
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN ALZHEIMER HASTALIĞI'NDA EPİGENETİK REGÜLASYONLAR ÜZERİNE ETKİLERİ

Şennur FUŞA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HAZİRAN 2025

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

.

Şennur FUŞA

24/06/2025

MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN ALZHEIMER HASTALIĞI'NDA EPİGENETİK REGÜLASYONLAR ÜZERİNE ETKİLERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Şennur FUŞA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2025

ÖZET

Alzheimer Hastalığı (AH), yaşlanmaya bağlı olarak gelişebilen ve epigenetik mekanizmaların hastalığın ilerleyişinde giderek daha fazla önem kazandığı nörodejeneratif bir hastalıktır. Bu çalışmada, insan nöroblastom hücre hattı SH-SY5Y kullanılarak oluşturulan sağlıklı ve $A\beta_{1-42}$ peptidi ile indüklenmiş AH hücre modeli üzerinde, çıplak demir oksit (Fe_3O_4) manyetik nanopartiküller (MNP) ve probiyotik kökenli ekzopolisakkarit (L-EPS) ile kaplanmış formlarının farklı kombinasyonlardaki uygulamalarının DNA metilasyon profili üzerindeki etkileri araştırılmıştır. DNA metilasyonundaki farklılıklar, genomik DNA'nın metilasyona duyarlı restriksiyon endonükleazları ile kesilmesi ve ardından seçici primerle amplifikasyonuna prensibine dayanan metilasyona duyarlı amplifikasyon polimorfizmi (MSAP) yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, $A\beta_{1-42}$ uygulamasının SH-SY5Y hücrelerinin DNA metilasyon profilinde belirgin değişikliklere yol açtığını ortaya koymuştur. MNP ve L-EPS'nin ayrı ayrı uygulanması özgün epigenetik profiller oluştururken, L-EPS ile kaplanmış MNP'lerin epigenetik stabilizasyon sağlayarak potansiyel bir nörokoruyucu etki gösterebileceği belirlenmiştir. Bu çalışma, nanomalzemelerin epigenetik etkilerini değerlendirmeye yönelik öncül bir model sunmakta olup, L-EPS kaplanmış MNP'lerin yalnızca fizyolojik düzeyde değil, aynı zamanda epigenetik düzeyde de güvenli ve nörokoruyucu potansiyel sahip bir biyomalzeme olabileceğini göstermektedir.

Bilim Kodu : 20309
Anahtar Kelimeler : Alzheimer hastalığı, biyoinformatik, ekzopolisakkarit, epigenetik, manyetik nanopartikül
Sayfa Adedi : 63
Danışman : Prof. Dr. Mine TÜRKTAŞ

THE EFFECTS OF MAGNETIC NANOPARTICLES ON EPIGENETIC REGULATIONS IN ALZHEIMER'S DISEASE

(M. Sc. Thesis)

Şennur FUŞA

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

June 2025

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenereative disease that can develop with aging, and epigenetic mechanisms are increasingly recognized as important contributors to its progression. In this study, the effects of various combinations of bare iron oxide (Fe_3O_4) magnetic nanoparticles (MNPs) and probiotic-derived exopolysaccharide (L-EPS)-coated forms on DNA metyhlation profile were investigated using a helthy SH-SY5Y human neuroblastoma cell line and an AD cell model induced by $A\beta_{1-42}$ peptide. DNA methylation differences were evaluated using the Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) technique, which is based on the digestion of genomic DNA with methylation-sensitive restriction endonucleases followed by selective primer amplification. The results revealed that $A\beta_{1-42}$ exposure caused significant alterations in the DNA methylation patterns of SH-SY5Y cells. While the individual applications of MNPs and L-EPS generated distinct epigenetic profiles, the MNPs coated with L-EPS showed potential neuroprotective effects by providing epigenetic stabilization. This study presents a preliminary model for evaluating the epigenetic effects of nanomaterials and suggests that L-EPS coated MNPs may represent a biomaterial with not only physological compatibility but also epigenetic safety and neuroprotective potential.

Science Code	:	20309
Key Words	:	Alzheimer's disease, bioinformatics, exopolysaccharide, epigenetics, magnetic nanoparticle
Page Number	:	63
Supervisor	:	Prof. Dr. Mine TÜRKTAŞ

TEŞEKKÜR

Tez sürecimin her aşamasında bilgi, deneyim ve rehberliğiyle yanımda olan, deneysel çalışmaların planlanması ve yürütülmesi sürecinde katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışmanım Prof. Dr. Mine TÜRKTAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca mesleki bilgi ve tecrübeleriyle bana yön veren, akademik gelişimime önemli katkılarda bulunan değerli hocam Prof. Dr. Belma ASLIM'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmaları sırasında desteğini esirgemeyen Ebrar BAKKALOĞLU'na, Arş. Gör. Zehra Kübra YILMAZ'a ve diğer tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasının hayata geçirilmesinde maddi destek sağlayan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (BAP), FYL-2023-8920 numaralı proje kapsamında verdikleri katkılar için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ ix

ŞEKİLLERİN LİSTESİ x

SİMGELER VE KISALTMALAR xi

1. GİRİŞ 1

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 5

2.1. Alzheimer Hastallığı (AH) ve Önemi 5

2.2. Alzheimer Hastalığı'nda Önleyici Tedavi Stratejileri ile Manyetik Nanopartiküllerin Rolü 6

2.3. Epigenetik 9

2.4. Manyetik Nanopartiküller ile Epigenetik Arasındaki İlişki 10

2.5. Epigenetik Analiz Yöntemleri 15

3. MATERYAL VE YÖNTEM 19

3.1. Yöntem 19

3.1.1. Manyetik nanopartiküllerin hazırlanması ve kaplanma işlemleri 19

3.1.2. Alzheimer hastalığına yönelik hücre kültürü modeli ve manyetik nanopartikül tabanlı hücresel uygulamalar 19

3.1.3. Genomik DNA örnekleri ve DNA saflaştırma işlemi 20

3.2. Metilasyona Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi (MSAP) Analizi 21

3.2.1. Restriksiyon enzimleri ile kesim 22

3.2.2. Adaptör bağlanması (Ligasyon) 23

3.2.4. Ön seçim polimeraz zincir (PZR) reaksiyonu 24

3.2.5. Seçim polimeraz zincir (PZR) reaksiyonu 24
3.2.6. Poliakrilamid jel görüntülemesi 25
3.2.7. Skorlama 26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 27
4.1. DNA İzolasyonu Sonuçları 27
4.2. MSAP Yöntemi Sonuçları 28
4.2.1. Restriksiyon enzimleriyle kesim sonuçları 29
4.2.2. Ön-seçilim PZR sonuçları 29
4.2.3. Seçilim PZR sonuçları 30
4.2.4. Skorlama sonuçları 35
4.3. Biyoinformatik Analiz Sonuçları 39
5. TARTIŞMA 43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 51
KAYNAKLAR 53
ÖZGEÇMİŞ 63

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 3.1. Örnek Setleri 20

Çizelge 3.1. Adaptör dizileri 23

Çizelge 3.2. Primer dizileri 24

Çizelge 3.3. Primer dizileri 25

Çizelge 3.4. Primer kombinasyonları 25

Çizelge 4.1. İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık ölçümleri 28

Çizelge 4.2. Ee-Ha skorlama sonuçları 35

Çizelge 4.3. Ee-Hc Skorlama sonuçları 35

Çizelge 4.4. Ee-Hd skorlama sonuçları 36

Çizelge 4.5. Ee-He primerlerinin skorlama sonuçları 36

Çizelge 4.6. Ed-Ha skorlama sonuçları 37

Çizelge 4.7. Ed-Hc Skorlama sonuçları 37

Çizelge 4.8. Ed-Hd skorlama sonuçları 38

Çizelge 4.9. Ed-He skorlama sonuçları 38

Çizelge 4.10. Örneklerin metilasyon profillerine ait frekans değerleri 39

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 3.1. MSAP tekniğinin şematik gösterimi 22

Şekil 4.1. İzole edilen DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi. . 27

Şekil 4.2. DNA örneklerinin restriksiyon enzimleriyle sindirimi sonrası jel elektroforezi ile görüntülemesi. 29

Şekil 4.3. DNA örneklerinin ön seçilim PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile görüntülemesi. 30

Şekil 4.4. Ee-Ha primerlerinin jel görüntüsü. 31

Şekil 4.5. Ee-Hc primerlerinin jel görüntüsü. 31

Şekil 4.6. Ee-Hd primerlerinin jel görüntüsü. 32

Şekil 4.7. Ee-He primerlerinin jel görüntüsü. 32

Şekil 4.8. Ed-Ha primerlerinin jel görüntüsü. 33

Şekil 4.9. Ed-Hc primerlerinin jel görüntüsü. 33

Şekil 4.10. Ed-Hd primerlerinin jel görüntüsü. 34

Şekil 4.11. Ed-He primerlerinin jel görüntüsü. 34

Şekil 4.12. PCoA analizi sonuçları 41

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
bp	Baz çifti
U	Birim
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
°C	Celsius
pmol	Pikamol
rpm	Dakikadaki devir sayısı
V	Volt

Kısaltmalar	Açıklamalar
β-CD	β-siklodekstrin
AchE	Asetilkolinesteraz
AH	Alzheimer hastalığı
APS	Amonyum persülfat
Aβ	Amiloid βeta
BACE-1	B-sekretaz 1
DdH2O	Deiyonize su
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
EPS	Ekzopolisakkarit
FBS	Fetal Bovine Serum

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
Fe_3O_4	Manyetik Nanopartikül
MSAP	Metilasyona Duyarlı Çoğaltılmış Polimorfizm
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
TBE	Tris-Borik Asit-EDTA

1. GİRİŞ

Dünya genelinde en sık rastlanan nörodejeneratif demans türü olan Alzheimer hastalığı (AH), özellikle yaşlı bireyleri etkileyen ciddi bir sağlık sorunudur (Lane ve diğerleri, 2018). Hastalığın patolojik özellikleri arasında, amiloid β (Aβ) peptidlerinin beyinde hücre dışı plaklar şeklinde birikmesi ve nöron içinde hiperfosforile tau proteinlerinin oluşturduğu nörofibriler yumakların birikimi yer almaktadır (Vlassenko ve diğerleri, 2012). Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı veya antioksidan seviyelerinin azalması sonucu nöronlarda bilişsel gerilemeye yol açar. Yaşlanma sürecinde artan oksidatif stres, beyindeki nöronlarda hasarlı proteinleri ve mitokondrileri biriktirir ve bu durum beyin dokusunun oksidatif hasara karşı savunmasız hale gelmesine neden olur (Halliwell, 2001; Finkell ve Holbrook, 2000).

AH tedavisinde, aktif ilaç adaylarının merkezi sinir sistemine hedefli dağıtımı, biyoyararlanımlarının düşük olması, çözünürlük problemleri ve kan-beyin bariyerinin (KBB) engelleri gibi bir dizi sınırlama ile karşı karşıyadır (Gupta ve diğerleri, 2019). Nanoteknolojideki ilerlemeler, aktif ilaç adaylarının beyine iletilmesindeki sınırlamaları aşmak adına umut verici bir çözüm sunmaktadır. Nano ilaç taşıma sistemleri, KBB'yi geçerek çeşitli terapötik hedeflere ve proteinlere ulaşma potansiyeli taşıyarak biyoyararlanımı artırabilir (Zhang ve diğerleri, 2019). Boyutları 100 nanometreye kadar ulaşabilen nanopartiküller (NP'ler), yüksek yüzey/hacim oranları, artırılmış kimyasal reaktivite, kontrollü ve uzun süreli salım imkânı, kolay fonksiyonelleştirilebilme yetenekleri ve etkinliklerinin artırılabilir olması gibi avantajları sayesinde biyomedikal uygulamalarda geniş çapta değerlendirilmektedir (Kush ve diğerleri, 2021). Bu bağlamda, tanı ve tedavi teknolojilerinin gelişimine katkı sağlayan nanomalzemeler arasında, manyetik nanopartiküller (MNP'ler), dikkate değer bir yere sahiptir. MNP'ler, kimyasal yapıları açısından metal oksitler, saf metaller ve manyetik nanokompozitler gibi çeşitli gruplara ayrılabilir; özellikle biyomedikal uygulamalarda daha iyi biyouyumluluğa sahip olmaları nedeniyle demir oksitler (Fe_3O_4) tercih edilmektedir (Figuerola ve diğerleri, 2010; Liu ve diğerleri, 2011). Bununla birlikte, MNP'lerin yüzey enerjilerini azaltarak kümelenme eğilimleri ve oksitlenmeleri, uygulamalarda daha yaygın kullanılmalarını engelleyen faktörler arasında yer alır. MNP'lerin çeşitli yüzey kaplamaları ile bu dezavantajlar da aşılmaya çalışılmaktadır (Liu ve diğerleri, 2011).

Son yıllarda, doğal polisakkaritler, biyolojik aktiviteleri ve çeşitlilikleri nedeniyle giderek daha fazla ilgi görmektedir (Ma ve diğerleri, 2018). Bakteriler, mantarlar ve mikroalgler gibi mikroorganizmalar, hücre dışı polisakkaritler ekzopolisakkaritler (EPS'ler) üreterek çevreye salmaktadır ve bu polisakkaritler MNP'lerin yüzey kaplamalarında da kullanılabilirler (Ma ve diğerleri, 2018; Silambarasan ve diğerleri, 2019; Yadav ve diğerleri, 2014).

Literatürde MNP'lerin nörodejeneratif hastalıklarda ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanım potansiyeli sıkça vurgulanmaktadır. Bu kapsamda Şirin ve Aslim (2020) tarafından yapılan çalışmada, probiyotik kökenli ekzopolisakkaritlerin (L-EPS) $A\beta_{1-42}$ ile indüklenmiş SH-SY5Y hücre hatlarında antioksidan özellikler gösterdiği, hücre canlılığını artırdığı, mitokondriyal membran potansiyelini (MMP) koruduğu ve çeşitli nörokoruyucu etkiler sağladığı belirlenmiştir. Prof. Dr. Belma ASLIM yürütücülüğünde gerçekleştirilen FBG-2022-7937 kodlu projede de Fe_3O_4 MNP'leri sentezlenmiş ve probiyotik kökenli L-EPS ile kaplanarak, nörodejeneratif hastalıklar için biyouyumlu, nörokoruyucu, KBB'yi geçebilen ve terapötik ajanların biyoyararlanımını artıran nanomalzeme geliştirilmiştir.

Bu bulgular, MNP'lerin yalnızca fizikokimyasal özellikleriyle değil, aynı zamanda uygun biyolojik yüzey kaplamaları sayesinde nörokoruyucu potansiyel taşıdığını da göstermektedir. Özellikle probiyotik kökenli L-EPS ile kaplanmış MNP'lerin olumlu etkiler göstermesi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde umut vaat eden bileşenler olduklarını düşündürmektedir. Ancak MNP'lerin biyolojik sistemlerle olan etkileşimlerinin yalnızca biyokimyasal ve hücresel düzeyde sınırlı kalmadığı, aynı zamanda gen ekspresyonunu düzenleyen epigenetik mekanizmalar üzerinde de etkili olabileceği yönünde artan sayıda bulgu mevcuttur. Ayrıca bu etkileşimlerin, NP kaynaklı olası epigenetik değişiklikler aracılığıyla nanotoksisite süreçlerine aracılık edebileceği öne sürülmektedir (Musolino ve diğerleri, 2022). Bu nedenle, MNP'lerin nörokoruyucu amaçlarla kullanımında epigenetik güvenlik önemli bir değerlendirme kriteri olarak öne çıkmaktadır.

Epigenetik, genetik dizide herhangi bir değişiklik olmaksızın gen ekspresyonunun kalıcı veya geçici olarak düzenlenmesini sağlayan mekanizmalar bütünüdür. Başlıca epigenetik mekanizmalar arasında DNA metilasyonu, histon modifikasyonları (Örneğin; asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon) ve kodlamayan RNA'lar (özellikle mikroRNA'lar) yer almaktadır (Zhang ve diğerleri, 2020). Özellikle nanoteknolojik ürünlerin, bu epigenetik düzenleyiciler üzerinde belirleyici etkiler oluşturabileceği yönündeki bulgular dikkat

çekmiştir. MNP ve bu epigenetik düzenleyiciler arasındaki ilişki, son yıllarda yapılan çalışmalarla giderek daha fazla ilgi görmektedir. MNP'lerin hücre içine alındıktan sonra DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve miRNA'lar gibi epigenetik düzenleyiciler üzerinde etkili olabileceği gösterilmiştir. Bu etkiler, gen ekspresyon profillerinin yeniden düzenlenmesine yol açarak hücresel homeostaz, farklılaşma, stres yanıtı ve hastalık süreçlerinde önemli rol oynayabilmektedir (Sanei ve diğerleri, 2023). Dolayısıyla MNP'lerin epigenetik mekanizmalarla olan etkileşimi, biyomedikal uygulamalarda taşıdıkları potansiyel faydaların yanı sıra olası risklerin de anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır.

Epigenetik mekanizmaların hücresel farklılaşma, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, gelişimsel süreçler ve hastalık patogenezinde kritik roller üstlenmesi, bu düzenleyici unsurların kapsamlı bir şekilde analiz edilmesini gerekli kılmaktadır. Bu nedenle, epigenetik profilleme çalışmaları günümüzde hem temel biyolojik araştırmalar hem de tanı ve tedavi amaçlı biyomedikal uygulamalar açısından büyük önem taşımaktadır. Epigenetik düzenlemelerin başlıca bileşenlerinden olan DNA metilasyonu, stabil ve kalıtılabilir yapısı sayesinde gen ifadesinin uzun vadeli kontrolünde belirleyici rol oynamakta, bu yönüyle nörodejeneratif hastalıklar dahil birçok kompleks hastalıkla olan ilişkisi açısından ön plana çıkmaktadır. Ayrıca DNA metilasyon düzeyindeki değişiklikler çevresel faktörlerin etkilerini yansıtabilmesi açısından epigenetik biyobelirteç potansiyeli taşımaktadır (Valente ve diğerleri, 2023). Bu doğrultuda, epigenetik profilleme teknikleri geliştirilmiş ve özellikle DNA metilasyonun kapsamlı bir şekilde analiz edilebilmesi amacıyla çeşitli moleküler biyoteknolojik yöntemler geliştirilmiştir.

Epigenetik düzeyde DNA metilasyonunun geniş çaplı analizine olanak tanıyan tekniklerden biri de Metilasyona Duyarlı Çoğaltılmış Polimorfizm (MSAP) analizidir. Yöntem, metilasyona duyarlı restriksiyon enzimleri *HpaII* veya *MspI* ile DNA'nın sindirilmesi, adaptörlerin bağlanması ve çoğaltılmasının ardından jel bazlı görselleştirme ve skorlama aracılığıyla veri işleme adımlarını içerir (Chwialkowska ve diğerleri, 2017). Bu teknik özellikle genom çapında metilasyon örüntülerini karşılaştırmalı analizinde düşük maliyetli, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlaması nedeniyle epigenetik araştırmalarda yaygın olarak tercih edilmektedir.

Bu bağlamda çalışmanın amacı, Prof. Dr. Belma Aslım tarafından geliştirilen biyouyumlu, nörokoruyucu ve kan-beyin bariyerini geçebilen probiyotik kökenli L-EPS kaplı Fe_3O_4 manyetik nanomalzemenin Alzheimer hastalığında (AH) DNA metilasyonu üzerine etkilerinin ortaya konulması ve aynı zamanda nörokoruyucu etki ile epigenetik arasındaki olası ilişkinin aydınlatılmasıdır. Bu kapsamda hem sağlıklı hem de $A\beta_{1-42}$ ile indüklenmiş Alzheimer hastalık (AH) modelinin uygulandığı SH-SY5Y hücre hatlarında geliştirilen MNP'lerin farklı kombinasyonlarına ait uygulamalarda DNA metilasyon profiline etkileri MSAP analizi ile değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Alzheimer Hastallığı (AH) ve Önemi

Alzheimer hastalığı (AH), ilerleyici hafıza kaybı, bilişsel işlevlerde bozulma, zihinsel yetersizlikler ve davranışsal değişikliklerle kendini gösteren, yaşlanmaya bağlı nörodejeneratif bir hastalıktır ve ileri evrelerinde ölümle sonuçlanabilmektedir (Hurd ve diğerleri, 2013; Prince ve diğerleri, 2013). Bu hastalık, özellikle hafıza merkezlerinden biri olan hipokampus ve beynin ön ile yan kısımlarında bulunan temporal ve frontal loblarda süregelen sinir hücresi tahribatı ile karakterizedir. Bu bölgelerdeki nöron dejenerasyonu, demans, öğrenme güçlüğü ve bilişsel yetilerde ilerleyici bozulma gibi klinik bulgulara yol açmaktadır (Lane ve diğerleri, 2017).

Hastalığın seyri yavaş ilerleyici olup geri dönüşsüz, karmaşık ve multifaktöriyel etkenlerin bir araya gelmesiyle şekillenir. Yaşlı bireylerde demansın en sık görülen nedeni olan AH, küresel ölçekte ciddi bir halk sağlığı sorununu teşkil etmektedir (Hampel ve diğerleri, 2017). Özellikle 65 yaş üstü bireylerde AH gelişme riski belirgin şekilde artmakta ve 85 yaş üzeri bireylerde bu oran %30'a kadar ulaşabilmektedir (Hickman ve diğerleri, 2016). Yaşlanma, nörodejeneratif hastalıkların başlıca risk faktörü olduğundan, insan ömrünün uzaması AH prevalansında paralel bir artışa neden olmaktadır (Hou ve diğerleri, 2019). 2015 yılı itibarıyla dünya genelinde yaklaşık 46,8 milyon demans hastası olduğu tahmin edilmektedir; bunların, %70'inin AH tarafından kaynaklandığı ve bu sayının 2030 yılına kadar 74,7 milyona, 2050'ye gelindiğinde ise 131,5 milyon seviyesine ulaşmasının beklendiği bildirilmektedir (Prince ve diğerleri, 2013). Alzheimer Derneği'nin 2017 verilerine göre yalnızca ABD'de 6,08 milyon kişide AH olduğu; Avrupa'da ise erkeklerde %3,31, kadınlarda %7,13 olmak üzere ortalama %5,05 prevalansa ulaştığı bildirilmektedir (Brookmeyer ve diğerleri, 2018; Niu ve diğerleri, 2016). Teşhis sonrası yaşam süresi kişiden kişiye değişiklik göstermekte olup, hastalığın ilerlemesi genellikle 3 ila 9 yıl arasında sürmektedir (Querfurth ve diğerleri, 2010; Todd ve diğerleri, 2013).

