

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ETİL PİRUVAT'IN MİKROGLİAL
HÜCRELERDE NLRP3 İNFLAMAZOM
AKTİVASYONUNA ETKİSİ**

İrem Nur GÖKBAYRAK

TEMEL SİNİRBİLİMLER
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2019

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2016970140

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ETİL PİRUVAT'IN MİKROGLİAL
HÜCRELERDE NLRP3 İNFLAMAZOM
AKTİVASYONUNA ETKİSİ**

TEMEL SİNİRBİLİMLER
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İrem Nur GÖKBAYRAK

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Şermin GENÇ

TEZ KODU: DEU.HSL.MSc-2016970140

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimler Anabilim Dalı, Temel Sinirbilimler Yüksek Lisans programı öğrencisi **İrem Nur GÖKBAYRAK**'ın '**ETİL PİRUVAT'IN MİKROGLİAL HÜCRELERDE NLRP3 İNFLAMAZOM AKTİVASYONUNA ETKİSİ**' konulu Yüksek Lisans tezini 07/01/2019 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



BAŞKAN

Prof. Dr. Şermin Genç

DEÜ Sağlık Bil. Ens. Sinirbilimler AD.

ÜYE

Prof. Dr. Pınar Akan

DEÜ Sağlık Bil. Ens. Sinirbilimler AD.

ÜYE

Prof. Dr. Mehmet Korkmaz

CBÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD.

YEDEK ÜYE

Dr. Öğr. Üyesi Mehtap Yüksel Eğrilmez

DEÜ Tıp Fak. Moleküler Tıp AD.

YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Kemal Sami Korkmaz

EGE Müh Fak. Biyomühendislik AD.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLO DİZİNİ.....	iv
ŞEKİL DİZİNİ	v
KISALTMALAR	vi
TEŞEKKÜR	viii
ÖZET.....	1
ABSTRACT	3
1. <u>GİRİŞ VE AMAC</u>	5
2. <u>GENEL BİLGİLER</u>	6
2.1. Mikroglia.....	6
Mikroglia Tarihçesi ve Kökeni	6
Mikroglia Gelişimi	7
Mikroglialının Polarizasyonu	7
Mikroglialının Fonksiyonları.....	8
Mikroglialının Nöronal Sağkalıma Etkileri	8
Mikroglialının Nöronal Ölüme Etkileri.....	9
Mikroglialının Sinaptogenezise Etkileri.....	9
Mikroglia ve Nörodejeneratif Hastalıklar	10
Mikroglia ve İnfeksiyon	10
2.2. İnflamazom.....	11
İnflamazom Aktivasyonu	11
NLRP3 İnflamazom Aktivatörleri.....	13
Mikrogliaada İnflamazom.....	16
2.3. Etil Piruvat.....	17
Genel Bilgiler	17
EP'nin Nöroprotektif Etkileri.....	17
Periferik Anti İnflamatuar Etkileri	18
<i>In vivo</i> Etkileri	18
<i>In vitro</i> Etkileri	21
Santral Anti İnflamatuar Etkileri.....	22

<i>In vivo</i> Etkileri	22
<i>In vitro</i> Etkileri	22
3. <u>GEREC VE YÖNTEM</u>	24
3.1. Araştırmanın Tipi	24
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	24
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	24
3.4. Çalışma Materyali	24
3.5. Çalışmanın Değişkenleri	24
3.6. Veri Toplama Araçları	25
Hücre Kültürü	25
Hücre Pasajı	25
<i>In vitro</i> Deneyle	26
Presto Blue ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	26
Propidium İyodür Boyaması ile Hücre Ölümünün Belirlenmesi	27
ELISA ile IL-1 β Sitokinin Ölçümü	27
EP'nin LPS + ATP ile İndüklenmiş N9 Mikroglia Hücrelerinde IL-1 β , IL-18 ve NALP3 Genlerinin mRNA Ekspresyon Seviyesine Etkisi	28
RNA İzolasyonu	28
cDNA Sentezi	29
Kantitatif PCR Analizi	29
İmmunoblot Yöntemiyle İnflamazom ile İlişkili Protein Değişimlerinin Gösterilmesi	29
Mitokondriyal Reaktif Oksijen Türlerinin MitoSOX ile Belirlenmesi	32
Hüresel Reaktif Oksijen Türlerinin CM-H ₂ DCFDA Yöntemi ile Belirlenmesi	32
Mitokondriyal Membran Potansiyelinin JC-1 Boyaması ile Belirlenmesi	32
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi:	34
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi:	34
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları:	35
3.10. Etik Kurul Onayı:	35
4. <u>SONUÇLAR</u>	36
4.3. EP'nin LPS + ATP ile İndüklenmiş N9 Mikroglia Hücrelerinde IL -1 β , IL-18 ve NALP3 Genlerinin mRNA Ekspresyon Seviyesine Etkisi	38

4.4. İmmüno blot Yöntemiyle İnflamazom ile İlişkili Protein Değişimlerinin Gösterilmesi	40
4.5. EP'nin LPS+ATP sitotoksitesinde N9 mikroglial hücre ölümü üzerine etkisi ...	42
4.6. EP'nin LPS+ATP ile uyarılmış mikroglial hücrelerin mitokondrial ROS üretimlerine olan etkisi.....	44
4.7. EP'nin LPS + ATP ile Uyarılmış Mikroglial Hücrelerin ROS Üretimlerine Olan Etkisi	45
4.8. EP'nin LPS + ATP ile Uyarılmış Mikroglial Hücrelerin Mitokondriyal Membran Potansiyeline Etkisinin Gösterilmesi	46
5. <u>TARTIŞMA</u>.....	47
6. <u>SONUÇ VE ÖNERİLER</u>	51
7. <u>KAYNAKLAR</u>.....	52
8. <u>EKLER</u>.....	59
8.1. EK-1 Etik Kurul Onayı	59
8.2. Özgeçmiş	62

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Etil Piruvat'ın in vivo Periferik Anti İnflamatuar Etkileri.....	20
Tablo 2: Antikor Listesi	31



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. NLRP3 inflamazom aktivasyonu:.....	10
Şekil 2. EP'nin çeşitli dozlarının bazal hücre ölümü üzerine etkisi:.....	35
Şekil 3. EP'nin IL-1 β sitokin seviyesine etkisinin ELISA yöntemiyle ölçülmesi:.....	36
Şekil 4. EP'nin inflamazom belirteci genlerin mRNA'ları üzerindeki baskılayıcı etkisi:.....	37
Şekil 5. EP'nin IL-1 β protein seviyesindeki etkisinin immünoiblottlama ile gösterilmesi:..	38
Şekil 6. EP'nin LPS+ATP ile indüklenen hücre ölümü üzerine etkisi:..	39
Şekil 7. LPS+ATP ile indüklenen mikroglial hücrelerin mitokondrial ROS üretimine EP'nin etkisi:..	40
Şekil 8.LPS+ATP ile indüklenen mikroglial hücrelerin ROS üretimine etkisi	40
Şekil 9. LPS+ATP ile indüklenen mikroglial hücrelerin membran potansiyelinin gösterilmesi:	41

KISALTMALAR

- ATP: Adenozin Trifosfat
- cDNA: Komplementer DNA (Complementary DNA)
- CNS: Santral Sinir Sistemi
- DAMP: Hasara-bağlı Moleküler Kalıplar (Danger-Associated Molecular Patterns)
- DC: Dendritik hücre
- DIC: Ayrımsal Girişim Zıtlıklı Işık Mikroskopisi (Differential Interference Contrast microscopy)
- 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
- LPS: Lipopolisakkarit
- MMP: Matriks Metaloproteinaz
- mRNA: Messenger RNA
- MS: Multipl Skleroz
- NADPH: Nikotin Adenin Dinükleotit Hidrojen Fosfat
- NALP3: NACHT, LRR ve PYD domainleri içeren Protein 3
- NF- κ B: Nükleer Faktör Kappa-B
- NLRP3: NOD benzeri reseptör ailesi pyrin domain içeren protein 3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing protein 3)
- NOD: Nükleotit –bağlı oligomerizasyon
- NRF2: Nükleer faktör-E2-ilişkili 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)

PI: Propidium İyodür

ROS: Reaktif Oksijen Türleri (Reactive oxygen species)

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

SOD1: Süperoksit Dismutaz 1

TLR: Toll-benzeri reseptör

TNF- α : Tümör Nekroz Faktör alfa



TEŞEKKÜR

Yüksek lisansımı tamamlarken bana yardımcı olan, bilgileriyle bana yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Şermin GENÇ'e,

Deneysel bilgileriyle bana destek olan Genç Lab ekibine,

Maddi ve en çok da manevi olarak bana her daim destek olan, bana sonsuz güvenen annem Deniz GÖKBAYRAK'a, babam Göktürk GÖKBAYRAK'a, teyzem Filiz MERGEN'e, anneannem Şeküre MERGEN'e,

Hayata beraber gözlerimi açtığım, sevgili yoldaşım Özde Elif GÖKBAYRAK'a,

İçtenliği ve yardımseverliğiyle yanımda olan, çalıştığım süre boyunca bana destek olan canım arkadaşlarım Tuğba ŞAN ve İrem ARTUN'a

Uzakta da olsa manevi desteğini esirgemeyen, canım dostum Erenay ÇERİ'ye,

Koşulsuz sevgisi ve sonsuz güveniyle her zaman yanımda olan, bilgisiyle bana farklı bakış açıları katan hayat arkadaşım Ekin ATAY'a teşekkür ediyorum.

