

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİMETİL FUMARAT'IN MİKROGLİAL
HÜCRELERDE NLRP3 İNFLAMAZOM
AKTİVASYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Bora TAŞTAN

TEMEL SİNİRBİLİMLER
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2018

TEZ KODU: DEU.HSL.MSc-2016970083

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİMETİL FUMARAT'IN MİKROGLİAL
HÜCRELERDE NLRP3 İNFLAMAZOM
AKTİVASYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

TEMEL SİNİRBİLİMLER
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bora TAŞTAN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Şermin GENÇ

Bu araştırma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından
215Z473 proje numarasıyla desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2016970083

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimler Anabilim Dalı, Temel Sinirbilimler Yüksek Lisans programı öğrencisi Bora TAŞTAN'ın '**DİMETİL FUMARAT'IN MİKROGLİAL HÜCRELERDE NLRP3 İNFLAMAZOM AKTİVASYONU ÜZERİNE ETKİSİ**' konulu Yüksek Lisans tezini 09/01/2018 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



BAŞKAN

Prof. Dr. Şermin Genç
DEÜ Sağlık Bil. Ens. Sinirbilimler AD.



ÜYE

Prof. Dr. Pınar Akan
DEÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya AD.



ÜYE

Prof. Dr. Volkan Seyrantepe
İYTE Fen Fak. Mol. Biy. ve Gen. Böl.

YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Görsev Yener
DEÜ Tıp Fak. Nöroloji AD.

YEDEK ÜYE

Yar. Doç. Dr. Çiğdem Tosun
İYTE Fen Fak. Mol. Biy. ve Gen. Böl.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ.....	iv
ŞEKİL DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Mikroglia.....	4
2.1.1. Mikroglia Tarihçesi ve Kökeni.....	4
2.1.2. Mikroglia Fenotipleri.....	5
2.1.3. Mikroglia Fonksiyonları.....	5
2.1.4. Nörodejeneratif Hastalıklarda Mikroglia.....	7
2.2. İnflamazom.....	8
2.2.1. İnflamazom Aktivasyonu	8
2.2.2. İnflamazom Aktivatörleri	8
2.2.3. İnflamazom Fonksiyonları ve Bağışıklık Sistemine Katkısı	10
2.2.4. Mikroglia'da İnflamazom	11
2.3. Dimetil Fumarat (C ₆ H ₈ O ₄)	12
2.3.1. Genel Bilgiler	12
2.3.2. Farmakolojik Özellikleri.....	12
2.3.3. Multipl Skleroz Hastalığında Dimetil Fumarat	13
2.3.4. Dimetil Fumarat ve İnflamasyon.....	14
2.3.5. Dimetil Fumarat ve İnflamazom.....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1. Araştırmanın Tipi	16
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	16
3.3. Çalışma Materyali	16

3.4. Çalışmanın Değişkenleri	16
3.5. Veri Toplama Araçları	16
3.5.1. Hücre Kültürü.....	16
3.5.2. <i>In vitro</i> Deneyler.....	17
3.5.2.1. Laktat Dehidrogenaz (LDH) ve CCK-8 Testi İçin <i>in vitro</i> Deney.....	17
3.5.2.2. ELISA Yöntemiyle IL-1beta ve IL-18 Sitokinlerinin Analizi İçin <i>in vitro</i> Deney	18
3.5.2.3. İnflamazom İlişkili Sitokinler (IL-1beta ve IL-18) ve NLRP3 mRNA Düzeyinin Belirlenmesi İçin <i>in vitro</i> Deney	19
3.5.2.4. İmmüno blot Yöntemiyle Kaspaz-1, NALP3 ve IL-1beta Protein Düzeylerinin Analizi İçin <i>in vitro</i> Deney	20
3.5.2.5. Kaspaz Aktivite Testi İçin <i>in vitro</i> Deney.....	21
3.5.2.6. Piroptotik Ölümün Mikroglia Hücrelerinde Gösterimi İçin <i>in vitro</i> Deney	22
3.5.2.7. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Belirlenmesi için <i>in vitro</i> Deney.	23
3.5.2.8. Mitokondriyal Reaktif Oksijen Türlerini İmmünflorasan Boyamayla Belirlenmesi İçin <i>in vitro</i> Deney.....	24
3.5.2.9. Mitokondriyal Reaktif Oksijen Türlerini Belirlenmesi için <i>in vitro</i> Deney	25
3.5.3. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Testi.....	26
3.5.4. CCK-8 Testi.....	27
3.5.5. ELISA Yöntemiyle IL-1beta ve IL-18 Sitokinlerinin Analizi.....	27
3.5.6. İnflamazom İlişkili Sitokinlerin (IL-1beta ve IL-18) ve NLRP3 için mRNA Düzeyinin Belirlenmesi	28
3.5.6.1. RNA İzolasyonu.....	28
3.5.6.2. cDNA Sentezi.....	29
3.5.6.3. RT-PCR Analizi	29
3.5.7. İmmüno blot Yöntemiyle Kaspaz-1, NALP3 ve IL-1beta Proteinlerinin Analizi	30
3.5.8. Kaspaz-1 Aktivite Testi	31
3.5.9. Piroptotik Ölümün Mikroglia Hücrelerinde Gösterimi	31
3.5.10. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin JC-1 Boyama ile Belirlenmesi	32
3.5.11. Mitokondriyal Reaktif Oksijen Türlerini MitoSOX Boya ile Belirlenmesi	32

3.5.12.	Mitokondriyal Reaktif Oksijen Türlerini İmmunhistokimyasal Boyamayla Belirlenmesi.....	32
3.6.	Araştırma Planı ve Takvimi:	33
3.7.	Verilerin Değerlendirilmesi:	33
3.8.	Araştırmanın Sınırlılıkları:	33
3.9.	Etik Kurul Onayı:	34
4.	SONUÇLAR.....	35
4.1.	DMF'nin Efektif Dozunun Belirlenmesi.....	35
4.2.	DMF'nin IL-1beta ve IL-18 Sitokinlerinin Düzeyine Etkisinin ELISA Yöntemiyle Gösterilmesi.....	35
4.3.	DMF'nin LPS ve ATP ile İndüklenmiş Hücrelerde IL-1beta, IL-18 ve NALP3 genlerinin mRNA Ekspresyon Seviyesine Etkisi	36
4.4.	İmmünoblot Yöntemiyle İnflamazom ile İlişkili Proteinlerin Değişimlerinin Gösterilmesi.....	37
4.5.	Kaspaz-1 Aktivite Testi.....	40
4.6.	DMF'nin Piroptotik Hücre Ölümüne Etkisi.....	41
4.7.	PI Boyama ile Hücre Ölümünün Belirlenmesi.....	41
4.8.	Mitokondriyal Membran Potansiyeli ve Süperoksit Üretimi Analizi	43
5.	TARTIŞMA.....	45
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	49
7.	KAYNAKLAR	50
8.	EKLER	59
8.1.	EK-1 Etik Kurul Onayı.....	59
8.2.	Özgeçmiş.....	62

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Primer Listesi	30
Tablo 2: Antikor Listesi.....	31



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. NLRP3 inflamazom aktivasyonu:.....	10
Şekil 2. DMF'nin çeşitli dozlarının bazal hücre ölümü üzerine etkisi:.....	35
Şekil 3.DMF'nin IL-1beta ve IL-18 düzeyine etkisinin ELISA yöntemiyle ölçülmesi:.....	36
Şekil 4.DMF'nin inflamazom belirteci genlerin mRNA'ları üzerindeki baskılayıcı etkisi:.....	37
Şekil 5. DMF'nin IL-1beta protein seviyesindeki etkisinin immünoiblotlama ile gösterilmesi:.....	38
Şekil 6. DMF'nin Kaspaz-1 protein seviyesindeki etkisinin immünoiblotlama ile gösterilmesi:.....	39
Şekil 7. DMF'nin NALP3 protein seviyesindeki etkisinin immünoiblotlama ile gösterilmesi:.....	40
Şekil 8.DMF'nin Kaspaz-1 aktivitesi üzerine etkisinin gösterimim.....	40
Şekil 9. DMF'nin piroptotik hücre ölümüne etkisi:.....	41
Şekil 10. NLRP3 İnflamazom modelinde piroptotik hücre ölümünün gösterilmesi:.....	42
Şekil 12. NLRP3 inflamazom modelinde mitokondriyal ROS'un gösterilmesi:.....	43
Şekil13.NLRP3 inflamazom modelinde mitokondriyal membran potansiyelinin gösterilmesi:.....	44

KISALTMALAR

ATP:	Adenozin Trifosfat
A β :	Amiloid-beta
AH:	Alzheimer Hastalığı
ALS:	Amyotrofik Lateral Skleroz
ARG1:	Arjinaz-1
ARR:	Yıllık Tekrarlama Oranı
CCK-8:	Cell Counting Kit-8
CCL2:	C-C motif kemokin 2
CCL22:	C-C motif kemokin 22
CCR7:	C-C kemokin reseptör 7
cDNA:	Komplementer DNA (Complementary DNA)
DAMP:	Hasara-bağılı Moleküler Kalıplar (Danger-Associated Molecular Patterns)
DIC:	Ayrımsal Girişim Zıtlıklı Işık Mikroskopisi (Differential Interference Contrast microscopy)
DMF:	Dimetil Fumarat
DSS:	Dekstran Sülfat Sodyum
EAE:	Deneysel Otoimmün Ensefalomiyelit
ELISA:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FBS:	Fötal Sığır Serumı (Fetal Bovine Serum)
GAPDH:	Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz
HRP:	Karaturp peroksidaz (Horseradish Peroxidase)
IF:	İmmünflorasan
IFN- β :	İnterferon Beta
IFN- γ :	İnterferon Gama
IL:	İnterlökin
INOS:	İndüklenen Nitrik Oksit Sentaz
KBB:	Kan Beyin Bariyeri
LDH:	Laktat Dehidrogenaz
LPS:	Lipopolisakkarit
MMF:	Mono Metil Fumarat

mRNA: Messenger RNA

MS: Multipl Skleroz

NADPH: Nikotin Adenin Dinükleotit Hidrojen Fosfat

NALP3: NACHT, LRR ve PYD domainleri içeren Protein 3

NF-κB: Nükleer Faktör Kappa-B

NGF: Sinir Büyüme Faktörü

NLRP3: NOD benzeri reseptör ailesi pyrin domain içeren protein 3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing protein 3)

NRF2: Nükleer faktör-E2-ilışkili faktör 2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2)

PAMP: Patojen ilişkili moleküler kalıplar (Pathogen associated molecular patterns)

PBS: Fosfat tamponlu fizyolojik solüsyon (Phosphate buffered saline)

PGE2: Prostaglandin E2

PH: Parkinson hastalığı

PI: Propidium İyodür

ROS: Reaktif Oksijen Türleri (Reactive oxygen species)

RRMS: Relapsing Remitting MS

RT-PCR: Kantitatif PCR (Real-Time PCR)

SN: Substantia Nigra

SOD1: Süperoksit Dismutaz 1

SSS: Santral Sinir Sistemi

TGF-β: Transforme Edici Büyüme Faktörü beta

TLR: Toll-benzeri reseptör

TREM-2: Myeloid hücrelerde eksprese olan reseptör-2

TNF-α: Tümör Nekroz Faktör alfa

WST-8: [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-isulfophenyl)-2Htetrazolium, monosodium salt]

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sırasında ve tezimin her aşamasında, benimle ilgilenen, entelektüel ve bilimsel bilgi-birikim ve donanımıyla her türlü süreçte yol gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. Şermin GENÇ’e,

Tez çalışmalarım süresince fikirleriyle yeni ufuklar gösteren, yardımlarını hiç çekinmeden sunan, değerli hocam Prof. Dr. Kemal Kürşad GENÇ’e,

Çalışmalarım boyunca hem deneysel hem de manevi olarak yardımlarını sunan değerli laboratuvar arkadaşlarım Burak İbrahim ARIÖZ, Dr. Kemal Uğur TÜFEKÇİ, Kamer Burak İŞCİ ve Erden EREN’e ve Genç Lab’ın diğer üyelerine,

Yardım ve destekleri için arkadaşlarım Hilal Cihankaya, Hamdullah Yanık, Kübra Altınel’e,

Ne yaparsam yapayım desteklerini hiç esirgemeyen, bana güvenen ve yardımcı olan annem Mefaret TAŞTAN, babam Doğan TAŞTAN, anneannem Solmaz YILMAZ’a, bu hayattaki yolculuğuma beraber başladığım kardeşim Burçin TAŞTAN’a,

Bana olan karşılıksız sevgisi ve inancı, tez sürecimdeki her türlü desteği için Nilsu AŞKIN’a,

Projeyi maddi açıdan destekleyen TÜBİTAK’a teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Bora TAŞTAN

DİMETİL FUMARAT'IN MİKROGLİAL HÜCRELERDE NLRP3 İNFLAMAZOM AKTİVASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Bora TAŞTAN, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilimler Ana Bilim Dalı, 35340, İnciraltı, İzmir

ÖZET

İnflamazom aktivasyonu klasik inflamatuvar yanıtlardan farklı olarak başlayan ve gelişen bir süreçtir. Mikrobiyal ajanların yanı sıra Adenozin Trifosfat(ATP) gibi metabolik stres ürünleri veya asbestos , silika gibi dış uyaranların etkisiyle de oluştuğu bilinmektedir. İnflamazom aktivasyonu hücrelerden Kaspaz-1 aracılığı ile interlökin-1beta (IL-1beta), interlökin-18 (IL-18) sitokinlerinin salınımı ile sonlanmaktadır. Bu süreçte inflamazom aktivasyonu hücrenin piroptotik yolla ölümüne de neden olabilir. Dolayısıyla inflamazom aktivasyonun baskılanması gereklidir. Dimetil Fumarat (DMF) anti-inflamatuvar ve pro-metabolik etkileri olan bir moleküldür. Fumarik asidin metil esteri olarak da bilinen DMF'nin Multipl skleroz'da klinik parametrelerde iyileşme sağladığı ve atak sıklığını azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca mikrogial hücrelerle aynı kökenden gelen THP-1 monosit hücre hattında inflamazom aktivasyonunu baskıladığı saptanmıştır. Çalışmamızda DMF'nin N9 mikrogial hücre hattında inflamazom aktivasyonuna etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, N9 mikrogial hücrelerine Lipopolisakkarit (LPS) ve ATP uygulaması ile NOD benzeri reseptör ailesi pyrin domain içeren protein 3 (NLRP3) inflamazom aktivasyonu oluşturuldu. İlk önce DMF'nin toksik olmayan, inflamazom aktivasyonunda etkili dozu belirlendi. Sonrasında inflamazom aktivasyonu göstergeleri mRNA düzeyinde real-time PCR, protein düzeyinde ELISA ve immüno blot yöntemleri ile incelendi. Ayrıca mitokondriyal Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve mitokondriyal membran potansiyeli akış sitometrisi, İmmünflorasan boyama (IF) ve florometrik yöntemlerle incelendi. Sonuçlarımıza göre DMF, LPS + ATP modeli ile NLRP3 inflamazom aktivasyonu gerçekleştirilen N9 mikrogial hücrelerinde, Kaspaz-1 aktivitesini ve IL-1beta ve IL-18 sitokinlerinin salınımı baskıladı. Ayrıca, inflamazom ilişkili proteinlerin ekspresyonunu ve inflamazom aktivasyonu sonucunda görülen piroptotik hücre ölümünü azalttı. Bunların yanı sıra, mitokondriyal ROS miktarını baskılayıp ve mitokondriyal membran potansiyelinin bozulmasını önledi.

Bu çalışma DMF'nin mikrogial hücrelerde inflamazom aktivasyonunu baskıladığını gösteren ilk çalışmadır.

Anahtar kelimeler: Dimetil Fumarat, Mikroglia, NLRP3 inflamazom, piroptoz, LPS, ATP

THE EFFECTS OF DIMETHYL FUMARATE ON NLRP3 INFLAMMASOME ACTIVATION IN MICROGLIAL CELLS

Bora TAŞTAN, Dokuz Eylul University, Institute of Health Sciences, Department of
Neuroscience, 35340, İnciraltı, İzmir

ABSTRACT

Inflammasome activation is a developing process differently from classical inflammatory responses. It has been known that inflammasome activation occurs by both microbial agents and the effects of some metabolic stress products (Adenosine triphosphate (ATP) and external agents like asbestos, Inflammasome activation is a process that is initiated by Interleukin-1beta (IL-1beta), Interleukin-18 (IL-18) cytokines production from activated cells and terminated by caspase-1 activation. In this process, inflammasome activation may cause cell death via pyroptotic pathway. Therefore, inflammasome activation is needed to be inhibited. Dimethyl fumarate (DMF) is anti-inflammatory molecule that has pro-metabolic effects. DMF, known as also methyl ester of fumaric acid, has been shown that it provided improvement for multiple sclerosis in clinical parameters and decreased frequency of attacks. And also, it has been established that DMF inhibited inflammasome activation in THP-1 monocyte cells which came from same ancestor of microglial cells. In our work, observing effects of DMF to inflammasome activation in N9 microglial cells has been aimed. In this regard, NOD-like receptor family, pyrin domain containing protein 3 (NLRP3) inflammasome activation in N9 microglial cells was initiated with lipopolysaccharide (LPS) and ATP model. Firstly, the effective and non-toxic dose of DMF was determined. After that, inflammasome activation parameters were observed with real-time PCR for mRNA level, ELISA and Western-blotting for protein level. Additionally, mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) production and mitochondrial membrane integrity were analyzed via flow cytometry, immunofluorescence (IF) and fluorometric analyses. Consequently, DMF significantly suppressed LPS + ATP induced NLRP3 inflammation, decreased Caspase-1 activity, secretion of IL-1beta and IL-18 cytokines, and reduced the rate of pyroptotic cell death resulting from inflammasome activation. Furthermore, the level of mitochondrial ROS was declined and mitochondrial membrane integrity was restored. This study is the first to demonstrate that DMF is effective to suppress the NLRP3 inflammasome activation in microglial cells.

Keywords: Dimethyl Fumarate, Microglia, NLRP3 Inflammasome, Pyroptosis, LPS, ATP

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikroglial hücreler Santral Sinir Sistemi (SSS)'nin ana inflamatuvar hücreleridir. Mikroglial hücreler patojenik veya patolojik uyaranlar ile aktif hale gelmektedir. İnflamazom aktivasyonu klasik immun yanıtlardan farklı mekanizmalarla aktive olan sitozolik protein kompleksidir. İnflamazom aktivasyonunun dokuya zarar verecek düzeye geldiğinde, hücrelerin hasardan korunması için baskılanması gereklidir. Dimetil Fumarat (DMF) ise anti-inflamatuvar ve sitoprotektif etkilere sahip bir kimyasaldır. Bu çalışmanın amacı DMF'nin, Lipopolisakkarit (LPS) ve Adenozin Trifosfat (ATP) ile NOD benzeri reseptör ailesi pyrin domain içeren 3 (NLRP3) inflamazom aktivasyonundaki etkisini incelemektir.

Çalışmamızda, N9 mikroglial hücre hattı kullanıldı. Mikroglial hücrelerde NLRP3 inflamazom aktivasyonu LPS + ATP uygulanarak gerçekleştirildi. DMF'nin NLRP3 inflamazom aktivasyonuna belirteçlerine etkisi protein ve mRNA ekspresyon düzeyinde incelendi. IL-1beta ve IL-18 düzeyi ELISA yöntemiyle belirlendi. Ayrıca IL-1beta, Kaspaz-1 ve NLRP3 proteinlerin düzeyleri immüno blot yöntemi ile analiz edildi. mRNA seviyesinde ise IL-1beta, IL-18 ve NLRP3 düzeyleri Real time PCR yöntemi kullanılarak incelendi. Kaspaz-1 aktivitesi ayrıca hazır kitle analiz edildi. NLRP3 inflamazom sonucu görülen piroptotik hücre ölümü, Laktat Dehidrojenaz (LDH), Cell Counting Kit-8 (CCK-8) ve Propidium iyodür (PI) boyaması yapılarak incelendi. Mitokondriyal membran potansiyeli JC-1 boyaması ile mitokondriyal ROS oluşumu MitoSOX boyaması ile incelendi.

Bu çalışma sonunda elde edilen bulgular DMF'nin mikroglial hücrelerde NLRP3 inflamazom aktivasyonunu ve bu aktivasyonla indüklenen piroptotik hücre ölümünü baskıladığını ortaya koymuştur.

H1: LPS ve ATP ile uyarılan N9 fare mikroglial hücrelerinde DMF NLRP3 inflamazom aktivasyonunu baskılar.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikroglia

Mikroglial hücreler oldukça hareketli fagositik makrofajlardır. Yetişkin bir insanda beyin ve omuriliğin tüm bölgelerinde bulunup, Santral Sinir Sistemindeki (SSS) hücrelerin %10-15'ini oluştururlar (Mittelbronn ve ark., 2001). Mikroglial hücreler nöronların gelişimini ve normal yapısal ve fonksiyonel süreçlerini sürdürmelerine katkıda bulunurlar (Singhal ve Baune, 2017). Doğal bağışıklık sisteminin bir üyesi olan mikroglial hücrelerin başlıca görevi, ölmekte olan veya strese girmiş hücrelerden salınan hasara-bağlı moleküler kalıplar (Danger-associated molecular patterns - DAMP) gibi yaralanma belirteçleri için mikro ortamı araştırmaktır. Mikroglial hücreler, bu belirteçleri fark ettikleri zaman fagositik ve sitotoksik mekanizmalar yoluyla, makrofajlar gibi bu tehlikeleri ortadan kaldırırlar. Ayrıca antijen sunumu ve sitokin salınımı özellikleri sayesinde inflamasyon ve homeostatik mekanizmalara katkıda bulunur (Cai ve ark., 2014).