AH'ın etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, hastalığın patolojik temelini hücre dışı amiloid β (Aβ) plakları, hücre içi nörofibriler yumaklar (NFT) ve nöroinflamasyon oluşturmaktadır. Aβ plakları, amiloid öncül proteininin (APP) BACE-1 ve γ-sekretaz enzimleriyle parçalanması sonucu oluşan çözünmez filamentlerin birikimiyle meydana gelir

(Serrano-Pazo ve diğerleri, 2011). Diğer bir önemli patolojik belirti olan NFT'ler ise mikrotübül ile ilişkili tau proteininin hiperfosforilasyonu sonucu oluşmakta olup, bu yumakların neokortekste artması demans şiddetiyle pozitif korelasyon göstermektedir (Arrigada ve diğerleri, 1992). Nöroinflamasyon ise mikroglia ve astrositlerin aktivasyonu sonucu inflamatuvar sitokin ve kemokinlerin üretimi ile karakterizedir ve hastalığın ilerlemesinde etkili olduğu düşünülmektedir (Heneka ve diğerleri, 2015). Bu patolojik bulgulara rağmen, AH'ın gelişiminde rol oynayan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak çözülememiştir. Bu da erken tanıya olanak sağlayacak güvenilir biyobelirteçlerin saptanmasını güçleştirmektedir ve moleküler mekanizmaların daha ayrıntılı biçimde anlaşılmasına yönelik çalışmalara duyulan ihtiyaç devam etmektedir (Van Bulck ve diğerleri, 2019; Liu ve diğerleri, 2018). AH genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle ortaya çıkan karmaşık bir hastalık olup, epigenetik mekanizmalar bu etkileşimin düzenlenmesinde kilit rol oynayabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, AH etiyolojisinde epigenetik düzenlemelerin potansiyel rolünü ortaya koyarak bu alanda yeni terapötik hedeflerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (Sharma ve diğerleri, 2020).

2.2. Alzheimer Hastalığı'nda Önleyici Tedavi Stratejileri ile Manyetik Nanopartiküllerin Rolü

AH patogenezinin henüz tam olarak anlaşılamamış olması, mevcut klinik tedavi yaklaşımları da sınırlandırmaktadır. Günümüzde hastalığın ilerleyişini durduracak veya tersine çevirecek etkin bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır (Pardo-Moreno ve diğerleri, 2022).

Tedavi girişimlerinin yetersiz kalmasının en önemli nedenlerinden biri, beyin ile kan arasındaki madde geçişini düzenleyen kan-beyin bariyeridir (KBB). KBB, merkezi sinir sisteminin korunmasında kritik bir rol oynar ve yalnızca gerekli besinlerin geçişine izin vererek beyni zararlı bileşiklerden izole eder (Abott, 2005; Dong ve diğerleri, 2018). Ancak bu seçici geçirgenlik, farmakolojik ajanların beyine ulaşmasını büyük ölçüde sınırlandırmaktadır (Jones ve diğerleri, 2007; Mitusova ve diğerleri, 2022). Dolayısıyla mevcut ilaçlar çoğunlukla semptomatik rahatlama sağlamakta ve hastalığın kökenine ulaşamamaktadır (Torre ve Ceña, 2018).

Bu bağlamda, son yıllarda nanoteknoloji temelli tedavi yaklaşımları ön plana çıkmıştır. Nanopartiküller (NP'ler), biyomedikal uygulamalarda ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanım

açısından oldukça elverişli olup, küçük boyutları, yüksek yüzey/hacim oranı, hedefe yönelik taşınım kabiliyeti ve kontrollü salım özellikleri sayesinde dikkat çekmektedir (Chattarje ve diğerleri, 2014; Bilal ve diğerleri, 2020). Ayrıca, istenmeyen sistemik yan etkileri azaltma ve hedef dokuya seçici etki gösterme potansiyeli taşımaktadırlar (Kaushik ve diğerleri, 2018; Kabanov ve Gendelmen, 2007). Özellikle KBB'ni geçebilme kapasiteleri, nanoteknolojik tedavileri nörodejeneratif hastalıklarda umut verici kılmaktadır (Tosi ve diğerleri, 2019).

Bu kapsamda özellikle demir oksit temelli manyetik nanopartiküller (Fe_3O_4 MNP), biyouyumluluk, yüksek yüzey alanı, süperparamanyetik özellikleri nedeniyle ön plana çıkmıştır. Fe_3O_4 MNP'lerin AH patofizyolojisine yönelik çeşitli deneysel çalışmalarda umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Bellova ve diğerleri, (2010) yılında gerçekleştirdiği bir çalışmada, MNP'lerin lizozim amiloid agregasyonu üzerinde inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır. Ansari ve diğerleri, (2016) tarafından β-siklodekstrin ile işlevselleştirilen Fe_3O_4 MNP'lerin Aβ agregasyonunu anlamlı düzeyde azalttığı rapor edilmiştir. Amin ve ark. (2017) ise bitki kaynaklı osmotin proteiniyle işlevselleştirilen Fe_3O_4 MNP'lerin manyetik alan yardımıyla fare beynine iletildiğinde, Aβ birikimi, tau hiperfosforilasyonu ve sinaptotoksisite gibi AH'ye özgü nöropatolojik değişimlerin gerilediğini göstermiştir. Kuang ve ark. (2020), kurkumin yüklenmiş Fe_3O_4 karbon nanokompozitlerin Aβ fibril oluşumunu inhibe ettiğini ve ROS üretimini baskılayarak nöronları koruduğunu bildirmiştir. Wang ve ark. (2020) ise polidopamin kaplı Fe_3O_4 NP'lerin kök hücre hedeflemesi yoluyla bilişsel işlevleri iyileştirdiğini ortaya koymuştur. Her ne kadar Fe_3O_4 NP'ler güvenli kabul edilse de, biyolojik sistemlerde homeostaz dengesizlikleri durumunda toksisite potansiyelleri göz ardı edilmemelidir (Gurzau ve diğerleri, 2003). Bu nedenle, klinik uygulamalarda kullanılmadan önce güvenli formülasyonlarının geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır (Green-Sadan ve diğerleri, 2005).

Çıplak MNP'ler fizyolojik koşullarda agregasyon eğiliminde olup, stabiliteleri düşüktür. Bu nedenle çeşitli polimerik kaplamalarla yüzey modifikasyonları yapılarak biyolojik sistemlerde stabiliteleri artırılabilir (Petri-Fink ve diğerleri, 2008; Mornet ve diğerleri, 2004). Mikrobiyal kökenli ekzopolisakkaritler (EPS), mikroorganizmalar tarafından sentezlenerek hücre dışına salgılanan, yüksek moleküler ağırlıklı, şeker kalıntılarından oluşan polimerik yapılardır (Poli ve diğerleri, 2010). Bakteriler, mayalar, algler ve protistalar gibi çeşitli mikroorganizmalar; yüksek tuzluluk, ekstrem pH değerleri, sıcaklık değişimleri, kuraklık ve radyasyon gibi çevresel stres faktörlerine karşı adaptasyon geliştirmek amacıyla bu tür

biyopolimerleri üretmektedir (Ruas-Madiedo ve diğerleri, 2005; Mahapatra ve Banarjee, 2013; Raposo ve diğerleri, 2013; Jain ve diğerleri, 2005). Özellikle ekstremofil mikroorganizmalar tarafından sentezlenen EPS'ler, bu canlıların hayatta kalmasında etkili olan en yaygın koruyucu mekanizmalardan biri olarak öne çıkmaktadır (Banarjee ve diğerleri, 2021).

EPS'ler temel olarak monosakkarit birimlerinden oluşmakla birlikte, yapılarında asetat, sülfat, fosfat, pirüvat ve süksinat gibi karbohidrat dışı yapısal gruplarda bulunabilir. Bu karmaşık yapı, EPS'lerin biyolojik aktivitesini ve fonksiyonel özelliklerini doğrudan etkilemektedir (Sivakumar ve diğerleri, 2014). Biyoteknoloji ve nanoteknoloji alanlarında dikkat çeken bu polimerler, özellikle NP sentezinde işlevsel bir rol üstlenmektedir. EPS ile metal iyonları arasında hidroksil grupları üzerinden gerçekleşen etkileşimler, sentezlenen nanoparçacıkların şekil ve boyutunu önemli ölçüde etkileyebilmektedir (Djokovic ve diğerleri, 2009).

Biyouyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir, toksik olmayan ve doğal kaynaklardan elde edilebilen EPS'ler, çevre dostu materyal arayışında öne çıkan sürdürülebilir biyo-polimerler arasında yer almaktadır. EPS'lerin biyolojik potansiyeli; monosakkarit kompozisyonu, glikozidik bağ türleri, kimyasal modifikasyonlar, konformasyonel yapısı ve moleküler ağırlığı gibi yapısal faktörlerden etkilenmektedir (Wang ve diğerleri, 2019). Bu özellikler, EPS'nin fonksiyonel aktivitelerini şekillendirmekte ve uygulama potansiyelini belirlemektedir. Nitekim EPS'lerin antimikrobiyal, immünmodülatör, anti-enflamatuar, antioksidan, antiviral, antitümör, antidiyabetik, antiülserojenik ve kolesterol düşürücü gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu literatürde geniş ölçüde belgelenmiştir (Hussain ve diğerleri, 2017; Patel ve diğerleri, 2011).

Prof. Dr. Belma ASLIM yürütücülüğünde gerçekleştirilen FBG-2022-7937 kodlu proje kapsamında Fe_3O_4 MNP'leri sentezlenmiş ve probiyotik kökenli L-EPS ile kaplanarak, nörodejeneratif hastalıklara yönelik biyouyumlu, nörokoruyucu, KBB'ni geçebilen ve terapötik ajanların biyoyararlanımını artırma potansiyeline sahip bir nanomalzeme geliştirilmiştir. Sirin ve Aslim, (2021) tarafından SH-SY5Y nöral hücre hattı kullanılarak yürütülen çalışmada, L-EPS'lerin belirgin antioksidan aktivite sergilediği ortaya konmuştur. Yapılan deneysel analizler sonucunda, L-EPS uygulamasının hücre canlılığını artırdığı, antioksidan enzim aktivitelerini yükselttiği, mitokondriyal membran potansiyelini (MMP)

koruduğu ve Bcl-2 ilişkili X *(BAX)* ile protein kinaz B (*AKT/PKB*) genlerinin ekspresyon seviyelerini artırdığı belirlenmiştir. Buna karşılık, L-EPS'lerin Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi, $A\beta_{1-42}$ agregasyonu, ROS düzeyini ve apoptotik hücre oranını azalttığı tespit edilmiştir. L-EPS'lerin özgün yapısal özellikleri ve yüzey morfolojisinin, nöronal hücreler üzerinde koruyucu etkiler oluşturduğunu göstermektedir.

Öte yandan bazı çalışmalar MNP'lerin AH üzerindeki etkilerinin yalnızca biyokimyasal düzeyle sınırlı kalmayıp, aynı zamanda epigenetik mekanizmalar aracılığıyla da ortaya çıkabildiğini ve bu durumun MNP kaynaklı nanotoksisite süreçlerine aracılık edebileceği öne sürmektedir.

2.3. Epigenetik

Epigenetik, DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen ekspresyonunu etkileyen ve nesiller boyunca aktarılabilen kalıtsal modifikasyonları ifade eder. Genetik koddan farklı olarak epigenetik kod; çevresel faktörler, yaşlanma süreçleri ve çeşitli hastalıklar gibi dışsal etmenlere bağlı olarak dinamik biçimde değişebilir (Feil ve Fraga, 2012). Bu durum, epigenetik mekanizmaların genetik varyasyonlardan temel farkını oluşturmaktadır; epigenetik, çevresel uyaranlara karşı organizmanın verdiği tepkileri düzenleme kapasitesine sahiptir. Epigenetik düzenlemeler; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA molekülleri olmak üzere üç temel mekanizma aracılığıyla gerçekleşir ve bu mekanizmalar gen ekspresyonunun kontrolünde kritik rol oynar (Mirbahai ve diğerleri, 2013).

DNA metilasyonu en yaygın çalışılan epigenetik mekanizmadır. DNA metilasyonu, DNA metiltransferaz enzimleri aracılığıyla metil (CH_3) grubunun sitozin bazının C-5 karbonuna kovalent olarak eklenmesiyle gerçekleşen bir epigenetik süreçtir (Robertson ve diğerleri, 2005). Memeli genomlarında bu modifikasyon genellikle CpG dinükleotid bölgelerinde yoğunlaşmakla birlikte, somatik hücrelerde CpG dışı bölgelerde de yaygın olarak görülebilir. İlginç bir şekilde, insan beyninde diğer dokulara kıyasla daha yüksek düzeyde DNA metilasyonu bulunduğu halde, genom genelinde 5-metilsitozin (5mC) seviyeleri görece düşük kalmaktadır. Tüm bu veriler ışığında, DNA metilasyonu günümüzde gen aktivitesini etkileyen temel epigenetik düzenleyici unsurlardan biri olarak kabul edilmektedir (Lister ve diğerleri, 2009). Bu düzenleyici mekanizmanın, fizyolojik ve

patolojik koşullar altında hafıza oluşumu ve nöronal plastisite gibi bilişsel süreçlerde de önemli işlevler üstlendiği literatürde çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Day ve diğerleri, 2011; Sananbenesi ve diğerleri, 2009). Özellikle AH, Parkinson hastalığı (PH) ve depresyon gibi nörolojik ve psikiyatrik hastalıklarla olan ilişkisi nedeniyle DNA metilasyonu, epigenetik araştırmaların odak noktası haline gelmiştir (Fuke ve diğerleri, 2004). Dolayısıyla epigenetik mekanizmalar, gen ve protein ifadesini doğrudan etkileyerek gen susturma, transkripsiyonel aktivite ve transkripsiyon sonrası RNA işlenmesi gibi moleküler süreçleri modüle eder. Bu bağlamda, AH patogenezinde epigenetik mekanizmaların etkili olabileceği yönünde artan sayıda bulgu mevcuttur (Qureshi ve diğerleri, 2013).

Sonuç olarak epigenetik mekanizmalar; çevresel uyaranlar, yaşlanma ve hastalıklar gibi çeşitli dış faktörler karşısında gen ekspresyonunun dinamik bir biçimde düzenlenmesini sağlar. Bu mekanizmaların özellikle nörodejeneratif hastalıklar gibi karmaşık patolojilerde rol oynadığı düşünülmektedir. Öte yandan biyomedikal alanda hızla gelişen nanoteknoloji uygulamaların, yalnızca fizyolojik değil, aynı zamnda epigenetik düzeyde de etkiler oluşturma potansiyeline sahip olabileceklerine dair çalışmalar dikkat çekmektedir. Bu bağlamda MNP'lerin terapötik potansiyellerinin yanı sıra, son yıllarda bazı çalışmalar MNP'lerin epigenetik düzeyde oluşturabileceği olası etkilerin üzerine yoğunlaşmıştır.

2.4. Manyetik Nanopartiküller ile Epigenetik Arasındaki İlişki

MNP'ler özellikle teşhis, hedefe yönelik ilaç taşıma ve manyetik hipertermi gibi biyomedikal uygulamalarda önemli avantajlar sunmaları nedeniyle son yıllarda yoğun ilgi görmektedir. Ancak bu partiküllerin biyolojik sistemlerle olan etkileşimlerinin yalnızca fizyolojik seviyede kalmadığı, aynı zamanda gen ekspresyonunu düzenleyen epigenetik mekanizmalar üzerinde de etkiler oluşturabileceği ortaya konmuştur (Pogribna ve Hammons, 2021).

Kısa süreli MNP maruziyetinin gen ekspresyonu üzerinde doğrudan etkisi sınırlı olsa da, uzun dönemde epigenetik düzeyde birikerek kalıcı lezyonlara neden olabileceği düşünülmektedir. Bu epigenetik değişiklikler, zamanla gen ekspresyonunu değiştirerek fenotipik düzeyde farklılıklara yol açabilir. Musolino ve diğerleri, (2022) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada epigenetik mekanizmaların MNP kaynaklı nanotoksisite süreçlerine aracılık edebileceği öne sürülmüştür. Dolayısıyla, MNP'lerin özellikle uzun

vadeli etkileri değerlendirilirken, yalnızca genetik değil, epigenetik düzenleyici mekanizmalar da dikkate alınmalıdır.

NP'lerin biyomoleküllerle olan etkileşimi, yalnızca hücre zarıyla sınırlı kalmamakta; aynı zamanda lizozom, mitokondri ve çekirdek gibi hücre içi organellerin fonksiyonlarını da etkileyebilmektedir. Sitoplazmada bulunan NP'ler, mitoz sırasında ya da nükleer porlar aracılığıyla pasif difüzyon mekanizmasıyla hücre çekirdeğine ulaşabilir ve burada DNA veya nükleer proteinlerle doğrudan etkileşerek genomik yapı ve işlevi üzerinde bozulmalara yol açabilir (Zahin ve diğerleri, 2019). Bu durum, NP'lerin yalnızca toksik etkileriyle değil, aynı zamanda hücresel regülasyon mekanizmaları üzerindeki potansiyel epigenetik etkileriyle de değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, MNP'lerin epigenetik süreçler üzerindeki etkileri özel bir önem taşımaktadır, ancak halen bu alanda literatürde kısıtlı sayıda çalışmalar mevcuttur.

Epigenetik düzeyde özellikle DNA metilasyonu açısından yapılan çalışmalar dikkat çekicidir ve çalışmalar MNP uygulamalarının epigenetik etkilerinin uygulamaya göre değişkenlik gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Nitekim, Bonadio ve diğerleri, (2017) yaptığı çalışmada, meme kanseri hücre hattı MCF-7'nin sitrat ile kaplanmış MNP'ler (MNP-CIT) ile geçici olarak muamelesinin, DNA metilasyon profili üzerindeki etkileri incelenmiştir. Tüm genom bisülfit sekanslama ile DNA metilasyonu analiz edilmiş, 58 gen bölgesinde metilasyon değişiklikleri tespit edilmiştir. Bu değişiklikler kanserle ilişkili genleri içermekte olup, hem kalıcı hem de geçici epigenetik modifikasyonlar olduğu belirlenmiştir. Ayrıca DNA metiltransferaz (DNMT) genlerinin ekspresyonunda (DNMT1 azalırken, DNMT3A ve DNMT3B artışı) modülasyonlar gözlenmiştir. Elde edilen bulgular MNP'lerin hücrelerde kalıcı epigenetik etkiler yaratabileceği ve biyomedikal uygulamalarda bu etkilerin dikkate alınması gerektiğini göstermektedir.

Benzer şekilde farklı hücre hatlarında yapılan çalışmalar da bu durumu desteklemektedir. Soltysova ve diğerleri, (2023) yaptığı çalışmada Fe_3O_4 MNP'lerin kronik maruziyeti sonrası insan böbrek hücreleri (TH-1) üzerindeki epigenetik ve transkriptomik etkileri incelenmiştir. Yapılan DNA metilasyon analizinde genom çapında DNA metilasyon profili çıkarılmış, özellikle proto-onkogen, AP-1 transkripisyon faktörü alt birimi (*FOS)* geninde

hipermetilasyon gözlenmiş ve bu metilasyonun gen ekspresyon ile ters korelasyon gösterdiği belirtilmiştir. RNA-seq ile yapılan transkriptom analizi sonucunda gen ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiş, bağışıklık yanıtı, DNA hasarı ve kanserle ilişkili yollar gibi birçok biyolojik süreçte yer alan genlerde anlamlı derecede değişiklikler gözlemlenmiştir.

Brzoska ve diğerleri, (2019) yaptığı bir çalışmada ise gümüş (AgNP), altın (AuNP) ve süperparamanyetik demir oksit MNP'lerin insan karaciğer kanserinden türetilmiş hepatoselüler karsinom hücre hattı (HepG2) hücreleri üzerinde epigenetik etkileri incelenmiştir. Düşük sitotoksik dozlarda uygulanan bu NP'lerin inflamasyon ve apoptozisle ilişkili genlerin promotör bölgelerinde DNA metilasyon düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı saptanmıştır. Sonuç olarak kısa süreli Fe_3O_4 NP maruziyeti sonrasında HepG2 hücrelerinde global metilasyon düzeylerinde herhangi bir değişiklik gözlenmediği belirlenmiştir (Brzoska ve diğerleri, 2019). Buna karşın, Soltysova ve diğerleri, (2023) tarafından yapılan çalışmada, uzun süreli Fe_3O_4 NP maruziyeti sonrasında TH-1 hücrelerinde yapılan analizlerde, 124 gene karşılık gelen 201 farklı metilasyon bölgesi (DMR) tespit edilmiştir. Bu bölgelerden 51'i promotör bölgesine ait metilasyon değişiklikleri, 19'unda ise transkripsiyon faktörlerini (TF) etkileyen metilasyon olayları belirlenmiştir. Özellikle, podosit ve hepatosit farklılaşmasında kilit rol oynayan *MYCN* (proto-onkogen) ve *MAFB* (transkripsiyon faktörü) genlerinin hipometile olduğu saptanmıştır. Bu durum, bu genlerin ekspresyonunun artmasına ve potansiyel olarak kanserojenik süreçlerin veya kontrolsüz hücresel aktivitelerin tetiklenmesine yol açabilir (Tscuhiya ve diğerleri, 2015). Öte yandan Fe_3O_4 MNP maruziyeti, bağışıklık sistemi düzenlenmesi ile B ve T hücre aktivasyonunda hayati rol oynayan ve transkripsiyon faktörlerinden biri olan erken büyüme yanıtı 2 (*EGR2)* geninde hipermetilasyona yol açmıştır. Hipermetilasyon bu genin susturulmasına neden olarak bağışıklık dengesizliğine yol açabilir. (Taefehshokr ve diğerleri, 2017). Bu bulgular, Fe_30_4 NP maruziyetinin gen ekspresyonunu epigenetik yollarla yeniden düzenleyerek biyolojik sistemlerde önemli değişikliklere neden olabileceğini göstermektedir.

