential Cell Surface Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 290(49), 29120-29126.
- [67] Li, X., Parker, M. W., & Kooi, C. W. V. (2014). Control of Cellular Motility by Neuropilin-mediated Physical Interactions. *Biomolecular Concepts*, 5(2), 157-166.
- [68] Narazaki, M., & Tosato, G. (2006). Ligand-induced Internalization Selects use of Common Receptor Neuropilin-1 by VEGF165 and Semaphorin3A. *Blood*, 107(10), 3892-3901.
- [69] Lee, C. C., Kreusch, A., McMullan, D., Ng, K., & Spraggon, G. (2003). Crystal structure of the human neuropilin-1 b1 domain. *Structure*, 11(1), 99-108.
- [70] Raimondi, C., Brash, J. T., Fantin, A., & Ruhrberg, C. (2016). NRP1 Function and Targeting in Neurovascular Development and Eye Disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 52, 64-83.
- [71] Bielenberg, D. R., Pettaway, C. A., Takashima, S., & Klagsbrun, M. (2006). Neuropilins in Neoplasms: Expression, Regulation and Function. *Experimental Cell Research*, 312(5), 584-593.
- [72] Long, J. B., Jay, S. M., Segal, S. S., & Madri, J. A. (2009). VEGF-A and Semaphorin3A: Modulators of Vascular Sympathetic Innervation. *Developmental Biology*, 334(1), 119-132.
- [73] Rosenstein, J. M., Krum, J. M., & Ruhrberg, C. (2010). VEGF in the Nervous System. *Organogenesis*, 6(2), 107-114.

- [74] Sano, N., Shimogawa, T., Sakaguchi, H., Ioroi, Y., Miyawaki, A., Morizane, S., Miyamoto, J., Takahashi, J. (2017). Enhanced Axonal Extension of Subcortical Projection Neurons Isolated from Murine Embryonic Cortex using Neuropilin-1. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 123.
- [75] Zachary, I. (2014). Neuropilins: role in signalling, angiogenesis and disease. *Angiogenesis, Lymphangiogenesis and Clinical Implications*, 99, 37-70.
- [76] Ruiz de Almodovar, C., Lambrechts, D., Mazzone, M., & Carmeliet, P. (2009). Role and Therapeutic Potential of VEGF in the Nervous System. *Physiological Reviews*, 89(2), 607-648.
- [77] Andrews, W. D., Barber, M., Nemitz, M., Memi, F., & Parnavelas, J. G. (2017). Semaphorin3A–neuropilin1 Signalling is involved in the generation of cortical interneurons. *Brain Structure and Function*, 222, 2217-2233.
- [78] Erskine, L., François, U., Denti, L., Joyce, A., Tillo, M., Bruce, F., Vargesson, N., Ruhrberg, C. (2017). VEGF-A and neuropilin 1 (NRP1) shape axon projections in the developing CNS via dual roles in neurons and blood vessels. *Development*, 144(13), 2504-2516.
- [79] Colotti, G., Failla, C. M., Lacal, P. M., Ungarelli, M., Ruffini, F., Di Micco, P., Orecchia, A., Morea, V. (2022). Neuropilin-1 is required for endothelial cell adhesion to soluble vascular endothelial growth factor receptor 1. *The FEBS Journal*, 289(1), 183-198.
- [80] Takagi, S., Kasuya, Y., Shimizu, M., Matsuura, T., Tsuboi, M., Kawakami, A., Fujisawa, H. (1995). Expression of a cell adhesion molecule, neuropilin, in the developing chick nervous system. *Developmental Biology*, 170(1), 207-222.
- [81] Sameer, A. S., & Nissar, S. (2021). Toll-like receptors (TLRs): structure, functions, signaling, and role of their polymorphisms in colorectal cancer susceptibility. *BioMed Research International*, 2021.
- [82] Kielian, T. (2006). Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *Journal of Neuroscience Research*, 83(5), 711-730.
- [83] Gómez, R., Villalvilla, A., Largo, R., Gualillo, O., & Herrero-Beaumont, G. (2015). TLR4 signalling in osteoarthritis-finding targets for candidate DMOADs. *Nature Reviews Rheumatology*, 11(3), 159-170.
- [84] Coscia, M. R., Giacomelli, S., Oreste, U. (2011). Toll-like receptors: an overview from invertebrates to vertebrates. *Invertebrate Survival Journal*, 8(2), 210-226.
- [85] Jin, M. S., & Lee, J. O. (2008). Structures of TLR–ligand complexes. *Current Opinion in Immunology*, 20(4), 414-419.