2.1.1. Mikroglia Tarihçesi ve Kökeni

Nöroglia kavramı ilk olarak Virchow tarafından 1846'da kullanılmış olup nöroglia hücrelerini nöronları birbirine bağlayan yapışkan bir madde olarak tanımlanmıştır ancak nöroglia 'nın astrositler, oligodendrositler ve mikroglialardan oluştuğu bilinmemektedir. (Garcia-Marin ve ark., 2007). Mikroglial hücrelerin, diğer neuroglial hücrelerden farklı bir gelişimsel kökene sahip olması özelleşmiş bir makrofaj popülasyonu olarak resmen tanınması için 150 yıldan daha fazla bir araştırma gerekmiştir (Wieghofer ve ark., 2015). Pio Del Rio-Hortega, SSS' de fagositik ve göç eden hücreleri tanımlayan ilk kişi idi ve bunların mezodermal kaynaklı olabileceğini öne sürdü. Birkaç yıl içinde "Mikroglia" terimini tanıttı ve bu hücreleri SSS'nin nöronal olmayan, astrositik olmayan elementleri olarak yeniden tanımladı (Kabba ve ark., 2017). Mikroglia, periferden göç etmiş ve mezodermal / mezenkimal kökenli progenitör hücrelerden gelmektedir. Makrofajlarla olan morfolojik ve fenotipik benzerlikleri Hortega'nın hipotezini desteklemektedir (Perez-Cerda ve ark., 2015).

2.1.2. Mikroglia Fenotipleri

Aktive edilmiş mikroglia M1 ve M2 şeklinde sınıflandırılır (Walker ve Lue, 2015). M1 mikroglia fenotipi amoeboid şekli, yüksek mobilitesi ve güçlü fagositik kapasitesi ile karakterize edilmiştir. M1 polarize mikroglia pro-inflamatuar sitokinlerin Tümör Nekroz Faktörü alfa (TNF- α), İnterlökin-1beta (IL-1beta), İnterlökin-6(IL-6), İnterlökin-12(IL-12), İnterlökin-23(IL-23), Nitrik Oksit (NO), sitotoksik maddeler, Reaktif Oksijen Türleri (ROS), Kinolinik asit, Prostaglandin E2 (PGE2), C-C motif kemokin 2 (CCL2), kemokinler ve glutamatların düzensiz salımı gerçekleştirebilir (Mahad ve Ransohoff, 2003; Loane ve Byrnes, 2010). M1 polarize mikroglia, yüzeylerinde CD86, CD16 / 32, CD40, CD74 ve C-C kemokin reseptör 7 (CCR7) eksprese etmektedir. Böylece karakterizasyonu kolayca yapılabilir (Peferoen ve ark., 2015). M2 mikroglia fenotipi ise ince ve dallanmış hücrelerle karakterize edilmiştir. Ayrıca IL-10 ve Transforme edici Büyüme Faktörü beta (TGF- β), fibronektin gibi hücre dışı matriks molekülleri gibi anti-inflamatuar molekülleri salgılamaktadır (Nimmerjahn ve ark., 2005). M2 polarize mikroglia, remodeling, anti-inflamatuar yanıt ve doku hasarının tamirinden sorumludur (David ve Kroner, 2011; Raj ve ark., 2014; Michell-Robinson ve ark., 2015). Ayrıca M2 polarize mikrogliyal hücrelerin, oligodendrosit farklılaşmasını uyardığı da bilinmektedir (Miron ve ark., 2013). M2 polarize mikroglia, IL-10 gibi anti-inflamatuar sitokinleri salgılar ve CD206, C-C motif kemokin 22 (CCL22) ve Arjinaz1 (ARG1) eksprese eder (Peferoen ve ark., 2015).

2.1.3. Mikroglia Fonksiyonları

Mikrogliyal hücreler, SSS'de bir temizleyici olarak görev yapar ve SSS'deki homeostazı sağlamada önemli fonksiyonlara sahiptir. Mikrogliyal hücreler bu fonksiyonları yerine getirirken gelişme, erişkinlik ve yaşlanma dönemlerinde farklı fonksiyonları sürdürmektedirler. Gelişmekte olan beyinde mikroglia, sinaps oluşumu ve sinaptik remodeling ve plastisite için gereklidir (Tremblay ve ark., 2010). Yetişkin SSS'de mikroglia, homeostaz, bakım ve gözetim, nöron ve doku onarımı işlevini yerine getirir. Hasarlı ajanları, apoptotik hücreleri ve yanlış katlanmış proteinlerin yıkımından sorumludur (Sierra ve ark., 2010; Kettenmann ve ark., 2011). Dahası, Purkinje hücrelerinin gelişimsel apoptozunu indüklemeye ve nöronlarda programlı ölüm sinyallerinin indüksiyonunda aktif bir rol oynamaktadır (Marin-Teva ve ark., 2011).

Mikroglial hücreler bu görevlerini yerine getirirken fagositoz yapmaktadırlar. Mikroglial hücrelerin fagositoz aktivitesi ile ilişkili iki farklı reseptör türü vardır. Bunlar birincil inflamasyonu uyaran patojenlerin tanınmasını sağlayan Toll-benzeri reseptörler (TLR) ve anti-inflamatuar yanıt için önem taşıyan Myeloid hücrelerde eksprese olan reseptör-2 (TREM2) reseptörleridir (Fu ve ark., 2014). TLR'lerin stimülasyonu ve patojenlerin yutulması pro inflammatuar bir tepkiye neden olurken, apoptotik maddenin çıkarılması ve fosfatidilserin kalıntılarının tanınması anti-inflamatuar bir yanıt üretir. Multipl Skleroz (MS) hayvan modelinde yapılan çalışmalarda, TREM2'nin koruyucu bir işlevi olduğu gösterilmiştir (Piccio ve ark., 2007). Ayrıca TREM2'de ki varyasyonların Parkinson Hastalığı (PH), Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) ve Alzheimer Hastalığı (AH) riskini önemli ölçüde artırdığını göstermiştir (Pottier ve ark., 2013; Rayaprolu ve ark., 2013; Cady ve ark., 2014) .

Mikroglia normal beyin fonksiyonu için gereklidir; Bununla birlikte, kontrolsüz ve aşırı aktifleşmiş mikroglia nörotoksisiteyi tetikleyebilir. Aktive edilmiş mikroglia tarafından salınan glutamat hücre dışı otonom nöronal hasara katkıda bulunur (Takeuchi ve ark., 2011). Aktive edilmiş mikroglia, Nikotin Adenin Dinükleotit Hidrojen Fosfat (NADPH) oksidaz vasıtasıyla ROS üretebilir ve kan beyin bariyeri (KBB) fonksiyonunda bozulmayı indükleyebilir (Tremblay ve ark., 2010).

İnterlökin-3 (IL-3) ve IL-10, nörotrofin-4/5, Sinir Büyüme Faktörü (NGF), TGF- β , glia kaynaklı nörotrofik faktör, fibroblast büyüme faktörü-2 gibi aktive edilmiş mikroglial hücreler tarafından üretilen birçok nörotrofik faktör nöronal sağkalımı etkiler (Nakajima ve ark., 2007).

Mikroglial hücreler, sinaptik fonksiyon ve sinaptik olgunlaşmayı kontrol etmektedir (Bilimoria ve Stevens, 2015). Mikroglial hücreler, sinir prekürsör hücre havuzlarını düzenler. Ayrıca, nöronlara dönüşen nöronal prekürsör hücreler gereğinden fazla sinaps oluşturdıklarında, mikroglial hücreler bu sinapsları elimine etmekle görevlidir (Cunningham ve ark., 2013). Mikroglial P2X4 reseptörleri nöron hasarından sonra ağrı hipersensitivitesi için kritik öneme sahiptir (Beggs ve ark., 2012).

2.1.4. Nörodejeneratif Hastalıklarda Mikroglia

Mikroglial hücrelerin aşırı aktivasyonu ve mikroglial hücrelerdeki hasar, mikroglial hücrelerin pro-inflamatuar sitokinler salınımına bu da nörodejeneratif hastalıkların patogenezeine katkıda bulunmasına yol açar (Lull ve Block, 2010).

AH, en sık görülen nörodejeneratif hastalık olup, kognitif işlev bozukluğuna neden olmaktadır. Hastalık tau hiperfosforilasyonu, nörofibriler yumak varlığı ve Amiloid-beta ($A\beta$) plakların varlığı ile karakterize edilmiştir (Scheltens ve ark., 2016). $A\beta$ plaklar, mikroglia hücrelerindeki reseptörlere bağlanarak mikroglial hücrelerin aktivasyonuna yol açabilir (Cherry ve ark., 2014). Yapılan birçok çalışmada, aktive edilmiş mikroglial hücrelerin oranının, kognitif bozukluk seviyesiyle doğrudan ilişkisi olduğu gösterilmiş olup, $A\beta$ plakların varlığı TNF- α , İnterferon gama (IFN- γ), IL-1beta, IL-6, IL-18 ve NO gibi pro-inflamatuar sitokinlerin üretilmesine yol açmıştır. (von Bernhardt ve ark., 2010; Wang ve ark., 2015).

PH en yaygın görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır. Hastalık Substantia Nigra (SN) dopaminerjik (DA) nöronlarında dejenerasyonu , α -synüklein plakları ve hareket bozuklukları ile karakterizedir (Kalia ve Lang, 2015). Yapılan çalışmalarda PH hastalarında aktive edilmiş mikroglial hücrelerin varlığı gösterilmiştir (Gerhard ve ark., 2006). Hastalığın patogenezeine katılan α -synüklein mikroglial hücreleri aktifleştirmektedir (Su ve ark., 2008). IL-1beta, TNF- α ve IL-6 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonları PH hastalarının BOS ve serumunda yüksek olduğu gösterilmiştir. (Hunot ve Hirsch, 2003; Long-Smith ve ark., 2009). Ayrıca DA nöronlarının ölümü, mikroglial hücreleri aktive eder ve aktive edilen mikroglial hücrelerin hastalığın patogenezeine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Dutta ve ark., 2008).

ALS, üst ve alt motor nöronların prematüre dejenerasyonu ile karakterize, yetişkin başlangıçlı ölümcül nörodejeneratif bir hastalıktır (Salameh ve ark., 2015). Süperoksit dismutaz 1 (SOD1) mutasyonları ailesel ALS'nin temel nedenidir. Yapılan çalışmalarda, Aktive edilmiş mikroglial hücrelerin varlığı hem ALS hastalarında hem de insan mutant SOD1 genini aşırı ekspresyonunun gözlemlendiği transgenik farelerde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Magnus ve ark., 2008; Liao ve ark., 2012) .Aktive edilmiş mikroglial hücrelerin ALS patolojisindeki rolü ve nasıl aktive edildikleri belirsizdir. Fakat yapılan çalışmalar, mSOD1 eksprese eden aktive edilmiş mikroglial hücrelerin hastalık başlangıcı ve ilerlemesine katkıda bulunduğunu göstermektedir (Boillee ve ark., 2006).

2.2. İnflamazom

2.2.1. İnflamazom Aktivasyonu

Normal koşullar altında, bağışıklık sistemi kendine yabancı olanı, patojenleri, ölü veya ölmekte olan hücreleri tanıma, canlı ve sağlıklı hücrelerden ayırt etme yeteneğine sahiptir (Poon ve ark., 2010). İmmün sistemin bu özelliği sayesinde vücut kendi kendine immün yanıt oluşturmaz ve yakındaki dokularda olası hasarı önlenmiş olur (Poon ve ark., 2010). Birincil yanıt oluşturan bağışıklık sisteminin görevleri mikropları saptamak ve fark etmek, immün yanıtları koordine etmek, patojenlere ve ölen hücrelerden gelen sinyallere karşı koruma sistemleri oluşturmaktır. Vücuda yabancı olan hücre veya moleküller bağışıklık sistemi hücreleri tarafından membrana bağlı ya da sitoplazmik reseptörler olan “patern tanıyan reseptörler (PRRs)” tarafından tanınırlar. Bu reseptörler RIG-benzeri reseptörler (RLRs), C-tip lektin reseptörleri, purinerjik reseptörler, TLR ve NOD-benzeri reseptörlerdir (NLRs) (He ve ark., 2016; Prochnicki ve ark., 2016). Bağışıklık sistemi yüksek-mobilite group box 1 (HMGB1), Adenozin Trifosfat (ATP), ısı şok proteini-60 (Hsp60) gibi hücresel kaynaklı DAMP’lar ile ayırt etme özelliğine sahiptir (Ciraci ve ark., 2012)

İnsanda 23, farede 34 çeşidi bulunan NLR’ler hücrelerin sitoplazmasında bulunurlar (Kumar ve ark., 2011). NLR’ler üç ana bölgeden oluşur (He ve ark., 2016; Prochnicki ve ark., 2016). NLR’ler N ucundaki bölgenin çeşitlerine göre (NLRA, NLRB, NLRC, NLRP ve NLRX olmak üzere beş ana grupta toplanır (Kersse ve ark., 2011). Her bir grupta yer alan alt tipler farklı sinyalleri tanımak üzere özelleşmiştir. Örneğin, NLRP1 anthrax lethal toksini; NLRC4 bakteriyel fragellini ve NOD benzeri reseptör ailesi pyrin domain içeren 3 (NLRP3) ekzojen ve endojen zararlı ve patojenik molekülleri örneğin; DAMP’lar ve patojen ilişkili moleküler kalıplar (Pathogen associated molecular patterns -PAMP) tanıyarak inflamazom komplekslerini oluştururlar (He ve ark., 2016; Prochnicki ve ark., 2016).

2.2.2. İnflamazom Aktivatörleri

ATP en yaygın bilinen NLRP3 inflamazom aktivasyonuna neden olan ajandır (Burnstock, 2016). Purinerjik ATP kanalları ligand bağımlı katyonik kanallardır ve purinerjik reseptörlerin (P2X7) ekzojen ATP ile aktive olmasının makrofajların sitozollerinden potasyum salınımını

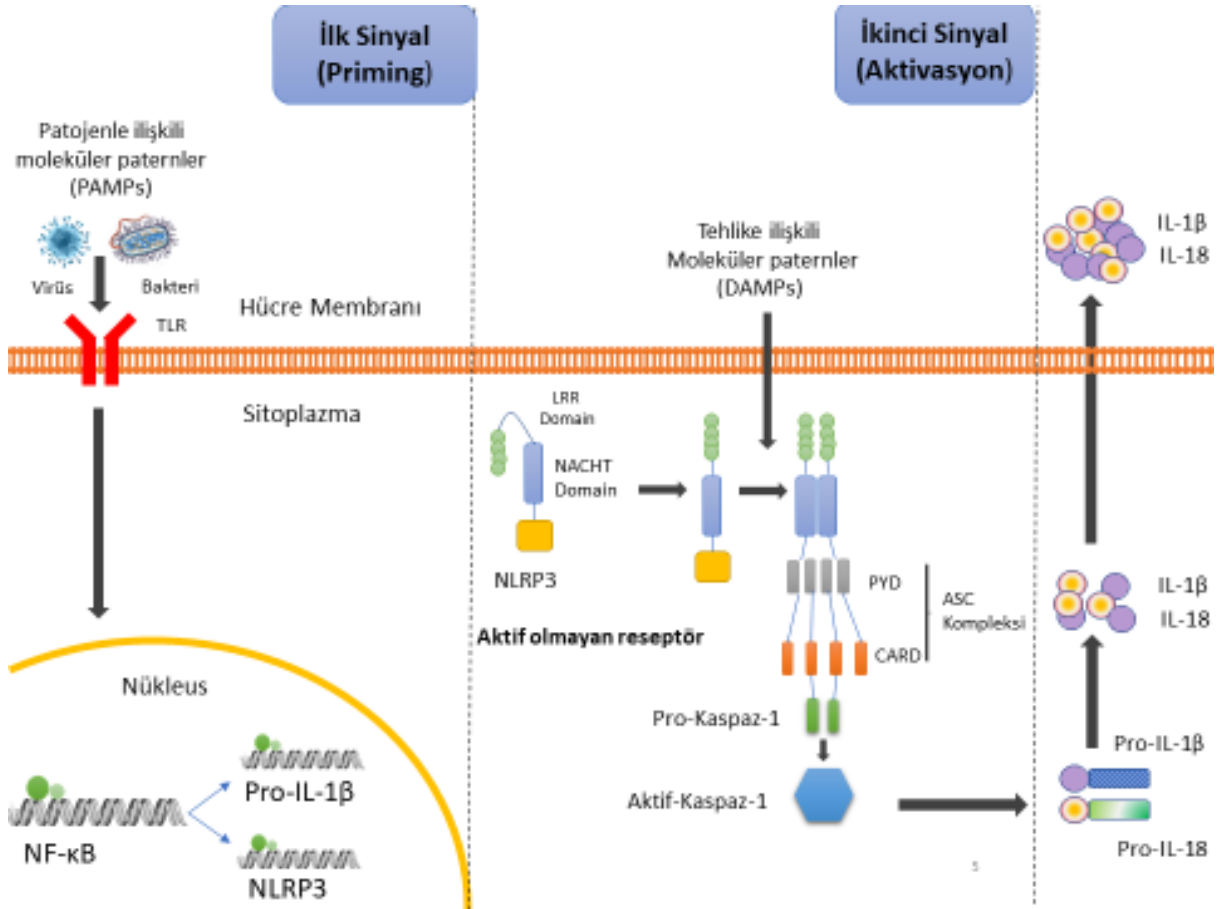
tetiklediği gösterilmiştir (Beamer ve ark., 2016; Burnstock, 2016). Sitozoldeki düşük potasyum konsantrasyonlarının pro-kaspaz-1'in aktif hale getirilmesinde ve pro-IL-1beta'nın olgunlaştırılmasında görevli olduğu bilinmektedir (Rivers-Auty ve Brough, 2015).

Bakteri kaynaklı muramil dipeptidin NLRP3 reseptörleri ile direkt olarak etkileşimde bulunduğu gösterilmiştir (Martinon ve ark., 2004). Ayrıca por oluşumuna neden olan toksinlerin hücre membranını geçirgenleştirip direkt olarak potasyum salınımına neden olduğu ve diğer katyonların (H^+ , Na^+ ve Ca^{+2}) değişimine neden olarak inflamazomu aktive ettiği bilinmektedir (Prochnicki ve ark., 2016). NLRP3 inflamazom kompleksinin oluşmasını fagositoz ile hücreye alınan bazı kristal yapıda moleküller (asbest, silika, alüminyum gibi) ve hücre türevli zararlı moleküller (ürik asit, kolesterol kristalleri gibi) de tetikleyebilir (Ciraci ve ark., 2012). Bu kristallerin düzgün olmayan fagositozu sonucunda lizozomlar parçalanabilmektedir. Katepsin B gibi lizozomal enzimlerin sitozole salındığı ve inflamazom aktivasyonuna sebep olabileceği gösterilmiştir (Kersse ve ark., 2011; He ve ark., 2016). Monosodyum ürat monohidrat (MSU) kristallerinin akuaporin su kanallarından suyun pasif geçişiyle ve osmolaritenin Na^+ salınımı ile kompanse edilmesiyle sitozoldeki potasyum konsantrasyonunu düşürdüğü öne sürülmektedir (Shi ve ark., 2010; Rock ve ark., 2013).

ROS mitokondriyal solunumun yan ürünleri olarak sağlıklı hücrelerde tolere edilebilir seviyelerde üretilmektedir (Minutoli ve ark., 2016; Yu ve Lee, 2016). ATP asbest, silika kristalleri gibi bazı uyaranlar büyük miktarlarda ROS oluşumunu tetikleyerek inflamazom aktivasyonuna yol açmaktadır (Prochnicki ve ark., 2016). ROS üretiminin NLRP3 inflamazom komponentlerinin ekspresyonunda gerekli olduğu gösterilmiştir (Kersse ve ark., 2011; Prochnicki ve ark., 2016).

NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu üç ana mekanizma tarafından düzenlenmektedir. NLRP3 agonist olarak bilinen ATP, P2X7 purinerjik reseptör bağımlı pannexin-1 hemikanalında por oluşumunu tetikleyerek diğer hücre dışı NLRP3 agonistlerinin sitozole girmesini ve NLRP3 inflamazomu ile direkt olarak etkileşmesini indükler. Ayrıca, kristal yapıdaki NLRP3 agonistleri hücre tarafından alınır ve fiziksel özellikleri nedeniyle düzgün bir fagositoz süreci gerçekleşemez ve lizozomal parçalanma yaşanır. Bunun sonucu olarak örneğin Katepsin-B enziminin sitozolde bulunması direkt olarak NLRP3 inflamazomunun ligandı olarak algılanır ve inflamazom aktive olur, ayrıca bütün DAMP ve PAMP'lar ROS oluşumunu tetikler ve ROS bağımlı yoldan NLRP3 inflamazomu aktive olur. Bütün bu mekanizmaların sonucunda kaspaz-

1 enzim aktivitesine bağı olarak pro inflamatuvar sitokinler olan IL-1beta ve IL-18 olgunlaşır ve hücre dışına salınır (Şekil 1).



Şekil 1. NLRP3 inflamazom Aktivasyonu: NLRP3 inflamazom kompleksi PAMP ve DAMP'ları algılayarak aktif hale gelmektedir. NLRP3, ASC ve de Kaspaz-1 proteinleri bir araya gelerek oluşan NLRP3 inflamazom kompleksi aktive olduktan sonra, komplekste bulunan Kaspaz-1 proteini, hücre içinde bulunan pro-IL1beta ve pro-IL-18 sitokinlerinin kesimini gerçekleştirerek, bu sitokinlerin matür hale gelip salınmasını sağlar (NACHT (nöral apoptoz inhibitör protein (NAIP)); CARD, kaspaz recruitment domain; LRRs, lizin zengin tekrarlar; PYD, pyrin domain.)