Bonadio ve diğerleri, (2019) tarafından yürütülen bir çalışmada, sitrik asitle kaplanmış maghemit (y-Fe_2O_3) NP'lerin insan submandibular tükürük bezi hücreleri (HSG hücre hattı) üzerindeki sitotoksik ve epigenetik etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmada, epigenetik düzeydeki değişiklikler kolorimetrik analiz yöntemleri ile belirlenmiş ve bulgular kantitatif PZR (qPZR) ile doğrulanmıştır. NP uygulaması sonrasında ROS üretiminde artış

gözlemlenmiş; ayrıca hücre sitoplazmasında demir iyonlarının kümelenmediği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, global DNA metilasyon düzeylerinde anlamlı değişiklikler saptanmış olup, bu durum NP maruziyetinin epigenom üzerinde yeniden programlanmaya yol açabileceğini düşündürmektedir. Gen ekspresyon analizleri, demir metabolizması ve oksidatif stresle ilişkili genlerin yukarı yönlü regülasyona uğradığını, buna karşılık epigenetik yeniden programlamayla ilişkili bir genin ifade düzeyinin azaldığını ortaya koymuştur. Bu çalışma, sitrik asitle kaplanmış NP'lerin HSG hücre hattında hücre canlılığını etkilemeksizin epigenetik yanıtları tetikleyebileceğini göstermesi bakımından literatüre önemli bir katkı sunmakta ve bu hücre hattında söz konusu NP'lerin etkilerini inceleyen ilk çalışma olma niteliğini taşımaktadır.

Lu ve diğerleri, (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, MNP'lerin, insan genomunun önemli bir bölümünü oluşturan tekrarlayan elementlerde, özellikle Line-1 ve Alu dizilerinde, DNA hipometilasyonuna yol açabileceğini göstermektedir. Söz konusu elementlerin metilasyon düzeylerinde meydana gelen azalma, transpozisyon ve rekombinasyon olaylarının sıklığını artırarak genomik istikrarın bozulmasına neden olabilmektedir. Bu durum, MNP'lerin yalnızca genotoksik değil, aynı zamanda epigenetik düzeyde genom bütünlüğünü tehdit edebilecek potansiyel zararlı etkiler oluşturabileceğini işaret etmektedir. Bu epigenetik toksisite belirteci olarak sıkça kullanılabilir.

Bununla birlikte sadece DNA metilasyonu değil, histon modifikasyonları da MNP maruziyetiyle değişime uğrayabilir. Bazı çalışmalarda MNP maruziyetinin histon metilasyon profilini değiştirdiği bildirilmiştir. Gamberoni ve diğerleri, (2023), tarafından yapılan çalışmada MNP'lere maruz kalan hücrelerde H3K27ac (Histon H3 lizinin 27 asetilasyonu) ve H3K4me1 (Histon H3 lizinin 4 monometilasyonu) gibi histon modifikasyonlarının genomik dağılımında belirgin değişikliklere yol açtığını ve bunun da olası nanotoksik etkilerle ilişkili olabileceği gözlemlenmiştir. Genomik dağılım, belirli bir epigenetik işaretin genom boyunca hangi bölgelerde yoğunlaştığını ve nasıl bir desen izlediğini ifade eder. Bu dağılımdaki değişiklikler, özellikle gen promotörleri ve enhansır bölgelerde epigenetik düzenlemenin yeniden yapılandırılmasına yol açarak, gen ekspresyonunda ve hücresel işlevlerde önemli farklılıklara neden olabilmektedir. Bu durum, epigenetik yeniden düzenleme anlamına gelir ve DNA metilasyonu ile koordineli çalışır. Bir diğer çalışmada da *y*-Fe_3O_4 NP'lere maruziyetin genomik sitozin metilasyonunu artırdığı ve

bunun sonucunda genomik stabilitenin bozulduğu gösterilmiştir (Haliloglu ve diğerleri, 2022).

Bonadio ve diğerleri, (2019) yaptığı bir çalışmada sitrik asitle kaplanmış maghemit NP'lerin HSG hücre hattı üzerindeki etkilerini kolorimetrik analiz yöntemleri ile belirlenmiş ve qPZR doğrulanmıştır; bu çalışma sonucunda histon H3 ve H4'ün asetilasyon profillerinde anlamlı değişiklikler gözlemlendiğini bildirilmiştir.

MNP uygulamaları sonucu mikroRNA (miRNA) düzeyinde de önemli etkiler gözlenmiştir. Birçok miRNA nörogelişim süreçlerinde kritik roller üstlenmektedir. Brzoska ve diğerleri, (2019) yaptığı bir çalışmada NP uygulamasına bağlı olarak 9 adet miRNA'nın ekspresyonunda anlamlı değişiklikler gözlenmiştir. Bu değişiklikler en fazla AgNP grubu (6 miRNA), ardından AuNP (4 miRNA) ve MNP (2 miRNA) gruplarında ortaya çıkmıştır. Çalışmada saptanan miRNA'ların büyük çoğunluğu daha önce yapılan araştırmalarda hücre proliferasyonunu ve tümör oluşumunu baskılayan mekanizmalarla ilişkilendirilmiştir. Ancak, bu miRNA ekspresyon değişikliklerinin tümör oluşumunu teşvik mi ettiği yoksa baskıladığı mı konusunda net bir sonuca ulaşılamamıştır. Ayrıca MNP'lerin DNA metilasyonu ve miRNA ekspresyonu üzerinde etkileri literatürde ilk kez bu çalışmada değerlendirilmiş ve Fe_3O_4 tipi MNP'nin miR-34a üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı saptanmıştır.

Fenton reaksiyonu aracılığıyla ROS oluşumu, MNP uygulamalarının yarattığı epigenetik değişikliklerdeki moleküler tetikleyicilerindendir (Singh ve diğerleri, 2010). MNP'ler, içerdikleri Fe^{2+} iyonlarının hidrojen peroksit (H_2O_2) ile reaksiyona girmesiyle hidroksil radikali (-OH) üretir. Bu süreç ROS üretimini tetikler. ROS oluşumu gen ekspresyonunun aktivasyonu veya baskılanmasında rol alan temel düzenleyici faktörler üzerinde modülatör etkilere yol açabilir. Bu süreçler, histon metiltransferaz (HMT), DNA metiltransferaz (DNMT), histon asetiltransferaz (HAT), histon demetilaz (HDM) ve histon deasetilaz (HDAC) gibi enzimler tarafından düzenlenen dinamik süreçlerdir. ROS'un, HMT, HDAC, DNMT enzimlerini hedef alarak hipometilasyona neden olduğu saptanmıştır. (Agarwal ve diğerleri, 2024).

MNP'lerin ROS aracılı neden olduğu oksidatif stresin, DNA metilasyon süreci üzerinde çeşitli yollarla etkili olabileceği bildirilmektedir. Birincisi, oksidatif hasarın DNA üzerinde

oluşturduğu yapısal bozulmalar, DNMT enzimlerinin hedef bölgelerine bağlanmasını engelleyebilir. İkincisi, ROS, 5-metilsitozini (5mC), DNMT'ler tarafından tanınmayan bir form olarm 5-hidroksimetilsitozine (5hmC) dönüştürerek DNA replikasyonu sırasında pasif demetilasyona yol açabilir. Üçüncü olarak, oksidatif stresin hem DNMT'lerin hem de demetilasyon enzimlerin arasında yer alan ten-eleven translocation (TET) proteinlerinin ekspresyon düzeylerini ve enzimatik aktivitelerini değiştirebildiği gösterilmiştir. Bu mekanizmaların bir araya gelmesiyle, MNP maruziyeti sonucunda DNA metilasyon dengesinin bozulabileceği ve buna bağlı olarak gen ekspresyonunun epigenetik düzeyde yeniden programlanabileceği öne sürülmektedir (Agarwal ve diğerleri, 2024).

Nitekim bu durumu destekler şekilde literatürde yer alan çeşitli çalışmalar; altın-kobalt, bakır oksit, çinko oksit ve titanyum oksit gibi farklı NP türlerinin toksisitelerinin, büyük oranda ROS üretimi aracılığıyla gerçekleştiğini göstermektedir (Girgis ve diğerleri, 2012). Bu toksik etki, kullanılan nanoparçacığın boyutu, şekli, yüzey yükü, kimyasal bileşimi, çözünürlüğü ve agregat oluşturma potansiyeli gibi fizikokimyasal özellikleri ile de doğrudan ilişkilidir. Ayrıca, NP'lerin temas ettiği hücre tipi de bu toksik yanıt üzerinde belirleyici rol oynamaktadır. Özellikle daha küçük boyutlu NP'lerin, biyolojik sistemlerde ROS üretimine neden olan moleküllerle etkileşime girme potansiyelinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Costa ve diğerleri, 2013).

NP'lerin epigenetik düzenleyici mekanizmalar üzerinde değişikliklere yol açabileceği literatürde farklı çalışmalar ile belgelenmiştir. Ancak, MNP'lere özgü epigenetik etkilerle ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu alandaki veri eksikliği, MNP'lerin olası biyomedikal uygulamaları konusunda daha fazla araştırma ihtiyacını ortaya koymaktadır. Sonuç olarak MNP'lerin epigenetik üzerindeki olası etkilerinin incelenmesi, hem güvenli kullanım sınırlarının belirlenmesi hem de MNP'lerin terapötik uygulamalardaki etkinliğinin artırılması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, MNP'lerin epigenetik düzeyde oluşturabileceği etkilerin anlaşılabilmesi için bu mekanizmaları incelemeye yönelik analiz yöntemlerinin kullanılması büyük önem taşımaktadır.

2.5. Epigenetik Analiz Yöntemleri

DNA metilasyonu başta olmak üzere epigenetik değişimlerin belirlenmesinde kullanılan analiz yöntemleri büyük önem taşımaktadır. Genom düzeyinde metilasyon profillerinin elde

edilmesi için farklı yöntemler bulunmaktadır. Bu kapsamda değerlendirilen önemli tekniklerden birisi Metilasyona Duyarlı Amplifiye Polimorfizm (MSAP) analizidir. MSAP, AFLP teknolojisinden türetilen genomik metilasyon varyasyonunu tespit etmek için PZR tabanlı bir tekniktir (Reyna-López ve diğerleri, 1997). Bu yöntem, DNA metilasyonunun belirlenmesinde metilasyona duyarlı restriksiyon enzimlerinin (*MspI* ve *HpaII* gibi izoşizomerler) kombinasyonuna dayanmaktadır. Söz konusu enzimler, 5′-CCGG-3′ tanıma dizisine bağlanmakla birlikte, sitozin metilasyonuna karşı farklı hassasiyetlere sahiptir (González-Benito ve diğ., 2020).

MSAP analizinin etkinliği, yalnızca model organizmalarda değil, aynı zamanda daha önce metilasyon profili çıkarılmamış örnekler için de başarıyla uygulanabilmesinden kaynaklanmaktadır. Uygulama kolaylığı, düşük maliyet, çok sayıda lokusun aynı anda analiz edilebilmesi ve yüksek verimlilik gibi avantajları nedeniyle MSAP yöntemi epigenetik analizlerde yaygın olarak tercih edilmektedir (Albertini ve Marconi, 2014). Bununla birlikte, MSAP yöntemi çevresel stres faktörlerinin metilasyon düzeyinde oluşturduğu değişimleri belirlemede de oldukça etkilidir. Biyolojik popülasyonlar içinde veya farklı popülasyonlar arasında epigenetik varyasyonları etkili bir biçimde ortaya koyabilen bu teknik, genetik çeşitlilik çalışmalarına epigenetik düzeyde önemli katkılar sağlamaktadır. Aynı zamanda organizmaların çevresel koşullara karşı geliştirdiği adaptif epigenetik yanıtların anlaşılmasında da güçlü bir araç olarak değerlendirilmektedir (Hyun-jun Park ve diğerleri, 2025).

MSAP'ın organ spesifik epigenetik düzenlemeleri ortaya koymadaki gücü, Bulut ve diğerleri, (2020) tarafından yapılan bir çalışmada da gösterilmiştir. Söz konusu çalışmada, altı farklı haşhaş çeşidi arasında 21 MSAP markörü kullanılarak DNA metilsyon seviyeleri karşılaştırılmış; farklı benzoizokinolin alkoloit (BIA) içeriğine sahip afyon haşhaş çeşitleri arasında farklı metilasyon durumlarını yansıtılmıştır. Ayrıca örnekler arasında organa özgü metilasyon profillerinin farklılık gösterdiği belirlenmiş ve bu durumun BIA biyosentezi ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Böylece MSAP yalnızca genotipler arası değil, aynı zamanda dokuya özgü epigenetik farklılıkların belirlenmesinde de etkili bir teknik olduğunu kanıtlamıştır.

Tüm bu çalışmalar, MSAP yönteminin farklı organizmalarda, doku tiplerinde ve fizyolojik özelliklerdeki örneklerde DNA metilasyonuna bağlı epigenetik farklılıkları başarıyla ortaya

koyabildiğini göstermektedir. Ancak literatürde, MSAP yöntemi kullanılarak SH-SY5Y hücre hattında $A\beta_{1-42}$ peptidi ile indüklenen AH modeli oluşturularak epigenetik düzeyde bir analiz gerçekleştirildiğine dair herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. MSAP tekniğinin sahip olduğu avantajlar, bu yöntemin nöroepigenetik araştırmalarda kullanım potansiyelini güçlendirmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Yöntem

3.1.1. Manyetik nanopartiküllerin hazırlanması ve kaplanma işlemleri

Çalışmada kullanılan liyofilize ekzopolisakkaritler (L-EPS'ler), Prof. Dr. Belma ASLIM'ın yürüttüğü çeşitli projeler kapsamında elde edilen *Lactiplantibacillus plantarum* probiyotik bakterisi B3 suşundan izole edilmiş ve karakterize edilmiştir (Çelik ve diğerleri, 2008). Yine Prof. Dr. Belma ASLIM'ın yürütücülüğünde 2025 yılında tamamlanmış olan başka bir proje (FPD-2023-9025) kapsamında da suşun yeni nesil sekans dizileme (NGS) ile tüm genom dizilemesi yapılmış ve Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) gen bankasında tüm genom dizisi JBMEAY000000000 erişim numarası ile mevcuttur.

Bu çalışmada kullanılan demir manyetik nanopartiküller (Fe_3O_4 MNP) ile EPS: karboksimetillenmiş kitosan (1:1) kaplı MNP'ler, Prof. Dr. Belma ASLIM'ın yürütücülüğünü yaptığı FBG-2022-7937 numaralı ve "Nöral Hasarı Onarıcı Ekzopolisakkarit (EPS) Kaplı Manyetik Nanopartiküllerden Geliştirilen Fonksiyonel Biyomalzemelerin Parkinson Hastalığındaki Etki Mekanizmasının Ortaya Konulması" başlıklı güdümlü proje kapsamında geliştirilen ve modifiye edilen protokollere göre sentezlenmiş olup, bu malzemeler Prof. Dr. Belma ASLIM'dan temin edilmiştir.

3.1.2. Alzheimer hastalığına yönelik hücre kültürü modeli ve manyetik nanopartikül tabanlı hücresel uygulamalar

Manyetik nanopartikül (MNP) uygulamaları, hem sağlıklı hücreler hem de Alzeimer hastalığı (AH) modeli oluşturulmuş hücreler üzerinde gerçekleştirilmiştir (Çizelge 1). Aβ uygulamasının farklı zaman dilimlerinde yapılması nedeniyle iki ayrı kontrol örneği hazırlanmıştır. Her bir örnek, üç ayrı biyolojik replikasyon temelinde oluşturulmuştur. SH-SY5Y hücre hattı (ATCC® CRL-2266™), AH hücre modelinin oluşturulmasında kullanılmıştır. Hücre kültürü için kullanılan ortam, %10 fetal bovine serum (FBS), %1,2 L-glutamin, %4 MCDB, 1% penisilin-streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Mediumda (DMEM) ile hazırlanmıştır. Hücreler 37°C sıcaklıkta ve %5 CO_2 içeren inkübatör (etüv) koşullarında kültüre edilmiş ve pasajlanmak üzere yeni kültür kaplarına

aktarılmıştır. Ayrıca %90 besi ortamı ve %10 DMSO içeren viallerde sıvı azot içerisine stok olarak alınarak saklanmıştır. Hücrelerin Thoma lamında sayımı yapılmış ve 96 kuyucuklu mikroplakalara $1x10^5$ hücre/kuyucuk yoğunluğunda ekilmiştir.

Amiloid beta ($A\beta_{1-42}$) 100 µM derişiminde deiyonize suda çözündürülmüştür. Hazırlanan stok solüsyon, uygulamadan hemen önce istenilen derişime seyreltilerek deneylerde kullanılmıştır (Sirin ve Aslim, 2020). SH-SY5Y hücreleri nihai konsantrasyonu 10 µM olan $A\beta 1_{42}$ ile 18 saat boyunca muamele edilmiştir.

Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmamış olup SH-SY5Y hücreleri sadece DMEM içeren standart besiyerinde kültüre edilmiştir. İkinci grup 200 µg/ml konsantrasyonunda uygulanan L-EPS örneklerinden oluşmaktadır. Üçüncü grup ise kaplanmamış çıplak MNP içermektedir. Dördüncü grupta 1:1 oranında EPS ve Kitosan ile kaplanmış MNP'ler kullanılmış olup bu grup 50 µg/mM konsantrasyonundadır. Beşinci grup, 10 µM konsantrasyonunda uygulanan $A\beta_{1-42}$ içermektedir. Geri kalan örnek grupları ise, $A\beta_{1-42}$ ile kombine edilen L-EPS (200 µg/uL), MNP (50 µg/mL), MNP/L-EPS ve kontrol örneklerinden oluşmaktadır. 10 µM konsantrasyonundaki $A\beta_{1-42}$ içeren ortama maruz bırakılan hücreler, MNP ile 18 saat süreyle işlem görerek deney gruplarını oluşturmuştur.

Çizelge 3.1. Örnek Setleri

Örnek Grupları	İçerikler
1. Kontrol 1	DMEM içerikli besiyerinde geliştirildi
2. Ekzopolisakkarit	B3 suşundan izole edilen ekzopolisakkarit (200 µg/ml)
3. Manyetik Nanopartikül	Çıplak manyetik nanopartikül (Kaplanmamış)
4. Manyetik Nanopartikül/EPS	EPS: Kitosan kaplı manyetik nanopartikül (1:1 oranı)
5. Amiloid ßeta 1	10 µM konsantrasyonda Aß
6. Kontrol 2	DMEM içerikli besiyerinde geliştirildi
7. Ekzopolisakkarit/Amiloid ßeta	(200 µg/ml) B3 bakterisinin ekzopolisakkariti ve 10 µM Aß
8. Manyetik Nanopartikül/Amiloid ßeta	Kaplanmamış manyetik nanopartikül ile 10 µM Aß uygulaması
9. Manyetik Nanopartikül/EPS/Amiloid ßeta	EPS: Kitosan kaplı manyetik nanopartikül ve 10 µM Aß uygulaması
10. Amiloid ßeta 2	10 µM konsantrasyonda Aß

3.1.3. Genomik DNA örnekleri ve DNA saflaştırma işlemi

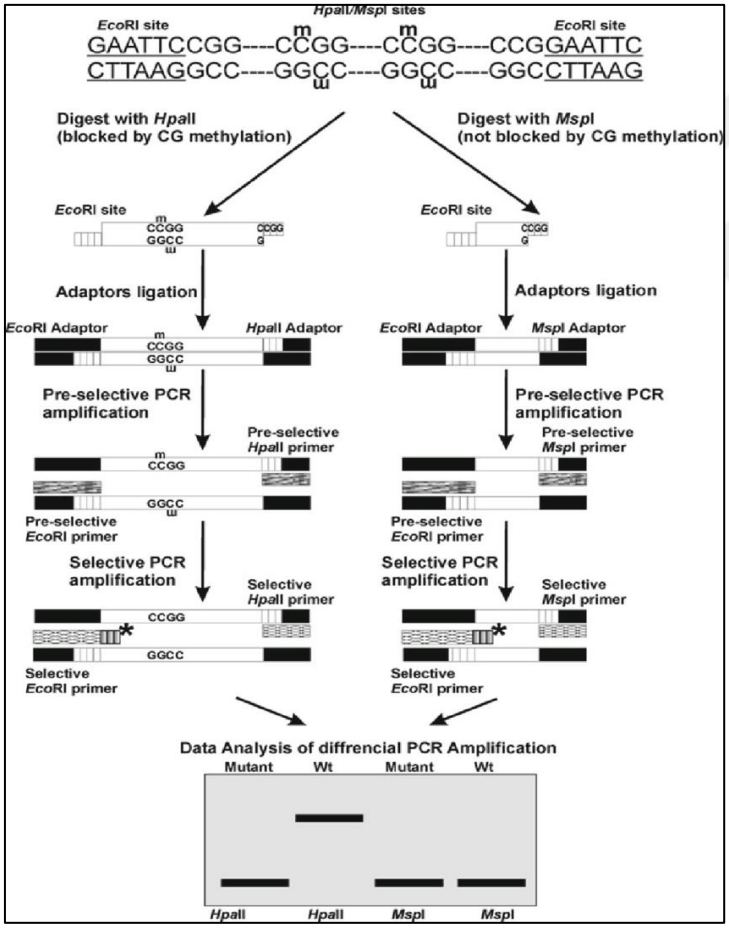
Çizelge 3.1'de belirtilen hücre örneklerinden toplam DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon işlemleri, A. B. T. DNA Purification Kit (Türkiye) ile üreticinin belirttiği protokole göre yapılmıştır. Uygulanan işlemler şu şekildedir:

İlk olarak steril kabinde AH hücre hattı örnekleri hücre kültür plağından soğuk Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline-PBS) içinde kazınıp toplanmış ve 1, 5 mL hacmindeki mikrosantrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra 2500 g'de ve +4 °C'de santrifüjlenmiştir. Ardından 20 µL Proteinaz K, 200 µL hücre numunesi ve 200 µL Liziz tamponu eklenmiş, karışım kısa süreli santrifüj ile homojenize edilmiştir. Liziz işlemini takiben tüpler 56 °C sıcaklıktaki sıcak su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından her örneğe 200 µL mutlak etanol ilave edilerek karıştırılmış ve mikrosantrifüjde santrifüj işlemi yapılmıştır. Bu karışım, DNA'nın bağlanmasını sağlamak için özel kolonlara aktarılmış ve 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiş ve tüplerde biriken sıvı kısım atılmıştır. Kolonlara sırasıyla 600 µl Yıkama Tamponu I ve ardından 700 µL yıkama Tamponu II ilave edilerek her aşamadan sonra 1000 rpm'de 1 dakika santrifüj işlemi uygulanmış, tüplerde biriken sıvı kısım atılmıştır. Yıkama adımlarının ardından kolonlar yeni steril mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiş ve DNA'nın kolondan ayrılması amacıyla her kolona 50 µl çözme tamponu eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyondan sonra, maksimum hızda 1 dakika santrifüjlenerek saf DNA elde edilmiştir. DNA örneklerinden olası RNA kontaminasyonunu uzaklaştırmak amacıyla RNase A (Biobasic, Kanada) uygulaması gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için her bir örneğe 3 µl Rnase A eklenmiş ve karışım 37 °C'de 1, 5 saat süreyle inkübe edilmiştir. DNA izolasyonunun ardından elde edilen DNA'ların bütünlüğünün ve kalitesinin değerlendirilmesi amacıyla %1 oranında agaroz jel elektroforezinde görüntüleme yapılmıştır. Bunun için 3 µl DNA örneklerinin üzerine 3 µl yükleme boyası (Thermo Scientific) eklenerek 120 V'luk sabit voltaj altında 30 dakika boyunca agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez sonunda, DNA bantlarının varlığı ve bütünlüğü UV transillüminatör (BIO-RAD) cihazında görüntülenmiştir. İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık oranlarını gösteren A260/A280 değerlerini belirlemek amacıyla her bir örneğe ait DNA spektrofotometrik olarak mikroplaka okuyucuda (Epoch, Biotek, ABD) ölçülmüştür. Elde edilen DNA örnekleri, deneylerin ilerleyen aşamalarına kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2. Metilasyona Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizmi (MSAP) Analizi

MSAP analizi, Reyna-Lopez ve diğerleri, (1997) geliştirdiği protokol temel alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem, DNA metilasyon durumunu belirlemek amacıyla, metilasyona duyarlı kesim enzimlerinin kullanılması esasına dayanmaktadır. Protokol

kapsamında ilk olarak DNA örnekleri hem metilasyona duyarlı olan *HpaII* enzimi hem de bunun izoşizomeri olup metilasyona karşı duyarsız olan *MspI* enzimi ile ayrı ayrı kesilir, elde edilen DNA parçalarının uçlarına spesifik adaptörler ligasyon yöntemiyle bağlanır ve ardından DNA parçaları spesifik ön seçici primerler ile ön amplifikasyon PZR (pre-selektif PZR) aşamasına tabi tutulur. Bu aşamada elde edilen polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ürünleri, seçici nükleotid içeren primerler kullanılarak seçici PZR (selektif amplifikasyon) işlemine alınarak amplifiye edilen DNA bantları, jel elektroforezi ile analiz edilir. Bantların varlığı ya da yokluğuna göre metilasyon profiline ilişkin skorlama yapılır (Yaish ve diğerleri, 2013). MSAP tekniğinin temel aşamalarına ilişkin şematik gösterim Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. MSAP tekniğinin şematik gösterimi (Yaish ve diğerleri, 2014)

3.2.1. Restriksiyon enzimleri ile kesim

MSAP analizinin gerçekleştirilmesi amacıyla, daha önce izolasyonu yapılan sağlıklı ve AH hücre hattı DNA örnekleri, birbirinin izoşizomeri olan *MspI* ve *HpaII* restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir.

MSPI ve *HPAII* enzimleri ile kesim işlemi ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. İlk enzim kesimi için DNA örneğinden 5 µL DNA alınarak, 5U *EcoRI* (Thermo Scientific), 10U *MSP1* (Thermo Scientific), 2X Tango Tamponu (Thermo Scientific) toplam hacim 25 µL olacak şekilde saf su (ddH20) eklenerek karışım hazırlanmış ve 37 °C'de 12 saat ve 80 °C'de 20 dakika boyunca inkübasyona tabi tutulmuştur. İkinci enzim kesimi için ise her bir DNA örneğinden 5 µL kullanılarak, 5 U *EcoRI* (Thermo Scientific), 20 U *HPAII* (Thermo Scientific), 2X Tango Tamponu (Thermo Scientific) karışımı saf su ile toplam hacim 25 µL'ye tamamlanmıştır. Bu tüpler de benzer şekilde 37 °C'de 12 saat ve 80 °C'de 20 dakika boyunca inkübasyona tabi tutulmuştur. Restriksiyon kesimi sonrası elde edilen DNA örneklerinden 5 µl alınıp üzerine 3 µl yükleme boyası (Thermo Scientific) eklenerek %1 oranında hazırlanmış agaroz jelde 120 V'luk sabit voltaj altında 30 dakika süreyle elektroforez işlemi uygulanmış ve bantlar UV transillüminatör (BIO-RAD) ile görüntülenmiştir.

3.2.2. Adaptör bağlanması (Ligasyon)

MSAP analizinde, restriksiyon enzimleriyle kesilen DNA fragmanlarının uçlarına, uygun adaptör dizileri bağlanarak DNA amplifikasyonu sağlanmıştır. Bu aşamada, hem metilasyona duyarlı bir *HpaII* hem de metilasyona duyarsız izoşizomeri olan *MspI* ile kesilmiş uçlarla uyumlu adaptör bölgeleri kullanılmıştır. Bu amaçla 60 U *HpaII* (Thermo Scientific) linker, 60 U EcoRI (Thermo Scientific) linker, 200 U T4 DNA Ligaz (Biobasic), 5 U T4 Ligaz Tamponu, 10 µL restriksiyon karışımı ve 4,65 µL su (ddH20) tüpte toplam 25 µL olacak şekilde bir araya getirilmiştir. Ligasyon reaksiyonu, adaptörlerin DNA uçlarına bağlanabilmesi amacıyla 23 °C'de 4 saat ve 60 °C'de 10 dakika inkübasyona tabi tutulduktan sonra PZR işlemlerinde kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Adaptör dizileri, ilgili aşamada Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Adaptör dizileri

Adaptörler	Baz Dizisi 5' – 3'
EcoRI adapter 5	5'CTCGTAGACTGCGTACC 3'
EcoRI adapter 3	5'AATTGGTACGCAGTCTAC 3'
HpaII/MspI adapter 5	5'GATCATGAGTCCTGCT 3'
HpaII/MspI adapter 3	5'CGAGCAGGACTCATGA 3'

3.2.4. Ön seçim polimeraz zincir (PZR) reaksiyonu

Ön seçim polimeraz zincir (PZR) reaksiyonunu gerçekleştirmek amacıyla 1/10 sulandırılması yapılmış ligasyon ürünlerinden 5 µL, 10X PCR Tamponu (Invitrogen), 50 mM Mg (Invitrogen), 10 mM dNTP (Thermo Scientific), 5 U *Taq* DNA (İnvitrogen), 10 pmol linker *EcoR1*, 10 pmol linker *HPAII*, 9,3 µL su (ddH2O) eklenerek toplamda 20 µL hacim olacak şekilde karışım tüpe alınmıştır. PZR protokolü 94°C'de 1 dakika denatürasyon aşaması, 94°C'de 30 saniye, 51°C'de 30 saniye, 72°C'de 1 dakika 30 döngü boyunca, 72°C'de 10 dakika olarak ayarlanmıştır. Ön seçim PZR reaksiyonunun doğrulanması amacıyla her örnekten 5 µL alınarak %1'lik agaroz jel elektroforezi yapılmış ve bant profilleri görüntülenmiştir. Ön seçim PZR aşamasında kullanılan primer dizileri Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Primer dizileri

Primerler	Baz Dizisi 5' – 3'
HM + 1 primer	ATCATGAGTCCTGCTCGGT
EcoR1 +1 primer	GACTGCGTACCAATTCA

3.2.5. Seçim polimeraz zincir (PZR) reaksiyonu

Seçim polimeraz zincir (PZR) reaksiyonunu gerçekleştirmek amacıyla ligasyon ürünü olan 1/10 sulandırılması yapılmış DNA örneklerinden 5 µL, 10X PCR Tamponu (Invitrogen), 50 mM Mg (Invitrogen), 10 mM dNTP (Thermo Scientific), 5 U Taq DNA (Invitrogen), 10 pmol ileri primer, 10 pmol geri primer, 9,3 µL ddH2O eklenerek toplamda 20 µL hacim olacak şekilde karışım tüp içinde hazırlanmıştır. Kullanılan primer dizileri Çizelge 3.3'de verilmiştir.

PZR işlemi 94°C'de 5 dakika, 94°C'de 30 saniye, 65°C'de 1 dakika (her döngüde sıcaklık 0,7 °C düşürülerek), 72°C'de 1 dakika 12 döngü, sonrasında 94°C'de 30 saniye, 56°C'de 1 dakika, 72 °C'de 1 dakika 23 döngü, son olarak 72°C'de 5 dakika olacak şekilde tamamlanmıştır. PZR ürünleri jel görüntüleme aşamasına kadar -20 °C'de saklanmıştır. Primer dizileri ve primer kombinasyonları Çizelge 3.3 - 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Primer dizileri

Primerler	Baz Dizisi 5’ – 3’
HM + 3 c	ATCATGAGTCCTGCTCGGTTC
HM + 3 a	ATCATGAGTCCTGCTCGGTAA
H + 3 e	ATCATGAGTCCTGCTCGGGTGG
H + 3 d	ATCATGAGTCCTGCTCGGTAG
E_e	GACTGCGTACCAATTCACG
E_d	GACTGCGTACCAATTCAAC

Çizelge 3.4. Primer kombinasyonları

Primer Kombinasyonları
Ee - Ha
Ee - Hc
Ee - Hd
Ee - He
Ed - Ha
Ed - Hc
Ed - Hd
Ee - He

3.2.6. Poliakrilamid jel görüntülemesi

DNA fragmanlarının ayrıştırılması ve görselleştirilmesi amacıyla %6’lık poliakrilamid jel hazırlanmıştır. Jel çözeltisi 2,5 ml %40 (19:1) Acrylamide/Bisacrylamide Solution (BIO-RAD), %0,1 APS (Amonyum persülfat), 0,01X TEMED, 1X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) yürütme tamponu kullanılarak hazırlanmıştır. Jel dökümü sonrasında her iki cam plaka arasına 1 mm’lik tarak yerleştirilmiş ve jelin polimerize olması için yaklaşık 40 dakika beklenmiştir. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra cam plakalar jel yürütme aparatına yerleştirilip sabitlenmiştir. Ardından elektroforez tankına yerleştirilmiş ve yürütme tamponu olarak 1X TBE (Tris- Borik Asit-EDTA) tankın içine ilave edilmiştir. İşlem sonrasında taraklar dikkatlice çıkarılmıştır.

20 µL hacmindeki PZR reaksiyonu ürünlerinin üzerine 3 µL yükleme boyası (Thermo Scientific) ilave edilmiştir. Hazırlanan örnekler %6 oranındaki poliakrilamid jele yüklenmiş ve elektroforez işlemi 90 V’luk sabit voltaj altında 1 saat boyunca yürütülmüştür. Görselleştirme için jel etidyum bromür (10 mg/mL) (Sigma-Aldrich) ile 15 dakika ve distile su ile 10 dakika süresince boyanmış ve görüntüler UV transillüminatör (BIO-RAD) aracılığıyla kaydedilmiştir.

3.2.7. Skorlama

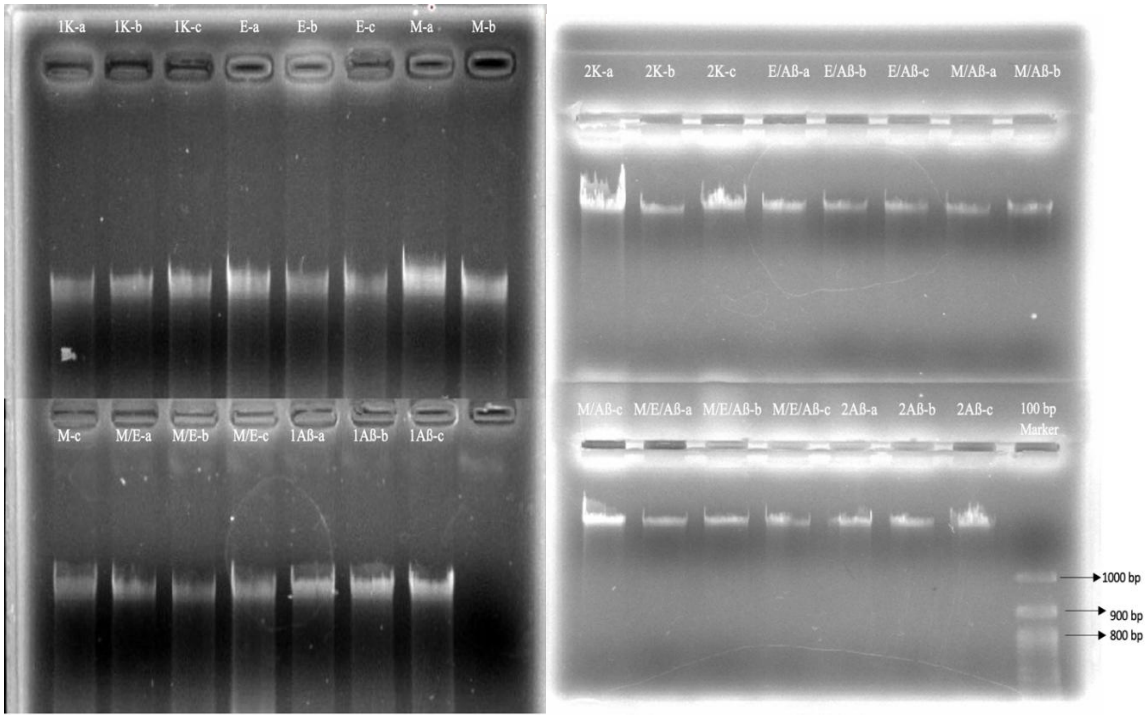
Epigenetik çalışmalar kapsamında MSAP analizi ile elde edilen *EcoRI/MspI* ve *EcoRI/HpaII* metilasyon profilleri verileri, istatistiksel analizler ile epigenetik çeşitlilik veya farklılaşma gibi tanımlayıcı göstergelerin hesaplanabilmesi amacıyla ikili bir veri matrisi haline getirilmelidir. Bu sebeple elde edilen bantların puanlama yöntemine göre analizinde metillenmiş kısımlar 1 olarak puanlanırken metillenmemiş kısımlar 0 olarak puanlanmıştır.

Elde edilen veriler *Msap R* programı (Herrera ve Bazaga, 2010) ile analiz edilmiştir. Programda her bir lokusun tüm örneklerdeki metillenme oranı, kullanıcı tarafından tanımlı hata eşiği (ERT: varsayılan değeri %5) dikkate alınarak değerlendirilir ve bunu aşıp aşmadığına bağlı olarak metilasyona duyarlı lokus (MSL) veya metillenmemiş lokus olarak kategorize edilir. Eşik değerini aşan lokuslar MSL olarak, eşik değerinin altında kalan lokuslar ise NML olarak tanımlanmaktadır. MSL lokusları epigenetik varyasyonu belirtirken, NML lokusları ise genetik varyasyonu temsil etmektedir (Pérez-Figueroa, ve diğerleri, 2013). Ayrıca metilasyon verilerini görselleştirmek amacıyla Principle Component Analysis (PcoA) grafiği oluşturulmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. DNA İzolasyonu Sonuçları

Üçer biyolojik replikasyon halinde hazırlanan DNA örneklerinin kalitatif değerlendirilmesi agaroz jel elektroforezi yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. İzole edilen DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi. K: Kontrol, E: Ekzopolisakkarit, M: Manyetik Nanopartikül, M/E: Manyetik Nanopartikül/Ekzopolisakkarit, Aβ: Amiloid βeta, E/Aβ: Ekzopolisakkarit/Amiloid βeta, M/Aβ: Manyetik Nanopartikül/Amiloid βeta, M/E/Aβ: Manyetik Nanopartikül/Ekzopolisakkarit/Amiloid βeta

Üçer biyolojik replikasyon halinde hazırlanan DNA örneklerinin konsanstrasyonları ise mikroplaka okuyucu (Epoch, BioTek, ABD) kullanılarak spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. Örneklerin saflık ve konsantrasyon düzeyleri 260/280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri (A260/A280) dikkate alınarak belirlenmiştir. Jel elektroforezinde örneklerin moleküler ağırlıklarının karşılaştırılabilmesi amacıyla 100 bp DNA ladder (EcoTech Biotechnology) kullanılmıştır. Elde edilen bulgular Çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık ölçümleri

Örnekler	260/280	ng/uL
1.Kontrol a	2,05	113
1.Kontrol b	2,03	121
1.Kontrol c	2,02	118
EPS a	2,05	123
EPS b	2,14	89
EPS c	2,07	126
MNP a	2,04	111
MNP b	2,07	141
MNP c	2,07	145
MNP/EPS a	2,04	76
MNP/EPS b	2,06	85
MNP/EPS c	2,03	236
1. Aß a	2,03	104
1. Aß b	2,02	107
1. Aß c	1,93	111
2.Kontrol a	2,00	332
2.Kontrol b	2,02	122
2.Kontrol c	1,99	315
EPS/Aβ a	1,97	84
EPS/Aβ b	2,00	165
EPS/Aβ c	1,91	100
MNP/Aβ a	1,93	118
MNP/Aβ b	1,93	119
MNP/Aβ c	1,93	170
MNP/ EPS /Aβ a	1,99	67
MNP /EPS /Aβ b	1,92	229
MNP /EPS /Aβ c	1,96	105
2.Aβ a	1,88	79
2.Aβ b	1,86	54
2.Aβ c	1,90	124

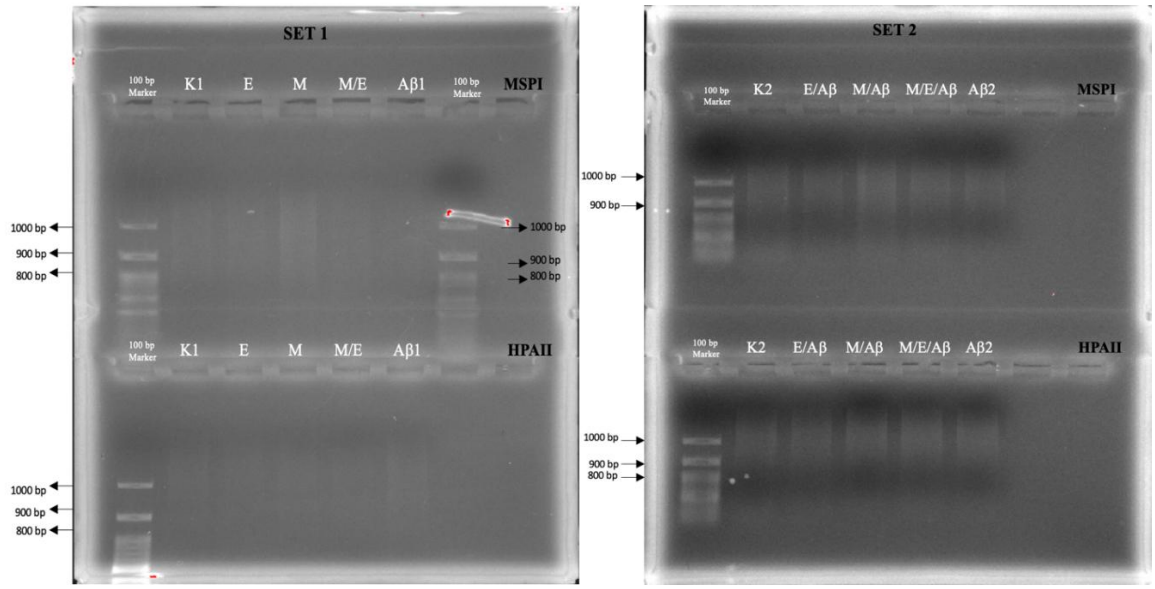
Her bir replikasyondan eşit miktarda örnek alınarak nihai 120 ng/uL olacak şekilde birleştirme yapılmış ve toplamda 10 adet nihai DNA örneği ile MSAP analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.2. MSAP Yöntemi Sonuçları

MSAP yöntemi, DNA metilasyonundaki varyasyonları analiz etmek amacıyla yaygın olarak kullanılan, pratik ve güvenilir tekniklerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde, metilasyon duyarlılıkları farklı olan ve birbirinin izoşizomeri niteliğindeki restriksiyon enzimleri *MspI* ve *HpaII* kullanılarak, sağlıklı ve AH hücre hattına ait DNA örneklerinin sindirimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2).