- [86] Heidari, A., Yazdanpanah, N., & Rezaei, N. (2022). The role of Toll-like receptors and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 19(1), 135.
- [87] Stefanova, N., Fellner, L., Reindl, M., Masliah, E., Poewe, W., & Wenning, G. K. (2011). Toll-like receptor 4 promotes α -synuclein clearance and survival of nigral dopaminergic neurons. *The American Journal of Pathology*, 179(2), 954-963.
- [88] Korgaonkar, A. A., Li, Y., Sekhar, D., Subramanian, D., Guevarra, J., Swietek, B., ... & Santhakumar, V. (2019). Neuronal TLR4 signaling enhances AMPA Currents and Drives Posttraumatic Epileptogenesis. *BioRxiv*, 649780.
- [89] Zhao, Y., Zhao, Y., Zhang, M., Zhao, J., Ma, X., Huang, T., ... & Song, J. (2016). Inhibition of TLR4 signalling-induced inflammation attenuates secondary injury after diffuse axonal injury in rats. *Mediators of Inflammation*, 2016.
- [90] Najjar, S., Najjar, A., Chong, D. J., Pramanik, B. K., Kirsch, C., Kuzniecky, R. I., ... & Azhar, S. (2020). Central nervous system complications associated with SARS-CoV-2 infection: integrative concepts of pathophysiology and case reports. *Journal of Neuroinflammation*, 17, 1-14.
- [91] Goel, K., Kumar, A., Diwan, S., Kohli, S., Sachdeva, H. C., Ganapathy, U., ... & Kumar, P. (2021). Neurological manifestations of COVID-19: a series of seven cases. *Indian Journal of Critical Care Medicine: Peer-reviewed, Official Publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, 25(2), 219.
- [92] DosSantos, M. F., Devalle, S., Aran, V., Capra, D., Roque, N. R., Coelho-Aguiar, J. D. M., ... & Moura-Neto, V. (2020). Neuromechanisms of SARS-CoV-2: a review. *Frontiers in Neuroanatomy*, 14, 37.
- [93] Verma, A. K., Zheng, J., Meyerholz, D. K., & Perlman, S. (2022). SARS-CoV-2 infection of sustentacular cells disrupts olfactory signaling pathways. *JCI insight*, 7(24).
- [94] Chen, M., Pekosz, A., Villano, J. S., Shen, W., Zhou, R., Kulaga, H., ... & Lane, A. P. (2024). Evolution of nasal and olfactory infection characteristics of SARS-CoV-2 variants. *The Journal of Clinical Investigation*, 134(8).
- [95] Vitale-Cross, L., Szalayova, I., Scoggins, A., Palkovits, M., & Mezey, E. (2022). SARS-CoV-2 entry sites are present in all structural elements of the human glossopharyngeal and vagal nerves: clinical implications. *EbioMedicine*, 78.
- [96] DeOre, B. J., Tran, K. A., Andrews, A. M., Ramirez, S. H., & Galie, P. A. (2021). SARS-CoV-2 spike protein disrupts blood-brain barrier integrity via RhoA activation. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 16, 722-728.

- [97] Rhea, E. M., Logsdon, A. F., Hansen, K. M., Williams, L. M., Reed, M. J., Baumann, K. K., ... & Erickson, M. A. (2021). The S1 protein of SARS-CoV-2 crosses the blood–brain barrier in mice. *Nature Neuroscience*, 24(3), 368-378.
- [98] Percivalle, E., Sammartino, J. C., Cassaniti, I., Arbustini, E., Urtis, M., Smirnova, A., ... & Baldanti, F. (2021). Macrophages and monocytes:“Trojan Horses” in COVID-19. *Viruses*, 13(11), 2178.
- [99] Datta, G., Miller, N. M., Halcrow, P. W., Khan, N., Colwell, T., Geiger, J. D., & Chen, X. (2021). SARS-CoV-2 S1 protein induces endolysosome dysfunction and neuritic dystrophy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 777738.
- [100] Kim, E. S., Jeon, M. T., Kim, K. S., Lee, S., Kim, S., & Kim, D. G. (2021). Spike proteins of SARS-CoV-2 induce pathological changes in molecular delivery and metabolic function in the brain endothelial cells. *Viruses*, 13(10), 2021.
- [101] Olajide, O. A., Iwuanyanwu, V. U., Adegbola, O. D., & Al-Hindawi, A. A. (2022). SARS-CoV-2 spike glycoprotein S1 induces neuroinflammation in BV-2 microglia. *Molecular Neurobiology*, 1-14.
- [102] Idrees, D., & Kumar, V. (2021). SARS-CoV-2 spike protein interactions with amyloidogenic proteins: Potential clues to neurodegeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 554, 94-98.