2.2.3. İnflamazom Fonksiyonları ve Bağışıklık Sistemine Katkısı

Pro-inflamatuvar IL-1beta ve IL-18 sitokinlerinin salınmasında ve inflamazom komplekslerinin oluşmasında NLR'ler önemli rol oynarlar. Bir diğer reseptör çeşidi olan TLR'ler nükleer faktör-kappa B (NF-κB) sinyal yoluyla bu sitokinlerin pro-formlarının ekspresyonunu gerçekleştirirler (Kersse ve ark., 2011). İnaktif kaspaz-1 enzimi kesilerek aktif hale geçmesinde ve bu enzimin

pro-IL-1beta (35 kDa) sitokininin hücre dışına salınacak hale getirmesinde NLRP3 inflamazomunun proteolitik aktivite gösteren multiprotein kompleks yapısı rol oynar (Kumar ve ark., 2011). Hücre dışına salınan olgun IL-1beta sitokini immün hücrelerdeki IL-1 reseptörlerine bağlanarak yerel etkilere, lenfosit aktivasyonu gibi, yol açabileceği şekilde ateş yükselmesi ve akut faz protein indüklenmesine de sebep olmaktadır (Guarda ve So, 2010; Kersse ve ark., 2011). Buna ek olarak IL-1beta, tamir mekanizmalarını aktifleştirerek anjiyogenezi ve hücre kalıntıların temizlenmesi için nötrofilleri de indüklediği gibi T hücrelerinin proliferasyonuna da neden olduğu bilinmektedir (Guarda ve So, 2010; Tschopp ve Schroder, 2010). İmmün aktivasyondan farklı olarak inflamazom aktivasyonu enfekte ya da hasarlı olan hücrenin ölümünü indükleyerek biyolojik bir fonksiyon gösterir.

2.2.4. Mikroglialda İnflamazom

Mikroglial hücreler merkezi sinir sisteminde birincil yanıt oluşumunda rol oynayan ve NLR ve TLR'leri eksprese eden myeloid kökenli hücrelerdir (Hanamsagar ve ark., 2012). Mikroglial hücrelerde inflamazom aktivasyonunu gösteren ilk çalışmalardan birinde A β 'nin mikroglial hücrelerde *in vitro* kaspaz-1 ve Katepsin B bağımlı yolla NLRP3 inflamazom aktivasyonunu indüklediği gösterilmiştir (Halle ve ark., 2008). Mikroglial hücrelerin NLRP3 yokluğunda onarıcı özellikteki M2 fenotipine döndürülmesi ve fagositoz yaparak A β akümüülasyonunu engellediği AH'nin genetik modelinde gösterilmiştir (Heneka ve ark., 2013). İnflamazom aktivasyonunun inhibisyonunun AH'de yeni bir tedavi şekli olabileceği görüşü bu sonuçlarla desteklenmiştir.

Transgenik fare ALS modelinde mutant SOD'un mikroglial hücrelerde IL-1beta salınımı ile sonlanan inflamazom aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Meissner ve ark., 2010). Ayrıca Kaspaz-1 ya da IL-1beta mutasyonlarının SOD defektif farelerde hastalık seyrini yavaşlattığı bulgusu ALS'de inflamazom aktivasyonunun baskılanmasının bir tedavi seçeneği olabileceği düşünülmüştür.

Daha sonra yapılan *in vivo* pek çok çalışmada mikroglial hücrelerde inflamazom aktivasyonunun hastalıkların patogeneze katıldığı ortaya konmuştur (Freeman ve Ting, 2016). *In vitro* çalışmalarda da alfa-synuclein, prion peptid ve ATP gibi farklı uyarıların mikroglial

hücrelerde inflamazom aktivasyonu yaptığı gösterilmiştir (Shi ve ark., 2012; Codolo ve ark., 2013).

2.3. Dimetil Fumarat ($C_6H_8O_4$)

2.3.1. Genel Bilgiler

Dimetil Fumarat (DMF) (IUPAC ismi trans-1,2-etilendikarboksilik asit dimetil ester), fumarik asidin türevi olup birçok oto-immün hastalıkta anti-inflamatuar etkileri nedeniyle yeni bir tedavi molekülü olarak kullanılmaktadır (Phillips ve Fox, 2013). Fumarik asit tuzları ve esterleri fumaratlar olarak bilinen kimyasal bileşikler oluşturur. Bu bileşikler toprak dumanı (*Fumaria officinalis*) de dahil olmak üzere bazı bitkilerde ve mantarlarda doğal olarak bulunur (Linker ve Gold, 2013). Tıptaki ilk kullanımı 1959'da Alman biyokimyacı Schweckendiek tarafından gerçekleştirilmiştir (Schweckendiek, 1959). Schweckendiek kronik inflammatuar bir cilt hastalığı olan sedef hastalığına sahipti ve bu hastalığın fumarik asit eksikliğinden kaynaklandığına inanmaktaydı. Bu yüzden kendi üzerinde gerçekleştirdiği deney sonucu Fumarik asitlerin sedef hastalığında kullanılabileceğini gösterip daha sonra fumarik asitlerin biyoyararlılığını ve toleransını optimize etmek, ilacın oral yollardan alınımını mümkün kılmak için çalışmıştır (Papadopoulou ve ark., 2010). 30 yıldan fazla bir süre sonra sedef hastalığında fumarik asit kullanımı için klinik çalışmalar gerçekleştirildi (Salmen ve Gold, 2014). Bu çalışmaların sonucunda, 1994 yılında Almanya'da DMF içeren “Fumaderm” adlı ilaç piyasaya sürüldü (Mrowietz ve ark., 1999). Daha sonra Relapsing Remitting MS (RRMS) hastalarında yapılan pilot çalışmayla (n=10) DMF'nin MS hastalığında kullanılabileceği gösterilmiştir (Schimrigk ve ark., 2006).

2.3.2. Farmakolojik Özellikleri

Oral alımdan sonra DMF, bağırsağın alkali ortamında esteraazlar tarafından hidrolize edilerek aktif metabolit olan Mono Metil Fumarat (MMF) haline hızla dönüştürülür. Dimetil fumarat bağırsak duvarından geçemez ve bu nedenle, ana metabolit olarak MMF vücutta aktif bileşik olarak kabul edilir (Ruggieri ve ark., 2014). Tamamen absorbe edildikten sonra, MMF kısa sürede serum pik konsantrasyonlarına ulaşır ve CNS de dahil olmak üzere tüm organlara eşit

şekilde dağılır. MMF, Krebs döngüsünde, su ve karbondioksit metabolize olur ve solunum yoluyla vücuttan atılır. Ayrıca az miktarda da olsa idrar ve dışkı ile atılımı sağlanır (Linker ve Gold, 2013).

2.3.3. Multipl Skleroz Hastalığında Dimetil Fumarat

İmmün modülatör olarak DMF, MS hastalığında 2006 yılında kullanılmaya başlamıştır (Schimrigk ve ark., 2016). DMF'nin klinik etkinliği, RRMS evresindeki hastalarda, iki büyük Faz III klinik çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmalardan ilki DEFINE (RRMS de Oral Fumaratın Etkinliği ve Güvenilirliğinin Belirlenmesi) ikincisi ise CONFIRM (RRMS de Oral Fumarat: Plasebo Kontrollü Faz 3 MS'de Oral Dimetil Fumarat veya Glatiramer Çalışması) çalışmasıdır (Fox ve ark., 2012; Gold ve ark., 2012).

DEFINE çalışması; çift kör (Double Blind), Plasebo kontrollü ve çok merkezli yürütülmüş bir çalışmadır. Bu çalışmada 1:1:1 oranında randomize edilen RRMS hastaları (n=1,237) günde iki doz 240 mg DMF, günde üç doz 240 mg DMF ve plaseboyu oral olarak almışlardır. Çalışmanın birincil sonlanım noktası, 2 yılın sonunda tekrarlayan hastaların oranı olmuştur. İkincil sonlanım noktası ise, yıllık tekrarlama oranı (ARR), disabilite ilerlemesi ve T2 lezyonlarını içeren çeşitli MRG parametreleri göz önüne alınarak belirlenmiştir. Sonuçlara göre, birincil sonlanım noktasında atak evresine giren hastaların oranı her iki DMF grubunda da plaseboya göre daha düşük gözlenmiştir (günde iki doz DMF ile % 27, günde üç doz DMF ile % 27, plasebo ile % 46). ARR oranları da plaseboya kıyasla azalmıştır (günde iki doz DMF grubunda 0.17, günde üç doz DMF grubunda 0.19, plasebo grubunda 0.36). Ayrıca disabilite artışı, T2 lezyonlarının sayısı ve büyüklüğünde iki DMF grubunda da plaseboya göre anlamlı bir azalma görülmüştür (Gold ve ark., 2012).

CONFIRM, çalışması; çift kör, Plasebo kontrollü ve çok merkezli yürütülen başka bir çalışmadır. RRMS hastaları; oral plasebo, günde iki doz 240 mg dimetil fumarat, günde üç doz 240 mg dimetil fumarat ve 20 mg Glatiramer asetat (GA) deri altı enjeksiyonu için 1: 1: 1: 1 oranında randomize edildi (n = 1,430). Çalışmanın birincil sonlanım noktası, 2 yıldaki ARR oranı, ikincil sonlanım noktası ise, atak olan hastaların oranı, 2 yıldaki sakatlık ilerlemesi ve T2 lezyonlarını içeren çeşitli MRG parametreleriydi. 2 yıl sonra, ARR, DMF ve GA tedavi gruplarında, plasebo grubuna göre daha düşük saptandı (günlük iki doz DMF için 0.22, günlük

üç doz DMF için 0.20; GA için; 0,29, plasebo için 0.40). Ayrıca T2 lezyonlarının sayısı ve büyüklüğünde iki DMF grubu ve GA grubunda da plaseboya göre anlamlı bir azalma görüldü. DMF veya GA tedavi grupları ile plasebo arasındaki disabilite artışında anlamlı bir farklılık bulunmadı (Fox ve ark., 2012). Bu iki çalışma DMF'nin belirgin bir yan etkisi olmadığı, hastalığın klinik progresyonunu yavaşlattığını ve immun yanıtları baskıladığı gösterilmiştir (Schimrigk ve ark., 2016).

Bu klinik çalışmalar yanı sıra DMF'nin MS'in hayvan modeli olan deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) klinik bulguları ve medulla spinaliste inflamatuvar hücre infiltrasyonu baskıladığı gösterilmiştir (Chen ve ark., 2014; Miljkovic ve ark., 2015). Ayrıca immun hücrelerde IL-17 ve IFN- γ düzeyinde azalmaya yol açmıştır (Chen ve ark., 2014). Diğer bir çalışmada EAE' de İnterferon-beta (IFN- β) ile birlikte kullanımı klinik ve histolojik skorlarda daha belirgin düzelme sağlamıştır (Reick ve ark., 2014).

2.3.4. Dimetil Fumarat ve İnflamasyon

DMF'nin anti-inflamatuvar etkilere sahip olduğu daha önce yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmalarda DMF, pro inflamatuvar sitokin salınımlarını, NF- κ B sinyallemesini baskılamıştır (Loewe ve ark., 2002; Schilling ve ark., 2006).

DMF'nin monosit kökenli dentritik hücrelerde, THP-1 insan myelomonositik hücrelerinde, monosit-türevli makrofajlarda ve T-lenfositlerinde NF- κ B yolağını inhibe etmiştir. TNF- α IL-1beta ve IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımını baskılamasıyla anti-inflamatuvar etkileri olduğu gösterilmiştir (Cross ve ark., 2011; Peng ve ark., 2012; Gill ve Kolson, 2013; Miglio ve ark., 2015).

DMF, santral sinir sisteminin immun hücreleri olan hem astrositte hem de mikroglia da anti-inflamatuvar etki göstermektedir. Astrositte pro-inflamatuvar etkileri olan TNF- α , IL-1beta, IL-6 ve NO RNA düzeyinde baskılamaktadır (Wilms ve ark., 2010; Miljkovic ve ark., 2015). Başka bir çalışmada DMF'nin astrositlerde inflamatuvar yanıtları transkripsiyon faktörü olan Nükleer faktör-E2-ilişkili faktör 2 (Nrf2) yolağı ve histon deasetilaz ekspresyonunu düzenleyerek yaptığı gösterilmiştir (Kalinin ve ark., 2013). DMF'nin BV2 mikroglial hücrelerde TNF- α , PGE2 ve nitriti azaltığı bildirilmiştir (Foresti ve ark., 2013). Diğer bir çalışmada, DMF Lipopolisakkarit (LPS) ile aktive edilmiş primer mikroglia hücrelerinde, ERK

fosforilasyonu aracılığı ile pro inflamatuvar yanıtlar olan indüklenen nitrik oksit sentaz (INOS), TNF- α , IL-1beta ve IL-6 sitokin salınımını azalttığı gösterilmiştir (Wilms ve ark., 2010).

2.3.5. Dimetil Fumarat ve İnflamazom

DMF'nin sitoprotektif, antioksidan ve anti-inflamatuvar özelliklere sahip olduğunu gösteren yeteri kadar çalışma vardır. Fakat DMF'nin inflamazom aktivasyonu üzerindeki etkileri yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarla gösterilmiştir. DMF'nin NLRP3 inflamazom aktivasyonu üzerindeki etkileri mikrogial hücrelerle aynı kökenden gelen makrofaj hücre hattında gösterilmiştir. Yapılan çalışmada, THP-1 hücrelerinde LPS ve ATP ile NLRP3 inflamazom aktivasyonu indüklenmiş olup, DMF, aktivasyon sonucu salınan IL-1beta sitokininin seviyesini azaltmıştır. Ayrıca Kaspaz-1 aktivitesi ve Kaspaz-1 aktivitesine bağlı görülen piroptotik hücre ölümünü önlediği gösterilmiştir (Miglio ve ark., 2015). Yapılan başka bir çalışmada, Dekstran Sülfat Sodyum (DSS) ile indüklenen deneysel kolit fare modelinde, DMF'nin NLRP3 inflamazom aktivasyonu üzerine baskılayıcı etkileri gösterilmiştir (Liu ve ark., 2016). Çalışma DSS ile indüklenen kolit sonucunda IL-1beta, NLRP3 ve Kaspaz-1'in Messenger RNA (mRNA) ve protein seviyeleri serumda ve bağırsak dokusunda artış göstermiş olup DMF bu mRNA ve protein seviyelerini baskılamıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Çalışma deneysel (*in vitro*) bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışmamız Haziran 2017 ile Aralık 2017 tarihleri arasında 9 Eylül Üniversitesi İzmir Biyotıp ve Genom Merkezinde (İBG) yürütüldü.

3.3. Çalışma Materyali

Araştırmada N9 fare mikrogial hücre hattı kullanıldı.

3.4. Çalışmanın Değişkenleri

Bağımsız değişken: LPS (1 µg/ml) + ATP (5 mM) ve DMF (10 µM) uygulaması

Bağımlı değişken: Hücre canlılık ve ölüm oranları, ROS seviyesi, İnflamatuar sitokinlerin (IL-1beta ve IL-18) ve NLRP3 protein ve mRNA seviyesi, hücre ölüm tipi

3.5. Veri Toplama Araçları

3.5.1. Hücre Kültürü

Çalışmamızda Dr. Paola Ricciardi-Castagnoli (Cellular Pharmacology Center, Milano, İtalya) tarafından sağlanan N9 fare mikrogial hücre hattı kullanıldı. C-myc transkripsiyon faktörünün overekpresyonu ile immortalize edilmiş olan N9 hücre hattının, primer fare mikrogia kültürünü temsil ettiği daha önce gösterilmiştir (Righi ve ark., 1989). Hücre kültürü için, %10 Fötal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum; FBS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml

streptomisin içeren RPMI 1640 hücre kültür ortamı kullanıldı. Hücreler, 75 cm² lik flasklarda, 37°C ve 5% CO₂ koşullarına sahip inkübatörde idame ettirildi.

DMF, LPS ve ATP ile yaptığımız uygulamalarda ise Fötal Sığır Serumı içermeyen, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren RPMI 1640 hücre kültür ortamı kullanıldı. Hücre kültürü ortamları hazırlanırken sterilize veya otoklavlanmış şişe kullanılarak yeteri kadar RPMI 1640 ortamı konuldu. Daha sonra yine yeterli miktarlarda L-Glutamin, penisilin ve streptomisin ilave edildi. Fötal Sığır Serumı 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek karışıma eklendi. Hazırlanan ortam pipetaj yardımıyla homojen bir hale getirildi. Homojen ortamın bulunduğu şişe parafilm yardımıyla sarıldı ve de 4°C 'de muhafaza edildi.

Hücreler, Inverted faz kontrast mikroskobu ile kontrol edilip, sağlıklı ve konfluent hücrelerin pasajı, 75 cm² büyüklüğündeki hücre kültür flasklarına, haftada 3 kere olacak şekilde, %0.05 Trypsin/EDTA ile yapıldı. Bunun için, hücrelerin içinde bulunduğu flask dik konuma getirilmiş daha sonra flask içerisindeki ortam hücrelerin bulunduğu yüzeye dikkat edilerek 10 ml serolojik pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. 5 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkama yapıldı ve PBS uzaklaştırıldı. Ardından, 3 ml Trypsin/EDTA flaska eklendi ve flask inkübatöre kaldırıldı. 5 dakika beklemeden sonra, inkübatörde alınan flask kabine geri getirildi. Hücrelerin iyi bir şekilde kalkmasını sağlamak için flaskın tabanına birkaç kere vurulduktan sonra flask dik bir şekilde konuldu. Bundan sonra 7 ml komplet ortam 10 ml serolojik pipet yardımıyla flaska eklendi. Hücreler 10 ml serolojik pipetle 15 ml hacimli falkon tüpe alındı ve de 1500 rpm hızda 5 dk boyunca santrifüj işlemi uygulanarak hücreler çöktürüldü. Supernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet 2 ml komplet ortam ile birçok kez pipetaj yapılarak suspanse edildi. Suspanse edilen hücreler Thoma lamında sayıldı. Hücre sayımı sonuçlarına göre planlanan deney için önerilen yoğunlukta hücre ekimi yapıldı. Deney yapılmayacaksa hücreler 1/6 oranında pasajlandı. Pasajlama yapılan flask "Hücre Hattı / Pasaj Numarası / Pasaj Oranı / Pasaj Tarihi" bilgilerini gösterecek şekilde kayıt altına alındı. Kayıt altına alınan flask inkübatöre kaldırıldı.

3.5.2. *In vitro* Deneyler

3.5.2.1. Laktat Dehidrogenaz (LDH) ve CCK-8 Testi İçin *in vitro* Deney

İlk gün, inkübatörden alınan flask faz kontrast mikroskobunda kontrol edildi. Pasajlama için yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler, 3.5.1'de ki gibi hücreler flasktan kaldırıldı. Kaldırılan

hücreler Thoma lamında sayıldıktan sonra, 96 kuyucuklu plağa kuyucuk başına 1×10^4 hücre ve 200 µl son hacim olacak şekilde ekildi. Her koşul için 5 kuyucuğa ekim yapıldı. Boş kontrol olarak kullanılmak üzere 3 ayrı kuyucuğa sadece ortam konuldu. Ekimi yapılan 96 kuyucuklu plak inkübatöre kaldırıldı.

İkinci gün, önce deneyde kullanılacak olan ortam hazırlandı. Fötal Sığır serumu içermeyen ve L-Glutamin, Penisilin ve Streptomisin içeren renksiz RPMI 1640 ortam hazırlandıktan sonra su banyosunda ısıtılarak deney için uygun hale getirildi. Daha sonra 96 kuyucuklu plak inkübatörden alınarak deneye başlandı.

Öncelikle kontrol, maksimal salınım, LPS+ATP ve DMF + LPS + ATP gruplarındaki ortamlar vakum aracılığıyla çekildi. Daha sonra kontrol, maksimal salınım ve LPS+ATP gruplarına FBS içermeyen renksiz deney ortamı konuldu. DMF + LPS + ATP grubuna ise kuyucuk başına 100 µl hacminde 10 µM DMF eklendi ve 1 saat boyunca bu grup inkübe edildi. 1 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS + ATP grubundaki ortam çekilerek, kuyucuk başına 150 µl hacminde 1 µg/ml LPS içeren deney ortamı eklendi. Yine DMF + LPS + ATP grubuna kuyucuk başına 50 µl hacminde 3 µg/ml LPS (son konsantrasyon= 1 µg/ml) ve 10 µM DMF içeren deney ortamı eklendi ve hücreler 4 saat boyunca inkübe edildi. 4 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS + ATP grubuna kuyucuk başına 50 µl hacminde 20 mM ATP (son konsantrasyon= 5 mM) ve 1 µg/ml LPS içeren deney ortamı eklendi. Yine DMF + LPS + ATP grubuna ise 50 µl hacminde 20 mM ATP (son konsantrasyon= 5 mM) , 1 µg/ml LPS ve 10 µM DMF içeren deney ortamı eklendi ve bu basamakta tüm koşullardaki kuyucukların son hacimleri 200 µl' ye eşitlenmiş oldu. Karışımlar eklendikten sonra hücreler 1 saatlik inkübasyona tabi tutuldu.

Inkübasyon bitiminden sonra inkübatörden alınan hücreler, hücre ölümü ve canlılık değerlendirmeleri için sırasıyla Laktat Dehidrogenaz (LDH) ve Cell Counting Kit-8 (CCK-8) testlerine tabii tutuldu.

3.5.2.2. ELISA Yöntemiyle IL-1beta ve IL-18 Sitokinlerinin Analizi İçin *in vitro* Deney

İlk gün inkübatörden alınan flask faz kontrast mikroskopunda kontrol edildi. Pasajlama için yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler, 3.5.1'de ki gibi Tripsin/EDTA uygulaması ile flasktan kaldırıldı. Daha sonra kaldırılan hücreler Thoma lamında sayıldıktan sonra, modelimizin

koşullarına göre 96 kuyucuklu plaklara, her kuyucuğa 5×10^4 hücre son hacim 200 µl olacak şekilde her koşul için 5 kuyucuğa ekim yapıldı. Ekimi yapılan 96 kuyucuklu plaklar inkübatöre kaldırıldı.

İkinci gün kullanılacak olan deney ortamı hazırlandı. FBS içermeyen ve L-Glutamin, Penisilin ve Streptomisin içeren renksiz RPMI 1640 ortam hazırlandıktan sonra su banyosunda ısıtılarak deney için uygun hale getirildi. Daha sonra 96 kuyucuklu plak inkübatörden alınarak deneye başlandı.