4.2.1. Restriksiyon enzimleriyle kesim sonuçları

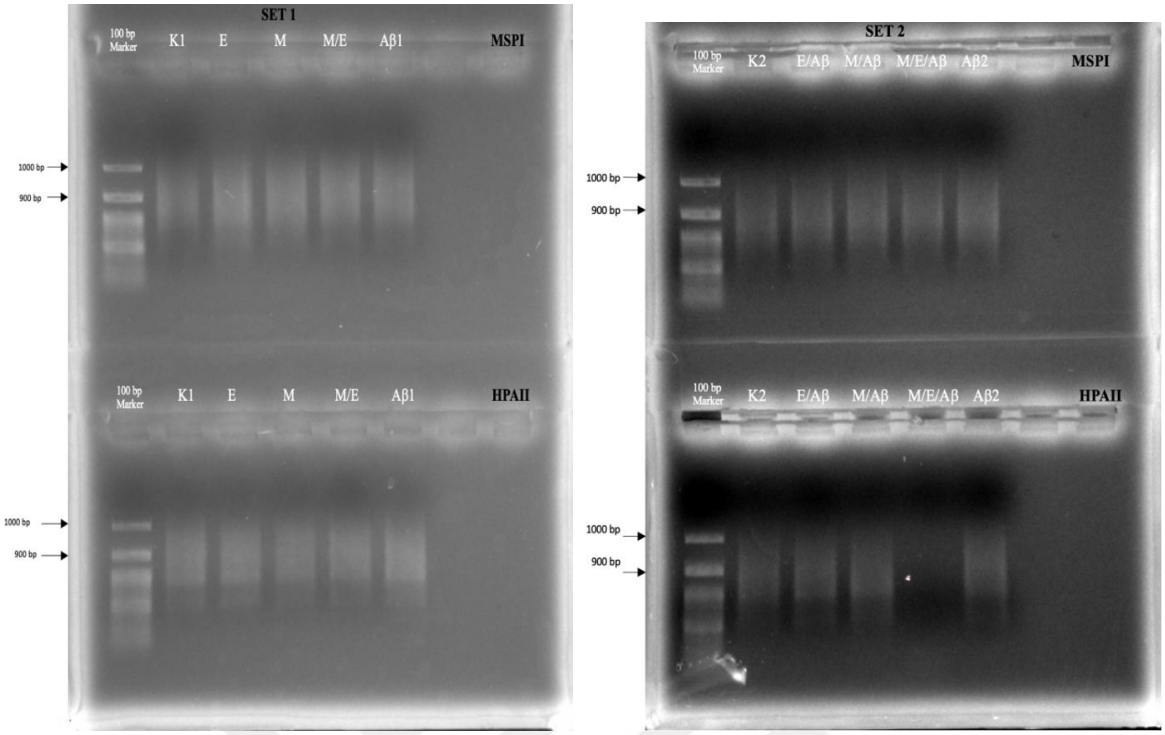
Hem *MSPI* hem de *HPAII* restiksiyon enzimleri ile ayrı ayrı kesimler gerçekleştirilmiştir. Doğru bir kesim gerçekleşmesi sonucu jelde sürüntü görüntüsü oluşması beklenir. Çalışmada tüm örnekler için beklenen bu görüntü edilmiş ve kesim işleminin başarıyla gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. DNA örneklerinin restriksiyon enzimleriyle sindirimi sonrası jel elektroforezi ile görüntülemesi. *MSPI* ve *HPAII* enzimleri ile kesilen örnekler ayrı ayrı analiz edilmiş ve örneklerin hangi enzim ile kesildiği jel resimleri üzerinde belirtilmiştir. Set1 Aβ uygulaması yapılmamış, Set2 ise Aβ uygulaması yapılmış örnek grubunu temsilen yazılmıştır**.**

4.2.2. Ön-seçilim PZR sonuçları

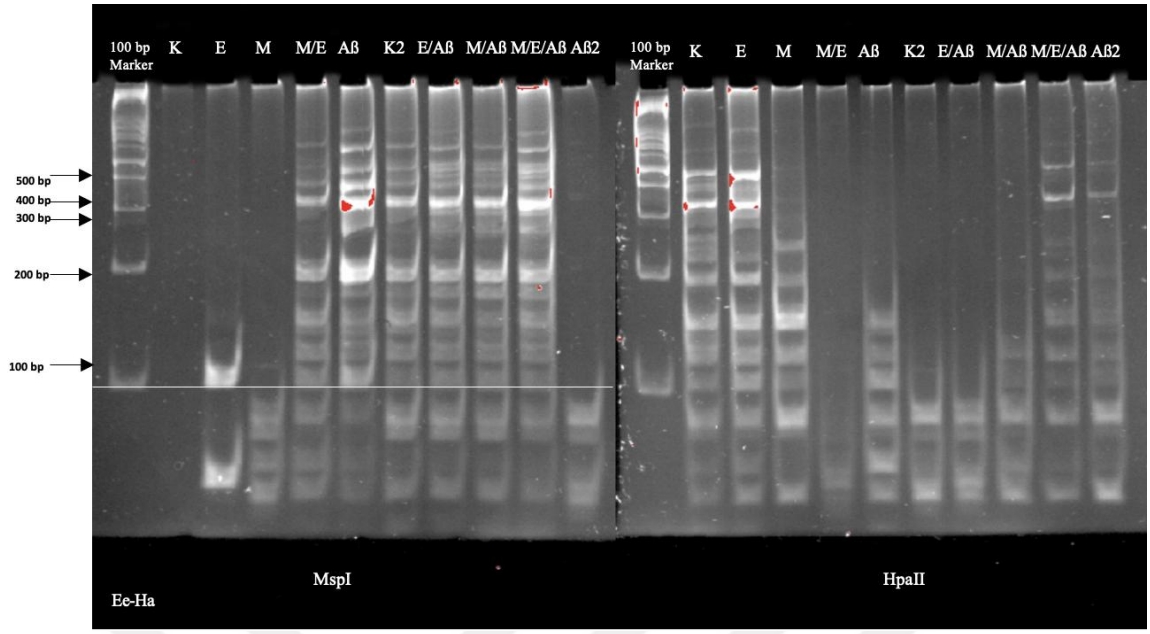
Yapışkan uçlara sahip DNA uçlarına, uygun adaptörler eklenerek ligasyon gerçekleştirilmiştir. Sonraki aşamada, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) işlemi ön-seçilim primerleriyle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi yöntemiyle görüntülenmiştir (Şekil 4.3). Tüm örneklerde beklenen sürüntü görüntüsü elde edilmiştir.



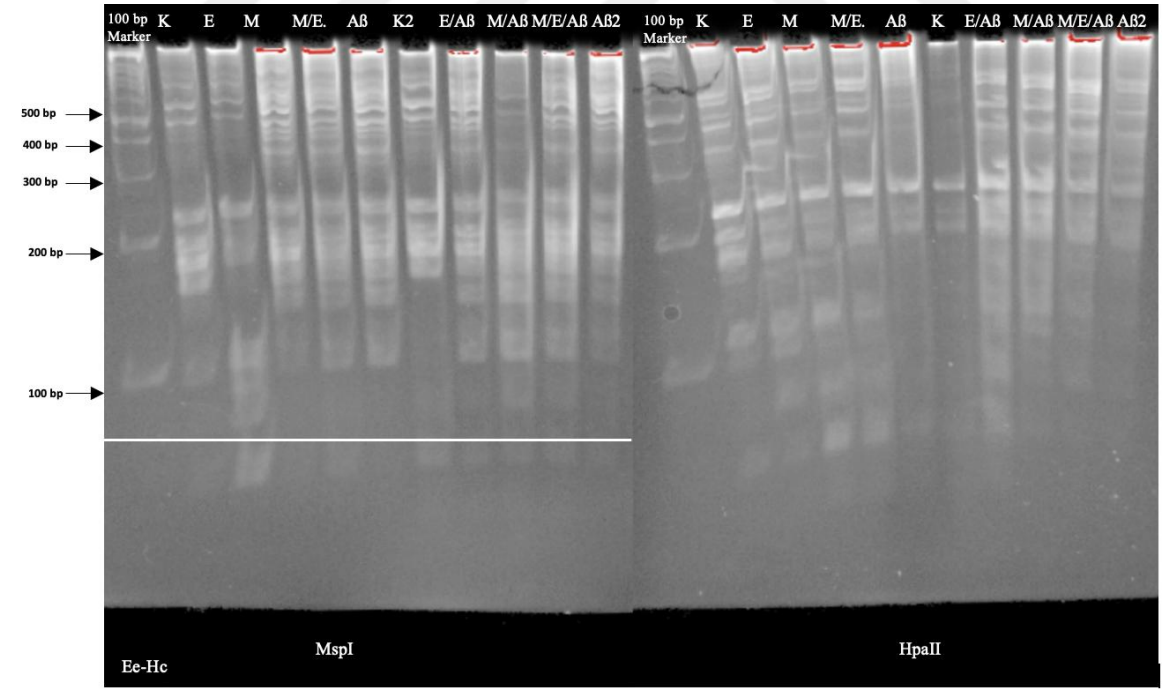
Şekil 4.3. DNA örneklerinin ön seçilim PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile görüntülemesi. *MSPI* ve *HPAII* enzimleri ile kesilen örnekler ayrı ayrı analiz edilmiş ve örneklerin hangi enzim ile kesildiği jel resimleri üzerinde belirtilmiştir. Set1 Aβ uygulaması yapılmamış, Set2 ise Aβ uygulaması yapılmış örnek grubunu temsilen yazılmıştır**.**

4.2.3. Seçilim PZR sonuçları

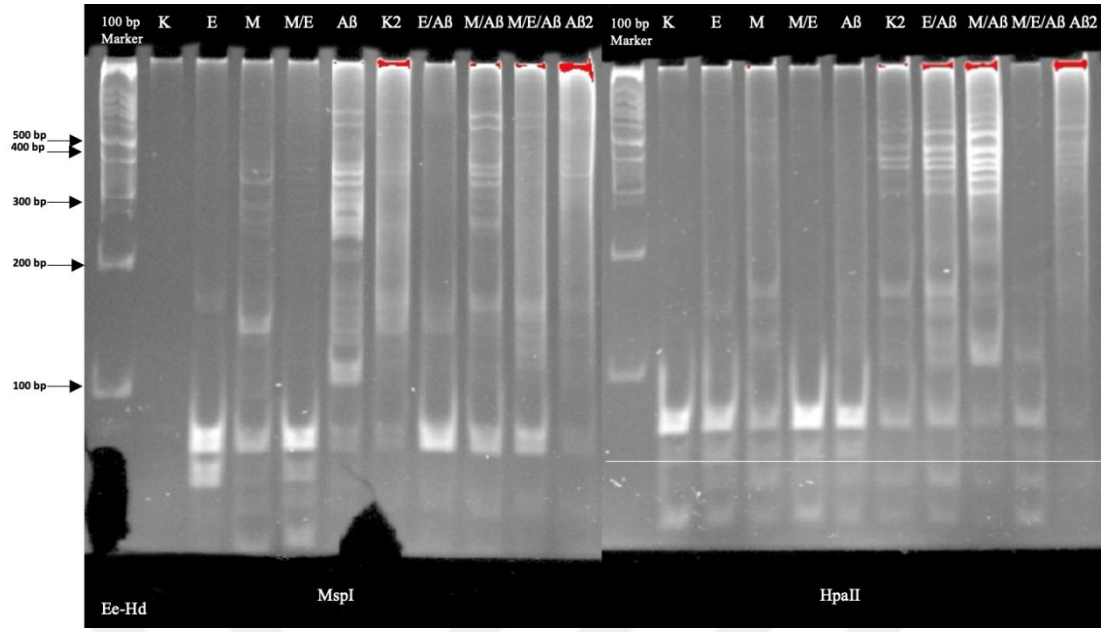
Bu çalışmada, sekiz farklı primer kombinasyonu kullanılarak seçim PZR analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri, poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılmış ve etidyum bromür ile boyaranak görüntülenmiştir. Görüntüleme işlemi, UV transillüminatör (BIO-RAD) ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.4 - 4.11 arasında yer alan görsellerde, elde edilen jel görüntüleri sunulmakta olup, bu jellerde gözlemlenen bazı polimorfik bantlar temsili olarak beyaz çizgilerle işaretlenmiştir. Her bir jel görüntüsünün altında kullanılan primer kombinasyonu yazılmıştır. *MSPI* ve *HPAII* enzimleri ile kesilen örnekler ayrı ayrı analiz edilmiş ve örneklerin hangi enzim ile kesildiği jel resimleri üzerinde belirtilmiştir.



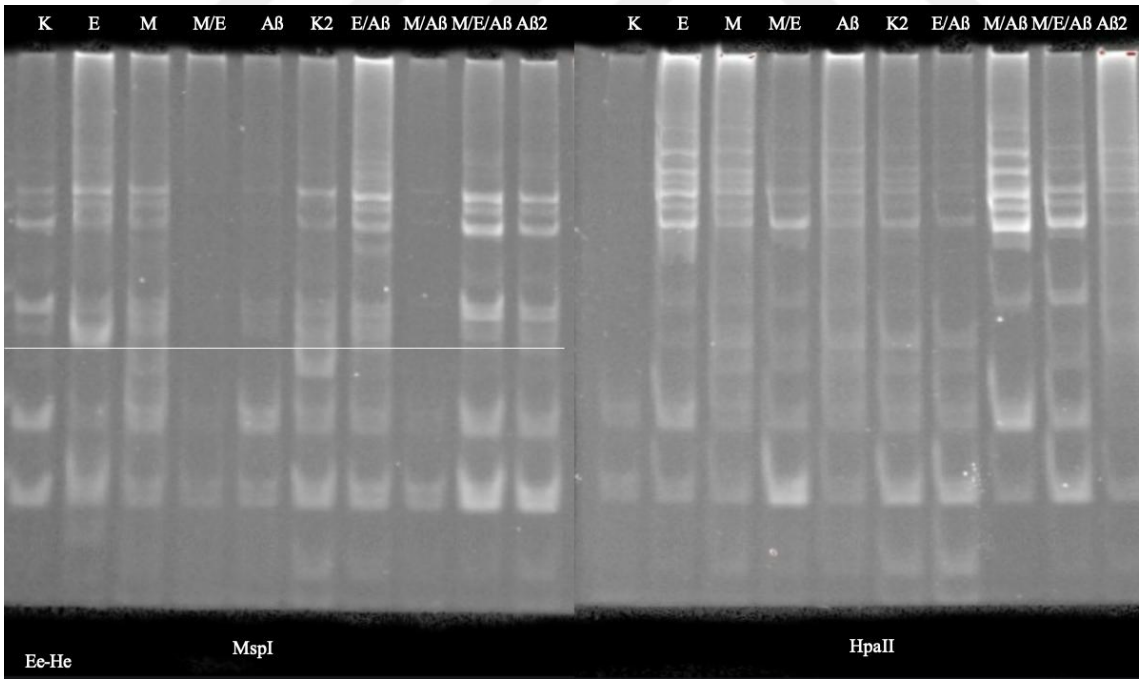
Şekil 4.4. Ee-Ha primerlerinin jel görüntüsü. *MSPI* ve *HPAII* enzimleri ile kesilen örnekler ayrı ayrı analiz edilmiş ve örneklerin hangi enzim ile kesildiği jel resimleri üzerinde belirtilmiştir. Set1 Aβ uygulaması yapılmamış, Set2 ise Aβ uygulaması yapılmış örnek grubunu temsilen yazılmıştır**.**



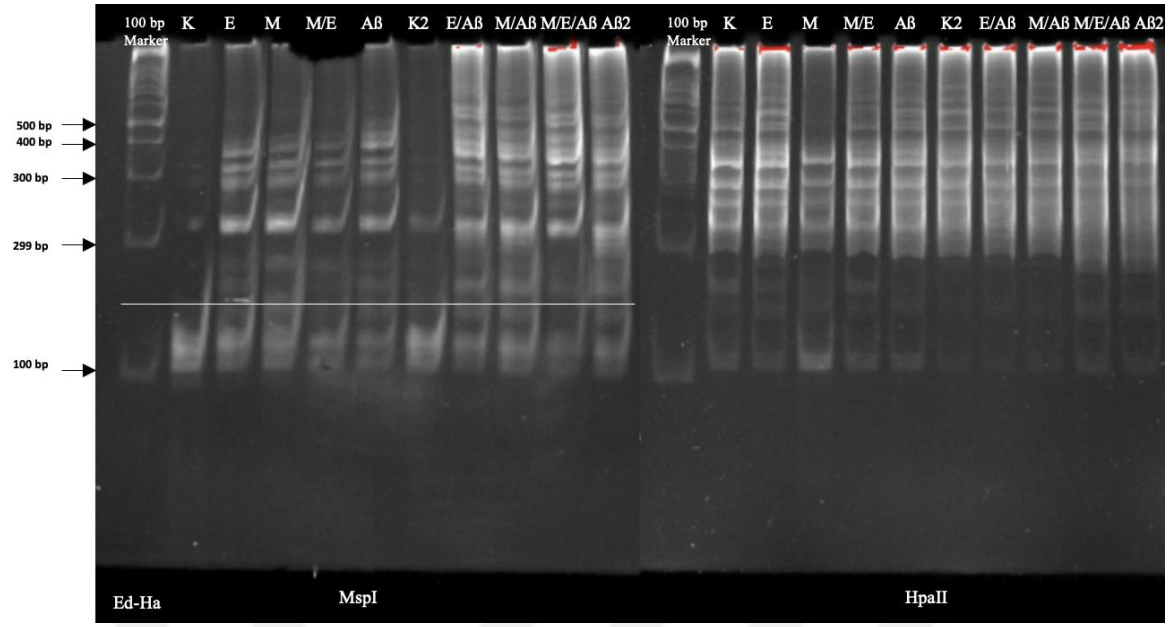
Şekil 4.5. Ee-Hc primerlerinin jel görüntüsü. *MSPI* ve *HPAII* enzimleri ile kesilen örnekler ayrı ayrı analiz edilmiş ve örneklerin hangi enzim ile kesildiği jel resimleri üzerinde belirtilmiştir. Set1 Aβ uygulaması yapılmamış, Set2 ise Aβ uygulaması yapılmış örnek grubunu temsilen yazılmıştır**.**



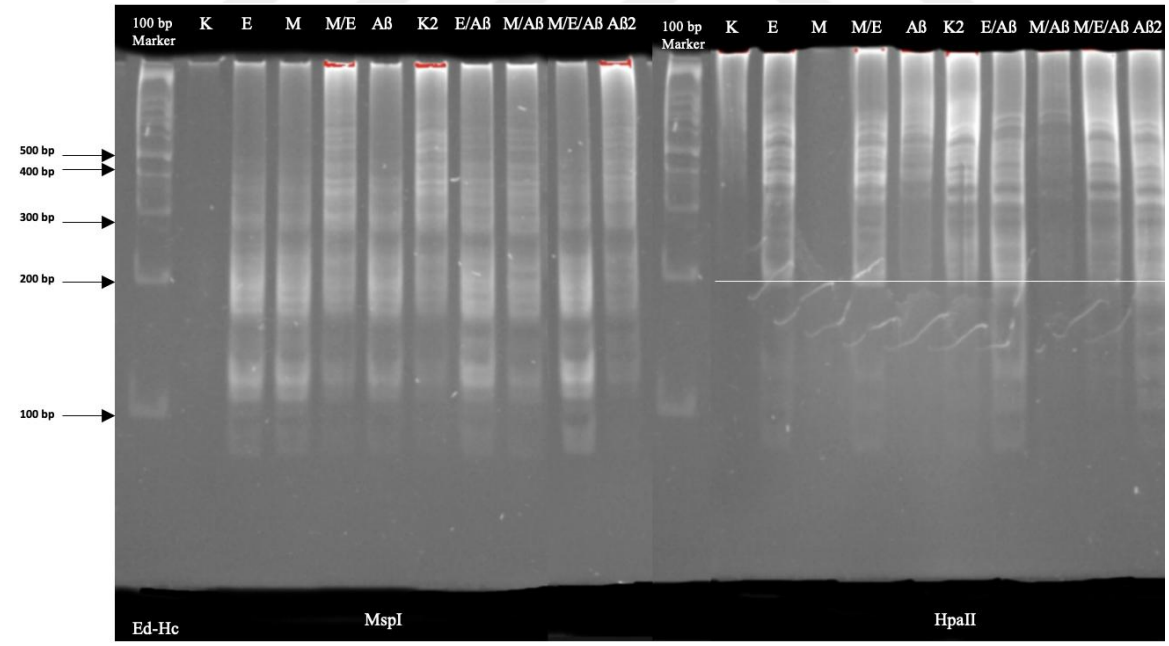
Şekil 4.6. Ee-Hd primerlerinin jel görüntüsü. *MSPI* ve *HPAII* enzimleri ile kesilen örnekler ayrı ayrı analiz edilmiş ve örneklerin hangi enzim ile kesildiği jel resimleri üzerinde belirtilmiştir. Set1 Aβ uygulaması yapılmamış, Set2 ise Aβ uygulaması yapılmış örnek grubunu temsilen yazılmıştır**.**



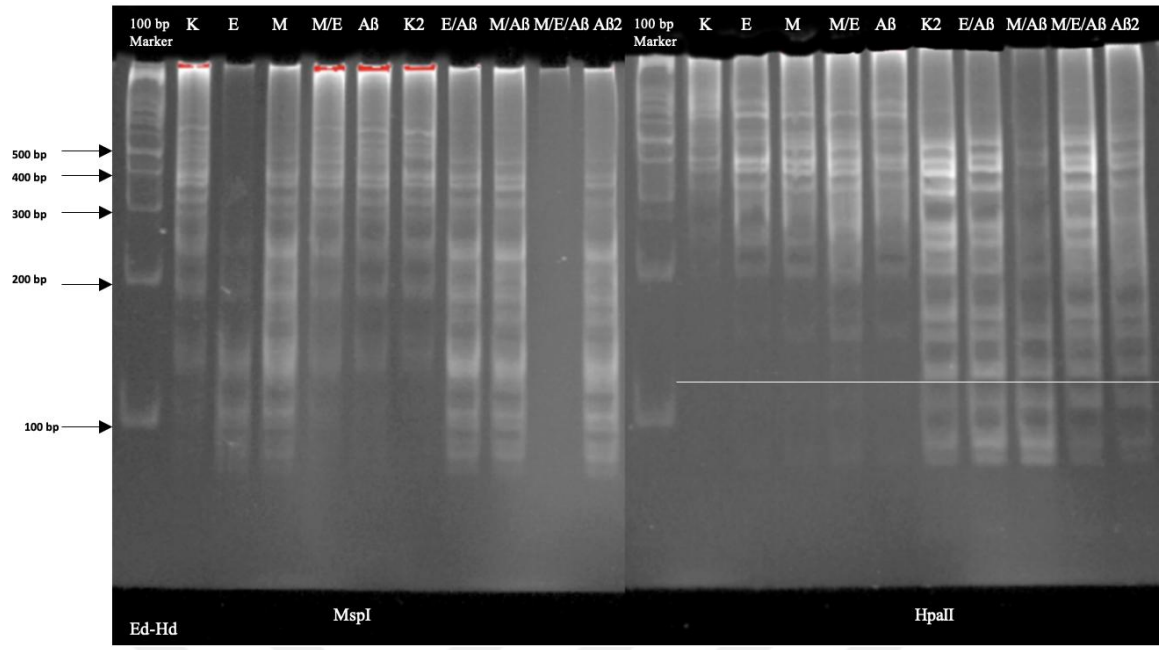
Şekil 4.7. Ee-He primerlerinin jel görüntüsü. *MSPI* ve *HPAII* enzimleri ile kesilen örnekler ayrı ayrı analiz edilmiş ve örneklerin hangi enzim ile kesildiği jel resimleri üzerinde belirtilmiştir. Set1 Aβ uygulaması yapılmamış, Set2 ise Aβ uygulaması yapılmış örnek grubunu temsilen yazılmıştır**.**