İrem Nur GÖKBAYRAK

ETİL PİRUVAT'IN MİKROGLİAL HÜCRELERDE NLRP3 İNFLAMAZOM AKTİVASYONUNA ETKİSİ

İrem Nur GÖKBAYRAK, 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. İnflamazom aktivasyonun oluşabilmesi için makrofaj veya mikroglia hücrelerinin algılayacağı bir tehlike sinyalinin olması gerekir. Bu sinyal; patojenle ilişkili moleküler yapılar (PAMP) ya da hasarlanma ile ilişkili moleküler yapılar (DAMP) olarak adlandırılırlar. İnflamazom aktive olduğunda kaspaz-1 aracılığıyla interlökin-1 β (IL-1 β) ve interlökin-18 (IL-18) gibi sitokinlerin salınımı gerçekleşmektedir. İnflamazom aktivasyonu olduğunda hücre ölümü de gerçekleştiğinden, inflamazom aktivasyonunun regülasyonu ve baskılanması önem arz etmektedir. Etil Piruvat (EP) anti inflamatuvar ve pro metabolik etkileri olan bir moleküldür. EP'nin Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların klinik tablolarında iyileşme sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca BV2 mikroglial hücre hattında inflamatuvar aktivasyonu baskıladığı saptanmıştır. Çalışmamızda EP'nin N9 mikroglial hücre hattında inflamazom aktivasyonuna etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, N9 mikroglial hücrelerine Lipopolisakkarit (LPS) ve ATP uygulaması ile NOD benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren protein 3 (NLRP3) inflamazom aktivasyonu oluşturuldu. Öncelikle EP'nin inflamazom aktivasyonunu baskılayacak ve en önemlisi hücrelere toksik olmayacak dozu belirlenerek başlandı. Daha sonra inflamazom aktivasyonunun belirteçleri mRNA düzeyinde real-time PCR, protein düzeyinde ELISA ve immunblot yöntemleri ile incelendi. Bunun yanında mitokondriyal reaktif oksijen türleri (ROS) ve mitokondriyal membran potansiyeli florometrik yöntemlerle tespit edildi. Sonuçlarımıza göre EP, LPS+ATP modeli ile NLRP3 inflamazom aktivasyonu gerçekleştirilen N9 mikroglial hücrelerinde, IL-1 β ve IL-18 inflamatuvar sitokinlerinin mRNA düzeyinde miktarını istatistiksel olarak anlamlı azaltmıştır. Ayrıca, inflamazom ile 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 alışma EP'nin mikroglial hucelerde inflamazom aktivasyonunu baskıladığını gosteren ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Etil Piruvat, Mikroglia, NLRP3 inflamazom, piropitoz, LPS, ATP



THE EFFECTS OF ETHYL PYRUVATE ON NLRP3 INFLAMMASOME ACTIVATION IN MICROGLIAL CELLS

İrem Nur GÖKBAYRAK, Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences,
Department of Neuroscience, 35340, Inciraltı, İzmir

ABSTRACT

Inflammasome activation is a process that begins and develops differently from classical inflammatory responses. For inflammasome activation, a danger signal must first reach the macrophage or microglia cell. In order to induce inflammasome activation, there must be a danger signal detected by the macrophage or microglia cell. This signal either can be named damage-associated molecular pattern (DAMP) or pathogen-associated molecular pattern (PAMP). When inflammasome mediators are active, cytokines such as interleukin-1 β and interleukin-18 (IL-18) are released via caspase-1. Regulation and suppression of inflammasome activation is important because cell death can occur when inflammatory activity is present. Ethyl pyruvate (EP) is a molecule with anti-inflammatory and pro metabolic effects. EP has been shown to improve clinical presentation of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's. It was also found that BV2 inhibits inflammasome activation in the microglial cell line. In our study, it was aimed to investigate the effect of EP on N9 microglial cell line for inflammasome activation.

In our study, inflammasome activation of protein 3 (NLRP3) containing NAD-like receptor family pyrine domain by Lipopolysaccharide (LPS) and ATP administration to N9 microglial cells was established. First, it will play an active role in the inflammasome activation of EP and most importantly it has been started by determining the dose not toxic to the cells. Subsequently, outputs of inflammasome activation were examined by real-time PCR, protein level ELISA and immunoblot methods at mRNA level. In addition, mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential were determined by fluorometric methods. According to our results, EP significantly reduced the amount of IL-1 β and IL-18 inflammatory cytokines in mRNA level with LPS+ATP model which activates NLRP3 inflammasome in N9 microglial cells. In addition, it suppressed the amount of mitochondrial ROS and prevented the mitochondrial membrane potential from deteriorating. This study is the first to demonstrate that EP is effective to suppress the NLRP3 inflammasome activation in microglial cells.

Keywords: Ethyl Pyruvate, Microglia, NLRP3 Inflammasome, Pyroptosis, LPS, ATP



1. GİRİŞ VE AMAC

Mikroglial hücreler Santral Sinir Sistemi (SSS)'nin ana inflamatuvar hücreleridir. Mikroglial hücreler patojenik veya patolojik uyarılar 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. Etil Piruvat (EP) ise anti inflamatuvar ve sitoprotektif etkilere sahip bir kimyasaldır. Bu çalışmanın amacı EP'nin, Lipopolisakkarit (LPS) ve Adenozin Trifosfat (ATP) ile NOD benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren 3 (NLRP3) inflamazom aktivasyonundaki etkisini incelemektir.

Çalışmamızda, N9 mikroglial hücre hattı kullanıldı. Mikroglial hücrelerde NLRP3 inflamazom aktivasyonu LPS+ATP uygulanarak gerçekleştirildi. EP'nin NLRP3 inflamazom aktivasyon belirteçlerine etkisi protein ve mRNA ekspresyon düzeyinde incelendi. IL-1 β düzeyi ELISA yöntemiyle belirlenirken, IL-1 β proteininin düzeyi immüno blot yöntemi ile analiz edildi. mRNA seviyesinde ise IL-1 β , IL-18 ve NLRP3 düzeyleri real-time PCR yöntemi kullanılarak incelendi. NLRP3 inflamazom sonucu görülen pirototik hücre ölümü Propidium iyodür (PI) boyaması yapılarak incelendi. Mitokondriyal membran potansiyeli JC-1 boyaması ile mitokondriyal ROS oluşumu mitoSOX boyaması ve CM-H₂DCFDA yöntemleri ile incelendi.

Bu çalışma sonunda elde edilen bulgular EP'nin mikroglial hücrelerde NLRP3 inflamazom aktivasyonu ile ilişkili sitokinlerin salınımı ve proteinlerin ekspresyonu inhibe etmiş, ayrıca bu aktivasyonla indüklenen pirototik hücre ölümünü baskıladığını ortaya koymuştur.

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

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikroglia

Mikroglia, merkezi sinir sisteminde (CNS) yerleşik bulunan immün hücrelerdir ve bağışıklık yanıtında önemli bir rol oynarlar. Bunun yanı sıra nörovasküler birimin de (NVU) önemli bir bileşenidir (Spindler & Hsu, 2012). Mikroglia beyin hasarı ve immünolojik uyaranlar altında aktif hale gelir (Kreutzberg, 1996) ve “istirahat halinden” aktif duruma geçerken çeşitli değişiklikler geçirir (Hanisch & Kettenmann, 2007). Bu aktivasyonun sonucu olarak gerçekleşen nöroinflamasyon, nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesinde (McGeer & McGeer, 1995) ve kan-beyin bariyerinin (KBB) bozulmasında önemli rol oynar (Lassmann, van Horssen, & Mahad, 2012). Mikroglia, tüm glial hücrelerin %10 ila 15'ini oluşturur ve sıklıkla CNS'nin dokuya yerleşik makrofajları olarak adlandırılır. Ancak, meningeal, koroid pleksus ve perivasküler makrofajlardan farklı olarak mikroglia, yumurta sarısı (yolk sak) kesesinden köken alır ve CNS'yi doldurur (Ginhoux et al., 2010). Erişkin beyninde mikroglia, küçük bir hücre gövdesine sahiptir ve yüksek oranda parçalanmıştır. Bu özellikleri ile makrofajlardan ve dendritik hücrelerden (DC) ayrı bir morfolojiye sahiptirler. Mikroglia CNS gelişimi, homeostazisi ve neredeyse tüm CNS hastalıklarına katılır (Nayak, Roth, & McGavern, 2014).