Öncelikle kontrol, LPS+ATP ve DMF + LPS + ATP gruplarındaki ortamlar vakum aracılığıyla çekildi. Daha sonra kontrol ve LPS+ATP gruplarına FBS içermeyen renksiz deney ortamı konuldu. DMF + LPS + ATP grubuna ise kuyucuk başına 100 µl hacminde 10 µM DMF eklendi ve 1 saat boyunca bu grup inkübe edildi. 1 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS + ATP grubundaki ortam çekilerek, kuyucuk başına 150 µl hacminde 1 µg/ml LPS içeren deney ortamı eklendi. Yine DMF + LPS + ATP grubuna kuyucuk başına 50 µl hacminde 3 µg/ml LPS (son konsantrasyon= 1 µg/ml) ve 10 µM DMF içeren deney ortamı eklendi ve hücreler 4 saat boyunca inkübe edildi. 4 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS + ATP grubuna kuyucuk başına 50 µl hacminde 20 mM ATP (son konsantrasyon= 5 mM) ve 1 µg/ml LPS içeren deney ortamı eklendi. Yine DMF + LPS + ATP grubuna ise 50 µl hacminde 20 mM ATP (son konsantrasyon= 1 µg/ml), 1 µg/ml LPS ve 10 µM DMF içeren deney ortamı eklendi ve bu basamakta tüm koşullardaki kuyucukların son hacimleri 200 µl' ye eşitlenmiş oldu. Karışımlar eklendikten sonra hücreler 1 saatlik inkübe edildi. Toplam 7 saatlik süreç sonrasında kuyucuklarda ki son hacimleri 200 µl olan plak inkübatörden alındı. Sonrasında ilgili proteinlerin - IL-1beta ve IL-18 - sandviç ELISA kitleri kullanılarak ölçümler yapıldı.

3.5.2.3. İnflamazom İlişkili Sitokinler (IL-1beta ve IL-18) ve NLRP3 mRNA Düzeyinin Belirlenmesi İçin *in vitro* Deney

İlk gün, inkübatörden alınan flask faz kontrast mikroskopunda kontrol edildi. Pasajlama için yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler, 3.5.1'de ki gibi hücreler flasktan kaldırıldı. Kaldırılan hücreler Thoma lamında sayıldıktan sonra, 6 kuyucuklu plağa kuyucuk başına 3×10^5 hücre ve 2 ml son hacim olacak şekilde komplet ortam ile ekildi. Her koşul için 5 kuyucuğa ekim yapıldı. Ekimi yapılan 6 kuyucuklu plaklar inkübatöre kaldırıldı.

İkinci gün, önce kullanılacak olan deney ortamı hazırlandı. FBS içermeyen ve L-Glutamin, Penisilin ve Streptomisin içeren RPMI 1640 ortam hazırlandıktan sonra su banyosunda ısıtılarak deney için uygun hale getirildi. Daha sonra 6 kuyucuklu plaklar inkübatörden alınarak deneye başlandı.

Öncelikle kontrol, LPS+ATP ve DMF + LPS + ATP gruplarındaki ortamlar vakum aracılığıyla çekildi. Daha sonra kontrol ve LPS+ATP gruplarına FBS içermeyen deney ortamı konuldu. DMF + LPS + ATP grubuna ise kuyucuk başına 1 ml hacminde 10 μ M DMF eklendi ve 1 saat boyunca bu grup inkübe edildi. 1 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS + ATP grubundaki ortam çekilerek, kuyucuk başına 1500 μ l hacminde 1 μ g/ml LPS içeren deney ortamı eklendi. Yine DMF + LPS + ATP grubuna kuyucuk başına 500 μ l hacminde 3 μ g/ml LPS (son konsantrasyon= 1 μ g/ml) ve 10 μ M DMF içeren deney ortamı eklendi ve hücreler 4 saat boyunca inkübe edildi. 4 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS + ATP grubuna kuyucuk başına 500 μ l hacminde 20 mM ATP (son konsantrasyon= 5 mM) ve 1 μ g/ml LPS içeren deney ortamı eklendi. Yine DMF + LPS + ATP grubuna ise 500 μ l hacminde 20 mM ATP (son konsantrasyon= 5 mM), 1 μ g/ml LPS ve 10 μ M DMF içeren deney ortamı eklendi ve bu basamakta tüm koşullardaki kuyucukların son hacimleri 2ml'ye eşitlenmiş oldu. Hücreler 1 saat boyunca inkübatörde bekletildi.

İnkübasyondan sonra, 6 kuyucuklu plaklar sırayla hücre kazıyıcısı ile kazınarak hücrelerin kaldırılması sağlandı. Daha sonra emin olmak için faz kontrast mikroskopu ile kontrol yapıldı. Kazınan hücreler 2 ml'lik tüplere içinde bulundukları ortam ile aktarıldı ve 1500 rpm 'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Tüplerde bulunan süpernatant atılarak daha sonra kullanılacak olan RNA izolasyon kitine ait olan lizis solüsyonundan 350 μ l eklendi. Elde edilen lizat pipetleme ve vorteksleme yapılarak homojenize edildi. Elde edilen homojenat daha sonra kullanılmak üzere -80°C ye konuldu.

3.5.2.4. İmmünoblot Yöntemiyle Kaspaz-1, NALP3 ve IL-1beta Protein Düzeylerinin Analizi İçin *in vitro* Deney

İlk gün inkübatörden alınan flask faz kontrast mikroskopunda kontrol edildi. Pasajlama için yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler, 3.5.1'de ki gibi Tripsin/EDTA uygulaması ile flasktan kaldırıldı. Daha sonra kaldırılan hücreler Thoma lamında sayıldıktan sonra, modelimizin

koşullarına göre 75 cm²'lik flasklara, her flaska 3x 10⁶ hücre son hacim 8 ml olacak şekilde her koşul için 5 flaska ekim yapıldı. Ekimi yapılan 75 cm²'lik flasklar inkübatöre kaldırıldı.

İkinci gün önce kullanılacak olan deney ortamı hazırlandı. FBS içermeyen ve L-Glutamin, Penisilin ve Streptomisin içeren renksiz RPMI 1640 ortam hazırlandıktan sonra su banyosunda ısıtılarak deney için uygun hale getirildi. Daha sonra 75 cm²'lik flasklar inkübatörden alınarak deneye başlandı.

Öncelikle kontrol, LPS+ATP ve DMF + LPS + ATP gruplarındaki ortamlar vakum aracılığıyla çekildi. Daha sonra kontrol ve LPS+ATP gruplarına FBS içermeyen renksiz deney ortamı konuldu. DMF + LPS + ATP grubuna ise flask başına 4 ml hacminde 10 µM DMF eklendi ve 1 saat boyunca bu grup inkübe edildi. 1 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS + ATP grubundaki ortam çekilerek, Flask başına 6 ml hacminde 1 µg/ml LPS içeren deney ortamı eklendi. Yine DMF + LPS + ATP grubuna flask başına 2 ml hacminde 3 µg/ml LPS (son konsantrasyon= 1 µg/ml) ve 10 µM DMF içeren deney ortamı eklendi ve flasklar 4 saat boyunca inkübe edildi. 4 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS + ATP grubuna flask başına 2 ml hacminde 20 mM ATP (son konsantrasyon= 5 mM) ve 1 µg/ml LPS içeren deney ortamı eklendi. Yine DMF + LPS + ATP grubuna ise 2 ml hacminde 20 mM ATP (son konsantrasyon= 5 mM), 1 µg/ml LPS ve 10 µM DMF içeren deney ortamı eklendi ve bu basamakta tüm koşullardaki kuyucukların son hacimleri 8 ml'ye eşitlenmiş oldu. Son karışımlar eklendikten sonra flasklar 1 saat boyunca inkübatörde tutuldu.

Toplam 7 saatlik süreç sonrasında son hacimleri 8 ml olan flasklar inkübatörden alındı. Sonrasında hücreler hücre kazıyıcılar yardımıyla flasklardan kaldırıldı. Kaldırılan hücreler proteinaz inhibitörü içeren 1 ml RIPA solüsyonuna konularak daha sonra kullanılmak üzere - 80°C ye konuldu.

3.5.2.5. Kaspaz Aktivite Testi İçin *in vitro* Deney

İlk gün inkübatörden alınan flask faz kontrast mikroskopunda kontrol edildi. Pasajlama için yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler, 3.5.1'de ki gibi hücreler Tripsin/EDTA uygulaması ile flasktan kaldırıldı. Daha sonra kaldırılan hücreler Thoma lamında sayıldıktan sonra, modelimizin koşullarına göre siyah 96 kuyucuklu plağa, her kuyucuğa 1 x 10⁴ hücre son hacim

200 µl olacak şekilde her koşul için 5 kuyucuğa ekim yapıldı. Ekimi yapılan siyah 96 kuyucuklu plak inkübatöre kaldırıldı.

İkinci gün kullanılacak olan deney ortamı hazırlandı. FBS içermeyen ve L-Glutamin, Penisilin ve Streptomisin içeren renksiz RPMI 1640 ortam hazırlandıktan sonra su banyosunda ısıtılarak deney için uygun hale getirildi. Daha sonra 96 kuyucuklu plak inkübatörden alınarak deneye başlandı. Önce ortamlar vakum aracılığıyla çekildi. Daha sonra kontrol ve LPS+ATP gruplarına FBS içermeyen renksiz deney ortamı konuldu. DMF + LPS + ATP grubuna ise kuyucuk başına 100 µl hacminde 10 µM DMF eklendi ve 1 saat boyunca bu grup inkübe edildi. 1 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS + ATP grubundaki ortam çekilerek, kuyucuk başına 150 µl hacminde 1 µg/ml LPS içeren deney ortamı eklendi. Yine DMF + LPS + ATP grubuna kuyucuk başına 50 µl hacminde 3 µg/ml LPS (son konsantrasyon= 1 µg/ml) ve 10 µM DMF içeren deney ortamı eklendi ve hücreler 4 saat boyunca inkübe edildi. 4 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS + ATP grubuna kuyucuk başına 50 µl hacminde 20 mM ATP (son konsantrasyon= 5 mM) ve 1 µg/ml LPS içeren deney ortamı eklendi. Yine DMF + LPS + ATP grubuna ise 50 µl hacminde 20 mM ATP (son konsantrasyon= 5 mM), 1 µg/ml LPS ve 10 µM DMF içeren deney ortamı eklendi ve bu basamakta tüm koşullardaki kuyucukların son hacimleri 200 µl' ye eşitlenmiş oldu. Karışımlar eklendikten sonra hücreler 1 saatlik inkübasyona tabi tutuldu.

İnkübasyon sonrasında, Kaspaz Aktivite kiti kullanılarak Kaspaz aktivitesi analiz edildi.

3.5.2.6. Piroptotik Ölümün Mikroglia Hücrelerinde Gösterimi İçin *in vitro* Deney

İlk gün inkübatörden alınan flask faz kontrast mikroskopunda kontrol edildi. Pasajlama için yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler, 3.5.1'de ki gibi hücreler flasktan kaldırıldı. Daha sonra kaldırılan hücreler Thoma lamında sayıldıktan sonra, modelimizin koşullarına göre siyah 48 kuyucuklu plağa, her kuyucuğa 3×10^4 hücre son hacim 400 µl olacak şekilde her koşul için 5 kuyucuğa ekim yapıldı. Ekimi yapılan siyah 48 kuyucuklu plak inkübatöre kaldırıldı.

İkinci gün önce kullanılacak olan deney ortamı hazırlandı. FBS içermeyen ve L-Glutamin, Penisilin ve Streptomisin içeren renksiz RPMI 1640 ortam hazırlandıktan sonra su banyosunda ısıtılarak deney için uygun hale getirildi. Daha sonra 48 kuyucuklu plak inkübatörden alınarak deneye başlandı.

Öncelikle kontrol, LPS+ATP ve DMF + LPS + ATP gruplarındaki ortamlar vakum aracılığıyla çekildi. Daha sonra kontrol ve LPS+ATP gruplarına FBS içermeyen deney ortamı konuldu. DMF + LPS + ATP grubuna ise kuyucuk başına 200 µl hacminde 10 µM DMF eklendi ve 1 saat boyunca bu grup inkübe edildi. 1 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS + ATP grubundaki ortam çekilerek, kuyucuk başına 300 µl hacminde 1 µg/ml LPS içeren deney ortamı eklendi. Yine DMF + LPS + ATP grubuna kuyucuk başına 100 µl hacminde 3 µg/ml LPS (son konsantrasyon= 1 µg/ml) ve 10 µM DMF içeren deney ortamı eklendi ve hücreler 4 saat boyunca inkübe edildi. 4 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS + ATP grubuna kuyucuk başına 100 µl hacminde 20 mM ATP (son konsantrasyon= 5 mM) ve 1 µg/ml LPS içeren deney ortamı eklendi. Yine DMF + LPS + ATP grubuna ise 100 µl hacminde 20 mM ATP (son konsantrasyon= 5 mM), 1 µg/ml LPS ve 10 µM DMF içeren deney ortamı eklendi ve bu basamakta tüm koşullardaki kuyucukların son hacimleri 400 µl' ye eşitlenmiş oldu. Hücreler 1 saat boyunca inkübatörde bekletildi.

İnkübasyon sonrasında, PI boyası kullanılarak pirototik ölümü göstermek amacıyla hücreler boyandı ve floresan mikroskopuyla görüntülendi.

3.5.2.7. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Belirlenmesi için *in vitro* Deney

İlk gün inkübatörden alınan flask faz kontrast mikroskopunda kontrol edildi. Pasajlama için yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler, 3.5.1'de ki gibi Tripsin/EDTA uygulaması ile flasktan kaldırıldı. Daha sonra kaldırılan hücreler Thoma lamında sayıldıktan sonra, modelimizin koşullarına göre 25 cm²'lik flasklara, her flaska 1 x 10⁶ hücre son hacim 4 ml olacak şekilde her koşul için 5 flaska ekim yapıldı. Ekimi yapılan 25 cm²'lik flasklar inkübatöre kaldırıldı.

İkinci gün kullanılacak olan deney ortamı hazırlandı. FBS içermeyen ve L-Glutamin, Penisilin ve Streptomisin içeren RPMI 1640 ortam hazırlandıktan sonra su banyosunda ısıtılarak deney

için uygun hale getirildi. Ayrıca her koşul için gereken karışımlar hazırlandı. Daha sonra 25 cm²'lik flasklar inkübatörden alınarak deneye başlandı.

Öncelikle kontrol, LPS+ATP ve DMF + LPS + ATP gruplarındaki ortamlar vakum aracılığıyla çekildi. Daha sonra kontrol ve LPS+ATP gruplarına FBS içermeyen deney ortamı konuldu. DMF + LPS + ATP grubuna ise flask başına 2 ml hacminde 10 µM DMF eklendi ve 1 saat boyunca bu grup inkübe edildi. 1 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS + ATP grubundaki ortam çekilerek, Flask başına 3 ml hacminde 1 µg/ml LPS içeren deney ortamı eklendi. Yine DMF + LPS + ATP grubuna flask başına 1 ml hacminde 3 µg/ml LPS (son konsantrasyon= 1 µg/ml) ve 10 µM DMF içeren deney ortamı eklendi ve flasklar 4 saat boyunca inkübe edildi. 4 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS + ATP grubuna flask başına 1 ml hacminde 20 mM ATP (son konsantrasyon= 5 mM) ve 1 µg/ml LPS içeren deney ortamı eklendi. Yine DMF + LPS + ATP grubuna ise 1 ml hacminde 20 mM ATP (son konsantrasyon= 5 mM), 1 µg/ml LPS ve 10 µM DMF içeren deney ortamı eklendi ve bu basamakta tüm koşullardaki kuyucukların son hacimleri 4 ml'ye eşitlenmiş oldu. Flasklar 1 saat daha inkübatörde bekletildi.

İnkübasyon bitiminden sonra hücrelerin mitokondriyal membran potansiyeli JC-1 boyamasıyla akış sitometrisi uygulanarak analiz edildi.

3.5.2.8. Mitokondriyal Reaktif Oksijen Türlerini İmmünflorasan Boyamayla Belirlenmesi İçin *in vitro* Deney

İlk gün inkübatörden alınan flask faz kontrast mikroskopunda kontrol edildi. Pasajlama için yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler, 3.5.1'de ki gibi Tripsin/EDTA uygulaması ile flasktan kaldırıldı. Daha sonra kaldırılan hücreler Thoma lamında sayıldıktan sonra, modelimizin koşullarına göre siyah 48 kuyucuklu plağa, her kuyucuğa 3 x 10⁵ hücre son hacim 400 µl olacak şekilde her koşul için 5 kuyucuğa ekim yapıldı. Ekimi yapılan siyah 48 kuyucuklu plak inkübatöre kaldırıldı.

İkinci gün önce kullanılacak olan deney ortamı hazırlandı. FBS içermeyen ve L-Glutamin, Penisilin ve Streptomisin içeren RPMI 1640 ortam hazırlandıktan sonra su banyosunda ısıtılarak deney için uygun hale getirildi. Daha sonra 48 kuyucuklu plak inkübatörden alınarak deneye başlandı.

Öncelikle kontrol, LPS+ATP ve DMF + LPS + ATP gruplarındaki ortamlar vakum aracılığıyla çekildi. Daha sonra kontrol ve LPS+ATP gruplarına FBS içermeyen deney ortamı konuldu. DMF + LPS + ATP grubuna ise kuyucuk başına 200 µl hacminde 10 µM DMF eklendi ve 1 saat boyunca bu grup inkübe edildi. 1 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS + ATP grubundaki ortam çekilerek, kuyucuk başına 300 µl hacminde 1 µg/ml LPS içeren deney ortamı eklendi. Yine DMF + LPS + ATP grubuna kuyucuk başına 100 µl hacminde 3 µg/ml LPS (son konsantrasyon= 1 µg/ml) ve 10 µM DMF içeren deney ortamı eklendi ve hücreler 4 saat boyunca inkübe edildi. 4 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS + ATP grubuna kuyucuk başına 100 µl hacminde 20 mM ATP (son konsantrasyon= 5 mM) ve 1 µg/ml LPS içeren deney ortamı eklendi. Yine DMF + LPS + ATP grubuna ise 100 µl hacminde 20 mM ATP (son konsantrasyon= 5 mM), 1 µg/ml LPS ve 10 µM DMF içeren deney ortamı eklendi ve bu basamakta tüm koşullardaki kuyucukların son hacimleri 400 µl' ye eşitlenmiş oldu. Hücreler 1 saat daha inkübatörde bekletildi.

İnkübasyon sonrasında, MitoSOX kiti kullanılarak mitokondriyal ROS miktarını göstermek amacıyla hücreler boyandı ve floresan mikroskopuyla görüntülendi.

3.5.2.9. Mitokondriyal Reaktif Oksijen Türlerini Belirlenmesi için *in vitro* Deney

İlk gün inkübatörden alınan flask faz kontrast mikroskopunda kontrol edildi. Pasajlama için yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler, 3.5.1'de ki gibi Tripsin/EDTA uygulaması ile flasktan kaldırıldı. Daha sonra kaldırılan hücreler Thoma lamında sayıldıktan sonra, modelimizin koşullarına göre siyah 96 kuyucuklu plağa, her kuyucuğa 1 x 10⁴ hücre son hacim 200 µl olacak şekilde her koşul için 5 kuyucuğa ekim yapıldı. Ekimi yapılan siyah 96 kuyucuklu plak inkübatöre kaldırıldı.

İkinci gün kullanılacak olan deney ortamı hazırlandı. FBS içermeyen ve L-Glutamin, Penisilin ve Streptomisin içeren renksiz RPMI 1640 ortam hazırlandıktan sonra su banyosunda ısıtılarak deney için uygun hale getirildi. Daha sonra 96 kuyucuklu plak inkübatörden alınarak deneye başlanıldı.

Öncelikle kontrol, LPS+ATP ve DMF + LPS + ATP gruplarındaki ortamlar vakum aracılığıyla çekildi. Daha sonra kontrol ve LPS+ATP gruplarına FBS içermeyen renksiz deney

ortamı konuldu. DMF + LPS + ATP grubuna ise kuyucuk başına 100 µl hacminde 10 µM DMF eklendi ve 1 saat boyunca bu grup inkübe edildi. 1 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS + ATP grubundaki ortam çekilerek, kuyucuk başına 150 µl hacminde 1 µg/ml LPS içeren deney ortamı eklendi. Yine DMF + LPS + ATP grubuna kuyucuk başına 50 µl hacminde 3 µg/ml LPS (son konsantrasyon= 1 µg/ml) ve 10 µM DMF içeren deney ortamı eklendi ve hücreler 4 saat boyunca inkübe edildi. 4 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS + ATP grubuna kuyucuk başına 50 µl hacminde 20 mM ATP (son konsantrasyon= 5 mM) ve 1 µg/ml LPS içeren deney ortamı eklendi. Yine DMF + LPS + ATP grubuna ise 50 µl hacminde 20 mM ATP (son konsantrasyon= 5 mM), 1 µg/ml LPS ve 10 µM DMF içeren deney ortamı eklendi ve bu basamakta tüm koşullardaki kuyucukların son hacimleri 200 µl' ye eşitlenmiş oldu. Hücreler 1 saat boyunca inkübe edildi. Toplam 7 saatlik süreç sonrasında kuyucuklarda ki son hacimleri 200 µl olan plak inkübatörden alındı.

İnkübasyon bitiminden sonra, MitoSOX kiti kullanılarak mitokondriyal ROS miktarı belirlendi.