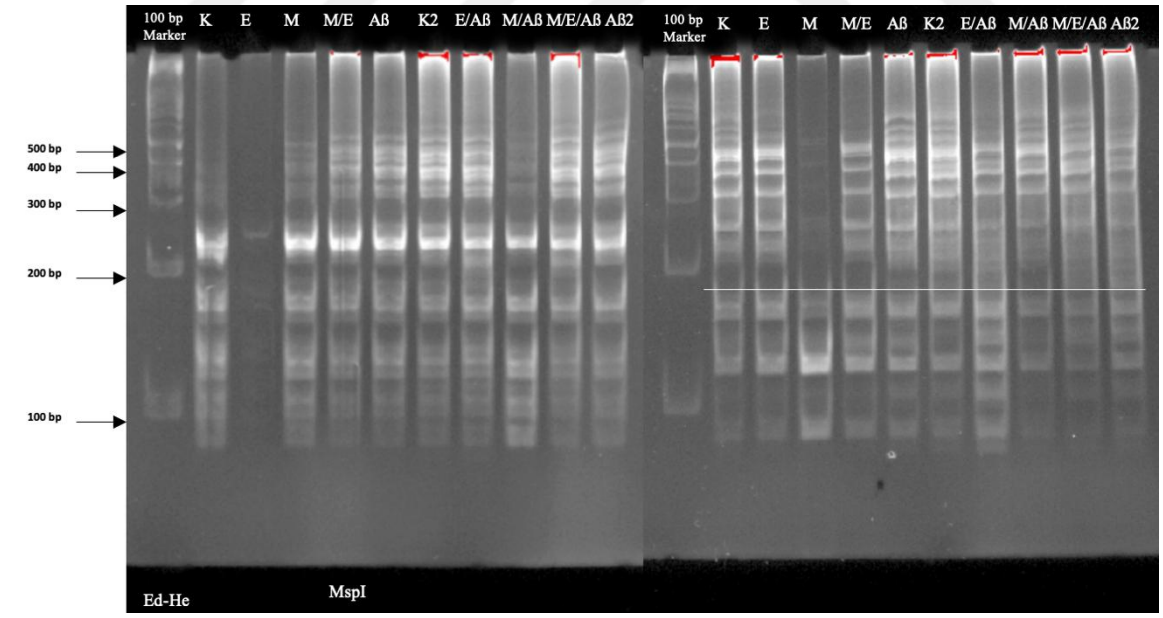
Şekil 4.8. Ed-Ha primerlerinin jel görüntüsü. *MSPI* ve *HPAII* enzimleri ile kesilen örnekler ayrı ayrı analiz edilmiş ve örneklerin hangi enzim ile kesildiği jel resimleri üzerinde belirtilmiştir. Set1 Aβ uygulaması yapılmamış, Set2 ise Aβ uygulaması yapılmış örnek grubunu temsilen yazılmıştır**.**



Şekil 4.9. Ed-Hc primerlerinin jel görüntüsü. *MSPI* ve *HPAII* enzimleri ile kesilen örnekler ayrı ayrı analiz edilmiş ve örneklerin hangi enzim ile kesildiği jel resimleri üzerinde belirtilmiştir. Set1 Aβ uygulaması yapılmamış, Set2 ise Aβ uygulaması yapılmış örnek grubunu temsilen yazılmıştır**.**



Şekil 4.10. Ed-Hd primerlerinin jel görüntüsü. *MSPI* ve *HPAII* enzimleri ile kesilen örnekler ayrı ayrı analiz edilmiş ve örneklerin hangi enzim ile kesildiği jel resimleri üzerinde belirtilmiştir. Set1 Aβ uygulaması yapılmamış, Set2 ise Aβ uygulaması yapılmış örnek grubunu temsilen yazılmıştır.



Şekil 4.11. Ed-He primerlerinin jel görüntüsü. *MSPI* ve *HPAII* enzimleri ile kesilen örnekler ayrı ayrı analiz edilmiş ve örneklerin hangi enzim ile kesildiği jel resimleri üzerinde belirtilmiştir. Set1 Aβ uygulaması yapılmamış, Set2 ise Aβ uygulaması yapılmış örnek grubunu temsilen yazılmıştır.

4.2.4. Skorlama sonuçları

Jel verileri, bantların olup olmamasına bağlı olarak ikili (0/1) skorlamaya tabi tutulmuştur. Her bir PZR primer kombinasyonundan elde edilen skorlama verileri Çizelge 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10'da sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Ee-Ha skorlama sonuçları

		Ee-Ha														
MSPI	K1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	M+E	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
	Aβ	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
	K2	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
	E+Aβ	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
	M+Aβ	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
	M+E+Aβ	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
	K+Aβ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
HPAII	K1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	E	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
	M	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
	M+E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Aβ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
	K2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	E+Aβ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	M+Aβ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	M+E+Aβ	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
	K+Aβ	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0

Çizelge 4.3. Ee-Hc Skorlama sonuçları

		Ee-Hc						
MSPI	K1	1	0	1	0	1	0	1
	E	1	0	0	0	1	1	0
	M	1	1	1	1	1	0	0
	M+E	1	1	1	1	1	0	1
	Aβ	1	1	1	1	1	0	0
	K2	1	0	0	0	1	1	1
	E+Aβ	1	1	1	0	1	0	1
	M+Aβ	0	1	1	0	1	1	1

Çizelge 4.3. (devam) Ee-Hc Skorlama sonuçları

	M+E+Aβ	1	1	1	0	1	0	1
	K+Aβ	1	1	1	0	1	0	0
HPAI I	K1	1	1	1	0	1	0	1
	E	1	1	1	0	1	1	1
	M	1	1	1	0	1	1	1
	M+E	1	0	1	0	1	1	1
	Aβ	1	0	0	0	0	0	0
	K2	0	0	0	0	0	0	0
	E+Aβ	1	0	1	1	1	1	1
	M+Aβ	1	0	1	1	1	1	0
	M+E+AB	1	1	1	1	0	1	0
	K+AB	1	1	0	0	0	0	0

Çizelge 4.4. Ee-Hd skorlama sonuçları

		Ee-Hd										
MSPI	K1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	M	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
	M+E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Aβ	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0
	K2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	E+Aβ	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	M+Aβ	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
	M+E+Aβ	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	K+Aβ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HPAI I	K1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	M	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
	M+E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Aβ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	K2	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0
	E+Aβ	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0
	M+Aβ	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0
	M+E+Aβ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	K+Aβ	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.5. Ee-He primerlerinin skorlama sonuçları

		Ee-He										
MSP1	K1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
	E	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
	M	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0
	M+E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	AB	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0
	K2	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0
	E+AB	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	M+Aβ	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	M+E+Aβ	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0
	K+Aβ	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0

Çizelge 4.5. (devam) Ee-He primerlerinin skorlama sonuçları

HPAI I	K1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	E	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
	M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	M+E	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
	Aβ	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	K2	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
	E+Aβ	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0
	M+Aβ	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
	M+E+Aβ	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
	K+Aβ	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0

Çizelge 4.6. Ed-Ha skorlama sonuçları

		Ed-Ha								
MSPI	K1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	E	0	0	0	1	1	1	0	0	1
	M	0	0	0	1	1	1	0	1	1
	M+E	0	0	0	1	1	1	0	0	1
	Aβ	0	0	0	1	1	1	0	1	1
	K2	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	E+Aβ	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	M+Aβ	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	M+E+Aβ	0	1	1	1	1	0	0	0	1
	K+Aβ	0	1	1	1	1	1	1	1	0
HPAI I	K1	0	1	1	1	1	0	1	0	0
	E	1	1	1	1	1	0	1	1	0
	M	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	M+E	0	1	1	1	1	0	1	0	0
	Aβ	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	K2	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	E+Aβ	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	M+Aβ	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	M+E+Aβ	0	1	1	1	1	1	0	1	0
	K+Aβ	1	1	1	1	1	0	0	0	0

Çizelge 4.7. Ed-Hc Skorlama sonuçları

		Ed-Hc					
MSPI	K1	0	0	0	0	0	0
	E	0	0	1	1	1	1
	M	0	0	1	1	1	1
	M+E	1	1	1	1	1	1
	Aβ	0	0	1	1	1	1
	K2	1	1	1	1	1	1
	E+Aβ	0	1	1	1	1	1
	M+Aβ	0	1	1	1	1	1
	M+E+Aβ	0	0	1	1	1	1
	K+Aβ	0	1	1	1	1	0

Çizelge 4.7. (devam) Ed-Hc Skorlama sonuçları

HPAII	K1	0	0	0	0	0	0
	E	1	1	1	1	0	1
	M	0	0	0	0	0	0
	M+E	1	1	1	1	0	1
	Aβ	0	1	1	0	0	0
	K2	0	1	1	1	0	1
	E+Aβ	1	1	1	1	0	1
	M+Aβ	1	1	1	0	0	0
	M+E+Aβ	0	1	1	1	0	0
	K+Aβ	0	1	1	1	0	0

Çizelge 4.8. Ed-Hd skorlama sonuçları

		Ed-Hd										
MSPI	K1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
	E	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
	M	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	M+E	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
	Aβ	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
	K2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
	E+Aβ	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	M+Aβ	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	M+E+Aβ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	K+Aβ	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
HPAII	K1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
	E	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
	M	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
	M+E	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
	Aβ	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
	K2	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1
	E+Aβ	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1
	M+Aβ	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1
	M+E+Aβ	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1
	K+Aβ	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1

Çizelge 4.9. Ed-He skorlama sonuçları

		Ed-He						
MSPI	K1	0	0	0	1	1	0	0
	E	0	0	0	0	0	0	1
	M	0	1	1	1	1	0	1
	M+E	0	1	1	1	1	0	1
	Aβ	1	1	1	1	1	1	1
	K2	1	1	1	1	1	1	1
	E+Aβ	1	1	1	1	1	1	1
	M+Aβ	0	1	0	1	1	0	1
	M+E+Aβ	1	1	1	1	1	0	1
	K+Aβ	1	1	1	1	1	0	1

Çizelge 4.9. (devam) Ed-He skorlama sonuçları

HPAII	K1	1	1	1	1	1	0	0
	E	1	1	1	1	1	0	0
	M	0	0	0	0	1	0	0
	M+E	0	1	1	1	1	1	0
	Aβ	1	1	1	1	1	1	1
	K2	1	1	1	1	1	0	1
	E+Aβ	0	1	1	1	1	1	1
	M+Aβ	1	1	1	1	1	0	0
	M+E+Aβ	1	1	1	1	1	1	1
	K+Aβ	0	0	1	1	1	1	1

4.3. Biyoinformatik Analiz Sonuçları

DNA fragmanları MSAP tekniğiyle profillendikten sonra, örnekler arası epigenetik farklılıkların belirlemesi amacıyla *Msap R* paketiyle analiz edilmiştir. Sekiz farklı primer kombinasyonunun uygulanmasıyla, genel olarak 77 lokusta metilasyona duyarlı bölgeler (methylation susceptible loci: MSL) ve metillenmemiş bölgeler (non-methylated loci: NML) sayısı 0 olarak belirlenmiştir. Bu lokuslardan 55'i (%71) polimorfik MSL olarak tanımlanırken, NML değeri 0 olarak saptanmıştır. MSL, epigenetik değişimleri; NML ise genetik düzeydeki farklılıkları göstermektedir (Labella-Ortega ve diğerleri, 2024).

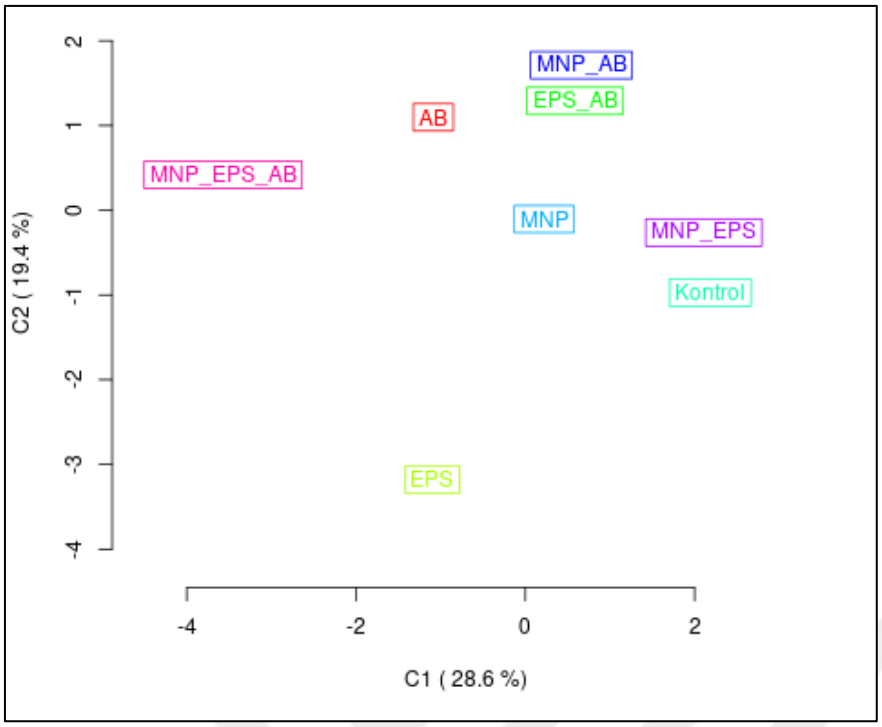
Metilasyon profillerine ilişkin örneklerin frekans dağılımları Çizelge 4.11'de sunulmuştur. Bu tabloya göre, en yüksek frekansa sahip fragmanlar metillenmemiş olanlardır. Bunu tam metillenmiş fragmanlar takip etmektedir. En yüksek metillenmemiş fragman frekansları sırasıyla EPS+Aβ (0,4026) ve MNP+EPS+Aβ (0,3636) gruplarında gözlemlenmiştir. Öte yandan, en yüksek hemimetillenmiş fragman frekansı EPS grubunda (0,4286) kaydedilmiştir. İç sitozin metilasyonu taşıyan ve hemimetilasyon özellikli fragmanlar, en düşük frekansa sahiptir.

Çizelge 4.10. Örneklerin metilasyon profillerine ait frekans değerleri

Metilas-yon durumları	K1	EPS	MNP	MNP_EPS	Aβ1	K2	EPS_Aβ	MNP_Aβ	MNP_EPS_Aβ	Aβ2
HPA+/MSP+ (Metillenmemiş)	0.169	0.234	0.286	0.286	0.338	0.286	0.403	0.351	0.364	0.312
HPA+/MSP- (Hemimetasyon)	0.325	0.429	0.169	0.169	0.130	0.195	0.130	0.208	0.221	0.169
HPA-/MSP+ (İç sitozin metilasyonu)	0.091	0.117	0.260	0.247	0.364	0.286	0.325	0.286	0.195	0.156
HPA-/MSP- (Tam metilasyon)	0.416	0.221	0.286	0.299	0.169	0.234	0.143	0.156	0.221	0.364

Epigenetik düzeyde örnekler arasındaki farklılaşmayı değerlendirebilmek amacıyla, DNA metilasyon profillerine dayalı olarak PCoA yöntemi uygulanmıştır. PCoA analizi sonucunda örneklerin dağılımı, birinci bileşen (C1, %28,6) ve ikinci bileşen (C2, %19,4) olmak üzere iki ana eksende açıklanmıştır (Şekil 4.12). Analiz sonuçlarına göre, örnekler iki temel eksen boyunca net şekilde gruplanmış ve özellikle $A\beta_{1-42}$ uygulanmış ve $A\beta_{1-42}$ uygulanmamış örnekler arasında belirgin bir ayrım gözlemlenmiştir. Bu farklılık, AH modeli oluşturabilmek amacıyla uygulanan $A\beta_{1-42}$'nın hücrelerde epigenetik yeniden programlama oluşturduğuna işaret etmektedir. Bu bağlamda, C2 bileşeni üzerindeki ayrım, $A\beta_{1-42}$ uygulamasının epigenetik belirleyiciliğini yansıtmaktadır. MNP uygulanan örnek grubu, özgün bir dağılım göstermesi, epigenetik yapıda değişiklik meydana getirebileceğini göstermektedir. Buna karşın EPS örneği, özellikle Aβ, MNP_ Aβ ve MNP_EPS_Aβ gibi $A\beta_{1-42}$ uygulanmış örneklerden uzak bir bölgede dağılım göstermiştir. PCoA'daki bu uzaklık, DNA metilasyon profilleri arasındaki farkı temsil etmektedir.

MNP-EPS örneğinin kontrol örneğine konum olarak yakın bir bölgede dağılım göstermesi dikkat çekicidir. Bu durum, probiyotik kökenli L-EPS kaplamasının, MNP'lerin epigenetik düzeyde oluşturabileceği potansiyel olumsuz etkileri baskılayarak, hücrenin metilasyon örüntüsünü koruyabileceğini göstermektedir. Bu bulgu, literatürde L-EPS'nin oksidatif stres karşıtı etkileri ve genomik stabilite üzerindeki olumlu rolü ile de desteklenmektedir (Sirin ve Aslim, 2020). Bu örneklerin C1 ve C2 düzlemlerinde ayrı kümelenmesi, uygulamaların epigenetik düzeyde anlamlı etkiler oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, PCoA analizleri, $A\beta_{1-42}$ uygulamasının hücrelerin epigenetik profilini ciddi şekilde değiştirdiğini, MNP uygulamasının bu etkileri artırabileceğini; ancak EPS kaplamasının MNP'nin olumsuz etkilerini baskılayarak epigenetik stabilite sağlayabileceğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.12. PCoA analizi sonuçları

5. TARTIŞMA

AH, karmaşık fizyopatolojisi ve kesin bir tedavisinin bulunmaması nedeniyle nörodejeneratif hastalıklar arasında en çok araştırılan hastalıklardan biridir. Hastalığın patogenezi yalnızca Aβ agregasyonu ve tau proteinlerinin hiperforsforilasyonu gibi klasik patolojik değişimlerle sınırlı olmayıp, son yıllarda epigenetik mekanizmaların da AH gelişiminde belirleyici bir rol oynadığı gösterilmiştir. Özellikle DNA metilasyonu gibi kalıcı ve çevresel etkilere duyarlı epigenetik düzenleyici süreçlerin, AH'de gen ekspresyonunu etkileyerek nöronal fonksiyonların bozulmasında rol oynadığı bilinmektedir (Perkovic ve diğerleri, 2021).

AH için geliştirilen güncel terapötik yaklaşımlar, nörodejenerasyonun ilerlemesini yavaşlatmaya odaklanmakla birlikte, bu alanda henüz umut vaat eden yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda MNP'ler, hedeflenebilirlikleri, biyouyumlulukları ve manyetik özellikleri sayesinde AH'na tedavisinde büyük bir potansiyele sahiptir. Bu kapsamda Prof. Dr. Belma ASLIM yürütücülüğünde gerçekleştirilen FBG-2022-7937 kodlu projede, Fe_3O_4 MNP'leri sentezlenmiş ve probiyotik kökenli L-EPS ile kaplanarak, nörodejeneratif hastalıklar için biyouyumlu, nörokoruyucu, kan-beyin bariyerini geçebilen ve terapötik ajanların biyoyararlanımını artıran nanomalzemeler geliştirilmiştir.

MNP'lerin sahip olduğu manyetik yönlendirilebilirlik, biyouyumluluk ve terapötik potansiyel gibi çok yönlü avantajlarının yanı sıra, literatürde maruziyet sonrası epigenetik düzeyde potansiyel riskler oluşturabileceği de vurgulanmaktadır (Bilal ve diğerleri, 2020). Dolayısıyla MNP kullanımının beraberinde getirebileceği epigenetik riskler ve potansiyel toksik etkilerin de dikkate alınması gerekmektedir. Özellikle MNP'lerin biyolojik sistemlerde DNA, RNA, protein ve lipit gibi temel biyomoleküllerle doğrudan ya da dolaylı etkileşime girerek epigenetik değişikliklere yol açabileceği bildirilmiştir. Bu etkileşimler; hücre döngüsü, apoptoz, hücresel stres yanıtı ve sinyal iletimi gibi temel biyolojik süreçlerde kalıcı değişikliklere neden olabilir (Singh ve diğerleri, 2010). Bu nedenle, MNP'lerin güvenli ve etkili kullanımını sağlamak amacıyla epigenetik etkilerinin detaylı şekilde değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu nedenle çalışmamızda, SH-SY5Y hücre hattında $A\beta_{1-42}$ uygulaması ile oluşturulan AH modelinde, Prof. Dr. Belma ASLIM tarafından geliştirilen hem FE_30_4 MNP hem de

probiyotik kökenli L-EPS kapllı MNP uygulamaların DNA metilasyon profili üzerindeki etkileri MSAP yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir.

MSAP analizi ile örneklerin tüm genom düzeyindeki metilasyon profilleri ortaya konmuş, elde edilen epigenetik verilere göre 77 banttan 55'i (%71) polimorfik MSL (methylation susceptible loci: MSL) olarak tanımlanmış, NML (non-methylated loci: NML) oranı ise sıfır olarak saptanmıştır. MSL oranlarının yüksekliği, örnekler arasındaki epigenetik statü farklılıklarını yansıtmaktadır. Buna karşılık, NML oranının sıfır olarak tespit edilmesi, analiz edilen hücrelerin genetik düzeyde tamamen özdeş olduğunu ve gözlemlenen varyasyonların yalnızca epigenetik kaynaklı olduğunu doğrulamaktadır. Aynı hücre hattından türetilen bu örnekler arasında genetik kontaminasyon ve hücre heterojenitesinin bulunmaması, epigenetik profil analizlerinin güvenilirliği ve çalışmanın deneysel bütünlüğünü desteklemektedir.