- [103] 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.
- [104] Gordon, J., & Amini, S. (2021). General overview of neuronal cell culture. *Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols*, 1-8.
- [105] Hoffmann, L. F., Martins, A., Majolo, F., Contini, V., Laufer, S., & Goettert, M. I. (2023). Neural regeneration research model to be explored: SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neural Regeneration Research*, 18(6), 1265-1266.
- [106] Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G. J. (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson’s disease research: a systematic review. *Molecular Neurodegeneration*, 12, 1-11.
- [107] Kovalevich, J., & Langford, D. (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Neuronal cell culture: methods and protocols*, 9-21.
- [108] 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, 1-11.

- [109] Simões, R. F., Ferrão, R., Silva, M. R., Pinho, S. L., Ferreira, L., Oliveira, P. J., & Cunha-Oliveira, T. (2021). Refinement of a differentiation protocol using neuroblastoma SH-SY5Y cells for use in neurotoxicology research. *Food and Chemical Toxicology*, 149, 111967.
- [110] Ulbrich, F., Kaufmann, K., Roesslein, M., Wellner, F., Auwärter, V., Kempf, J., ... & Goebel, U. (2015). Argon mediates anti-apoptotic signaling and neuroprotection via inhibition of toll-like receptor 2 and 4. *PloS one*, 10(12), e0143887.
- [111] Twarużek, M., Zastempowska, E., Soszczyńska, E., & Ałtyn, I. (2019). The use of in vitro assays for the assessment of cytotoxicity on the example of MTT test.
- [112] Ude, A., Afi-Leslie, K., Okeke, K., & Ogbodo, E. (2022). Trypan Blue Exclusion Assay, Neutral Red, Acridine Orange and Propidium Iodide. *IntechOpen*.
- [113] De Conto, V., Cheung, V., Maubon, G., Souguir, Z., Maubon, N., Vandenhaute, E., & Bérézowski, V. (2021). In vitro differentiation modifies the neurotoxic response of SH-SY5Y cells. *Toxicology in Vitro*, 77, 105235.
- [114] Feles, S., Overath, C., Reichardt, S., Diegeler, S., Schmitz, C., Kronenberg, J., ... & Liemersdorf, C. (2022). Streamlining culture conditions for the neuroblastoma cell line SH-SY5Y: A prerequisite for functional studies. *Methods and Protocols*, 5(4), 58.
- [115] Lopes, F. M., Schröder, R., da Frota Júnior, M. L. C., Zanotto-Filho, A., Müller, C. B., Pires, A. S., ... & Klamt, F. (2010). Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Research*, 1337, 85-94.
- [116] Yang, H., Wang, J., Sun, J., Liu, X., Duan, W. M., & Qu, T. (2016). A new method to effectively and rapidly generate neurons from SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters*, 610, 43-47.
- [117] Huang, Z., Cheng, C., Xiong, H., Wang, Y., Chen, K. K., Yang, J., ... & Sang, Y. (2018). NRP1 promotes cell migration and invasion and serves as a therapeutic target in nasopharyngeal carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology*, 11(5), 2460.
- [118] Dragoni, S., Brash, J. T., Fantin, A., Burridge, C., Denti, L., Turowski, P., & Ruhrberg, C. (2023). Targeting NRP1 with EG00229 induces neurovascular permeability. *BioRxiv*, 2023-11.
- [119] Sharma, G., Braga, C. B., Chen, K. E., Jia, X., Ramanujam, V., Collins, B. M., ... & Mobli, M. (2021). Structural basis for the binding of the cancer targeting scorpion toxin, CITx, to the vascular endothelial growth factor receptor neuropilin-1. *Current Research in Structural Biology*, 3, 179-186.

- [120] Jarvis, A., Allerston, C. K., Jia, H., Herzog, B., Garza-Garcia, A., Winfield, N., ... & Selwood, D. L. (2010). Small molecule inhibitors of the neuropilin-1 vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) interaction. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(5), 2215-2226.
- [121] Palanca, P. F. (2023). Study of the role of neuropilin-1 in the development, prognosis and cellular response to lenvatinib in human hepatocellular carcinoma (Doctoral dissertation, Universidad de León).
- [122] Karami, J., Farhadi, E., Delbandi, A. A., Shekarabi, M., Tahmasebi, M. N., Vaziri, A. S., ... & Mahmoudi, M. (2021). Evaluation of TAK-242 (Resatorvid) effects on inflammatory status of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis and trauma patients. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 20(4), 453-464.