3.5.3. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Testi

DMF'nin, inflamazom aktivasyonu sonucu meydana gelen hücre ölümüne etkisi, LDH salınımı yapılarak belirlendi. LDH salınımına Cytotoxicity Detection Kiti (Roche, Almanya) ile bakıldı. Bunun için kontrol grubu ve maksimal salınım grupları kullanıldı. Kontrol grubunda hiçbir ek faktör kullanılmazken, maksimal salınım grubunda hücreler deney sonunda lizis tamponu ile lize edildi ve LDH testi için maksimal ölüm grubu oluşturuldu. Kontrol grubu ve maksimal salınım grupları LPS+ATP ile indüklenen ölümü ve DMF nin bu ölümlere karşı ne kadar koruyucu olduğunun hesaplanmasında kullanıldı. Sonrasında bütün kuyucuklardan 100 µl süpernatant yeni bir 96 kuyucuklu plağa aktarıldı. Kit ile beraber gelen LDH deteksiyon solüsyonundan örnek başına 100 µl konuldu. Örnekler oda sıcaklığında 15 dakika boyunca inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda örnekler çoklu plak okuyucusunda Varioskan (Thermo, ABD) 490 nm ve referans olarak da 620 nm dalga boyunda okutma yapıldı. Yüzde hücre ölümü aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

% Sitotoksosite = (Bulunan absorbans- Kontrol absorbans) / (Maksimal Salınım Absorbansı- Kontrol absorbansı) X 100

3.5.4. CCK-8 Testi

DMF' nin hücre canlılığına etkisinin ölçülmesinde CCK-8 (Sigma Aldrich, St. Louis, ABD) kullanıldı. CCK-8 testi WST-8 (2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-Tetrazolyum, Monosodyum tuzunun indirgenmesi ile turuncu renk vermektedir. Bu reaksiyon hücresel dehidrojenazlar tarafından gerçekleştirilir ve WST-8 1-metoksi PMS'in varlığında turuncu formazanın oluşmasına yol açar.

İnkübasyon bitiminde, kuyulardan 100 µl kadar LDH testi için süpernatant alındıktan sonra, WST-8 solüsyonundan her kuyucuğa 10 µl konuldu. İki saat sonra absorbanslar çoklu plak okuyucusunda (Varioskan, Thermo, ABD) 450 nm ve 620 nm referans dalga boyunda okutuldu. Yüzde hücre canlılığı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

%Viabilite=(Bulunan absorbans/Maksimum absorbans)X100

3.5.5. ELISA Yöntemiyle IL-1beta ve IL-18 Sitokinlerinin Analizi

DMF'nin mikrogial hücrelerde inflamazom aktivasyonuna etkileri, IL-1beta ve IL-18 sitokin düzeylerinin miktarlarının belirlenmesi ile yapıldı. Sandwich ELISA (Ebioscience, Viyana, Avusturya) hazır kitleri IL-1beta ve IL-18 sitokinlerinin analizi için kullanıldı.

İlk olarak, hazır kitlerin içinde bulunan standart solüsyonu hazırlandı. Standart 1 ml steril su ile çözüldü. Çözülen standart ana stok olarak hazırlandı ve konsantrasyonu 1000 pg/ml'dir. Bu solüsyon daha sonra seri dilüsyon yapılarak 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,5 pg/ml ve 15.6 pg/ml konsantrasyonlarına seyreltildi. Tüm bu konsantrasyonlar standart eğri çizmek için kullanıldı. Deney sonucunda elde edilen örnekler, kullanılmadan önce 1:15 oranında seyreltildi. Seyreltilen örneklerden 100 µl kullanıldı. Örnekler IL-1beta ve IL-18 kaplı hazır Sandwich ELISA plaklarına eklendi ve 2 saat boyunca inkübasyona maruz bırakıldı. İnkübasyondan sonra plaklar yine kitle beraber gelen yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Yıkamadan sonra, her kuyuya 100 µl biyotin konjuge solüsyonu eklendi ve plaklar yeniden 1

saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tekrardan yıkama işlemi tekrarlandı. Daha sonra, her kuyuya 100 µl HRP-Avidin solüsyonu eklenerek plak tekrardan 30 dakika boyunca inkübasyonda tutuldu. Bu inkübasyondan sonra, tekrardan yıkama yapıldı. Bu sefer plak yıkama solüsyonuyla 3 - 5 defa yıkandı. Yıkamadan sonra son olarak her kuyuya 100 µl substrat eklendi ve plak 15 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlık bir ortamda inkübasyonda tutuldu. İnkübasyondan sonra örneklerin renk dönüşümleri kontrol edildi ve kuyu başına 100 µl stop solüsyonu eklendi. Plagın 450 ve 620 nm dalga boylarında okuması çoklu plak okuyucu yardımıyla yapıldı.

3.5.6. İnflamazom İlişkili Sitokinlerin (IL-1beta ve IL-18) ve NLRP3 için mRNA Düzeyinin Belirlenmesi

3.5.6.1. RNA İzolasyonu

DMF'nin inflamazom aktivasyonuna etkileri, Real time PCR (RT-PCR) yöntemi kullanılarak IL-1beta, IL-18 ve NACHT, LRR ve PYD domainleri içeren Protein 3 (NALP3) mRNA düzeyleri tayin edilerek incelendi. Bunun için öncelikle Total RNA, Nucleospin RNA izolasyon kiti (Macherey – Nagel, Düren, Almanya) ile izole edildi. İzolasyon için örnek başına 350 µl LBP lizis solüsyonundan eklendi. Lizis solüsyonu eklenen örnekler pipetleme ve daha sonra vorteksleme ile iyice parçalandı. Parçalanmış örnekler kitle beraber gelen gDNA temizleme kolonu kullanılarak 30 saniye boyunca 11,000 x g de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolondan geçen sıvıya 100 µl Binding solution eklendi ve de vorteksleme ve pipetleme ile iyice karıştırıldı. Bundan sonraki adımda üzerlerine Binding solution eklenen örnekler RNA Plus kolonuna aktarıldı. RNA plus kolonları 15 saniye boyunca 11,000 g de santrifüj edildikten sonra kolondan geçen sıvı atıldı ve kolonu yıkama işlemine geçildi. Öncelikle mavi kolon 200 µl WB1 solüsyonu ile 5 saniye boyunca 11,000 g de santrifüj edildi. Daha sonra mavi kolon yeni bir 2 ml hacminde toplama tüpüne yerleştirildikten sonra 600 µl WB2 solüsyonu eklenerek 15 saniye boyunca 11,000 g de santrifüj edildi. Bu basamaktan sonra kolon bir kez daha 250 µl WB2 solüsyonu eklenerek 2 dakika boyunca 11,000 g de santrifüj edildi. Yıkama işlemi bittikten sonra yeni bir toplama tüpüne yerleştirilen mavi kolona 30 µl nükleaz içermeyen su eklendi ve 1 dakika boyunca 11,000 x g de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında aynı işlem tekrarlanarak RNA'nın elüsyonu tamamlandı.

Elüsyon sonrasında RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometrik ölçüm yöntemiyle, Nanodrop cihazı aracılığıyla analiz edildi. A260/A280 ve A260/A230 oranları kontrol edilen RNA örneklerinden değerleri 1,8 ile 2,2 arasında olan örnekler kullanıma uygun olarak kabul edildi ve daha sonra kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

3.5.6.2. cDNA Sentezi

RNA izolasyonu sonrasında, RNA'larını elde ettiğimiz örneklerden iScript (Bio-Rad, ABD) Komplementer DNA (cDNA) sentez kitiyle cDNA sentezi yapıldı. Sentezleme sırasında, bir reaksiyon 1 µg RNA, 4 µl iScript Reaksiyon karışımı, 1 µl iScript Reverse Transkriptaz enzimi ve de 14 µl nükleaz içermeyen su eklendi. Reaksiyonun toplam hacmi 20 µl'ye ayarlandı. Örnekler termal döngü cihazında reaksiyona sokuldu. Reaksiyon 3 dakika 25°C'de priming, 20 dakika 46°C'de reverse transkripsiyon ve de 1 dakika 95°C'de RT inaktivasyon şeklinde kuruldu. Reaksiyon tamamlandığında ise örnekler termal döngü cihazından alınarak daha sonra kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

3.5.6.3. RT-PCR Analizi

cDNA sentezlenmesinden sonra, elde edilen cDNA'lar ile RT-PCR analizi yapıldı. RT-PCR analizi için GoTaq qPCR (Promega, ABD) kiti kullanıldı. Bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Öncelikle, kitin içinde bulunan qPCR master karışımı buz üzerinde çözülde. Çözölme işleminden sonra RT-PCR için reaksiyon kuruldu. Reaksiyon kurulurken, reaksiyon başına 10 µl hacminde SYBR green içeren 5X Master karışımı, 1 µl forward ve 1 µl reverse primer, 2 µl cDNA ve de 6 µl nükleaz içermeyen su kullanıldı. RT-PCR analizi için Light Cycler 1.5 (Roche, Almanya) cihazı kullanıldı. İnflamazom markörleri olan IL-1beta, IL-18 ve NLRP3 mRNA'larına spesifik primerler ile analiz yapıldı. Analiz yapılırken ayrıca Housekeeping gen olan Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) kullanılarak örnekler arasında normalizasyon sağlandı. Reaksiyon, 10 dakika 95°C, 10 saniye 60°C ve 30 saniye 72°C şeklinde 40 döngü olarak yapıldı. RT-PCR analizi bittikten sonra, reaksiyonun kalite kontrolü erime eğrisi analiziyle sağlandı. Daha sonra gruplar arasındaki ekspresyon değişimleri $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile hesaplandı.

Tablo 1: Primer Listesi

IL-1beta	F	5'-TTCTTTTCCTTCATCTTTGAAGAAG-3'
	R	5'-TCCATCTTCTTCTTTGGGTATTGTT-3'
IL-18	F	5'-GAAGAACACTTGGCCCTGAG-3'
	R	5'-TTTCACAGGCATGTGGTAGC-3'
NALP3	F	5'-TGCCTGTTCTTCCAGACTGGTGA-3'
	R	5'-CACAGCACCTCATGCCCGG-3'
GAPDH	F	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
	R	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

3.5.7. İmmüno blot Yöntemiyle Kaspaz-1, NALP3 ve IL-1beta Proteinlerinin Analizi

DMF'nin inflamazom aktivasyonuna etkisini protein düzeyinde göstermek için, inflamazom proteini olan NALP3, aktivasyon için gerekli olan Kaspaz-1 enzimi, bu proteinlere özel antikorlar kullanılarak analiz edildi. Bu proteinlerin yanında, hem hücre içi hem de salınan IL-1beta sitokini, uygun antikor kullanılarak tayin edildi. BCA protein analiz yöntemi ile örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi. Protein örnekleri, SDS-PAGE jel ile ayrılanıp, PVDF (poliviniliden diflorür) membranına aktarıldı. Membrana uygulanan bloklama işleminden sonra, örnekler Kaspaz-1, NALP3, IL-1beta ve kontrol protein olan Beta-aktin antikoruyla inkübe edildi. İmmüno blot işlemi yapılırken, Kaspaz-1 ve IL-1betanın hem pro-formlarına hem de olgun formları analiz edildi. Bunun için proteinlerin iki formunu da tayin edebilecek farklı antikorlar kullanılmıştır. Daha sonra, örnekler Horseradish Peroxidase (HRP) ile işaretli sekonder antikor ile inkübe edildi. Görüntüleme, kemiluminesans yöntemine dayanan ECL kiti kullanılarak yapıldı. Görüntüler, UVP jel dokümantasyon sistemi yardımıyla alındı. Band yoğunlukları ImageJ programı kullanılarak dansitometrik analizi yapıldı. Supernatantta ki proteinlerin sonuçları dansitometrik olarak, hücre içi proteinler ise aktin bandına oranlanarak olarak verildi.

Tablo 2: Antikor Listesi

IL-1beta	Abcam	Ab-9722	Anti-Rabbit
NALP3	Adipogen	Ag-20b-0014-c100	Anti-Mouse
Kaspaz-1	Abcam	Ab-1872	Anti-Rabbit
Beta-Aktin	Abcam	Ab-8727	Anti-Rabbit

3.5.8. Kaspaz-1 Aktivite Testi

Hücresel kaspaz-1 aktivitesi, Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay (Promega, Madison, ABD) kitiyle, üretici tarafından sağlanan protokole göre ölçülmüştür. , Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay kiti, Ac-YVAD-CHO isimli Kaspaz-1 inhibitörünü kullanmaktadır. Bu inhibitörün kullanılması, Kaspaz-1 aktivitesini %99 oranında düşürürken diğer Kaspaz enzimlerinin aktivitesinde büyük bir değişikliğe neden olmaz. Bu sebepten dolayı Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay kiti Kaspaz-1 aktivitesini spesifik bir şekilde analizi etmemizi sağlamıştır.

Deney sırasında, 96 kuyucuklu plakta yapılan deneyde, kuyularda 200 µl olan toplam hacim her kuyudan 100 µl hacim mikro pipet yardımıyla dikkatlice çekilip atılarak 100 µl son hacmine düşürüldü. Daha sonra, kuyu başına 100 µl Caspase-Glo® 1 solüsyonu eklendi. 96 kuyucuklu plak, oda sıcaklığında 30 dk. – 1 saat kadar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında Kaspaz-1 aktivitesi üreticinin protokolüne göre ölçülmüştür. Absorbans luminometre (Berthold Technologies Centro XS3 LB 960) ile okunmuştur. Sonuçlar kontrole göre oranlanarak verilmiştir.

3.5.9. Piroptotik Ölümün Mikroglia Hücrelerinde Gösterimi

Deney modelinin tamamlanmasından sonra 48 kuyucuklu plak inkübatörden alındı. Kuyu başına 50 µg/ml PI boya eklendi ve 15 dakika boyunca hücreler boya ile inkübe edildi. Daha sonra boyanan hücreler floresan mikroskopuyla görüntülendi. Her bir kuyudan 20X büyütmede 5 alan fotoğraflandı. Bu fotoğraflardan ImageJ programı ile PI pozitif hücreler sayıldı.

3.5.10. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin JC-1 Boyama ile Belirlenmesi

DMF'nin mitokondriyal membran potansiyeline etkisi JC-1(Thermo Fisher, ABD) boyaması ile akış sitometrisinde analiz edildi. Deney modelinin tamamlanmasından sonra flasklar inkübatörden alındı ve tripsin/EDTA uygulamasıyla hücreler kaldırıldı. Faz kontrast mikroskopuyla hücreler kontrol edildikten sonra örnekler 15 ml hacmindeki tüplere toplandı. Tüpler 5 dakika boyunca 1500 rpm de santrifüj edildi. Sonrasında süpernatantlar atıldı ve hücre pelletleri PBS ile çözülerek yıkandı. Yıkanan hücreler tekrar aynı koşullarda santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatantları atılan örnekler 500 µl 1X Binding Bufferda çözüldü. Bundan sonra her örneğe 5 µl JC-1 boyası eklendi ve örnekler 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyonda tutuldu. İnkübasyon sonrasında hücreler, örnek başına en az 1×10^4 hücre sayımı yapılacak şekilde akış sitometrisinde analiz edildi.

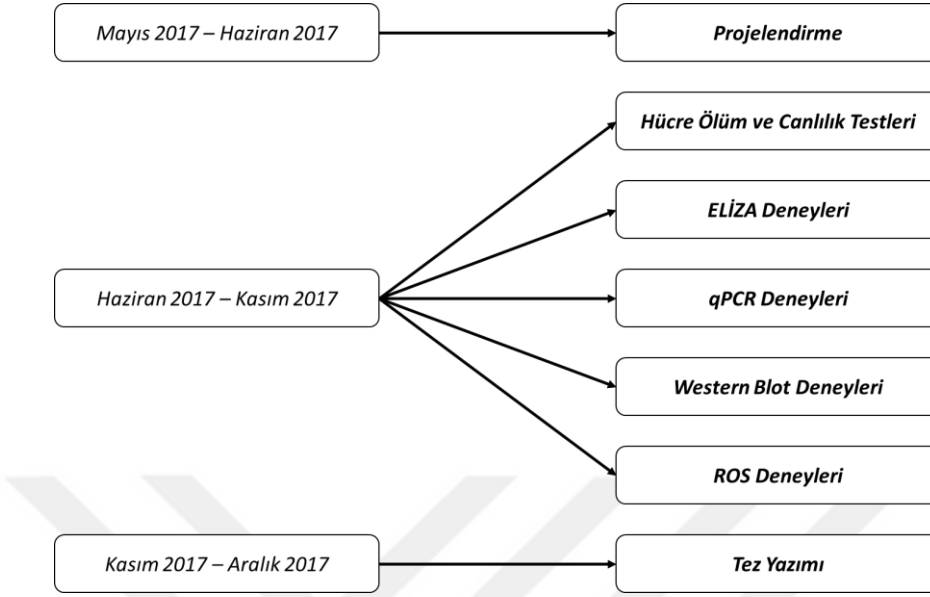
3.5.11. Mitokondriyal Reaktif Oksijen Türlerini MitoSOX Boya ile Belirlenmesi

Deney modelinin tamamlanmasından sonra mitokondriyal süperoksit seviyesi, MitoSOX (Thermo Fisher, ABD) boyamasıyla ölçüldü. Hücreler MitoSOX ile 15 dakika boyunca boyandı. Boyama bittikten sonra, 96 kuyucuklu plağın 510 ve 580 nm dalga boylarında okuması çoklu plak okuyucu yardımıyla yapıldı.

3.5.12. Mitokondriyal Reaktif Oksijen Türlerini İmmunhistokimyasal Boyamayla Belirlenmesi

Deney modeli tamamlandıktan sonra, mitokondriyal süperoksit seviyesi, MitoSOX (Thermo Fisher, ABD) boyaması ile gösterildi. Hücreler MitoSOX ile 15 dakika boyunca boyandı. Boyama bittikten sonra, hücreler floresan mikroskop aracılığıyla görüntülendi.

3.6. Araştırma Planı ve Takvimi:



3.7. Verilerin Değerlendirilmesi:

Araştırma sonuçlarının analizleri Graphpad Prism 7.0 programı kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata biçiminde verildi. Gruplar arası karşılaştırma yapmak için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi tüm değerlendirmelerde $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları:

Tez çalışmamızda ki sınırlılıklardan ilki, çalışmanın N9 mikroglia hücre hattında yapılmış olmasıdır. Primer mikroglia hücrelerinin N9 hücre hattıyla benzerlikleri olsa da çalışma sonuçlarımızın primer mikroglia hücrelerinde konfirme edilmesi uygundur. Diğer yandan çalışmanın *in vivo* olarak tekrarlanması gerekmektedir. Çalışmamızda ki diğer bir sınırlılık ise, çalışmalar yapılırken sadece NLRP3 inflamazom aktivasyonun çalışılmasıdır. Diğer inflamazom türlerinin de dikkate alınarak çalışılması uygun olacaktır. Son olarak DMF'nin gösterdiği etkileri hangi yollar üzerinden gerçekleştirdiği bilinmemektedir. Bundan sonraki çalışmalarda bu yollar incelenmelidir.

3.9. Etik Kurul Onayı:

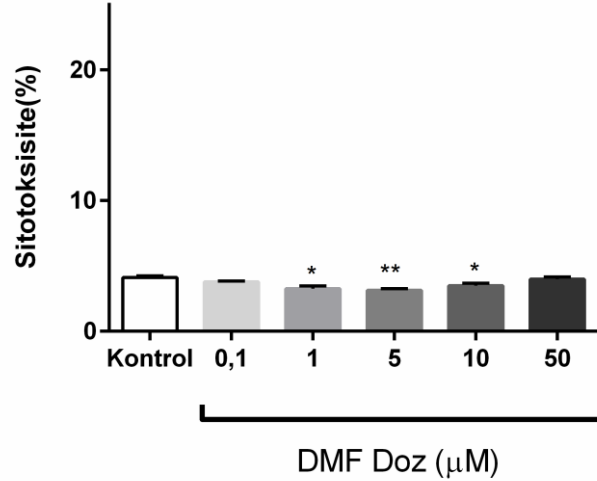
Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu 15.06.2017 tarih 3391-GOA protokol numaralı 2017/16-21 karar numaralı kararında çalışmamızın etik açıdan uygun olduğu sonucu çıkmıştır.



4. SONUÇLAR

4.1. DMF'nin Efektif Dozunun Belirlenmesi

İlk olarak DMF'nin bazal hücre ölümü üzerinde etkisine bakıldı. 96 kuyucuklu plaklara, kuyu başına 1×10^4 olacak şekilde ekilen hücrelere DMF'nin çeşitli dozları (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M ve 50 μ M) uygulandı. DMF'nin toksisite göstermediği dozu bulmak amacıyla LDH testi yapıldı. Buna göre, kullanılan dozlar hücreler üzerinde sitotoksisite göstermemiştir. DMF'nin 1-10 μ M dozlarında bazal ölümüne karşı koruyuculuk göstermiştir (**Şekil 2**) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).