Mikroglia Tarihçesi ve Kökeni

Mikroglia araştırmasının kökleri, Franz Nissl, Santiago Ramón y Cajal ve Pío del Río Hortega'nın öncü çalışmalarından gelmektedir. Ramón y Cajal'ın öğrencisi olan Río Hortega, bu hücreleri isimlendirdi ve mikroglianın babası olarak kabul edilmiştir (Kettenmann, Hanisch, Noda, & Verkhratsky, 2011). Hortega, mikroglianın temel morfolojik özelliklerini titizlikle tanımladı ve fagositik fonksiyonlarını tahmin etti. Ayrıntılı histolojik analizleri ile bugünkü mikroglial biyoloji anlayışının da temelini attı. Río Hortega'nın gözlemlerinden bu yana, mikroglia ile ilgili buluşlar büyük ölçüde gelişti. Karmaşık morfolojiye ve plastisiteye sahip olan mikroglia, sürekli değişen çevrelerinin ihtiyaçlarını karşılamak için fagositik faaliyetlere katılabilen beyinde yerleşik fagositlerdir, ancak işlevleri bunun ötesine uzanır (Goldmann, Tay, & Prinz, 2013).

Mikroglia Gelişimi

Mikroglial soy ve kökeni ile ilgili tartışmalar Río Hortega'nın keşfinden kısa bir süre sonra başladı. Periferik monositler/makrofajlar ve DC'lere fenotipik benzerlikler nedeniyle mikroglialın hematopoietik kökenli olduğu öne sürülmüştür. Nitekim bir dizi kemik iliğinin yeniden inşası çalışması ile mikroglialın myeloid kökenli olduğuna ve hematopoietik sistemden türediği sonucuna varmıştır (Simard & Rivest, 2004).

Başlangıçta mikroglialın dolaşan monositlerden türediği düşünülmüştür. Bu varsayım, radyasyona bağlı miyeloablasyonun kandan türetilmiş Ly-6C hi CCR2 + monositler tarafından CNS'nin geçişini kolaylaştırdığını gösteren çalışmalarla desteklenmektedir (Mildner et al., 2007). Yenidoğan gelişimi sırasında, işlenmiş miyeloid öncüleri mikrogliala farklılaştığı ve bu gelişim programı transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri, kemokinler, matriks metaloproteinazlar (MMP) ve mikroRNA'ları içeren ancak bunlarla sınırlı olmayan çeşitli moleküller tarafından kontrol edildiği bilinmektedir. Erişkin CNS'de mikroglia, mitoz ve apoptoz arasında bir denge ile sabit durum koşullarında tutulduğu belirlenmiştir (Wirenfeldt et al., 2009).

Mikroglialının Polarizasyonu

Mikroglia polarizasyonu yaralanmaya yanıt olarak gelişir. Pro inflamatuvar M1 (klasik) ve anti inflamatuvar M2 (alternatif) olmak üzere iki çeşit fenotip içerir (Hu et al., 2012). M1 polarizasyonunun indüksiyonu, bir sürü farklı sinyal yollarını içerir. Bunlardan bazıları; IFN- γ , IL-1 β , IL-6, TNF- α gibi sitokinler, Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve İndüklenen Nitrik Oksit Sentaz (iNOS) gibi metabolik enzimler, CD16 ve CD32 gibi yüzey reseptörleridir (Zhao et al., 2018).

Diğer taraftan, M2 polarizasyonuna IL-4, IL-10, TGF- β gibi sitokinler ve CD206 gibi yüzey belirteçleri aracılık eder (Martinez, Helming, & Gordon, 2009). M2 mikroglia, M1 mikroglialardan ayrı bir fonksiyona sahiptir. Glial hücreden türetilmiş nörotrofik faktör (GDNF) ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) dahil olmak üzere nöroprotektif faktörlerin salgılanması yoluyla doku hasarını iyileştirebilir (Matsushita, Nakajima, Tohyama, Kurihara et al., 2008).

Mikroglial Fonksiyonları

Mikroglia normal beyin gelişimi için vazgeçilmezdir. Gelişen beyinde mikroglionenez ve nörojenesis meydana geldiği düşünüldüğünde, bu iki mekanizmanın iç içe geçmesi muhtemeldir. Son on yıl boyunca yapılan çalışmalar ile mikroglial gelişim sırasında nöronlarla etkileştiği ve yetişkin CNS'de olduğu ortaya çıkmıştır. Bu etkileşimlerin bozulması, CNS gelişimi ve işlevi üzerinde ciddi bir olumsuz etkiye sahip olabilmektedir (Nayak et al., 2014).

Homeostatik fonksiyonlarının bir parçası olarak, mikroglial hücre gövdeleri sabit kalır, ancak süreçleri çevreleyen ekstraselüler alanı sürekli olarak tarar ve doğrudan nöronlar, astrositler ve kan damarları ile iletişim kurar. Mikroglialın sürekli hareket durumu, aktif bir fenotipe dönüşerek ve inflamatuvar fonksiyonları gerçekleştirerek hasara veya enfeksiyona hızlı bir şekilde yanıt vermelerini sağlar. Mikroglia çok çeşitli hasarlara karşı cevap verebilmektedirler. Örneğin parankimal hasar, dejenerasyon veya enfeksiyonun neden olduğu spesifik faktörlerin saptanması üzerine mikroglia, morfolojik dönüşümlere uğrar ve CNS hasarlarının üstesinden gelmek ve onarmak için tasarlanan genetik programların indüksiyonu yoluyla hızlı bir şekilde yanıt verir. Neredeyse tüm nöropatolojik durumlarda (örneğin dejeneratif hastalıklar, enfeksiyon, inme, tümörler, beyin hasarı) mikroglial morfoloji, fenotip ve fonksiyon dönüşümleri gözlemlenir (Nayak et al., 2014). Çalışmalar, bu uzmanlaşmış hücrelerin, CNS'nin genel sağlığının korunmasında büyük bir rol oynadığını göstermiştir (Goldmann et al., 2013).

Mikroglialın Nöronal Sağkalıma Etkileri

Erken gelişim sırasında, çeşitli nörotrofik faktörler spesifik nöronal soylarının ve sinaps oluşumunun farklılaşmasını ve sağkalımını destekler; yetişkinlik döneminde bu aynı nörotrofinlerden bazıları nöronların sağlığını ve sağkalımını düzenler. Mikroglialın önemli bir işlevi, nöronal sinapsların oluşumunu ve hayatta kalmalarını destekleyen trofik faktörleri serbest bırakarak çevredeki hücrelere katkıda bulunmasıdır. Örneğin, çevredeki mikroglia tarafından salınan insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), postnatal gelişim sırasında V tabakası kortikal nöronlarının hayatta kalmasını tetikler (Ueno et al., 2013).

Mikroglialın Nöronal Ölüme Etkileri

Olgunlaşmamış nöronların yaklaşık yarısı, öncelikle programlanmış hücre ölümüyle beyin gelişimi sırasında ölmektedir. Bu kapsamlı programlanmış hücre ölümünün nedeni tam olarak anlaşılmamış olsa da, hatalı farklılaşma ve göçten kaynaklanan hatalı nöronların fazlalığının ortadan kaldırılmasını gerektirdiği öne sürülmektedir. Ek olarak, uygun nöronal sinapsları oluşturmada başarısız olan veya sadece geçici fonksiyonları yerine getiren nöronlar programlanmış hücre ölümlerinden geçmelidir. Nöronal hücre ölümü, hücre içi faktörler tarafından veya programlanmış hücre ölümünü indüklemek ve ortaya çıkan hücre kalıntıları temizlemek için iyi dengelenmiş mikroglia gibi aksesuar hücreler tarafından başlatılabilir (Nayak et al., 2014).

Gelişim sırasında indüklenen hücre ölüm miktarı, ortaya çıkan hücre kalıntıları gidermek için etkin ve verimli bir temizleme sistemini zorunlu kılmaktadır. Bilindiği üzere, mikroglia bu temizlemeye fagositoz yoluyla katılır ve daha da önemlisi, bir inflamatuvar yanıtı başlatmadan fagositik hücreleri devreye sokabilir (Hristova et al., 2010).