Elde edilen bu genel metilasyon farklılıklarını daha ayrıntılı değerlendirebilmek amacıyla, MSAP analizinde tanımlanan dört temel bant tipi üzerinden örnekler arasındaki epigenetik farklılıklar incelenmiştir. MSAP analizinde elde edilen dört temel bant tipi, epigenetik profillemenin önemli göstergeleri olarak kabul edilir ve her biri belirli bir DNA metilasyon durumunu yansıtır: Metillenmemiş bölgeler (HPA+MSP+), sitozinin metillenmemiş olduğunu ve epigenetik açıdan transkripsiyonel olarak aktif bölgeleri temsil eder. Hemimetillenmiş bölgeler (HPA+/MSP-), yarı metilasyon durumunu ifade eder ve genellikle geçici veya çevresel uyarılara yanıt olarak oluşan epigenetik değişikliklerin bir göstergesi olarak kabul edilir. İç sitozin metilasyonu (HPA-/MSP+) durumu, kısmi baskılanmış bir transkripsiyonel durumu yansıtır. Tam metillenmiş (HPA-/MSP-) durum, genellikle tam metillenmiş CpG bölgelerini ya da DNA konformasyonundaki değişiklikleri yansıtır ve transkripsiyonel olarak inaktif bölgeleri temsil eder. Yapılan analizler sonucunda, örneklerde en yaygın olarak metillenmemiş fragmanlar gözlemlenmiş; ardından tam metillenmiş olanlar gelmiş ve en düşük sıklıkta iç sitozin metilasyonu ile hemimetillenmiş fragmanlar belirlenmiştir. Her ne kadar metilasyon oranı genom boyunca bölgesel farklılıklar gösterse de, tüm insan genomunun yaklaşık %3'lük bir kısmı metillenmiştir (Loyfer ve diğerleri, 2023). Dolayısıyla çalışmamızda da en çok oranda metillenmemiş bölgelerin bulunması genomun stabilitesi için önemli bir özelliği olup, beklenen bir durumdur.

Çalışmada Aβ uygulaması sonucunda örneklerde tam metilasyon oranlarında bir azalma görülmektedir. Bu durum uygulama sonucunda oluşan AH modelinde epigenetik açıdan önemli değişimler olduğunu ve birçok genin ifadesinin baskılandığına işaret etmektedir.

Skorlama sonucu elde edilen MSL verilerine dayanarak PCoA grafiği oluşturulmuştur. PCoA analizinde örneklerin C1 (%28,6) ve C2 (%19,4) bileşenleri boyunca iki temel epigenetik profile dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Analiz sonucunda, özellikle C2 ekseninde örnekler arasındaki gözlenen ayrımda Aβ uygulamasının temel belirleyicisi olarak öne çıktığı görülmüştür. Bu bulgu literatürde, Aβ uygulamasının DNA metilasyon düzenini bozduğuna dair mevcut verilerle uyumludur. Nitekim Sanchez-Mut ve diğerleri, (2015), Alzheimer hastalarına ait beyin dokularında nörodejeneratif süreçle ilişkili bazı genlerin promotör bölgelerinde hipermetilasyon tespit ettiklerini bildirmiştir. Benzer şekilde, De Jager ve diğerleri, (2014) ise Alzheimer hastalarında genom genelinde hipometilasyon ile birlikte, gen bölgesine özgü metilasyon farklılıklarının görüldüğü bildirilmiştir. Bu bağlamda, tez çalışmamız da $A\beta_{1-42}$'nın hücresel düzeyde epigenetik yeniden programlama oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum, $A\beta_{1-42}$'nın yalnızca nörotoksik bir peptit değil, aynı zamanda DNA metilasyon mekanizmalarını etkileyerek gen ekspresyonunu düzenleyebilen güçlü bir epigenetik modülatör olduğunu göstermektedir. Ayrıca $A\beta_{1-42}$ örneğinde tespit edilen yüksek tam metilasyon oranı bu epigenetik baskılayıcı mekanizma ile desteklenmektedir. Söz konusu bulgular, $A\beta_{1-42}$ uygulamasının DNA metilasyon desenininde baskılayıcı bir yönelime neden olduğunu ve epigenetik regülasyonlar üzerinde belirgin bir yeniden yapılandırma meydana getirdiğini göstermektedir.

Öte yandan sağlıklı hücrede MNP tek başına uygulandığında kontrol grubundan daha farklı bir epigenetik profil oluşturmuştur. Bu bağlamda, çalışmada elde edilen metilasyon profili verileri çıplak MNP'lerin epigenetik düzeyde farklılaşmalara neden olabileceği yönündeki literatür bulgularını destekler niteliktedir. Bu durum, literatürde MNP'lerin ROS üreterek DNMT aktivitesini etkilediğine ve bu yolla DNA metilasyon düzeninde bozulmaya neden olduğuna dair verilerle paralellik göstermektedir (Bonadio ve diğerleri, 2017 Soltysove ark., 2023). Bunun yanı sıra, sağlıklı hücrede EPS örneğinin diğer tüm örneklerden belirgin şekilde farklı profil göstermesi, bu örneğin hücrede kendine özgü bir DNA metilasyon profili oluşturduğunu düşündürmektedir. Özellikle probiyotik kökenli L-EPS'lerin immünomodülatör ve antioksidan etkileri, özgün epigenetik izler bırakabilir (Shao ve

diğerleri, 2014; Patel ve diğerleri, 2011). Literatürde EPS'nin antioksidan savunma sistemlerini güçlendirerek ROS kaynaklı hasarı önleyebileceği bildirilmiştir (Sirin ve Aslim, 2021). Bu bağlamda EPS'nin oluşturduğu farklı epigenetik profilin, hücrede bağımsız olarak tetiklediği moleküler etkileşimlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla çalışmamızda gözlemlenen farklılaşma, EPS'nin yalnızca fizyolojik değil, aynı zamanda epigenetik düzeyde de aktif bir biyomolekül olduğuna işaret etmektedir. Öte yandan EPS kaplı MNP uygulamasında epigenetik profilin belirgin bir şekilde kontrol örneğine daha yakın olduğu, dolayısıyla MNP'nin tek başına oluşturduğu metilasyon durumunda geri dönüşüm olduğu gözlemlenmiştir. Farklı çalışmalarda güvenli olduğu bildirilen MNP-EPS uygulamasının, bu araştırmada da epigenetik düzeyde belirgin bir toksik etkiye neden olmadığı ya da bu etkinin oldukça sınırlı olduğu gözlemlenmiştir. Bu da EPS kaplamasının, epigenetik düzeyde MNP kaynaklı riskleri azaltabileceği hipotezini desteklemektedir.

Öte yandan AH modelinde MNP-EPS uygulaması, (C1) boyutunda diğer örneklerden ayrışan bir etki göstermiş; (C2) boyutunda ise kontrol örneğine daha yakın bir profil sergilemiştir. Bu durum, uygulamanın epigenetik değişim oluşturduğunu ancak belirli yönlerden bu değişikliklerin geri dönebilir nitelikte olduğu yorumu yapılabilmektedir.

Bu bağlamda, EPS'nin yapısal özelliklerinin, MNP ile birlikte uygulandığında epigenetik etkilerin düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir. L-EPS kaplı MNP'lerin epigenetik düzeyde oluşturduğu etkiler bu biyomolekülün yapısal özelliklerinden de kaynaklanmış olabilir. EPS'ler, probiyotik mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve genellikle glikoz, galaktoz, mannoz, rhamnoz, fukoz gibi farklı monosakkaritlerin belirli oranlarda bir araya gelmesiyle oluşan yüksek moleküler ağırlıklı polisakkaritlerdir. Bu yapıların monosakkarit kompozisyonu, glikozidik bağ tipleri, dallanma derecesi ve moleküler konformasyonları, biyolojik sistemler üzerindeki etkilerinini belirleyen temel parametrelerdir (Angelin ve diğerleri, 2020). Özellikle yüksek hidroksil grubu içeriği sayesinde serbest radikallerle etkileşime girerek ROS seviyelerini azaltabileceği kanıtlanan EPS'ler, oksidatif stres kaynaklı epigenetik bozulmaları önleyebilecek potansiyele sahiptir (Li ve diğerleri, 2014). Bilindiği üzere, ROS birikimi DNMT aktivitesini baskılayarak DNA metilasyonunda bozulmalara yol açabilmektedir. Bu bağlamda, EPS'nin antioksidan etkisi, DNMT'lerin fonksiyonel stabilitesini destekleyerek epigenetik düzenin korunmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Buna paralel olarak, bu çalışmamızda MNP-EPS uygulanan örneğin, PCoA analizinde kontrol örneğine yakın bir konumda dağılım göstermesi, EPS'nin yukarıda bahsedilen antioksidan özelliklerinin epigenetik düzeyde metilasyon profiline yansıdığına işaret edebilir. Benzer şekilde, sadece EPS uygulanan örneğin diğer örneklerden farklı metilasyon profili sergilemesi, bu molekülün hücre içinde kendine özgü bir metilasyon profili oluşturduğunu düşündürmektedir.

Bununla birlikte, EPS'lerin hücre içi sinyal yolları üzerindeki etkileri de epigenetik yeniden programlamayı şekillendirebilir. EPS yapısında yer alan glikozidik bağ türleri ve dallanma motifleri, hücre yüzeyindeki belirli reseptörlerle özgün etkileşimler kurarak *MAPK, NF-κB* veya *PI3K/Akt* gibi epigenetik regülasyonda rol oynayan sinyal yollarını aktive edebilir. Bu yolakların aktive edilmesiyle birlikte, DNMT, TET ve histon modifikasyon enzimlerinin ekspresyon ve aktivitesinde değişiklikler meydana gelebilir (Wachi ve diğerleri, 2014; Murofushi ve diğerleri, 2015). Çalışmamızda EPS örneğinin özgün bir epigenetik profille konumlanması, bu sinyal ağlarının epigenetik düzeyde farklılaşma yaratabileceği hipotezini güçlendirmektedir.

Literatürde, L-EPS'nin Aβ kaynaklı hücresel toksisiteye karşı koruyucu etkiler sağladığı; bu etkilerin *AKT/PKB, NF-κB* ve *MAPK* gibi hücresel sinyal yolakları üzerinden anti-apoptotik mekanizmalarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu fizyolojik düzeyde elde edilen bulgular, L-EPS'nin hücre sağlığını destekleyici potansiyelini vurgulamaktadır (Sirin ve Aslim, 2020). Tez çalışmamızda ise, bu koruyucu etkilerin epigenetik düzeydeki yansımaları ilk kez değerlendirilmiş ve L-EPS'nin yalnızca fizyolojik değil, aynı zamanda epigenetik düzeyde de dengeleyici bir etki oluşturduğunu göstermektedir. Elde edilen bulgular, MNP ve EPS'nin birlikte uygulamasının, tekil uygulamalara kıyasla daha dengeli ve stabilize bir epigenetik yanıt oluşturduğunu ortaya koymuştur. Böylece L-EPS kaplamalı MNP'lerin yalnızca toksisiteyi azaltmakla kalmayıp, aynı zamanda DNA metilasyon dengesinin korunmasına katkıda bulunarak epigenetik düzeyde nörokoruyucu bir rol üstlenebileceği hipotezini desteklemektedir.

Literatürde, farklı fizyolojik koşulların (örneğin metabolik sendromlu ve sağlıklı farelerin bronkoalveolar lavaj sıvıları) biyokorona kompozisyonunu değiştirdiği ve bu değişikliğin MNP'lerin makrofajlar tarafından tutulma oranı, biyodağılımı ve toksik etkileri gibi hücresel yanıtlar üzerinde belirleyici olduğu gösterilmiştir (Li ve diğerleri, 2024). Bu bağlamda

biyokorona kompozisyonu, yalnızca hücrelerin fizyolojik yanıtlarını değil, aynı zamanda gen ekspresyonu ve epigenetik düzenlemeler gibi daha derin biyolojik süreçleri de dolaylı olarak etkileyebileceği düşünülmektedir. Nitekim MNP'lerin hücre içi taşınımı, çekirdek membranı geçişi ve ROS üretimi gibi faktörleri DNMT enzimlerinin aktivitesini ve DNA metilasyon profillerini değiştirebilecek düzeyde etkileşimlere neden olabilmektedir.

Tez çalışmasında kullanılan probiyotik kökenli L-EPS kaplaması, MNP'lerin yüzeyinde oluşabilecek istenmeyen biyokorona yapılarının oluşumunu sınırlandırarak, protein ve lipid adsorpsiyonunu kontrol altında tutuyor olabilir. EPS kaplaması, nanopartiküllerin biyouyumluluğunu artırmakta; hücrelerle olan etkileşimlerini düzenlemekte; bağışıklık sistesmi tarafından tanınabilirliğini azaltmakta ve dolayısıyla potansiyel toksik etkilerini sınırlayabilmektedir (Xiu ve diğerleri, 2018). L-EPS kaplı MNP'lerin bu tezde de gözlenen şekilde, özellikle DNA metilasyon profili açısından kontrol örneğine daha yakın bir dağılım göstermesi, olası epigenetik toksisiteyi baskılayabilen ya da toksisite oluşturmayan bir mekanizmanın varlığına işaret etmektedir. Bu yönüyle L-EPS kaplaması, yalnızca yüzeysel stabilite sağlamakla kalmayıp, fizyolojik etkilerinin ötesinde gen ekspresyonu ve epigenetik mekanizmalar üzerinde de düzenleyici rol oynayabilecek potansiyel bir epigenetik düzenleyici olarak değerlendirilebilir. Böylece L-EPS kaplı MNP'ler, terapötik ve tanısal uygulamalarda hem etkinlik hem de biyogüvenlik açısından avantajlı bir biyomalzeme profili sunmaktadır.

Çalışmanın özgün katkısı, MNP'lerin probiyotik kökenli L-EPS kaplamasıyla birlikte epigenetik düzeyde AH modeli üzerindeki etkilerinin ilk kez sistematik olarak değerlendirilmiş olmasıdır. Literatürde, L-EPS ile kaplı MNP'lerin DNA metilasyon düzeni üzerindeki epigenetik etkilerini $A\beta_{1-42}$ ile indüklenen nöronal hücrelerde inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yönüyle tez çalışmamız, alandaki önemli bir bilgi boşluğunu doldurmakta ve nöroepigenetik yaklaşımlar açısından yenilikçi bir perspektif sunmaktadır. Elde edilen bulgular, $A\beta_{1-42}$ uygulamasının hücrelerde belirgin epigenetik değişikliklere yol açtığını ve L-EPS ile kaplanmış MNP'lerin bu olumsuz etkileri epigenetik düzeyde dengeleyerek DNA metilasyon örüntüsünü stabilize edebileceğini göstermektedir. Özellikle MNP_EPS_ Aβ uygulamasının diğer $A\beta_{1-42}$ uygulama gruplarından epigenetik olarak ayrışması, L-EPS'nin $A\beta_{1-42}$ kaynaklı epigenetik düzensizliği baskılayabileceğini ortaya koymaktadır. Verilerin bütüncül değerlendirilmesi, yalnızca tekil uygulamaların değil, aynı zamanda bileşenlerin kombinasyonlarının da hücresel epigenetik yanıt üzerinde sinerjik

veya antagonistik etkiler oluşturabileceğini ortaya koymuştur. Özellikle EPS'nin MNP ile birlikte kullanılması durumunda, hem fizyolojik hem de epigenetik düzeyde nörokoruyucu etkinin sürdürülebildiği gözlemlenmiştir. Bu bulgular, L-EPS'nin koruyucu etkisinin, yalnızca biyokimyasal mekanizmalarla sınırlı kalmayıp, aynı zamanda epigenetik regülasyon mekanizmaları aracılığıyla da gerçekleştiğini ve dolayısıyla potansiyel bir nöroepigenetik koruma stratejisi sunabileceğini desteklemektedir. Dolayısıyla elde edilen bulgular, gelecekte epigenetik güvenliği ön planda tutan yeni nesil nanoterapötik stratejilerin geliştirilmesinde önemli bir referans oluşturmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde aşağıdaki çıkarımlar ve öneriler yapılmıştır:

Bu çalışmada elde edilen bulgular AH modellemesi amacıyla kullanılan Aβ uygulamasının hücrelerde metilasyon profillerini belirgin şekilde değiştirdiğini göstermiştir. Yapılan PCoA analizinde, $A\beta_{1\text{-}42}$ uygulanan örnekler kontrol örneğinden ayrışarak, epigenetik düzenin bozulduğunu ve metilasyon desenlerinin yeniden programlandığını ortaya koymuştur. Bu sonuç, $A\beta_{1\text{-}42}$ uygulamasının epigenetik düzenleme mekanizmaları üzerinde etkili olabileceği yönündeki hipotezi desteklemektedir.

MNP uygulamasının, kontrol örneğine göre özgün bir epigenetik profile sahip olması, literatürde bildirilen MNP'lerin ROS üretimi ve DNMT aktivitesine etkisiyle uyumludur. Bu durum, MNP'lerin tek başına kullanıldığında epigenetik toksisite riski taşıyabileceğini göstermektedir.

Öte yandan probiyotik kökenli L-EPS ile kaplanmış MNP'ler (MNP-EPS), $A\beta_{1\text{-}42}$ uygulanmamış hücrelerde kontrol örneğine epigenetik açıdan en yakın profili göstermiştir. Bu durum, EPS kaplamasının MNP'lerin olası epigenetik etkilerini baskılayabildiğini ve epigenetik stabilizasyon sağlayarak nörokoruyucu etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, MNP-EPS kombinasyonu epigenetik toksisite oluşturmamış; bu da güvenli bir biyomalzeme olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, çalışmanın bulguları literatürdeki bulgularla birlikte değerlendirildiğinde, $A\beta_{1\text{-}42}$ uygulamasının hücrelerin DNA metilasyon profillerini anlamlı şekilde değiştirdiğini, MNP'lerin bu etkiyi artırabileceğini, ancak L-EPS kaplamalı MNP'lerin bu değişimleri baskılayarak epigenetik stabilite sağlayabileceğini göstermiştir. Bu bulgular, L-EPS kaplamalı MNP'lerin nörokoruyucu etkilerini epigenetik seviyede de ortaya koymakta ve gelecekteki terapötik stratejiler için önemli çıkarımlar sunmaktadır. Bu bağlamda, L-EPS kaplanan MNP'ler, sadece fizikokimyasal avantajlarıyla değil, aynı zamanda epigenetik açıdan da güvenli ve işlevsel bir biyomalzeme olarak ön plana çıkmaktadır. Bu durum, gelecekte MNP uygulamalarının biyomedikal alanlarda daha güvenli hale getirilmesi için önemli ipuçları sunmaktadır. Ancak elde edilen bu öncül bulguların desteklenmesi için ileri

düzey dizileme analizleriyle hangi gen bölgelerinin etkilendiği veya metilasyona uğradığı, histon modifikasyonları ve miRNA düzeyindeki etkilerin incelenmesi çok katmanlı epigenetik yaklaşımlar için gerekmektedir. Aynı zamanda farklı MNP kaplama materyalleri ve konsantrasyonlarıyla da daha geniş kapsamda epigenetik toksisite analizleri yürütülmesi, MSAP analizinde daha fazla primer kombinasyonu kullanılarak epigenetik profil detaylandırılması, farklı konsantrasyonlar ve hücre modelleriyle uygulamalar yapılarak doz-tepki ilişkisinin incelenmesi de gelecekteki çalışmalar için önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Abbott N. J. (2005). Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation, *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(1), 5–23.

Agarwal R., Adhikary S., Bhattacharya S., Goswami S., Roy D., Dutta S., Ganguly A., Nanda S. and Rajak P. (2024). Iron oxide nanoparticles: a narrative review of in-depth analysis from neuroprotection to neurodegeneration, *Environmental Science Advances*, 3(5), 635–660.

Albertini E. and Marconi G. (2014). Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) marker to investigate Drought-Stress response in Montepulciano and Sangiovese grape cultivars, *Methods in Molecular Biology*, 151–164.

Amin F. U., Hoshiar A. K., Duc T., Do Noh Y., Shah S. A., Khan M. S., Yoon J. and Kim M. O. (2017). Osmotin-loaded magnetic nanoparticles with electromagnetic guidance for the treatment of Alzheimer's disease, *Nanoscale*, 9(30), 10619–10632.

Angelin J. and Kavitha M. (2020). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential, *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 853–865.

Ansari M., Habibi-Rezaei M., Salahshour-Kordestani S., Ferdousi M. and Movahedi A. A. M. (2015). An investigation on the effect of β-CD modified Fe3O4 magnetic nanoparticles on aggregation of amyloid β peptide (25-35), *Materials Technology*, 31(6), 315–321.

Arriagada P. V., Growdon J. H., Hedley-Whyte E. T. and Hyman B. T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease, *Neurology*, 42(3), 631.

Banerjee A., Sarkar S., Govil T., González-Faune P., Cabrera-Barjas G., Bandopadhyay R., Salem D. R. and Sani R. K. (2021). Extremophilic exopolysaccharides: Biotechnologies and Wastewater Remediation, *Frontiers in Microbiology*, 12.

Bellova A., Bystrenova E., Koneracka M., Kopcansky P., Valle F., Tomasovicova N., Timko M., Bagelova J., Biscarini F. and Gazova Z. (2010). Effect of Fe3O4 magnetic nanoparticles on lysozyme amyloid aggregation, *Nanotechnology*, 21(6), 065103.

Bilal M., Ashraf S. S., Ferreira L. F. R., Cui J., Lou W., Franco M. and Iqbal H. M. (2020). Nanostructured materials as a host matrix to develop robust peroxidases-based nanobiocatalytic systems, *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 1906–1923.

Bonadio R. S., Arcanjo A. C., Lima E. C., Vasconcelos A. T., Silva R. C., Horst F. H., Azevedo R. B., Poças-Fonseca M. J. and Longo J. P. F. (2017). DNA methylation alterations induced by transient exposure of MCF-7 cells to maghemite nanoparticles, *Nanomedicine*, 12(23), 2637–2649.