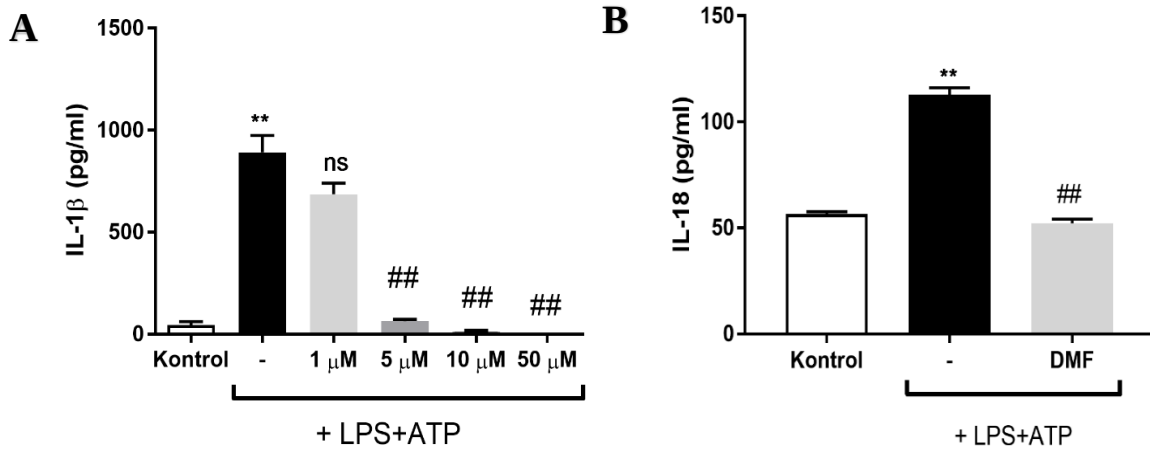
Şekil 2: DMF'nin çeşitli dozlarının bazal hücre ölümü üzerine etkisi. DMF'nin farklı dozlarının- 1 μ M, 5 μ M ve 10 μ M, 50 μ M- N9 mikroglial hücrelerinde ki bazal hücre ölümüne etkisi gösterilmiştir (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.2. DMF'nin IL-1beta ve IL-18 Sitokinlerinin Düzeyine Etkisinin ELISA Yöntemiyle Gösterilmesi

DMF'nin toksik olmayan uygun dozları belirlendikten sonra ilk olarak inflamazom belirteçlerinden IL-1beta ve IL-18 sitokinlerinin analizi yapıldı. Bu amaçla, LPS + ATP uygulaması öncesinde DMF'nin 4 farklı dozu (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M) kullanıldı. LPS + ATP grubunda IL-1beta miktarı $892,1 \pm 184,4$ pg/ml olarak saptandı. DMF ön inkübasyon

yapılan gruplarda (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M) IL-1beta düzeyi sırasıyla; $686,9 \pm 120,9$; $64,96 \pm 17,76$; $11,94 \pm 8,645$; $4,323 \pm 1,086$ pg/ml olarak saptandı. DMF, LPS + ATP ile artış gösteren IL-1beta düzeyini doza bağımlı olarak baskıladı ($##p<0,01$; $**p<0,01$) (Şekil 3A). 10 μ M dozu IL-1beta seviyesini kontrol grubu seviyesine indirdiği, ayrıca 10 μ M ve 50 μ M arasında belirgin bir fark olmadığı için uygun dozun 10 μ M olduğuna karar verildi. Sonraki deneylerde DMF'nin 10 μ M dozuyla devam edildi.

IL-18 testinde ise LPS + ATP verilen grubun IL-18 miktarı $113 \pm 7,34$ pg/ml olarak saptandı. DMF ön inkübasyon grubunda (10 μ M) grubunda ise bu miktar $52,21 \pm 4,51$ pg/ml seviyesinde saptandı. DMF, LPS + ATP ile miktarı artan IL-18 düzeyini baskıladı ($##p<0,01$; $**p<0,01$) (Şekil 3B).



Şekil 3. DMF'nin IL-1beta ve IL-18 düzeyine etkisinin ELISA yöntemiyle ölçülmesi. LPS + ATP ile aktive edilmiş inflamazom grubuna göre DMF, IL – 1beta (A) ve IL-18 (B) seviyelerini anlamlı olarak azaltmıştır ($##p<0,01$; $**p<0,01$). Sonuçlar ortalama $\pm$ S.D. olarak verildi.

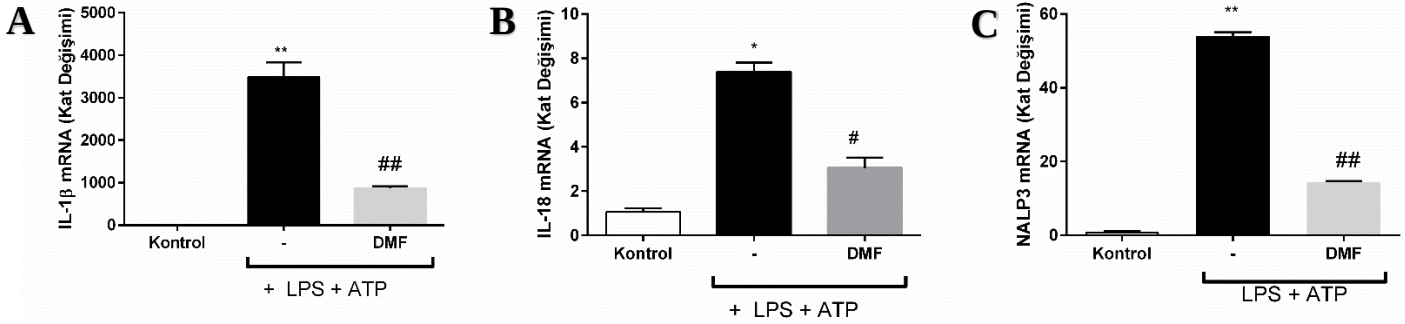
4.3. DMF'nin LPS ve ATP ile İndüklenmiş Hücrelerde IL-1beta, IL-18 ve NALP3 genlerinin mRNA Ekspresyon Seviyesine Etkisi

DMF'nin LPS + ATP ile indüklenen mikrogial hücrelerde, inflamazom belirteci olan genlerin IL-1beta, IL-18 ve NALP3 - mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi incelendi. LPS + ATP

grubunda IL-1beta mRNA seviyesi $3489,1 \pm 764,2$ kat değişimi gösterirken, DMF ön inkübasyonunun bu oranı $868,2 \pm 103,3$ kata indirdiği saptandı. DMF, LPS + ATP ile indüklenen IL-1beta mRNA ekspresyon düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde baskıladı ($##p<0,01$; $**p<0.01$) (Şekil 4A).

LPS + ATP grubunda IL-18 mRNA seviyesi $7,3 \pm 0,8$ kat değişimi gösterirken, DMF ön inkübasyonu ile beraber bu seviyenin $3,05 \pm 0,9$ kata indiği görüldü. DMF, LPS + ATP ile indüklenen IL-18 mRNA ekspresyon düzeyini baskıladı ($#p<0,05$; $*p<0.05$) (Şekil 4B).

LPS + ATP grubunda NALP3 mRNA seviyesi $54,08 \pm 2,25$ kat değişimi gösterirken, DMF ön inkübasyonunun etkisiyle bu seviyenin $14,45 \pm 0,61$ kata indiği saptandı. DMF LPS + ATP ile indüklenen NALP3 mRNA ekspresyonunu baskıladı ($#p<0,05$; $**p<0.01$) (Şekil 4C).

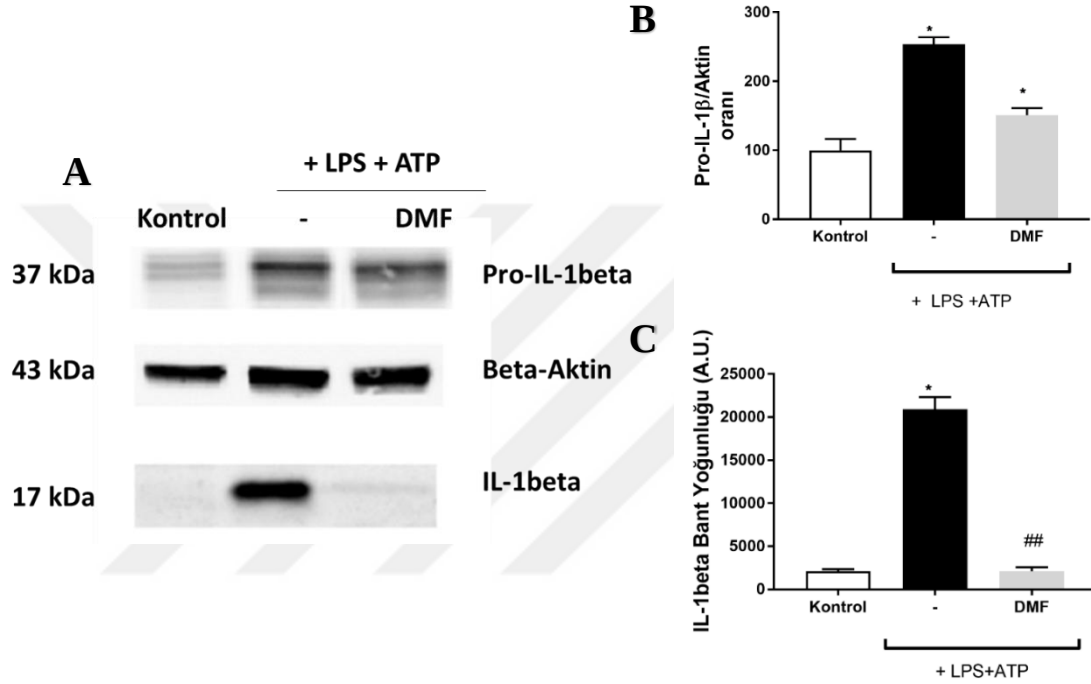


Şekil 4. DMF'nin inflamazom belirteci genlerin mRNA'ları üzerindeki baskılayıcı etkisi. DMF ön inkübasyonunun, inflamazom aktivasyonu ile ekspresyonları artan IL-1beta (A), IL-18 (B), NALP3 (C) genlerinin ekspresyon düzeylerini azalttığı saptandı ($##p<0,01$; $**p<0.01$; $#p<0,05$; $*p<0,05$). Sonuçlar ortalama $\pm$ S.D. olarak verildi.

4.4. İmmüno blot Yöntemiyle İnflamazom ile İlişkili Proteinlerin Değişimlerinin Gösterilmesi

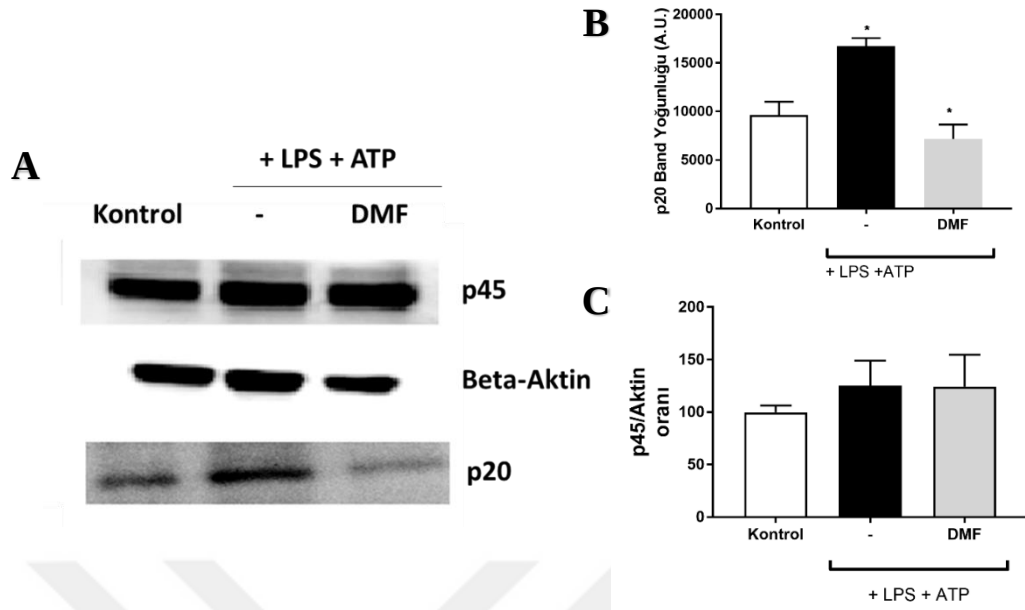
DMF'nin, inflamazom belirteci proteinler üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla İmmüno blot yöntemiyle pro-IL-1beta, IL-1beta Kaspaz-1(p20 ve p45) ve NALP3 protein miktarlarına bakıldı.

Pro-IL-1beta miktarları karşılaştırıldığında, LPS + ATP verilen grupta pro-IL-1beta bant yoğunluğu $254 \pm 17,01$ değerinde bulunurken bu değer DMF ön inkübasyonu ile $150,9 \pm 22,96$ kadar inmiştir (**Şekil 5B**). IL-1beta miktarları karşılaştırıldığında ise, LPS + ATP grubunda IL-1beta bant yoğunluğu 20908 ± 2458 iken, DMF ön inkübasyonu ile beraber bu yoğunluk 2100 ± 1110 seviyelerine inmiştir (**Şekil 5C**). DMF, LPS + ATP ile artan pro-IL-1beta ve IL-1beta oranlarını azaltmıştır ($\#p<0,05$; $*p<0,05$; $\#\#p<0,01$).



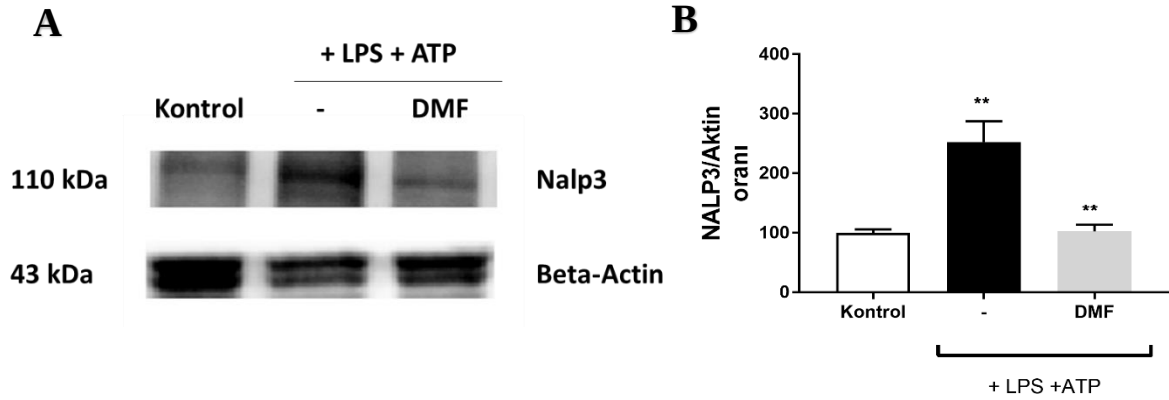
Şekil 5. DMF'nin IL-1beta protein seviyesindeki etkisinin immünoblotlama ile gösterilmesi. DMF ön inkübasyonunun, inflamazom sonucu ekspresyonları artan pro-IL-1beta(A-B) ve IL-1beta (A-C) düzeyini azalttığı saptandı ($\#\#p<0,01$; $**p<0,01$; $\#p<0,05$; $*p<0,05$). Sonuçlar ortalama $\pm$ S.D. olarak verildi.

Aktif Kaspaz (p20) miktarları karşılaştırıldığında, LPS + ATP ile indüklenen grupta bant yoğunluğu 16704 ± 1714 iken, DMF ile ön inkübe edilmiş grupta bu değer 7170 ± 2976 seviyesine inmiştir. p45 miktarları karşılaştırıldığında ise, LPS + ATP grubunda bant yoğunluğu $125,2 \pm 41,23$ iken bu değer DMF ön inkübasyon grubunda $124,2 \pm 42,96$ olarak bulunmuştur. DMF, LPS + ATP ile artan Aktif Kaspaz-1 (p20) miktarını düşürmüştür (**Şekil 6B**) ($\#p<0,05$; $*p<0,05$). Diğer bir yandan Kaspaz-1 (p45) miktarında anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır (**Şekil 6C**).



Şekil 6. DMF'nin Kaspaz-1 protein seviyesindeki etkisinin immünoblotlama ile gösterilmesi. DMF ön inkübasyonunun, inflamazom sonucu artan aktif Kaspaz-1(P20)'i (A-C) azalttığı saptandı (## $p < 0,01$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,05$; * $p < 0,05$). Sonuçlar ortalama $\pm$ S.D. olarak verildi.

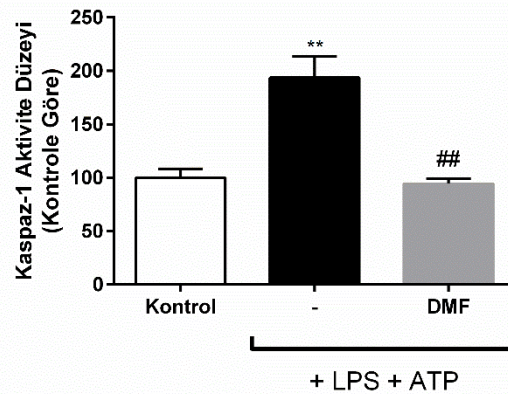
NALP3 miktarları karşılaştırıldığında ise, LPS + ATP ile indüklenen grupta NALP3 bant yoğunluğu $252,6 \pm 77,71$ iken, $77,71 \pm 24,59$ iken, DMF ile ön inkübe edilen grupta bu değer $102,4 \pm 24,59$ seviyesine inmiştir (**Şekil 7B**). DMF, LPS + ATP ile miktarı artan NALP3 miktarını istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde azaltmıştır (**Şekil 7**) (## $p < 0,01$; ** $p < 0,01$).



Şekil 7. DMF'nin NALP3 protein seviyesindeki etkisinin immünoyotlama ile gösterilmesi. DMF ön inkübasyonunun, inflamazom sonucu ekspresyonu artan NALP3 (A-C) azalttığı saptandı ($##p<0,01$; $p<0,01$; $#p<0,05$; $*p<0,05$). Sonuçlar ortalama $\pm$ S.D. olarak verildi.**

4.5. Kaspaz-1 Aktivite Testi

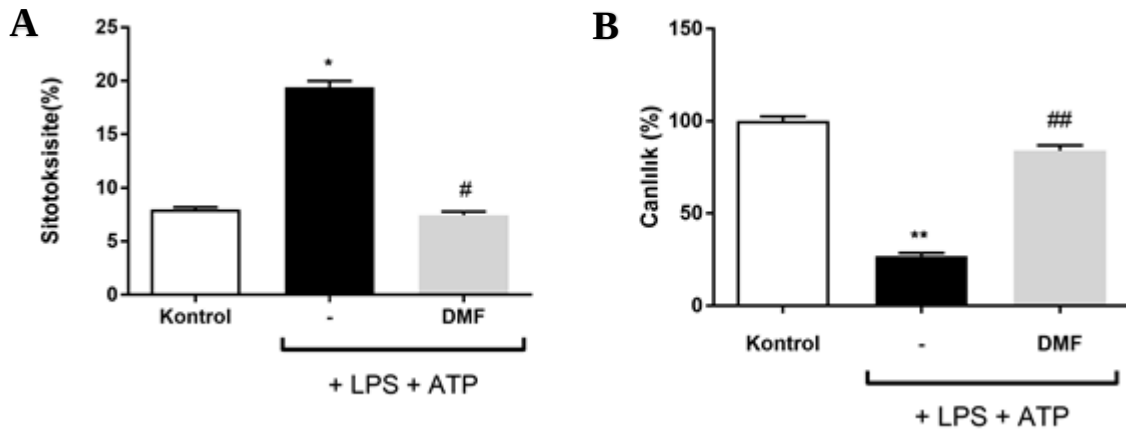
Mikroglia hücrelerinde aktive edilen inflamazomun önemli göstergelerinden birisi olan Kaspaz-1'in aktivitesi bu amaçla geliştirilmiş hazır ticari kitler kullanılarak belirlendi. LPS + ATP ile indüklenmiş hücrelerde Kaspaz-1 aktivitesi $193,8 \pm 44,23$ olarak ölçülmüştür. DMF ön inkübasyonu ile beraber bu seviye $94,41 \pm 10,36$ ya inmiştir. DMF, LPS + ATP ile indüklenen Kaspaz-1 aktivitesini anlamlı olarak azaltmıştır ($##p<0,01$; $**p<0,01$) (Şekil 8).



Şekil 8. DMF'nin Kaspaz-1 aktivitesi üzerine etkisinin gösterimi. LPS + ATP ile aktive edilmiş inflamazom grubuna göre, DMF Kaspaz-1 aktivitesini anlamlı olarak azaltmıştır ($##p<0,01$; $p<0,01$). Sonuçlar ortalama $\pm$ S.D. olarak verildi.**

4.6. DMF'nin Piroptotik Hücre Ölümüne Etkisi

DMF'nin, LPS + ATP verilerek hücre ölümü ve canlılığı LDH ve CCK-8 testleriyle belirlendi. Sonuçlara göre, LPS + ATP verilen grubun ölüm oranı 19.4 ± 1.16 olarak saptandı. DMF ön inkübasyon grubunda ise 7.44 ± 0.77 seviyesinde saptandı. DMF, LPS + ATP ile indüklenen piroptotik hücre ölümünü istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde baskılamıştır. ($\#p<0,05$; $*p<0,05$) (Şekil 9A). Hücre canlılığı ise LPS + ATP grubunda 26.99 ± 3.4 , DMF ön inkübasyon grubunda ise 83.9 ± 6.48 olarak saptandı. DMF, LPS + ATP ile azalan hücre canlılığını istatistiksel açıdan anlamlı şekilde arttırmıştır ($\#\#p<0,01$; $**p<0,01$) (Şekil 9B).