Mikroglialın Sinaptogenezise Etkileri

Sinaptik homeostaz için mikroglial fagositik aktivite çok önemlidir (Wake, Moorhouse, Jinno, Kohsaka et al., 2009). Mikroglia gelişim sırasında nöronal budama sürecine katılır ve sinaptik aktivitenin yanı sıra plastisiteye cevap verir (Roumier et al., 2004). Embriyogenez sırasında ortaya çıkan ilk mikroglia miyeloid progenitörlerden türevlenmiştir ve bu aşamada hem astrogliogenez hem de oligodendrogliogenezden önce CNS'nin tek glial hücreleridir (Ginhoux et al., 2010). Böylece, astrositlerin yokluğunda, mikroglia erken embriyonik sinaptogenezde aktif bir rol oynar, pre ve postnatal gelişimin sonraki aşamalarında, mikroglia sinaptik budamanın kilit bir düzenleyicisi haline gelir ve bu şekilde nöral bağlantı gelişimini teşvik eder (Wu, Dissing-Olesen, MacVicar, & Stevens, 2015). Fraktalkin olarak da bilinen CX3 kemokin ligand 1 (CX3CL1), salgılanabilir veya membrana bağlı olabilir ve reseptörü olan CX3CR1, CNS mikroglia tarafından ekspres edilir (Jung et al., 2000). Mikroglialın sinaptik olgunlaşmayı desteklediği kesin mekanizması bilinmemekle birlikte, nöronlar tarafından salgılanan CX3CL1'in mikroglialıyı çeken ve CX3CL1'i CX3CR1'e bağladığı

bilinmektedir (Lauro et al., 2014). Öte yandan, CX3CR1 geninin susturulduğu farelerde yapılan bir çalışma, görsel korteksteki erken veya geç aktiviteye bağlı plastisitenin fraktalkin sinyallemesinden bağımsız olduğunu göstermiştir. Bu, sinaptik plastisitenin evrensel bir düzenleyicisi olmaktan ziyade, fraktalkinin böyle bir süreci bir bölgede ve/veya yaşa bağlı bir şekilde seçici olarak düzenleyebileceğini göstermiştir (Lowery, Tremblay, Hopkins, & Majewska, 2017).

Mikroglia ve Nörodejeneratif Hastalıklar

Mikroglia ve nöron arasında yakın ilişki olduğu bilinmektedir. Örneğin, disfonksiyonel ve hasarlı nöronların hastalığın birincil etkeni olmaları nedeniyle mikroglia bazı durumlarda nörodejeneratif hastalığa yanıt verebilir, bazen de hastalığı şiddetlendirebilir. Alzheimer, Parkinson, Huntington ve Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS) gibi nörodejeneratif hastalıklar, tüm nöronlarda anormal protein agregatları ile karakterizedir. Bu da mikroglianın aktif hale gelmesini ve başlangıçtaki rolünün nöroprotektif olmasına rağmen, CNS'de kronik bir nöroinflamatuvar duruma dönüşür (Nayak et al., 2014).

Mikroglia ve İnfeksiyon

Mikroglia, CNS parankimi içinde yer almakta ve bakteriler, mantarlar, parazitler ve virüsler de dahil olmak üzere çeşitli istilacı patojenlere karşı ilk savunma hattını sağlamaktadır. Mikroglia, doğuştan örüntü tanıma sistemlerine sahip olduğu için çeşitli patern tanıma reseptörlerinin ekspresyonu yoluyla, CNS'yi kolonize eden yabancı antijenleri tespit edip, aktivasyonu takiben anti-inflamatuar sitokinler, kemokinler, serbest radikaller ve trofik faktörler üreterek yanıt verir. Mikroglia ayrıca proliferasyon ve inflamasyon bölgelerine göç eder (Xu & Shinohara, 2017). Mikroglia tarafından kullanılan bu doğal programlar, zararlı patojenlerin hızlı kontrolünü sağlar ve T ve B hücreleri gibi adaptif bağışıklık hücrelerinin gelişimini düzenler. Mikroglia, hem MHC-I hem de MHC-II kompleksleriyle antijen sunabilir ve bu nedenle doğrudan patojen-spesifik CD8 + ve CD4 + T hücreleri ile etkileşime girer. Bu etkileşimler ile patojen temizlenmesinin desteklenmesi sağlanır ancak bazen regülasyonda meydana gelen problemler sebebiyle CNS' de patolojik durumlara yol açan yoğun inflamatuvar reaksiyonları da kolaylaştırır (Nayak et al., 2014).

2.2. İnflamazom

İnflamazom Aktivasyonu

İnflamasyon, patojenlere karşı konakçı savunmasında doğal ve adaptif immünite mekanizmalarının birlikte kullanıldığı bir bağışıklık yanıtıdır. İnflamasyon, patojene yanıt olarak nötrofil ve makrofaj gibi inflamatuvar hücrelerin birikmesiyle başlar, daha sonra patojenin fagosite edilmesi bazı kemokinlerin ve sitokinlerin salgılanmasına yol açar. Bu moleküller, lenfositleri aktive ederek adaptif immün yanıtı başlatır. Bu süreç, patojenin ortadan kaldırılmasıyla ya da inflamasyonun kronikleşmesiyle sonuçlanır (Bisht, Sharma, & Tremblay, 2018).

İnflamazom, büyük bir hücre içi PRR ailesine, nükleotit-bağlanan oligomerizasyon domain (NOD) benzeri reseptörlere (NLR'ler) ait büyük multimerik kompleks proteinler grubudur. NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12, NLRC4, AIM2, RIG-I ve IFI16 dahil olmak üzere birçok inflamazom tespit edilmiştir (Strowig, Henao-Mejia, Elinav, & Flavell, 2012). Vücuda yabancı olan hücre veya moleküller bağışıklık sistemi hücreleri tarafından membrana bağlı ya da sitoplazmik reseptörler olan “patern tanıyan reseptörler (PRRs)” tarafından tanınırlar. Bugüne kadar beş farklı tipte PRR tanımlanmıştır (Takeuchi & Akira, 2010). Bunlar;

- Hücre membranı veya endozomlarda bulunan Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler)
- NOD-benzeri, lösin zengin tekrarlar (LRR) içeren reseptörler (NLR'ler)
- İntraselüler yerleşimli ve antiviral bağışıklıkta önemli retinoik asit-indüklenebilir protein 1 (RIG-1)-benzeri reseptörler (RLR'ler)
- C-tipi lektin reseptörleri (CLR'ler)
- Pirin bölgesi ve intraselüler mikrobiyal DNA'nın tanındığı DNA-bağlayıcı HIN bölgesine sahip absent in melanoma 2 (AIM2)- benzeri reseptörler (ALR'ler)'dir.

Bu PRR'ler özgül ligandı ile bağlanıp, nükleer faktör- κ B (NF- κ B), mitojen ile aktive protein kinaz (MAPK) ve tip 1 interferon yolaklarını uyarırlar. Böylece proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin üretimi ve salgılanması başlamış olur (Jin, Lee, Park, Choi et al., 2007). PRR'ler “hasar ilişkili moleküler paternler (DAMP'lar)” olarak bilinen endojen molekülleri tanırlar. DAMP'lar hücre ya da doku hasarının olmadığı durumlarda, hücrenin içinde veya

ekstraselüler matrikste bulunması sayesinde immün sistem tarafından tespit edilemezler ancak hücrel stres veya hasar oluştuğu zaman serbest kalırlar (Srikrishna & Freeze, 2009).

İnflamazom, infeksiyöz ajanlara ve fizyolojik hasara karşı konakçı savunma mekanizmalarını düzenlemek için inflamatuvar hücreler tarafından oluşturulan multimerik protein komplekstir. İnflamazom kompleksi, genellikle NLR ailesinden bir PRR, adaptör protein olan ASC [CARD (kaspaz aktivasyon ve işe alım bölgesi) içeren apoptozis –ilişkili nokta benzeri protein] ve aktif kaspaz-1’den oluşur (Schroder & Tschopp, 2010). İnflamazom kompleksinin bir araya gelmesi NLR’ler veya ALR’ler tarafından düzenlenir, böylece pro inflamatuvar kaspaz-1’in aktivasyonu başlatılır. NLR oligomerize olur ve protein-bölge etkileşimleriyle ASC adaptör proteinine bağlanır. ASC ise kendisinde mevcut olan CARD bölgesiyle pro kaspaz-1’i aktif kaspaz-1’e dönüştürür. Aktif kaspaz-1 de, IL-1 β ve IL-18 sitokinlerinin öncül halde bulunan formlarını proteolitik olarak keser ve olgun hale getirir. İnflamazom kompleksleri, bulundukları PRR yapısına göre adlandırılırlar. Tanımlanmış dört farklı inflamazom kompleksi bulunmaktadır (Khare, Luc, Dorfleutner, & Stehlik, 2010).