Bonadio R. S., Da Cunha M. C. P. C., Longo J. P. F., Azevedo R. B. and Poças-Fonseca M. J. (2019). Exposure to maghemite nanoparticles induces epigenetic alterations in human submandibular gland cells, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 20(3), 1454–1462.

Brzóska K., Grądzka I. and Kruszewski M. (2019). Silver, gold, and iron oxide nanoparticles alter mIRNA expression but do not affect DNA methylation in HEPG2 cells, *Materials*, 12(7), 1038.

Bulut B., Aydinli Z. ve Türktaş-Erken M. (2020). MSAP analysis reveals diverse epigenetic statuses in opium poppy varieties with different benzyisoquinoline alkaloid content, *Turkish Journal of Biology*, 44(2), 103–109.

Celik G. Y., Aslim B. ve Beyatli Y. (2008). Characterization and production of the exopolysaccharide (EPS) from Pseudomonas aeruginosa G1 and Pseudomonas putida G12 strains, *Carbohydrate Polymers*, 73(1), 178–182.

Chatterjee K., Sarkar S., Rao K. J. and Paria S. (2014). Core/shell nanoparticles in biomedical applications, *Advances in Colloid and Interface Science*, 209, 8–39.

Chwialkowska K., Korotko U., Kosinska J., Szarejko I. and Kwasniewski M. (2017). Methylation sensitive amplification polymorphism sequencing (MSAP-Seq)—A method for high-throughput analysis of differentially methylated CCGG sites in plants with large genomes, *Frontiers in Plant Science*, 8, 45-66.

Costa Y. Y. M. (2013). Genetic and epigenetic effects of nanoparticles, *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, 07(04), 144-145.

Day J. J. and Sweatt J. D. (2011). Epigenetic mechanisms in cognition, *Neuron*, 70(5), 813–829.

De Jager P. L., Srivastava G., Lunnon K., Burgess J., Schalkwyk L. C., Yu L., Eaton M. L., Keenan B. T., Ernst J., McCabe C., Tang A., Raj T., Replogle J., Brodeur W., Gabriel S., Chai H. S., Younkin C., Younkin S. G., Zou F. and Bennett D. A. (2014). Alzheimer's disease: early alterations in brain DNA methylation at ANK1, BIN1, RHBDF2 and other loci, *Nature Neuroscience*, 17(9), 1156–1163.

De La Torre C. and Ceña V. (2018). The delivery challenge in neurodegenerative disorders: the nanoparticles role in Alzheimer's disease therapeutics and diagnostics, *Pharmaceutics*, 10(4), 190.

Djoković V., Krsmanović R., Božanić D. K., McPherson M., Van Tendeloo G., Nair P. S., Georges M. K. and Radhakrishnan T. (2009). Adsorption of sulfur onto a surface of silver nanoparticles stabilized with sago starch biopolymer, *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 73(1), 30–35.

Dong Y., Lagarde J., Xicota L., Corne H., Chantran Y., Chaigneau T., Crestani B., Bottlaender M., Potier M., Aucouturier P., Dorothée G., Sarazin M. and Elbim C. (2018). Neutrophil hyperactivation correlates with Alzheimer's disease progression, *Annals of Neurology*, 83(2), 387–405.

Feil R. and Fraga M. F. (2012). Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications, *Nature Reviews Genetics*, 13(2), 97–109.

Figuerola A., Di Corato R., Manna L. and Pellegrino T. (2010). From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications, *Pharmacological Research*, 62(2), 126–143.

Finkel T. and Holbrook N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, *Nature*, 408(6809), 239–247.

Fuke C., Shimabukuro M., Petronis A., Sugimoto J., Oda T., Miura K., Miyazaki T., Ogura C., Okazaki Y. and Jinno Y. (2004). Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study, *Annals of Human Genetics*, 68(3), 196–204.

Gamberoni F., Borgese M., Pagiatakis C., Armenia I., Grazù V., Gornati R., Serio S., Papait R. and Bernardini G. (2023). Iron oxide nanoparticles with and without cobalt functionalization provoke changes in the transcription profile via epigenetic modulation of enhancer activity, *Nano Letters*, 23(19), 9151–9159.

Gao X., Chen Q., Yao H., Tan J., Liu Z., Zhou Y. and Zou Z. (2022). Epigenetics in Alzheimer's disease, *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14, 85-96.

Girgis E., Khalil W. K. B., Emam A. N., Mohamed M. B. and Rao K. V. (2012). Nanotoxicity of gold and gold–cobalt nanoalloy, *Chemical Research in Toxicology*, 25(5), 1086–1098.

González-Benito M. E., Ibáñez M., Pirredda M., Mira S. and Martin C. (2020). Application of the MSAP technique to evaluate epigenetic changes in plant conservation, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7459.

Green-Sadan T., Kuttner Y., Lublin-Tennenbaum T., Kinor N., Boguslavsky Y., Margel S. and Yadid G. (2005). Glial cell line-derived neurotrophic factor-conjugated nanoparticles suppress acquisition of cocaine self-administration in rats, *Experimental Neurology*, 194(1), 97–105.

Gupta J., Fatima M. T., Islam Z., Khan R. H., Uversky V. N. and Salahuddin P. (2019). Nanoparticle formulations in the diagnosis and therapy of Alzheimer's disease, *International Journal of Biological Macromolecules*, 130, 515–526.

Gurzau E. S., Neagu C. and Gurzau A. E. (2003). Essential metals—case study on iron, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(1), 190–200.

Haliloğlu K., Türkoğlu A., Balpınar Ö., Nadaroğlu H., Alaylı A. ve Poczai P. (2022). Effects of zinc, copper and iron oxide nanoparticles on induced DNA methylation, genomic instability and LTR retrotransposon polymorphism in wheat (Triticum aestivum L.), *Plants*, 11(17), 2193.

Halliwell B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases, *Drugs & Aging*, 18(9), 685–716.

Hampel H., O'Bryant S. E., Durrleman S., Younesi E., Rojkova K., Escott-Price V., Corvol J., Broich K., Dubois B. and Lista S. (2017). A precision medicine initiative for Alzheimer's disease: the road ahead to biomarker-guided integrative disease modeling, *Climacteric*, 20(2), 107–118.

Heneka M. T., Carson M. J., Khoury J. E., Landreth G. E., Brosseron F., Feinstein D. L., Jacobs A. H., Wyss-Coray T., Vitorica J., Ransohoff R. M., Herrup K., Frautschy S. A., Finsen B., Brown G. C., Verkhratsky A., Yamanaka K., Koistinaho J., Latz E., Halle A. and Kummer M. P. (2015), Neuroinflammation in Alzheimer's disease, *The Lancet Neurology*, 14(4), 388–405.

Herrera C. M. and Bazaga P. (2010). Epigenetic differentiation and relationship to adaptive genetic divergence in discrete populations of the violet Viola cazorlensis, *New Phytologist*, 187(3), 867–876.

Hickman R. A., Faustin A. and Wisniewski T. (2016). Alzheimer disease and its growing epidemic, *Neurologic Clinics*, 34(4), 941–953.

Hou Y., Dan X., Babbar M., Wei Y., Hasselbalch S. G., Croteau D. L. and Bohr V. A. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease, *Nature Reviews Neurology*, 15(10), 565–581.

Hurd M. D., Martorell P., Delavande A., Mullen K. J. and Langa K. M. (2013). Monetary costs of dementia in the United States, *New England Journal of Medicine*, 368(14), 1326–1334.

Hussain A., Zia K. M., Tabasum S., Noreen A., Ali M., Iqbal R. and Zuber M. (2016). Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: a review, *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 10–27.

Jain R., Raghukumar S., Tharanathan R. and Bhosle N. (2005). Extracellular polysaccharide production by thraustochytrid protists, *Marine Biotechnology*, 7(3), 184–192.

Jones B. F. (2007). *Cingulate cortex networks: role in learning and memory and Alzheimer's disease related changes.* Doctoral Dissertation, Vrije Universiteit Amsterdam, Amsterdam, 12-18.

Kabanov A. and Gendelman H. (2007). Nanomedicine in the diagnosis and therapy of neurodegenerative disorders, *Progress in Polymer Science*, 32(8–9), 1054–1082.

Kaushik A. C., Bharadwaj S., Kumar S. and Wei D. (2018). Nano-particle mediated inhibition of Parkinson's disease using computational biology approach, *Scientific Reports*, 8(1), 45-66.

Khan J. A., Mandal T. K., Das T. K., Singh Y., Pillai B. and Maiti S. (2011). Magnetite (Fe3O4) nanocrystals affect the expression of genes involved in the TGF-beta signalling pathway, *Molecular BioSystems*, 7(5), 1481.

Kuang Y., Zhang J., Xiong M., Zeng W., Lin X., Yi X., Luo Y., Yang M., Li F. and Huang Q. (2020). A novel nanosystem realizing curcumin delivery based on FE3O4@Carbon dots nanocomposite for Alzheimer's disease therapy, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 77-85.

Kush P., Kumar P., Singh R. and Kaushik A. (2021). Aspects of high-performance and bio-acceptable magnetic nanoparticles for biomedical application, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(6), 704–737.

Labella-Ortega M., Martín C., Valledor L., Castiglione S., Castillejo M., Jorrín-Novo J. V. and Rey M. (2024). Unravelling DNA methylation dynamics during developmental stages in Quercus ilex subsp. ballota [Desf.] Samp, *BMC Plant Biology*, 24(1), 122-135.

Lane C. A., Hardy J. and Schott J. M. (2017). Alzheimer's disease, *European Journal of Neurology*, 25(1), 59–70.

Lane C. A., Hardy J. and Schott J. M. (2018). Alzheimer's disease, *European Journal of Neurology*, 25(1), 59–70.

Li S., Huang R., Shah N. P., Tao X., Xiong Y. and Wei H. (2014). Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from Bifidobacterium bifidum WBIN03 and Lactobacillus plantarum R315, *Journal of Dairy Science*, 97(12), 7334–7343.

Li Y., Vulpe C., Lammers T. and Pallares R. M. (2024). Assessing inorganic nanoparticle toxicity through omics approaches, *Nanoscale*, 16(34), 15928–15945.

Lister R., Pelizzola M., Dowen R. H., Hawkins R. D., Hon G., Tonti-Filippini J., Nery J. R., Lee L., Ye Z., Ngo Q., Edsall L., Antosiewicz-Bourget J., Stewart R., Ruotti V., Millar A. H., Thomson J. A., Ren B. and Ecker J. R. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences, *Nature*, 462(7271), 315–322.

Liu J., Qiao S. Z., Hu Q. H. and Lu G. Q. (2011). Magnetic nanocomposites with mesoporous structures: synthesis and applications, *Small*, 7(4), 418.

Liu K. Y., Stringer A. E., Reeves S. J. and Howard R. J. (2018). The neurochemistry of agitation in Alzheimer's disease: a systematic review, *Ageing Research Reviews*, 43, 99–107.

Lu X., Miousse I. R., Pirela S. V., Melnyk S., Koturbash I. and Demokritou P. (2015). Short-term exposure to engineered nanomaterials affects cellular epigenome, *Nanotoxicology*, 1–11.

Ma W., Chen X., Wang B., Lou W., Chen X., Jun-Li H., Sun Y., Yu Z. and Peng T. (2018). Characterization, antioxidativity, and anti-carcinoma activity of exopolysaccharide extract from Rhodotorula mucilaginosa CICC 33013, *Carbohydrate Polymers*, 181, 768–777.

Mahapatra S. and Banerjee D. (2013). Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications, *Microbiology Insights*, 6, 85-103.

Mirbahai L. and Chipman J. K. (2013). Epigenetic memory of environmental organisms: a reflection of lifetime stressor exposures, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 764–765, 10–17.

Mitusova K., Peltek O. O., Karpov T. E., Muslimov A. R., Zyuzin M. V. and Timin A. S. (2022). Overcoming the blood–brain barrier for the therapy of malignant brain tumor: current status and prospects of drug delivery approaches, *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 106-108.

Mornet S., Vasseur S., Grasset F. and Duguet E. (2004). Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy, *Journal of Materials Chemistry*, 14(14), 2161.

Murofushi Y., Villena J., Morie K., Kanmani P., Tohno M., Shimazu T., Aso H., Suda Y., Hashiguchi K., Saito T. and Kitazawa H. (2014). The toll-like receptor family protein RP105/MD1 complex is involved in the immunoregulatory effect of exopolysaccharides from Lactobacillus plantarum N14, *Molecular Immunology*, 64(1), 63–75.

Musolino E., Pagiatakis C., Serio S., Borgese M., Gamberoni F., Gornati R., Bernardini G. and Papait R. (2022). The Yin and Yang of epigenetics in the field of nanoparticles, *Nanoscale Advances*, 4(4), 979–994.

Pardo-Moreno T., González-Acedo A., Rivas-Domínguez A., García-Morales V., García-Cozar F. J., Ramos-Rodríguez J. J. and Melguizo-Rodríguez L. (2022). Therapeutic approach to Alzheimer's disease: current treatments and new perspectives, *Pharmaceutics*, 14(6), 1117.

Park H. and Son J. (2025). The application of methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) in ecology, *Cambridge Science Advance*, 2025(2), 25–31.

Patel S., Majumder A. and Goyal A. (2011). Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria, *Indian Journal of Microbiology*, 52(1), 3–12.

Pérez-Figueroa A. (2013). MSAP: a tool for the statistical analysis of methylation-sensitive amplified polymorphism data, *Molecular Ecology Resources*, 13(3), 522–527.

Perkovic M. N., Paska A. V., Konjevod M., Kouter K., Strac D. S., Erjavec G. N. and Pivac N. (2021). Epigenetics of Alzheimer's disease, *Biomolecules*, 11(2), 195.

Petri-Fink A., Steitz B., Finka A., Salaklang J. and Hofmann H. (2007). Effect of cell media on polymer coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): colloidal stability, cytotoxicity, and cellular uptake studies, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(1), 129–137.

Pogribna M. and Hammons G. (2021). Epigenetic effects of nanomaterials and nanoparticles, *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 26-36.

Poli A., Anzelmo G., Tommonaro G., Pavlova K., Casaburi A. and Nicolaus B. (2010). Production and chemical characterization of an exopolysaccharide synthesized by psychrophilic yeast strain Sporobolomyces salmonicolor AL1 isolated from Livingston Island, Antarctica, *Folia Microbiologica*, 55(6), 576–581.

Prince M., Bryce R., Albanese E., Wimo A., Ribeiro W. and Ferri C. P. (2013). The global prevalence of dementia: a systematic review and meta-analysis, *Alzheimer's & Dementia*, 9(1), 63.

Querfurth H. W. and LaFerla F. M. (2010). Alzheimer's disease, *New England Journal of Medicine*, 362(4), 329–344.

Qureshi I. A. and Mehler M. F. (2013). Understanding neurological disease mechanisms in the era of epigenetics, *JAMA Neurology*, 70(6), 703.

Raposo M., De Morais R. and De Morais A. B. (2013). Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae, *Marine Drugs*, 11(1), 233–252.

Reyna-López G. E., Simpson J. and Ruiz-Herrera J. (1997). Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms, *MGG Molecular & General Genetics*, 253(6), 703–710.

Robertson K. D. (2005). DNA methylation and human disease, *Nature Reviews Genetics*, 6(8), 597–610.

Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J. and Zoon P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 12(2–3), 163–171.

Sananbenesi F. and Fischer A. (2009). The epigenetic bottleneck of neurodegenerative and psychiatric diseases, *Biological Chemistry*, 390(11), 1145–1153.

Sanchez-Mut J. V. and Gräff J. (2015). Epigenetic alterations in Alzheimer's disease, *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9, 102-108.

Sanei M., Amirheidari B. and Satarzadeh N. (2023). Mutuality of epigenetic and nanoparticles: two sides of a coin, *Heliyon*, 10(1), e23679.

Serrano-Pozo A., Frosch M. P., Masliah E. and Hyman B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), a006189.

Shannahan J. (2016). The biocorona: a challenge for the biomedical application of nanoparticles, *Nanotechnology Reviews*, 6(4), 345–353.

Shao L., Wu Z., Zhang H., Chen W., Ai L. and Guo B. (2014). Partial characterization and immunostimulatory activity of exopolysaccharides from Lactobacillus rhamnosus KF5, *Carbohydrate Polymers*, 107, 51–56.

Sharma V. K., Mehta V. and Singh T. G. (2020). Alzheimer's disorder: epigenetic connection and associated risk factors, *Current Neuropharmacology*, 18(8), 740–753.

Silambarasan S., Logeswari P., Cornejo P. and Kannan V. R. (2019). Evaluation of the production of exopolysaccharide by plant growth promoting yeast Rhodotorula sp. strain CAH2 under abiotic stress conditions, *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 55–62.

Singh N., Jenkins G. J., Asadi R. and Doak S. H. (2010). Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION), *Nano Reviews*, 1(1), 5358.

Sirin S. ve Aslim B. (2020). Characterization of lactic acid bacteria derived exopolysaccharides for use as a defined neuroprotective agent against amyloid beta1–42-induced apoptosis in SH-SY5Y cells, *Scientific Reports*, 10(1), 121-136.

Sivakumar B., Aswathy R. G., Sreejith R., Nagaoka Y., Iwai S., Suzuki M., Fukuda T., Hasumura T., Yoshida Y., Maekawa T. and Sakthikumar D. N. (2013). Bacterial exopolysaccharide based magnetic nanoparticles: a versatile nanotool for cancer cell imaging, targeted drug delivery and synergistic effect of drug and hyperthermia mediated cancer therapy, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10(6), 885–899.

Soltysova A., Begerova P., Jakic K., Kozics K., Sramkova M., Meese E., Smolkova B. and Gabelova A. (2022). Genome-wide DNA methylome and transcriptome changes induced by inorganic nanoparticles in human kidney cells after chronic exposure, *Cell Biology and Toxicology*, 39(5), 1939–1956.

Taefehshokr S., Key Y. A., Khakpour M., Dadebighlu P. and Oveisi A. (2017). Early growth response 2 and Egr3 are unique regulators in immune system, *Central European Journal of Immunology*, 2, 205–209.

Todd S., Barr S., Roberts M. and Passmore A. P. (2013). Survival in dementia and predictors of mortality: a review, *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 28(11), 1109–1124.

Tosi G., Pederzoli F., Belletti D., Vandelli M. A., Forni F., Duskey J. T. and Ruozi B. (2019). Nanomedicine in Alzheimer's disease: amyloid beta targeting strategy, *Progress in Brain Research*, 3, 1–32.

Tsuchiya M. (2015). Transcriptional factors, Mafs and their biological roles, *World Journal of Diabetes*, 6(1), 175.

Valente A., Vieira L., Silva M. J. and Ventura C. (2023). The effect of nanomaterials on DNA methylation: a review, *Nanomaterials*, 13(12), 1880.

Van Bulck M., Sierra-Magro A., Alarcon-Gil J., Perez-Castillo A. and Morales-Garcia J. A. (2019). Novel approaches for the treatment of Alzheimer's and Parkinson's disease, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 719.

Vlassenko A. G., Benzinger T. L. and Morris J. C. (2011). PET amyloid-beta imaging in preclinical Alzheimer's disease, *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(3), 370–379.

Wachi S., Kanmani P., Tomosada Y., Kobayashi H., Yuri T., Egusa S., Shimazu T., Suda Y., Aso H., Sugawara M., Saito T., Mishima T., Villena J. and Kitazawa H. (2014). Lactobacillus delbrueckii TUA4408L and its extracellular polysaccharides attenuate enterotoxigenic Escherichia coli-induced inflammatory response in porcine intestinal epitheliocytes via Toll-like receptor-2 and 4, *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(10), 2080–2093.

Wang K., Niu M., Song D., Song X., Zhao J., Wu Y., Lu B. and Niu G. (2019). Preparation, partial characterization and biological activity of exopolysaccharides produced from Lactobacillus fermentum S1, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 129(2), 206–214.

Wang Y., Jiang J., Fu X., Zhang J., Song J., Duan L., Shao P., Xu X., Zeng L. and Zhang F. (2020). FE3O4@Polydopamine nanoparticle-loaded human umbilical cord mesenchymal stem cells improve the cognitive function in Alzheimer's disease mice by promoting hippocampal neurogenesis, *Research Square (Research Square)*.

Xia L., Alqahtani S., Ferreira C. R., Aryal U. K., Biggs K. and Shannahan J. H. (2022). Modulation of pulmonary toxicity in metabolic syndrome due to variations in iron oxide nanoparticle-biocorona composition, *Nanomaterials*, 12(12), 2022.

Xiu L., Zhang H., Hu Z., Liang Y., Guo S., Yang M., Du R. and Wang X. (2018). Immunostimulatory activity of exopolysaccharides from probiotic Lactobacillus casei WXD030 strain as a novel adjuvant in vitro and in vivo, *Food and Agricultural Immunology*, 29(1), 1086–1105.

Yadav K., Rahi D. K. and Soni S. (2013). An indigenous hyperproductive species of Aureobasidium pullulans RYLF-10: influence of fermentation conditions on exopolysaccharide (EPS) production, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(4), 1898–1908.

Yaish M. W., Peng M. and Rothstein S. J. (2013). Global DNA methylation analysis using methyl-sensitive amplification polymorphism (MSAP), *Methods in Molecular Biology*, 285–298.

Zahin N., Anwar R., Tewari D., Kabir M. T., Sajid A., Mathew B., Uddin M. S., Aleya L. and Abdel-Daim M. M. (2019). Nanoparticles and its biomedical applications in health and diseases: special focus on drug delivery, *Environmental Science and Pollution Research*, 27(16), 19151–19168.

Zhang P., Kishimoto Y., Grammatikakis I., Gottimukkala K., Cutler R. G., Zhang S., Abdelmohsen K., Bohr V. A., Sen J. M., Gorospe M. and Mattson M. P. (2019). Senolytic therapy alleviates Aβ-associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model, *Nature Neuroscience*, 22(5), 719–728.

Zhang P., Kishimoto Y., Grammatikakis I., Gottimukkala K., Cutler R. G., Zhang S., Abdelmohsen K., Bohr V. A., Sen J. M., Gorospe M. and Mattson M. P. (2020). Senolytic therapy alleviates Aβ-associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model, *Nature Neuroscience*, 22(5), 719–728.



Gazili olmak ayrıcalıktır