- [123] Mostafa, H. A. M., Elsheikh, S. M., Mehanna, R. A., & Omar, E. M. (2024). Evaluation Of The Anticarcinogenic Effect Of TAK-242, A TLR4 Inhibitor, In Oral Squamous Cell Carcinoma (In Vitro Study). *Alexandria Dental Journal*, 49(1), 17-21.
- [124] Cui, W., Sun, C., Ma, Y., Wang, S., Wang, X., & Zhang, Y. (2020). Inhibition of TLR4 induces M2 microglial polarization and provides neuroprotection via the NLRP3 inflammasome in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 444.
- [125] Knight, A. C., Montgomery, S. A., Fletcher, C. A., & Baxter, V. K. (2021). Mouse models 100ort he study of SARS-CoV-2 infection. *Comparative Medicine*, 71(5), 383-397.
- [126] Lam, S. D., Bordin, N., Waman, V. P., Scholes, H. M., Ashford, P., Sen, N., ... & Orengo, C. A. (2020). SARS-CoV-2 spike protein predicted to form complexes with host receptor protein orthologues from a broad range of mammals. *Scientific Reports*, 10(1), 16471.
- [127] Dai, X., Okon, I., Liu, Z., Wu, Y., Zhu, H., Song, P., & Zou, M. H. (2017). A novel role for myeloid cell-specific neuropilin 1 in mitigating sepsis. *The FASEB Journal*, 31(7), 2881.
- [128] Oussa, N. A., Dahmani, A., Gomis, M., Richaud, M., Andreev, E., Navab-Daneshmand, A. R., ... & Delisle, J. S. (2016). VEGF requires the receptor NRP-1 to inhibit lipopolysaccharide-dependent dendritic cell maturation. *The Journal of Immunology*, 197(10), 3927-3935.
- [129] Saleki, K., Alijanizadeh, P., & Azadmehr, A. (2023). Is neuropilin-1 the neuroimmune initiator of multi-system hyperinflammation in COVID-19?. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 167, 115558.
- [130] Bittner, E. A., & Martyn, J. J. (2019). Neuromuscular physiology and pharmacology. In *Pharmacology and Physiology for Anesthesia* (pp. 412-427). Elsevier.

- [131] Castaño, Z., & Kypta, R. M. (2008). Housekeeping proteins: limitations as references during neuronal differentiation. *The Open Neuroscience Journal*, 2(1).
- [132] Paik, S., Somvanshi, R. K., & Kumar, U. (2019). Somatostatin-mediated changes in microtubule-associated proteins and retinoic acid-induced neurite outgrowth in SH-SY5Y cells. *Journal of Molecular Neuroscience*, 68, 120-134.
- [133] Yong, S. J. (2021). Persistent brainstem dysfunction in long-COVID: a hypothesis. *ACS Chemical Neuroscience*, 12(4), 573-580.
- [134] Singh, U. S., Pan, J., Kao, Y. L., Joshi, S., Young, K. L., & Baker, K. M. (2003). Tissue transglutaminase mediates activation of RhoA and MAP kinase pathways during retinoic acid-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), 391-399.
- [135] Cecchi, C., Pensalfini, A., Liguri, G., Baglioni, S., Fiorillo, C., Guadagna, S., ... & Stefani, M. (2008). Differentiation increases the resistance of neuronal cells to amyloid toxicity. *Neurochemical Research*, 33, 2516-2531.
- [136] Valeri, A., Chiricosta, L., Calcaterra, V., Biasin, M., Cappelletti, G., Carelli, S., ... & Gugliandolo, A. (2021). Transcriptomic analysis of HCN-2 cells suggests connection among oxidative stress, senescence, and neuron death after SARS-CoV-2 infection. *Cells*, 10(9), 2189.
- [137] Ryan, F., Francos-Quijorna, I., Hernández-Mir, G., Aquino, C., Schlapbach, R., Bradbury, E. J., & David, S. (2024). TLR4 deletion modulates cytokine and extracellular matrix expression in chronic spinal cord injury, leading to improved secondary damage and functional recovery. *Journal of Neuroscience*, 44(6).
- [138] Moraga, A., Pradillo, J. M., Cuartero, M. I., Hernández-Jiménez, M., Oses, M., Moro, M. A., & Lizasoain, I. (2014). Toll-like receptor 4 modulates cell migration and cortical neurogenesis after focal cerebral ischemia. *The FASEB Journal*, 28(11), 4710-4718.
- [139] Lee, S. J., Choi, E. K., Seo, K. W., Bae, J. U., Park, S. Y., & Kim, C. D. (2014). TLR4-mediated expression of Mac-1 in monocytes plays a pivotal role in monocyte adhesion to vascular endothelium. *PloS one*, 9(8), e104588.