- NLRP1 (NOD-, LRR- ve pyrin domain-içeren 1)
- NLRP3 (NOD-, LRR- ve pyrin domain- içeren 3)
- NLRC4 (NOD-, LRR- ve CARD domain-içeren 4)
- AIM2 (Absent in melanoma 2)

NLRP3 İnflamazom Aktivatörleri

Şekil 1' de gösterildiği üzere, NLRP3 aracılı IL-1 β sitokininin üretilmesi için iki farklı sinyal gerekmektedir. Hücre içinde pro IL-1 β miktarı düşüktür, bu nedenle ilk olarak öncül form ve NLRP3 üretilmelidir. İlk sinyal, NF- κ B'yi aktive eden ve NLRP3 ekspresyonunu indükleyen mikrobik veya endojen moleküller ile oluşur. Bu aktivasyon, infeksiyon varlığında LPS gibi mikrobiyal TLR veya NOD2 agonistleriyle, IL-1 β 'nin transkripsiyonu ve translasyonunu, ayrıca NLRP3 ekspresyonunu indükleyerek birinci sinyali başlatır (Franchi, Eigenbrod, Munoz-Planillo, & Nunez, 2009). ATP gibi ikinci bir sinyal ise, önce kaspaz-1'in aktivasyonuna, sonra IL-1 β 'nin kesilip salgılanmasına yol açan ve sonucunda piropitozisi tetikleyen inflamazom kompleksinin oluşmasını sağlar. NLRP3 inflamazomunun uyarılmasında birden fazla mekanizmanın rol oynadığı düşünülmektedir. Bunlar;

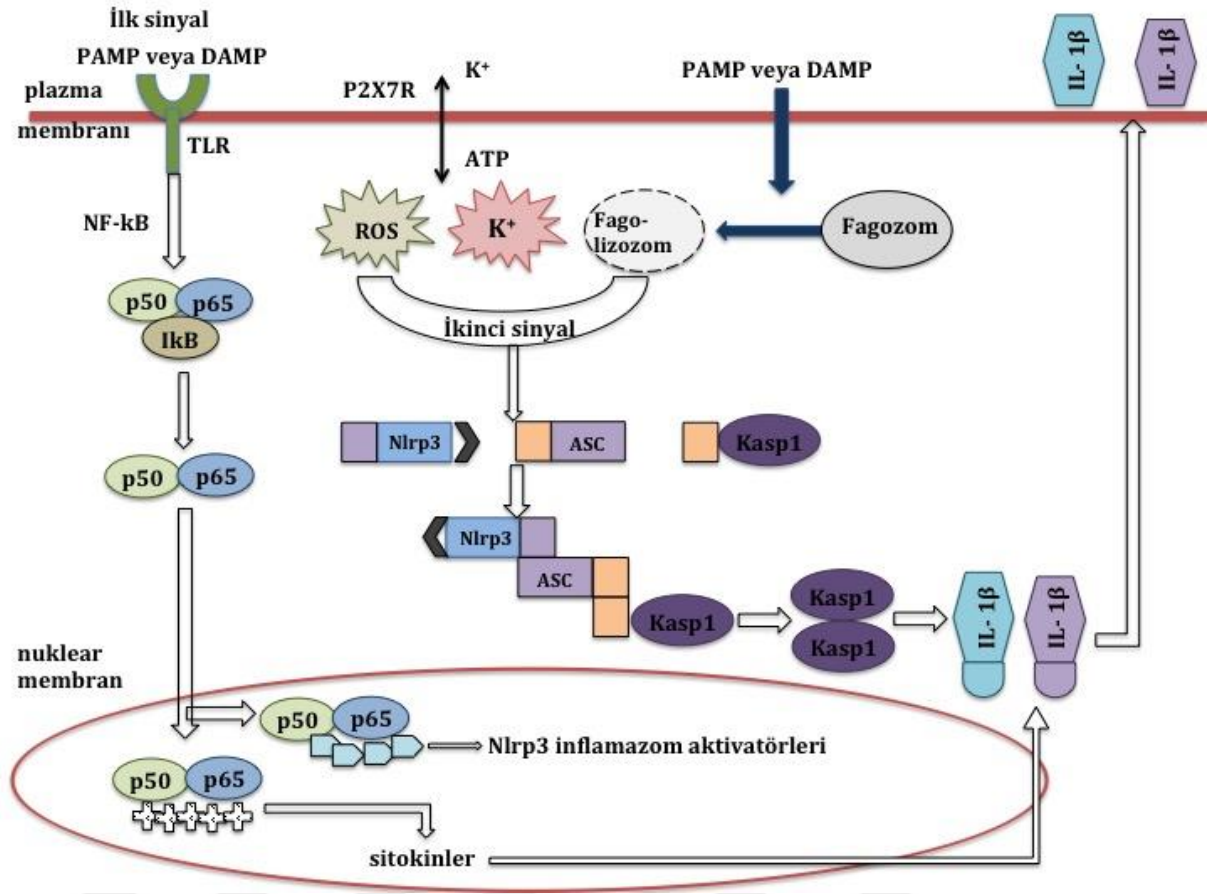
- NLRP3 antagonisti: ATP
- lizozomal destabilizasyon
- ROS-aracılı aktivasyon ve mitokondriyal hasar (Eisenbarth & Flavell, 2009).

K⁺ çıkışı, ATP ve bakteriyel bir toksin olan nigerisin dahil olmak üzere NLRP3 uyarılarının çoğuna yanıt olarak indüklenir. Hücre içi K⁺ konsantrasyonunun düşürülmesi, NLRP3 inflamazomunu aktive etmek için yeterlidir. ATP, hücre membranında bulunan P2RX7 pürinerjik reseptörüne bağlanarak K⁺ çıkışını sağlayan ATP-kapılı katyon kanalını açar ve bir kanal proteini olan pannexin-1 aracılığıyla por oluşturur, böylece hücre içi K⁺ bu porlardan serbest kalır. Öte yandan, nigerisin de pannexin-1'e bağlı bir şekilde K⁺ akışına neden olarak NLRP3'ün aktivasyonunu indükler (Pelegriin & Surprenant, 2006).

NLRP3 bağımlı kaspaz-1 aktivasyonu, lizozomal membranların bozulması ve lizozomal proteazlardan katepsin B'nin aktivasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. NLRP3 inflamazomlarını aktive eden tehlike sinyalleri arasında, monosodyum urat (MSU) ve silika gibi kristaller ve partiküler maddeler de yer alır. Makrofajlar ve nötrofiller dahil olmak üzere doğal immün hücreler yabancı maddeleri uzaklaştırmak için bu parçacıkları içine alır. Bununla birlikte, lizozomdaki fazla partikül yükü lizozomun destabilizasyonunu indükler. Katepsin B'nin sitozol içine sızması, NLRP3 inflamazom aktivasyonunu tetikler. Özellikle, lizozomal destabilizasyon ve katepsin B salınımı, kristaller ve partiküler madde ile NLRP3 inflamazom aktivasyonu için ortak bir yoldur (Hornung et al., 2008).

NLRP3 uyarımı ve kaspaz-1 aktivasyonu ile ilişkili bir diğer tehlike sinyali ise ROS'tur. ROS, inflamasyon oluştuğu zaman n6trofillerce 6retilir ve patojeni ortada kaldırır. Fakat aşırı h6cresel stres sebebiyle oksidatif stres oluşur, bunun sonucunda da h6cre 6l6m6 ve nekroz meydana gelir (Cano Sanchez, Lancel, Boulanger, & Neviere, 2018).





Şekil 1. NLRP3 inflammazom Aktivasyonu: Hücre dışı ve hücre içi patojen ilişkili moleküler paternler (PAMP'lar) NF-κBaktivasyonuna ve sitokinlerin transkripsiyonuna yol açan toll-benzeri reseptörler (TLR'ler; birinci sinyalleme) tarafından algılanır. NLRP3 aktivasyonunu harekete geçiren birkaç mekanizma mevcuttur. Bu mekanizmalar; K⁺ çıkışı, lizozomal hasar ve ROS üretimidir (ikinci sinyal). P2X7R'nin ATP ile aktivasyonu, membran porlarında K⁺ akışına ve hücre dışı faktörlerin sitoplazmaya girip NLRP3 aktivasyonuna yol açması ile sonuçlanır. Bazı patojenik mikropların fagositozu, lizozomların parçalanmasına yol açar, böylece katepsin B'yi sitoplazmaya bırakır ve NLRP3 aktivasyonuna neden olur. Adaptör molekülü ASC ve pro kaspaz-1'den oluşan NLRP3 inflammazom topluluğu, kaspaz-1 aktivasyonuna yol açar, bu da IL-1β ve IL-18 sitokinlerinin işlenmesi ve salgılanmasını tetikler (P. K. Anand ve ark., 2011, "Role of the NLRP3 Inflammasome in microbial infection" makalesinden uyarlanmıştır.)