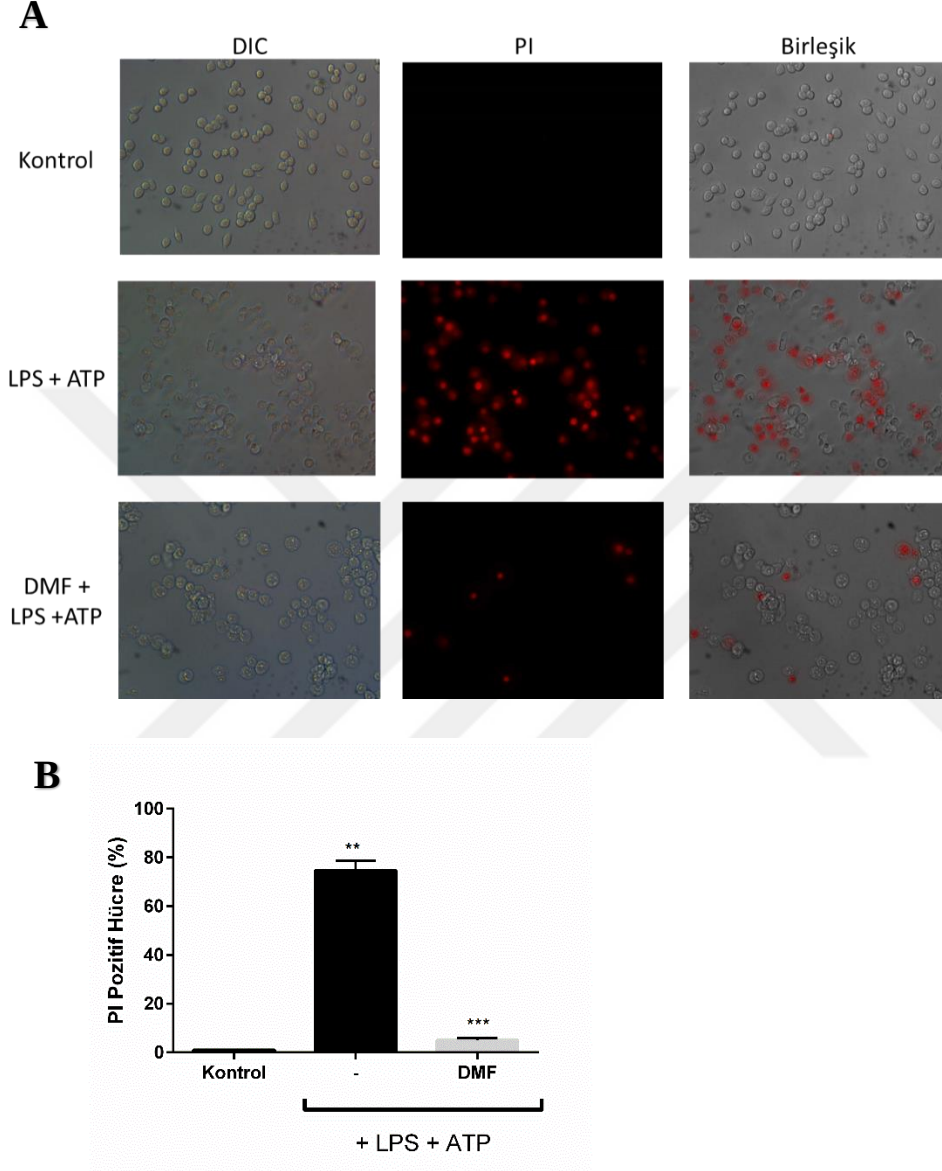


Şekil 9. DMF'nin piroptotik hücre ölümüne etkisi. LPS + ATP ile aktive edilmiş inflamazom, DMF ön inkübasyonu ile beraber piroptotik hücre ölümünü azaltmış olup hücre canlılığında artışa sebep olmuştur ($\#p<0,05$; $*p<0,05$; $\#\#p<0,01$; $**p<0,01$). Sonuçlar ortalama $\pm$ S.D. olarak verildi.

4.7. PI Boyama ile Hücre Ölümünün Belirlenmesi

DMF'nin, piroptotik hücre ölümüne etkisi Propidium İyodür (PI) boyaması yapılarak gösterildi. Mikroglial hücreler LPS ve ATP ile muamele edildikten sonra PI boyası ile boyandı. Sonrasında ise floresan mikroskop altında görüntüleri alındı. LPS + ATP grubunda kırmızıya boyanan hücreler piroptotik yolla ölen hücreleri göstermektedir. Sonuçlara göre, LPS ve ATP ile inkübe edilen grupta PI pozitif hücre yüzdesi 74.69 ± 10.69 olarak saptandı ($\#\#p<0,01$; $**p<0,01$). DMF ön inkübasyon grubunda ise 5.091 ± 2.187 olarak ($***p<0,01$) saptandı (Şekil 10B).

DMF, LPS + ATP ile indüklenen piroptotik hücre ölümünü anlamlı olarak azalttığı PI boyamasında da gösterilmiştir (Şekil 10A).



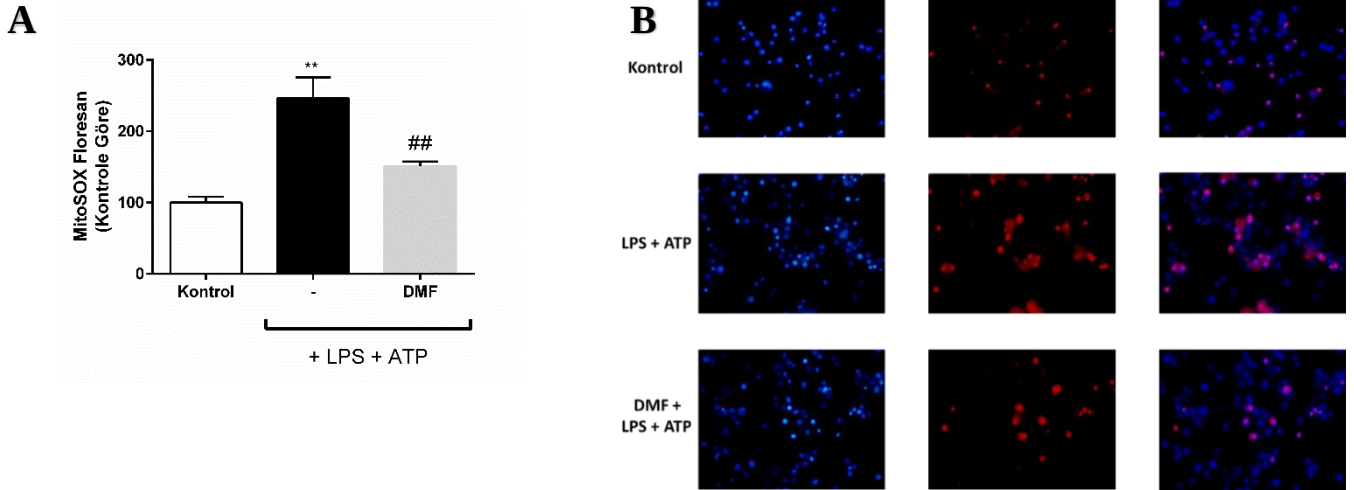
Şekil 10: NLRP3 İnflamazom modelinde Piroptotik ölümün gösterilmesi. Bu amaçla yapılan PI boyama sonuçlarına göre LPS ve ATP ile aktive edilmiş inflamazom, DMF ön inkübasyonu piroptotik hücre ölümünü azaltmıştır ($##p<0,01$; $**p<0,01$). Sonuçlar ortalama $\pm$ S.D. olarak verildi.

4.8. Mitokondriyal Membran Potansiyeli ve Süperoksit Üretimi Analizi

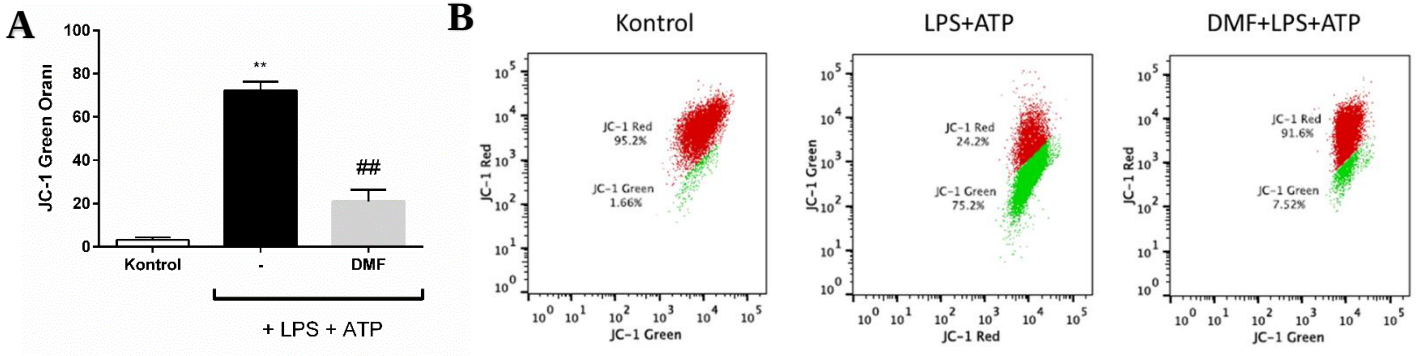
Mikroglial hücrelere verilen ATP'nin hücrede arttırdığı düşünülen Mitokondriyal süperoksit seviyesi MitoSOX ile bozulan mitokondriyal membran potansiyeli ise JC-1 boyaması ile gösterildi.

Sonuçlara göre, LPS + ATP eklendikten sonra ROS miktarı seviyesi $246,0 \pm 66,05$ seviyesine çıktığı, DMF ön muamelesi yapılan grupta ise $150,8 \pm 14,91$ seviyesine indiği saptandı (** $p < 0.01$) (Şekil 11A). Benzer şekilde, LPS ve ATP verilen hücrelerin floresan mikroskobu altındaki MitoSOX boyama görüntülerinde kırmızı renk ROS miktarında artış, DMF + LPS + ATP grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı azalış saptandı (Şekil 11B). DMF, LPS + ATP ile indüklenen mitokondriyal ROS oluşumunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır.

JC-1 akış sitometrisi sonuçları karşılaştırıldığında ise, LPS+ATP grubunda % 72,24 seviyesine çıkan yeşil boyama oranı, DMF ile ön muamele edilen grupta %21,05 seviyelerine düştüğü saptandı(Şekil 12).DMF'nin LPS + ATP ile bozulan mitokondriyal membran potansiyelini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde geri döndürmüştür.



Şekil 11: NLRP3 inflamazom modelinde mitokondriyal ROS'un gösterilmesi. LPS + ATP ile aktive edilmiş inflamazom grubuna göre, DMF mitokondriyal ROS üretimini anlamlı olarak azaltmıştır ($##p < 0,01$; $**p < 0.01$). Sonuçlar ortalama $\pm$ S.D. olarak verildi.



Şekil 12: NLRP3 inflamazom modelinde mitokondriyal membran potansiyelinin gösterilmesi. LPS + ATP ile aktive edilmiş inflamazom grubuna göre, DMF mitokondriyal membran potansiyelini anlamlı olarak onarmıştır (## $p < 0,01$; ** $p < 0,01$). Sonuçlar ortalama $\pm$ S.D. olarak verildi.

5. TARTIŞMA

İnflamazom, doğal bağışıklık sisteminin bir sonucu olup, inflamazom aktivasyonu Kaspaz-1 enzim aktivasyonuna, bu da IL-1beta ve de IL-18 gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımına ve de hücre ölümüne yol açmaktadır (Place ve Kanneganti, 2017). Bu süreç göz önüne alındığında, inflamazom aktivasyonunun regülasyonu önem teşkil etmektedir. Bunun nedeni, gereğinden uzun süren veya gereksiz yere gerçekleşen inflamazom aktivasyonu sağlıklı hücrelerin ölümüne bu da MS, diyabet, ateroskleroz gibi otoimmün hastalıklara yol açabilmektedir (Kesavardhana ve Kanneganti, 2017). İnflamazom aktivasyonunun baskılanması bu nedenle büyük önem teşkil etmektedir. Böylece, ortama salınacak inflamatuvar sitokinlerin engellenmesi ve de olası Kaspaz enzimi aktivitesini ve buna bağlı olarak sağlıklı hücre ölümlerinin önüne geçilmesi söz konusudur.

NLRP3 inflamazom modeli, inflamazom modelleri arasında en yaygın olarak çalışılan ve en iyi bilinen inflamazom modelidir. NLRP3 inflamazomu bir multi-protein kompleks olup, PAMP ve DAMP'ları algılar. Bu moleküllerin – PAMP ve DAMP- varlığı NLRP3 inflamazom kompleksinin oluşumunu tetikler. NLRP3, ASC ve de Kaspaz-1 proteinleri bir araya gelerek oluşan NLRP3 inflamazom kompleksi aktive olduktan sonra, komplekste bulunan Kaspaz-1 proteini, hücre içinde bulunan pro-IL1beta ve pro-IL-18 sitokinlerinin kesimini gerçekleştirerek, bu sitokinlerin matür hale gelmesini sağlar (He ve ark., 2016). Daha sonra, matür hale gelen IL-1beta ve IL-18 inflamatuvar sitokinlerin salınımı gerçekleşir.

Projemizde, NLRP3 aktivasyonu LPS ve ATP modeli ile gerçekleştirilmiştir. BV-2 mikroglia hücre hattında yapılan önceki çalışmalarda, NLRP3 aktivasyonu 1 µg/ml LPS ve 5mM ATP ile sağlanmıştır (Cai ve ark., 2016). Buna göre LPS, inflamazom aktivasyonu için gereken ilk sinyal (priming) olarak görev yapmakta, ATP ise NLRP3 inflamazom kompleksinin oluşumunu ve de IL-1beta ve IL-18 gen ekspresyonlarının artmasını sağlamaktadır (Mao ve ark., 2013). Bizde çalışmalarımızda N9 fare mikroglial hücrelerinde, 4 saat 1 µg/ml LPS ve 1 saat 5 mM ATP uygulaması ile NLRP3 aktivasyonu gerçekleştirdik.

NLRP3 inflamazom aktivasyonun en önemli sonuçlarından biri, inflamatuvar sitokinler olan IL-1beta ve IL-18 salınımıdır (Gold ve El Khoury, 2015). Endojen ve ekzojen tehlike faktörlerinin varlığı NLRP3 inflamazom kompleksini aktive eder. Aktive olan NLRP3 inflamazom kompleksi, hücre içinde bulunan ve de matür halde bulunmayan pro-IL-1beta ve

pro-IL-18 moleküllerin matür hale getirilmesini sağlar (He ve ark., 2016). LPS + ATP modeli ile N9 mikroglial hücrelerinde inflamazom aktivasyonundan sonra, IL-1beta ve IL-18 sitokinlerinde artış olduğunu yaptığımız çalışmalarda gösterilmiştir. IL-1beta ve IL-18 mRNA seviyelerinde de istatistiksel açıdan artış olduğu RT-PCR ile gösterilmiştir. Ayrıca bu inflamatuvar sitokinlerin protein seviyelerindeki artış ELISA ve İmmünoblot testleriyle de gösterilmiştir.

NLRP3 inflamazomunun aktivasyonunu piroptoz olarak adlandırılan programlanmış hücre ölümü takip eder. Piroptoz, Kaspaz-1 aktivitesinin yol açtığı pro inflamatuvar bir hücre ölümü çeşididir. Bu programlanmış ölüm tipinde, öncelikle myeloid ve myeloid kökenli olmayan bağışıklık hücreleri, DAMP ve PAMP gibi tehlike sinyallerini algılar, inflamatuvar sitokinlerin salınımını gerçekleştirir. Daha sonra Kaspaz aktivitesinin sonucunda hücre şişer ve patlar (Jo ve ark., 2016). Farenden alınan primer mikroglial hücrelerde yapılan çalışmada LPS + ATP inkübasyonunun piroptotik hücre ölümünü arttırdığı gösterilmiştir (Dempsey ve ark., 2017). Buna bağlı olarak, LPS + ATP modeli ile N9 mikroglial hücrelerinde inflamazom aktivasyonundan sonra, Kaspaz-1 aktivitesinin arttığı Kaspaz-1 aktivite testiyle gösterilmiştir. Ayrıca LPS + ATP ile indüklenen N9 mikroglial hücrelerinde Kaspaz-1 proteinin seviyesinde artış olduğu immünoblot yöntemi ile de gösterilmiştir. Kaspaz-1 aktivitesi sonucunda gerçekleşen piroptotik hücre ölümünün de yapılan canlılık ve ölüm testleriyle ve de Propidium İyonür (PI) boyama yöntemiyle arttığı ortaya koyulmuştur.

NLRP3 inflamazom kompleksi, endojen ya da ekzojen tehlike faktörlerini algılamak ve bu tehlike faktörlerine karşı harekete geçmekle görevlidir (Tan ve ark., 2013). Mitokondriyal hasar, mitokondriyal ROS aracılığıyla NLRP3 inflamazomunu aktive edebilmektedir. (Zhou ve ark., 2011). Bunun sebebi mitokondriyal ROS'un NLRP3 üzerindeki ubikutinlerle etkileşerek NLRP3'ü aktif etmektedir (Ren ve ark., 2016). Bunun yanı sıra, mitokondriyal membran potansiyeli de mitokondriyal ROS üretimi açısından önem taşımaktadır (Suski ve ark., 2012). Mitokondriyal membran potansiyeli değişimi mitokondriyal ROS üretimi tetiklemektedir (Korshunov ve ark., 1997). Primer mikroglial hücrelerde yapılan çalışmalarda LPS ile aktive edilmiş mikroglial hücrelerde mitokondriyal ROS'un NLRP3 inflamazomunu aktive ettiği gösterilmiştir (Sarkar ve ark., 2017). Primer mikroglia hücrelerinde yapılan bir başka çalışma, A β ile indüklenen NLRP3 inflamazom modelinde, değişen mitokondriyal membran potansiyelinin mitokondriyal ROS üretimini arttırdığı JC-1 boyamasıyla gösterilmiştir (Wang ve ark., 2017). Yine başka bir çalışmada, Fare THP hücrelerinde LPS+ATP ile aktive edilen

NLRP3 inflamazom modelinde, mitokondriyal membran potansiyelinde değişikliğe yol açtığını, mitokondriyal ROS oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (Liu ve ark., 2016). Çalışmamızda, LPS + ATP modeli ile N9 mikroglial hücrelerinde indüklediğimiz NLRP3 inflamazom aktivasyonu sonucunda, mitokondriyal ROS seviyesinin arttığı, MitoSOX florometrik testiyle ve boyamasıyla gösterilmiştir. Ayrıca, LPS + ATP ile indüklenen N9 mikroglial hücrelerde mitokondriyal membran potansiyeline akış sitometrisi yapılarak bakılmış olup, NLRP3 inflamazom aktivasyonunun mitokondriyal membran potansiyelini bozduğu ortaya koyulmuştur.

Yaptığımız çalışmada, DMF'nin LPS + ATP ile indüklenen NLRP3 inflamazom aktivasyonu üzerinde etkisi incelenmiştir. Daha önce yapılan *in vitro* çalışmada, mikroglial hücrelerle aynı kökenden gelen makrofaj hücrelerinde (THP-1) DMF'nin NLRP3 inflamazom aktivasyonuna etkisi incelenmiş, DMF ile ön inkübe edilen inflamazom aktivasyonu gerçekleştirilmiş hücrelerde, IL-1beta, Kaspaz-1 proteinlerinin seviyeleri immüno blotlama ve ELISA yöntemleriyle ölçülmüştür. Ayrıca Kaspaz-1 aktivitesi ve Kaspaz-1 aktivitesi sonucu ortaya çıkan piyrototik hücre ölümüne etkisine bakılmıştır (Miglio ve ark., 2015). Sonuçlara göre DMF, THP-1 hücrelerinde inflamazom aktivasyonunun göstergeleri olan IL-1beta, Kaspaz-1 proteinlerinin miktarlarını azaltmış, bu azalmaya bağlı olarak da Kaspaz-1 aktivitesi ve piyrototik hücre ölümünde azalma görülmüştür. Bir başka çalışmada DMF'nin etkisi, *in vivo* İnflamatuar Bağırsak Hastalığı modeli oluşturulan fareler üzerinde araştırılmıştır. Bir önceki *in vitro* çalışmada ki gibi, inflamazom aktivasyonunun göstergeleri olan NALP3, Kaspaz-1, IL-1beta proteinlerin miktarlarına immüno blotlama ve ELISA yöntemleriyle bakılmıştır (Liu ve ark., 2016). Benzer şekilde, DMF inflamazom aktivasyonu sonucunda miktarları artan bu proteinleri önemli ölçüde baskılamıştır.

DMF'nin mikroglial hücrelerde NLRP3 inflamazom aktivasyonu üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Ancak DMF'nin mikroglial hücrelerde inflamatuvar sitokin ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Peng ve ark., 2016). Fareden alınan primer mikroglial hücre hattında yapılan çalışmada DMF ile inkübe edilen primer mikroglial hücrelerde, inflamasyon belirteçleri olan başta IL-1beta ve IL-6 olmak üzere TNF- α gibi proteinlerinde anlamlı bir azalmaya yol açtığı bildirilmiştir. Çalışmamızda, DMF'nin inflamazom belirteçlerinden IL-1beta ve IL-18 inflamatuvar sitokinlerinin hem protein hem de mRNA düzeyinde miktarını azalttığı saptanmıştır. Ayrıca çalışmamızda ilk kez DMF'nin mikroglial hücrelerde NALP3 ve Kaspaz-1 protein düzeyini ve Kaspaz-1 aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir.

DMF'nin antioksidan özellikleri daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. RAW 264.7 makrofaj hücrelerde yapılan çalışmada, DMF'nin NRF2 yolağını aktive ederek HO-1, NQO1 antioksidan genlerinin ekspresyonunu arttırdığı ve makrofaj hücrelerini oksidatif hasara karşı koruduğu gösterilmiştir (Haas ve ark., 2015). DMF'nin, oksidatif hasara yol açan hasarlı mitokondriler üzerinde de etkili olduğu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır. DMF, THP-1 hücrelerinde LPS ve ATP ile indüklenen NLRP3 inflamazomu sonucunda bozulan mitokondriyal membran potansiyelini düzenlemiş ve mitokondriyal ROS oranını azaltmıştır (Liu ve ark., 2016). Çalışmamızda, DMF'nin N9 mikroglia hücre hattında mitokondriyal ROS oluşumunu azalttığı saptanmıştır. Ayrıca DMF'nin LPS+ATP ile mitokondriyal membran potansiyeli bozulmasını önlediği gösterilmiştir.