Mikrogliaada İnflamazom

Mikroglia, ana immun hücre olmasından dolayı inflamazom aktivasyonu görülmektedir. Mikroglia, Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler), çöpçü reseptörleri (SR'ler) ve gelişmiş glikozilasyon son ürünleri (RAGE'ler) için reseptörler dahil olmak üzere, patern tanıma reseptörü (PRR'ler) familyasına ait çeşitli doğal bağışıklık reseptörlerini eksprese ederler. PRR'ler, patojenle ilişkili moleküler paternler (PAMP) veya hasara bağlı moleküler paternler (DAMP) gibi tehlike sinyallerine tepki verir. PRR'lerin mikroglial hücreler üzerindeki aktivasyonu üzerine, farklı sinyalleme kaskatları hücre aktivasyonunu ve inflamatuvar mediatörlerin üretimini tetikler (Venegas & Heneka, 2017).

Mikroglial hücrelerde inflamazom çeşitli ajanlar ile tetiklenmektedir. Bunlardan en sık bilineni LPS+ATP kombinasyonudur. LPS, gram-negatif bakteri hücre duvarında bulunan bir endotoksin olup, inflamasyonun etkili bir başlatıcısıdır (J. Shi et al., 2014). Çalışmalar sonucu LPS'in birçok reseptörü tanılanmıştır. Bunlardan en bilineni TLR-4'dür (Meng et al., 2018). TLR-4, patojenleri algılamada ve bağışıklık yanıtlarını başlatmada önemli bir rol oynar. LPS, başlangıçta astrositler ve CNS'de mikroglia eksprese eden TLR-4 /CD14 reseptör kompleksi tarafından tanınır (Cochet & Peri, 2017). Bu kompleks, TLR-4'e bağlanır ve transkripsiyon aktivatörü NF-κB'nin derpresyon yoluyla gen ekspresyonunu düzenleyen hücre içi bir sinyal yolunu başlatır. TLR-4 aktivasyonu, NF-κB fosforilasyonunu indükler ve pro inflamatuvar sitokinlerin salınmasına katkıda bulunur (Tao et al., 2018).

Hücre dışı ATP ise, immün hücre aktivasyonu için bilinen çeşitli mekanizmalara sahip, evrensel bir tehlike-ilişkili moleküler model (DAMP) olarak hareket edebilir (Gilbert et al., 2016). ATP'nin, tek başına veya LPS ile kombinasyon halinde, mikroglia ve astrositleri aktive ettiği ve merkezi sinir sisteminde bir nöroinflamatuvar yanıtı indüklediği gösterilmiştir (Lim et al., 2017).

Mikroglial hücrelerde inflamazom aktivasyonu üzerine yapılan çalışmalardan birinde, LPS ve ATP kombine verildiğinde, HMC3 insan mikroglia klon hücrelerinden IL-1β ve IL-18 sitokinlerinin salınımı uyarılmıştır (Li et al., 2018).

2.3. Etil Piruvat

Genel Bilgiler

Piruvat, hücrelerde ROS'un endojen toplayıcısı olarak işlev görür (Yang, Zhu, & Tonnessen, 2016). Piruvatın, oksidan aracılı hücrel veya organ sistemi hasarının *in vivo* ve *in vitro* modellerinde koruyucu olduğu gösterilmiştir. Ancak piruvat, çözelti içerisinde çok zayıf bir stabiliteye sahip olduğundan, terapötik ajan olarak faydalı değildir (Sims, Wattanasirichaigoon, Menconi, Ajami et al., 2001). Piruvat, bir mono-karboksilik asitin anyonik formu iken, EP, piruvik asitin 2-karbon alkol, etanol ile yoğunlaştırılmasıyla oluşturulan esterdir (Kao & Fink, 2010). EP'nin farmakolojik etkileri oldukça çeşitlidir. Pro inflamatuvar sitokinlerin sekresyonunun aşağı regülasyonu, gelişmiş anti tümör bağışıklığı, hücrelere ve dokulara redoks aracılı hasarın iyileştirilmesi, apoptozisin inhibisyonu ya da teşvik edilmesi ve hücrel ATP sentezinin desteği gibi etkileri mevcuttur (Wagner et al., 2018).

EP'nin Nöroprotektif Etkileri

EP'nin pek çok çalışmada nöroprotektif etkileri olduğu bildirilmiştir. Nöroprotektif etkilerine örnek olarak, EP primer kortikal kültürlerinde, Oksijen–Glukoz Deprivasyonu (OGD) ve Hidrojen Peroksit (H₂O₂) uygulamasına karşı nöroprotektif etki göstermiştir. 2011 yılında yapılan bir çalışmada 1-metil-4 fenil-1,2,3,6-tetrahidropridin (MPTP) ile oluşturulan Parkinson hastalığı fare modelinde, EP glial aktivasyonu ve oluşan oksidatif stresi regüle ederek nigrostriatal dopaminerjik nöronları MPTP nörotoksisitesinden koruduğu gösterilmiştir (Huh et al., 2011). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada neonatal hipoksi–iskemik (HI) beyin hasarı sonrası EP'nin beyin hasarını ve uzun süreli nörolojik fonksiyonları iyileştirdiği bildirilmiştir (H. Shen et al., 2010). Yine sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada travmatik beyin hasarı (TBH) sonrası verilen EP ile nörolojik test skorlarında iyileşme görülmüştür. Ayrıca EP'in MMP-9 aracılı KBB bozulması, nöroinflamasyon ve uzun süreli beyin hasarı arasındaki ilişkiyi bozarak TBH'ye karşı uzun vadeli nöroproteksiyon sağladığı görülmüştür (H. Shi et al., 2015).

Periferik Anti İnflamatuvar Etkileri

In vivo Etkileri

EP'ın pek çok dokuda farklı ajanlara karşı koruyucu etkileri olduğu bilinmektedir. Bu etkiler Tablo 1'de gösterilmiştir.

EP'nin akciğer hasarında iyileştirici etkisi görülmüştür. Fareler ile yapılan bir çalışmada, radyasyondan 20 hafta sonra kilo kaybeden farelerin, EP verildiğinde vücut ağırlıklarının korudukları tespit edilmiştir (Chen et al., 2017). Sıçanlar ile yapılan trinitrobenzensulfonik asit (TNBS) ile indüklenmiş kolit modelinde, makroskopik ve mikroskopik kolonik analizler sonucu EP'nin mukozal hücre yapılımasında iyileşme, nötrofil infiltrasyonunda ve pro inflamatuvar sitokinlerden olan IL-1 β , IL-6 ve IL-12'de azalma yarattığı görülmüştür (Algieri et al., 2016). Farelerde yapılan TNBS ile indüklenmiş kolit modelinde, EP'nin intrarektal olarak eklenmesi koliti iyileştirmiş ve intestinal sitokin üretimini azaltmıştır (Dave et al., 2009). Sıçanlarda akut kronik karaciğer hasarında (ACLF) EP'nin koruyucu etkisine bakılan bir çalışmada, EP'nin karaciğer dokusundaki mikroskopik iske mi bulgularını önemli ölçüde gerilet tiği ve endotoksinlerin serum seviyelerini azalttığı gözlenmiştir (L. W. Wang et al., 2012). EP'nin bölgesel iske mi/reperfüzyon(I/R) hasarı sonrası anti inflamatuvar etkisi ve gecikmiş miyokard koruyucu etkileri olduğu da bulunmuştur. Sıçanlar ile yapılan bir çalışmada, iskemiden bir saat önce sıçanlara intraperitoneal şekilde Ringer's Lactate Solution (RLS) ya da Ringer's Ethyl Pyruvate Solution (REPS) verilmiştir. EP'nin nötrofil aktivasyonunu, inflamatuvar sitokin salınımını ve NF- κ B translokasyonunu inhibe edebildiği gösterilmiştir. EP'nin *in vivo* sıçan kalp modelinde bölgesel I/R hasarı sonrası gecikmiş miyokard koruyucu etkisi görülmüştür (I. S. Jang et al., 2010). EP'nin enerji metabolizmasını düzenleyerek sepsise karşı koruyucu etki gösterdiği de bilinmektedir. Buna örnek olarak, çekal ligasyon ve ponksiyon ile indüklenen septik farelere, intraperitoneal olarak RLS ya da REPS verilip farklı zaman noktalarında IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TNF- α 'nın plazma seviyeleri, karaciğerlerde toplam antioksidatif kapasite, malondialdehid içeriği ve laktat ve laktat/piruvat seviyeleri ölçülmüştür. Daha sonra da karaciğerlerde adenosin trifosfat, toplam adenilat ve enerji yükü düzeyleri belirlenmiştir. Buna göre EP eklenmesinin sağ kalım oranını belirgin olarak arttırdığını ve plazma IL-1 β , IL-6 ve TNF- α

seviyelerini inhibe edip, IL-10 seviyesini arttırdığı görülmüştür. Ayrıca malondialdehit, laktat ve laktat/piruvat seviyelerinin yükselmesini belirgin bir şekilde inhibe ettiği ve karaciğer dokularındaki toplam antioksidatif kapasite seviyelerini arttırdığı bildirilmiştir. EP ile tedavi edilen septik farelerde adenosin trifosfat, toplam adenilat ve karaciğer dokularındaki enerji yükü seviyelerinin azaltılması tersine çevrilmiştir, böylece EP'nin sepsisin tedavisinde önemli bir bileşen olabilecek enerji metabolizmasını etkili bir şekilde düzenlediği gösterilmiştir (Kang et al., 2016).



Tablo 1. Etil Piruvat'ın in vivo Periferik Anti İnflamatuar Etkileri

Deney hayvanı	Hastalık	Sonuç	Kaynak
Fare, Sıçan	Akciğer Hasarı	HMGB1, IL-6, IL-1 β ve GM-CSF 'nin azalması ile pulmoner inflamasyonda, kollajen depozisyonunda, alveolar bütünlüğün bozulmasında azalma, TNF- α seviyesinde azalma ve akciğerlerde nötrofil sayısındaki azalma ile lokal inflamasyonun önlenmesi, karaciğer dokularındaki doku içi ödem ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunda azalma, nötrofil infiltrasyonunda ve serbest radikal üretiminde baskılanma ile sistemik ve lokal inflamasyonda azalma.	(Chen et al., 2017; Pulathan et al., 2014; Relja et al., 2016)
Sıçan, Fare	Trinitrobenzensulfonik asit (TNBS) ile indüklenmiş kolit	Mukoza sitoskeletonunda iyileşme, nötrofil infiltrasyonunda, pro inflamatuvar sitokinlerde ve intestinal TNF- α üretiminde azalma.	(Algieri et al., 2016; Dave et al., 2009)
Sıçan	Hiperglisemi	Apoptotik hücre ölümünün ve tubular hasar derecesinde, TNF- α ve IL-1 β 'nin serum konsantrasyonlarında, Bcl-2 ekspresyonunda, ayrıca artan kreatinin ve kan-üre nitrojeninde azalma, Bax ekspresyonunda artma.	(Jun et al., 2018)
Sıçan, Fare	Akut-Kronik Karaciğer Yetmezliği	İnflamatuar sitokinlerde, endotoksinin serum seviyelerinde, inflamatuvar hücre infiltrasyonunda ve hepatositlerde, hepatik lipid peroksidasyonunda, karaciğer dokusundaki lobüllerde yağ değişimi ve nekrozda azalma.	(L. W. Wang et al., 2012; Yang, Shauf, Killeen, & Fink, 2009)
Sıçan, Domuz	Travma sonrası hemoraji	Serum, dalak ve kalpteki TNF seviyelerinde azalma, IL-6 ekspresyonunda, hepatoselüler hasarda, NF- κ B aktivasyonunda, hepatik iNOS, TNF ve COX-2 mRNA ekspresyonlarında, akciğer, kalp ve terminal ileumda myeloperoksidaz seviyelerinde ve serum TNF seviyesinde azalma	(Cai et al., 2009; Dong et al., 2010; Yang, Zou, Koskinen, & Tenhunen, 2012)
Sıçan, Fare	İskemi/reperfüzyon hasarı	Nötrofil aktivasyonu, inflamatuvar sitokin salınımı ve NF- κ B translokasyonunda inhibisyon, polimorfo nükleer monosit aktivasyonunun baskılanması, farelerin iskelet kaslarındaki L- laktat seviyelerinde artış, myeloperoksidaz seviyelerinde azalma, motor nöronların sayısının korunması, kollajen fiber degradasyonunun engellenmesi ve elastik lamellerin dalgali yapısının düzeltilmesi ile endotelial hücreler ve yumuşak kas hücrelerinin korunması	(Crawford et al., 2011; I. S. Jang et al., 2010; Nguyen et al., 2016)
Fare	Sepsis	İnflamatuar sitokinlerde, oksidatif hasarda, metabolik asidoziste, TNF- α 'nın plazma seviyesindeki ve böbrekteki mRNA ekspresyonunda azalma, malondialdehid, laktat ve laktat/piruvat seviyelerindeki artışın baskılanması, serumda kreatinin seviyesinde, çoklu organ hasarında ve tubular hasarda düşüş.	(Kang et al., 2016; Miyaji et al., 2003)
Fare	Spinal kord hasarı	Motor fonksiyonlardaki kaybın önlenmesi, nötrofil infiltrasyonunda, inflamatuvar sitokinlerinin spinal kord düzeylerinde azalma.	(Genovese et al., 2009)

***In vitro* Etkileri**

EP'nin *in vitro*'da da anti inflamatuvar etkileri de tespit edilmiştir. Bir çalışmada, EP'nin radyasyon ile indüklenmiş akciğer hasarını hafiflettiği de tespit edilmiştir. İnsan bronş epitelyal hücreleri (HBE) ve mürin makrofaj benzeri hücrelerinde (RAW 264.7) yapılan bir çalışmada, EP'nin radyasyon koruyucu etkisini test etmek için, 2 saat boyunca farklı dozlarda EP ile HBE ve RAW264.7 hücrelerini önceden işleminden geçirilmiş ve ardından hücreler farklı dozlarda radyasyona maruz bırakılmıştır. Koloni formasyon analizi sonucu, HBE hücrelerinde koruyucu etki görülüp, RAW264.7'de bir etkiye rastlanmamıştır (Chen et al., 2017). IL-6 tarafından indüklenen *in vitro* akut inflamasyon modeli olan başka bir çalışmada ise, nötrofillerin insan akciğer epitelyal hücrelerine yapışmaları EP ile azaltılmıştır. İzole hemorajik şokta EP, TNF- α ve IL-6'yı azaltarak inflamatuvar cevabı azaltma kapasitesini göstermiştir, bu da nötrofillerin daha az göçünü ve bağırsak mukozal fonksiyonunun korunmasını sağlamıştır. Öte yandan, LPS ile indüklenen şokta veya sepsiste, IL-6 ve TNF- α 'yı içeren bazı sitokinlerin plazma seviyelerini düşürmüş ve akciğer fonksiyonunu iyileştirmiştir (Relja et al., 2014). Endotelial hücrelerde, TNF- α stresi ile oluşan inflamatuvar hasara karşı EP'nin koruyucu olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada HUVEC hücreleri kullanılıp, TNF- α verildiğinde, hücre kültürü süpernatantlarında monosit adhezyonunun HUVEC ve inflamatuvar sitokin üretimini önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiş, dahası HUVEC'lerde ICAM ve MMP9 protein ekspresyonunun da arttığı bildirilmiştir. Ayrıca TNF- α HUVEC'lerde ERS ile ilgili molekülleri etkin bir şekilde arttırmıştır. EP tedavisi ile monositlerin TNF- α kaynaklı adezyonunun HUVEC'ler, inflamatuvar sitokinler ve ERS-ilişkili moleküller üzerindeki etkilerini başarılı bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür. Bu çalışma ile, EP'nin vasküler endotelial inflamasyonu etkili bir şekilde azaltabildiği ve bu etkinin en azından kısmen ERS'nin zayıflamasına bağlı olduğu gösterilmiştir (G. Wang et al., 2014).

Santral Anti İnflamatuar Etkileri

***In vivo* Etkileri**

EP'nin anti inflammatuar etkileri *in vivo* deneyler ile gösterilmiştir. Örneğin yeni doğan sıçan beyinlerinde LPS ile indüklenen beyaz madde hasarının incelendiği bir çalışmada, EP tedavisi ile ventrikül genişlemesini azaltarak hasarı iyileştirildiği gösterilmiştir (Fang, Zheng, & Zhang, 2016).

EP bazı maddelerle kombine şeklinde kullanıldığında da anti inflammatuar özellik göstermektedir. Buna örnek olarak yapılan bir çalışmada, MCAO hayvan modelinde uygulanan Aspirin ve EP kombine tedavisi sonucu sinerjistik bir nöroproteksiyon sağlandığı bildirilmiştir (S. W. Kim et al., 2010).