DMF'nin mikrogial hücrelerde NLRP3 inflamazom aktivasyonu ile indüklenen piroptotik hücre ölümüne etkisi bilinmemektedir. Ancak daha önce THP-1 hücrelerinde yapılan çalışmada DMF'nin inflamazom sonucu görülen piroptotik hücre ölümünü engellediği gösterilmiştir (Miglio ve ark., 2015). Ayrıca başka bir çalışmada DMF'nin serebral iskemi-reperfüzyon hasarına uğratılan farelerde, apoptoza bağlı nöron ölümlerini azalttığı bildirilmiştir (Yao ve ark., 2016). Bu çalışmalara ek olarak, ex vivo bir çalışma DMF'nin iskemik hasara uğramış hipokampal nöronlarda hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir (Lin-Holderer ve ark., 2016). Tüm bunlar DMF'nin sitoprotektif etkisi olduğunu ve mikrogial hücrelerde aynı etkiye sahip olabileceği düşündürmektedir. Yaptığımız çalışmada da DMF'nin piroptotik hücre ölünü engellediğini gösterdik. Bundan sonraki çalışmalarda DMF'nin bu etkiyi hangi yollarla üstünden gerçekleştirdiği incelenmelidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, DMF'nin, mikrogliyal hücrelerde NLRP3 inflamazom aktivasyonu üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda LPS ve ATP maddeleriyle N9 mikrogliya hücre hattında oluşturulan inflamazom modeline DMF uygulanarak, DMF'nin etkilerine bakılmıştır. Öncelikle DMF'nin değişik dozları denenerek efektif doz bulunmuştur. Daha sonra DMF'nin hücre ölümü ve canlılığına etkisi LDH ve CCK-8 testleriyle analiz edilmiş ve DMF'nin koruyuculuğu gösterilmiştir. İnflamazom aktivasyonu göstergelerinden olan- IL-1beta ve IL-18 sitokinleri ve NLRP3 ve Kaspaz-1 proteinleri, mRNA ve protein seviyelerinde ELISA, RT-PCR Western Blot yöntemleriyle incelenmiş ve DMF'nin bu proteinleri baskıladığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, DMF, LPS ve ATP modeli ile NLRP3 inflamazom aktivasyonu gerçekleştirilen N9 mikrogliyal hücrelerinde, Kaspaz-1 aktivitesini baskılamış, IL-1beta ve IL-18 sitokinlerinin salınımı azaltmıştır. Ayrıca, inflamazom ilişkili proteinlerin ekspresyonunu baskılamış ve inflamazom aktivasyonu sonucunda görülen piroptotik hücre ölümünü azaltmıştır. Bunlara ek olarak mitokondriyal ROS miktarını baskılayıp, mitokondriyal membran potansiyelindeki bozulmayı engellemiştir. DMF, NLRP3 inflamazomunu baskılayıcı bir terapötik ajan olarak kullanılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Beamer E, Goloncser F, Horvath G, Beko K, ve ark. Purinergic mechanisms in neuroinflammation: An update from molecules to behavior. *Neuropharmacology* 2016; 104: 94-104.
2. Beggs S, Trang T ve Salter MW. P2X4R+ microglia drive neuropathic pain. *Nat Neurosci* 2012; 15(8): 1068-1073.
3. Bilimoria PM ve Stevens B. Microglia function during brain development: New insights from animal models. *Brain Res* 2015; 1617: 7-17.
4. Boillee S, Vande Velde C ve Cleveland DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 2006; 52(1): 39-59.
5. Burnstock G. P2X ion channel receptors and inflammation. *Purinergic Signal* 2016; 12(1): 59-67.
6. Cady J, Koval ED, Benitez BA, Zaidman C, ve ark. TREM2 variant p.R47H as a risk factor for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol* 2014; 71(4): 449-453.
7. Cai Y, Kong H, Pan YB, Jiang L, ve ark. Procyanidins alleviates morphine tolerance by inhibiting activation of NLRP3 inflammasome in microglia. *J Neuroinflammation* 2016; 13(1): 53.
8. Cai Z, Hussain MD ve Yan LJ. Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci* 2014; 124(5): 307-321.
9. Chen H, Assmann JC, Krenz A, Rahman M, ve ark. Hydroxycarboxylic acid receptor 2 mediates dimethyl fumarate's protective effect in EAE. *J Clin Invest* 2014; 124(5): 2188-2192.
10. Cherry JD, Olschowka JA ve O'Banion MK. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation* 2014; 11: 98.
11. Ciraci C, Janczy JR, Sutterwala FS ve Cassel SL. Control of innate and adaptive immunity by the inflammasome. *Microbes Infect* 2012; 14(14): 1263-1270.
12. Codolo G, Plotegher N, Pozzobon T, Brucale M, ve ark. Triggering of inflammasome by aggregated alpha-synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies. *PLoS One* 2013; 8(1): e55375.
13. Cross SA, Cook DR, Chi AW, Vance PJ, ve ark. Dimethyl fumarate, an immune modulator and inducer of the antioxidant response, suppresses HIV replication and

- macrophage-mediated neurotoxicity: a novel candidate for HIV neuroprotection. *J Immunol* 2011; 187(10): 5015-5025.
14. Cunningham CL, Martinez-Cerdeno V ve Noctor SC. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 2013; 33(10): 4216-4233.
 15. David S ve Kroner A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 2011; 12(7): 388-399.
 16. Dempsey C, Rubio Araiz A, Bryson KJ, Finucane O, ve ark. Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 promotes non-phlogistic clearance of amyloid-beta and cognitive function in APP/PS1 mice. *Brain Behav Immun* 2017; 61: 306-316.
 17. Dutta G, Zhang P ve Liu B. The lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. *Fundam Clin Pharmacol* 2008; 22(5): 453-464.
 18. Foresti R, Bains SK, Pitchumony TS, de Castro Bras LE, ve ark. Small molecule activators of the Nrf2-HO-1 antioxidant axis modulate heme metabolism and inflammation in BV2 microglia cells. *Pharmacol Res* 2013; 76: 132-148.
 19. Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, Hutchinson M, ve ark. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012; 367(12): 1087-1097.
 20. Freeman LC ve Ting JP. The pathogenic role of the inflammasome in neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 2016; 136 Suppl 1: 29-38.
 21. Fu R, Shen Q, Xu P, Luo JJ, ve ark. Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Mol Neurobiol* 2014; 49(3): 1422-1434.
 22. Garcia-Marin V, Garcia-Lopez P ve Freire M. Cajal's contributions to glia research. *Trends Neurosci* 2007; 30(9): 479-487.
 23. Gerhard A, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, ve ark. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2006; 21(2): 404-412.
 24. Gill AJ ve Kolson DL. Dimethyl fumarate modulation of immune and antioxidant responses: application to HIV therapy. *Crit Rev Immunol* 2013; 33(4): 307-359.
 25. Gold M ve El Khoury J. beta-amyloid, microglia, and the inflammasome in Alzheimer's disease. *Semin Immunopathol* 2015; 37(6): 607-611.

26. Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, ve ark. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012; 367(12): 1098-1107.
27. Guarda G ve So A. Regulation of inflammasome activity. *Immunology* 2010; 130(3): 329-336.
28. Haas B, Chrusciel S, Fayad-Kobeissi S, Dubois-Rande JL, ve ark. Permanent culture of macrophages at physiological oxygen attenuates the antioxidant and immunomodulatory properties of dimethyl fumarate. *J Cell Physiol* 2015; 230(5): 1128-1138.
29. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, ve ark. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol* 2008; 9(8): 857-865.
30. Hanamsagar R, Hanke ML ve Kielian T. Toll-like receptor (TLR) and inflammasome actions in the central nervous system. *Trends Immunol* 2012; 33(7): 333-342.
31. He Y, Hara H ve Nunez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci* 2016; 41(12): 1012-1021.
32. Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, ve ark. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 2013; 493(7434): 674-678.
33. Hunot S ve Hirsch EC. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 53 Suppl 3: S49-58; discussion S58-60.
34. Jo EK, Kim JK, Shin DM ve Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol* 2016; 13(2): 148-159.
35. Kabba JA, Xu Y, Christian H, Ruan W, ve ark. Microglia: Housekeeper of the Central Nervous System. *Cell Mol Neurobiol* 2017.
36. Kalia LV ve Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet* 2015; 386(9996): 896-912.
37. Kalinin S, Polak PE, Lin SX, Braun D, ve ark. Dimethyl fumarate regulates histone deacetylase expression in astrocytes. *J Neuroimmunol* 2013; 263(1-2): 13-19.
38. Kersse K, Bertrand MJ, Lamkanfi M ve Vandenabeele P. NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; 22(5-6): 257-276.
39. Kesavardhana S ve Kanneganti TD. Mechanisms governing inflammasome activation, assembly and pyroptosis induction. *Int Immunol* 2017; 29(5): 201-210.

40. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M ve Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 2011; 91(2): 461-553.
41. Korshunov SS, Skulachev VP ve Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 1997; 416(1): 15-18.
42. Kumar H, Kawai T ve Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011; 30(1): 16-34.
43. Liao B, Zhao W, Beers DR, Henkel JS, ve ark. Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Exp Neurol* 2012; 237(1): 147-152.
44. Lin-Holderer J, Li L, Gruneberg D, Marti HH, ve ark. Fumaric acid esters promote neuronal survival upon ischemic stress through activation of the Nrf2 but not HIF-1 signaling pathway. *Neuropharmacology* 2016; 105: 228-240.
45. Linker RA ve Gold R. Dimethyl fumarate for treatment of multiple sclerosis: mechanism of action, effectiveness, and side effects. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2013; 13(11): 394.
46. Liu X, Zhou W, Zhang X, Lu P, ve ark. Dimethyl fumarate ameliorates dextran sulfate sodium-induced murine experimental colitis by activating Nrf2 and suppressing NLRP3 inflammasome activation. *Biochem Pharmacol* 2016; 112: 37-49.
47. Loane DJ ve Byrnes KR. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics* 2010; 7(4): 366-377.
48. Loewe R, Holnthoner W, Groger M, Pillinger M, ve ark. Dimethylfumarate inhibits TNF-induced nuclear entry of NF-kappa B/p65 in human endothelial cells. *J Immunol* 2002; 168(9): 4781-4787.
49. Long-Smith CM, Sullivan AM ve Nolan YM. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2009; 89(3): 277-287.
50. Lull ME ve Block ML. Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics* 2010; 7(4): 354-365.
51. Magnus T, Carmen J, Deleon J, Xue H, ve ark. Adult glial precursor proliferation in mutant SOD1G93A mice. *Glia* 2008; 56(2): 200-208.

52. Mahad DJ ve Ransohoff RM. The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin Immunol* 2003; 15(1): 23-32.
53. Mao K, Chen S, Chen M, Ma Y, ve ark. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Cell Res* 2013; 23(2): 201-212.
54. Marin-Teva JL, Cuadros MA, Martin-Oliva D ve Navascues J. Microglia and neuronal cell death. *Neuron Glia Biol* 2011; 7(1): 25-40.
55. Martinon F, Agostini L, Meylan E ve Tschopp J. Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr Biol* 2004; 14(21): 1929-1934.
56. Meissner F, Molawi K ve Zychlinsky A. Mutant superoxide dismutase 1-induced IL-1 β accelerates ALS pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(29): 13046-13050.
57. Michell-Robinson MA, Touil H, Healy LM, Owen DR, ve ark. Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain* 2015; 138(Pt 5): 1138-1159.
58. Miglio G, Veglia E ve Fantozzi R. Fumaric acid esters prevent the NLRP3 inflammasome-mediated and ATP-triggered pyroptosis of differentiated THP-1 cells. *Int Immunopharmacol* 2015; 28(1): 215-219.
59. Miljkovic D, Blazevski J, Petkovic F, Djedovic N, ve ark. A comparative analysis of multiple sclerosis-relevant anti-inflammatory properties of ethyl pyruvate and dimethyl fumarate. *J Immunol* 2015; 194(6): 2493-2503.
60. Minutoli L, Puzzolo D, Rinaldi M, Irrera N, ve ark. ROS-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation in Brain, Heart, Kidney, and Testis Ischemia/Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 2183026.
61. Miron VE, Boyd A, Zhao JW, Yuen TJ, ve ark. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci* 2013; 16(9): 1211-1218.
62. Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ ve Meyermann R. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol* 2001; 101(3): 249-255.

63. Mrowietz U, Christophers E ve Altmeyer P. Treatment of severe psoriasis with fumaric acid esters: scientific background and guidelines for therapeutic use. The German Fumaric Acid Ester Consensus Conference. *Br J Dermatol* 1999; 141(3): 424-429.
64. Nakajima K, Tohyama Y, Maeda S, Kohsaka S, ve ark. Neuronal regulation by which microglia enhance the production of neurotrophic factors for GABAergic, catecholaminergic, and cholinergic neurons. *Neurochem Int* 2007; 50(6): 807-820.
65. Nimmerjahn A, Kirchhoff F ve Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 2005; 308(5726): 1314-1318.
66. Papadopoulou A, D'Souza M, Kappos L ve Yaldizli O. Dimethyl fumarate for multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs* 2010; 19(12): 1603-1612.
67. Peferoen LA, Vogel DY, Ummenthum K, Breur M, ve ark. Activation status of human microglia is dependent on lesion formation stage and remyelination in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2015; 74(1): 48-63.
68. Peng H, Guerau-de-Arellano M, Mehta VB, Yang Y, ve ark. Dimethyl fumarate inhibits dendritic cell maturation via nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) and mitogen stress-activated kinase 1 (MSK1) signaling. *J Biol Chem* 2012; 287(33): 28017-28026.
69. Peng H, Li H, Sheehy A, Cullen P, ve ark. Dimethyl fumarate alters microglia phenotype and protects neurons against proinflammatory toxic microenvironments. *J Neuroimmunol* 2016; 299: 35-44.
70. Perez-Cerda F, Sanchez-Gomez MV ve Matute C. Pio del Rio Hortega and the discovery of the oligodendrocytes. *Front Neuroanat* 2015; 9: 92.
71. Phillips JT ve Fox RJ. BG-12 in multiple sclerosis. *Semin Neurol* 2013; 33(1): 56-65.
72. Piccio L, Buonsanti C, Mariani M, Cella M, ve ark. Blockade of TREM-2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 2007; 37(5): 1290-1301.
73. Place DE ve Kanneganti TD. Recent advances in inflammasome biology. *Curr Opin Immunol* 2017; 50: 32-38.
74. Poon IK, Hulett MD ve Parish CR. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death Differ* 2010; 17(3): 381-397.
75. Pottier C, Wallon D, Rousseau S, Rovelet-Lecrux A, ve ark. TREM2 R47H variant as a risk factor for early-onset Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2013; 35(1): 45-49.

76. Prochnicki T, Mangan MS ve Latz E. Recent insights into the molecular mechanisms of the NLRP3 inflammasome activation. *F1000Res* 2016; 5.
77. Raj DD, Jaarsma D, Holtman IR, Olah M, ve ark. Priming of microglia in a DNA-repair deficient model of accelerated aging. *Neurobiol Aging* 2014; 35(9): 2147-2160.
78. Rayaprolu S, Mullen B, Baker M, Lynch T, ve ark. TREM2 in neurodegeneration: evidence for association of the p.R47H variant with frontotemporal dementia and Parkinson's disease. *Mol Neurodegener* 2013; 8: 19.
79. Reick C, Ellrichmann G, Thone J, Scannevin RH, ve ark. Neuroprotective dimethyl fumarate synergizes with immunomodulatory interferon beta to provide enhanced axon protection in autoimmune neuroinflammation. *Exp Neurol* 2014; 257: 50-56.
80. Ren JD, Wu XB, Jiang R, Hao DP, ve ark. Molecular hydrogen inhibits lipopolysaccharide-triggered NLRP3 inflammasome activation in macrophages by targeting the mitochondrial reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1863(1): 50-55.
81. Righi M, Mori L, De Libero G, Sironi M, ve ark. Monokine production by microglial cell clones. *Eur J Immunol* 1989; 19(8): 1443-1448.
82. Rivers-Auty J ve Brough D. Potassium efflux fires the canon: Potassium efflux as a common trigger for canonical and noncanonical NLRP3 pathways. *Eur J Immunol* 2015; 45(10): 2758-2761.
83. Rock KL, Kataoka H ve Lai JJ. Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities. *Nat Rev Rheumatol* 2013; 9(1): 13-23.
84. Ruggieri S, Tortorella C ve Gasperini C. Pharmacology and clinical efficacy of dimethyl fumarate (BG-12) for treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ther Clin Risk Manag* 2014; 10: 229-239.
85. Salameh JS, Brown RH, Jr. ve Berry JD. Amyotrophic Lateral Sclerosis: Review. *Semin Neurol* 2015; 35(4): 469-476.
86. Salmen A ve Gold R. Mode of action and clinical studies with fumarates in multiple sclerosis. *Exp Neurol* 2014; 262 Pt A: 52-56.
87. Sarkar S, Malovic E, Harishchandra DS, Ghaisas S, ve ark. Mitochondrial impairment in microglia amplifies NLRP3 inflammasome proinflammatory signaling in cell culture and animal models of Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis* 2017; 3: 30.

88. Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, de Strooper B, ve ark. Alzheimer's disease. *Lancet* 2016; 388(10043): 505-517.
89. Schilling S, Goelz S, Linker R, Luehder F, ve ark. Fumaric acid esters are effective in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis and suppress macrophage infiltration. *Clin Exp Immunol* 2006; 145(1): 101-107.
90. Schimrigk S, Brune N, Hellwig K, Lukas C, ve ark. Oral fumaric acid esters for the treatment of active multiple sclerosis: an open-label, baseline-controlled pilot study. *Eur J Neurol* 2006; 13(6): 604-610.
91. Schimrigk S, Faiss J, Kohler W, Gunther A, ve ark. Escalation Therapy of Steroid Refractory Multiple Sclerosis Relapse with Tryptophan Immunoabsorption - Observational Multicenter Study with 147 Patients. *Eur Neurol* 2016; 75(5-6): 300-306.
92. Schreckendiek W. [Treatment of psoriasis vulgaris]. *Med Monatsschr* 1959; 13(2): 103-104.
93. Shi F, Yang L, Kouadir M, Yang Y, ve ark. The NALP3 inflammasome is involved in neurotoxic prion peptide-induced microglial activation. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 73.
94. Shi Y, Mucsi AD ve Ng G. Monosodium urate crystals in inflammation and immunity. *Immunol Rev* 2010; 233(1): 203-217.
95. Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, ve ark. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 2010; 7(4): 483-495.
96. Singhal G ve Baune BT. Microglia: An Interface between the Loss of Neuroplasticity and Depression. *Front Cell Neurosci* 2017; 11: 270.
97. Su X, Maguire-Zeiss KA, Giuliano R, Prifti L, ve ark. Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2008; 29(11): 1690-1701.
98. Suski JM, Lebedzinska M, Bonora M, Pinton P, ve ark. Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation. *Methods Mol Biol* 2012; 810: 183-205.
99. Takeuchi H, Mizoguchi H, Doi Y, Jin S, ve ark. Blockade of gap junction hemichannel suppresses disease progression in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer's disease. *PLoS One* 2011; 6(6): e21108.
100. Tan MS, Yu JT, Jiang T, Zhu XC, ve ark. The NLRP3 inflammasome in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 2013; 48(3): 875-882.

101. Tremblay ME, Lowery RL ve Majewska AK. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol* 2010; 8(11): e1000527.
102. Tschopp J ve Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol* 2010; 10(3): 210-215.
103. von Bernhardi R, Tichauer JE ve Eugenin J. Aging-dependent changes of microglial cells and their relevance for neurodegenerative disorders. *J Neurochem* 2010; 112(5): 1099-1114.
104. Walker DG ve Lue LF. Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimers Res Ther* 2015; 7(1): 56.
105. Wang HM, Zhang T, Huang JK, Xiang JY, ve ark. Edaravone Attenuates the Proinflammatory Response in Amyloid-beta-Treated Microglia by Inhibiting NLRP3 Inflammasome-Mediated IL-1beta Secretion. *Cell Physiol Biochem* 2017; 43(3): 1113-1125.
106. Wang WY, Tan MS, Yu JT ve Tan L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Ann Transl Med* 2015; 3(10): 136.
107. Wieghofer P, Knobloch KP ve Prinz M. Genetic targeting of microglia. *Glia* 2015; 63(1): 1-22.
108. Wilms H, Sievers J, Rickert U, Rostami-Yazdi M, ve ark. Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation. *J Neuroinflammation* 2010; 7: 30.
109. Yao Y, Miao W, Liu Z, Han W, ve ark. Dimethyl Fumarate and Monomethyl Fumarate Promote Post-Ischemic Recovery in Mice. *Transl Stroke Res* 2016; 7(6): 535-547.
110. Yu JW ve Lee MS. Mitochondria and the NLRP3 inflammasome: physiological and pathological relevance. *Arch Pharm Res* 2016; 39(11): 1503-1518.
111. Zhou R, Yazdi AS, Menu P ve Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 2011; 469(7329): 221-225.

8. EKLER

8.1. EK-1 Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.
Sayı: 1577

16.06.2017

Sayın Prof.Dr.Şermin GENÇ,

Kurulumuz tarafından 15.06.2017 tarih ve 3391-GOA protokol numaralı 2017/16-21 karar numarası ile görüşülen **“Dimetil Fumarat'ın Mikroglial Hücrelerde NLRP3 İnflamazom Aktivasyonu Üzerine Etkisi”** konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan 4.

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
AÇIK ADRES	GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
TELEFON	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
FAKS	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
E-POSTA	0 232 412 22 43
	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	3391-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Dimetil Fumarat'ın Mikroglial Hücrelerde NLRP3 İnflamazom Aktivasyonu Üzerine Etkisi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Şermin GENÇ Sağlık Bilimleri Ens.
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐	İngilizce ☒	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2017/16-21	Tarih:15.06.2017
	Prof.Dr.Şermin GENÇ'in sorumlusu olduğu "Dimetil Fumarat'ın Mikroglial Hücrelerde NLRP3 İnflamazom Aktivasyonu Üzerine Etkisi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

8.2. Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ BORA TAŞTAN

TC Kimlik No / Pasaport No:	12869314396
Doğum Yılı:	01/07/1992
Yazışma Adresi :	Çamtepe mah. Mithatpaşa cad. No:155/5 Narlıdere/İzmir
Telefon :	+90 5369686485
Faks :	
e-posta :	boratstn@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü	Fen Fak.	Moleküler Biyoloji ve Genetik	2,68	01.07.2016
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bil. Ens.	Temel Sinirbilimler Y.L.		Devam ediyor

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Moleküler Biyoloji

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı	

Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐			

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Sulforaphane inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation, cytotoxicity, oxidative stress and mir-155 expression and switches to Mox phenotype through activating ERK1/2-Nrf2/ARE pathway in murine microglial cells

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

The Effects of Dimethyl Fumarate on inflammasome activation in microglial cells