***In vitro* Etkileri**

EP'nin anti inflammatuar etkileri *in vitro* çalışmalar ile de gösterilmiştir. Örneğin, LPS ile indüklenmiş BV2 mikroglia hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, TNF- α , Nitrik Oksit (NO) ve reaktif oksijen türleri (ROS)'nin salınımını baskıladığı bildirilmiştir, MMP-9 ekspresyonunu hem mRNA hem de protein düzeyinde baskıladığı gösterilmiştir (Lee & Kim, 2011; Su et al., 2013). EP'nin, LPS ile indüklenen primer mikroglia kültürlerinin aktivasyonunu, NO salınımını azaltarak ve nükleer NF-kB aktivasyonunun indüklenmesiyle eşlik eden pro inflammatuar faktörleri baskıladığı görülmüştür (S. W. Kim et al., 2010).

EP'nin kısa süreli etkilerinin de anti inflammatuar özellik gösterdiği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Buna göre, BV2 mikroglial hücreleri, 10 dakika ila 60 dakika arasında değişen zaman aralıklarında EP ile ön inkübasyon tabii tutulduğunda, pro inflammatuar sitokinlerden IL-6 ve TNF- α ve NO salınımında azalma görülmüştür (Stanisavljevic, Jevtic, Djedovic, & Miljkovic, 2015).

Etil Piruvatın Etki Mekanizması

EP'nin etkisine aracılık eden en önemli molekülün HMGB1 olduğu bilinmektedir. HMGB1, histon olmayan, kromatinle–ilişkili nükleer proteindir. Hem hücre içi hem de hücre dışı önemli rolleri olan bir DAMP molekülü olarak kabul edilir. HMGB1, uyarılmış makrofajlar ve enterositler tarafından aktif olarak salgılanır ve apoptotik hücreler tarafından serbest bırakılır. Ekstraselüler HMGB1 inflamatuvar aracılığı uyarır ve endotoksemi, I/R ve artrit gibi sitokinle indüklenen patolojilerde yer alır (Dave et al., 2009).

Önceki çalışmalarda, EP'nin anti inflamatuvar etkisinin HMGB1 salınımını inhibe ettiği kanıtlanmıştır (Y. M. Kim et al., 2016). *In vivo* bir çalışmada ise yerleşik endotoksemi, sepsis ve murin koliti olan farelerde, EP'nin dolaşımdaki HMGB1 seviyelerini azalttığı ve ölümü önemli ölçüde engellediği bildirilmiştir (Dave et al., 2009). BV2 mikroglia ve RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada ise, EP'nin, HMGB1 ekspresyonunu ve salgılanmasını baskılayarak, inflamatuvar yanıtları inhibe eden terapötik bir yol sağladığı gösterilmiştir (Shin et al., 2015).

Ayrıca EP'nin bir diğer sinyal mekanizması olan STAT aracılığıyla işlev gördüğü bilinmektedir. EP, LPS ile uyarılan mikroglia da STAT1 ve STAT3'ün tirozin fosforilasyonunun inhibisyonuna yol açan JAK2 fosforilasyonunu baskılamıştır. Bu inhibisyon ile STAT1 ve STAT3'ün çekirdeğe translokasyonu bloke edilmiş, aynı zamanda STAT1 ve STAT3'ün her iki gen promoteri ile birleşmesi de engellenerek, iNOS ve COX-2'nin STAT-duyarlı genlerinin ekspresyonu bastırılmıştır (H. S. Kim et al., 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Çalışma deneysel (*in vitro*) bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışmamız Temmuz 2017 tarihinde başladı. 01. 03. 2018 tarihinde etik kurul onayı alındı. Deneyle Ağustos 2017 tarihinden Haziran 2018 tarihine kadar 9 Eylül Üniversitesi İzmir Biyotıp ve Genom Merkezinde (İBG) yürütüldü. Haziran 2018 tarihinde deney sonuçlarının analizlerine başlandı. Temmuz 2018 biten veri analizlerinden sonra tez yazımına başlandı. Kasım 2018 tarihinde tez yazımı tamamlandı.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Çalışmamız insan çalışması olmayıp, deneysel (*in vitro*) bir çalışma olduğundan araştırmanın evreni bulunmamaktadır.

3.4. Çalışma Materyali

Araştırmada N9 fare mikroglial hücre hattı kullanıldı.

3.5. Çalışmanın Değişkenleri

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

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

3.6. Veri Toplama Araçları

Hücre Kültürü

Bu çalışmada Dr. Paola Ricciardi–Castagnoli'den sağlanan (Cellular Pharmacology Center, Milan, İtalya) N9 fare mikroglial hücre hattı kullanıldı. Hücrelerin kültürü için %10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum; FBS, Gibco, Kat No:10500064), 2 mM L-Glutamin (Biochrom, Kat No: K0302), 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin (BioChrom, Kat No: A2213) içeren RPMI 1640 ortamı (Biochrom, Kat No: FG1215) kullanıldı. Hücreler 25 cm²'lik kültür flasklarına ekilip iki günde bir %0.05 konsantrasyonda Tripsin/EDTA (Biochrom, Kat No: L2163) ile pasajlandı. Hücreler %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C 'de inkübe edildi.

Hücre Pasajı

Hücreler inkübatörden çıkartılıp mikroskop altında kontrol edildi. Sağlıklı oldukları ve yüzeyi kapladıkları görülünce flask kabinete dik şekilde kondu ve kapağı yavaşça açılarak flaskın yüzeyine değmeden ortam cam pipet ile çekildi. Flaska 5 mL PBS (Invitrogen, Kat no: 14190-144) eklendi ve fazla bekletmeden cam pipet ile uzaklaştırılarak yıkama yapıldı. Hücreleri kaldırmak için üzerine 1 mL Tripsin/EDTA eklendi. Flask inkübatöre kaldırıldı ve enzimin ısı ile reaksiyon başlatması ve hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması için 1-2 dakika bekletildi. Sürenin sonunda flask inkübatörden çıkartılıp, birkaç defa yüzeye vurarak mekanik etki ile de hücrelerin tamamen kalkması sağlandı. Hücrelerin kalktığı mikroskop ile gözlemledikten sonra flask kabinete dik şekilde konuldu. Tripsini inhibe etmek için komplet mediumdan 2 mL eklendi ve 5 mL'lik pipetle çok sayıda pipetaj ile yıkama yapıldı. Flask iyice yıkandıktan sonra hücreler 15 mL'lik falcon tüpe aktarıldı. 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Steril cam pipet ile hücre pelletine dokunmadan süpernatant çekilip atıldı. Ardından 2 mL komplet medium eklendi ve pellet pipetaj ile çözüldü. Hücreleri saymak için süspansiyondan 10 µL alındı ve 1.5 mL'lik ependorf tüplerine, Trypan Blue (Gibco, Kat no: 15250061) boyası ile karıştırıldı. Thoma lamı ile hücre sayımı yapıldı. Hücre süspansiyonundan, son hacmi 5 mL olan 25 cm²'lik kültür flaskına 3x10⁵ yoğunlukta hücre ekildi. Hücreler mikroskopta incelendi. Daha sonra flask inkübatöre kaldırıldı.

***In vitro* Deneyle**

Hücre canlılığını saptamak için kullanılan Presto Blue, inflamatuvar sitokin düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan ELISA ve ROS türlerinin belirlenmesinde kullanılan mitoSOX, CM-H₂DCFDA ve JC-1 için *in vitro* deneyle 96 kuyucuklu plaklarda yapıldı. Yalnızca JC-1 ve CM-H₂DCFDA deneyle için siyah plak kullanıldı çünkü bu boyalar ışığa duyarlıdır. Hücre ölüm tipini belirlemek için yapılan PI için *in vitro* deneyle 48 kuyucuklu plaklarda gerçekleştirildi. mRNA düzeylerinin belirlenmesi için yapılan *in vitro* deney 25 cm² lik flasklarda, protein seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan immun blot yöntemi için 75 cm² lik flasklarda *in vitro* deneyle gerçekleştirildi.

Hücre ekim yoğunluğu 96 kuyucuklu plak için kuyucuk başına 1x10⁴ hücre ve 200 µl son hacim olacak şekilde ekildi. Yalnızca ELISA deneyi için bu oran 5x10⁴ olarak değiştirildi. 48 kuyucuklu plak için kuyucuk başına 3x10⁴ hücre ve 400 µl son hacim olacak şekilde ekildi. 25 cm² lik flasklar için flask başına 1x10⁶ hücre olup, 4 ml son hacim, 75 cm² lik flasklar için flask başına 3x10⁶ hücre olup 8 ml son hacim olacak şekilde ekildi.

Kontrol grubuna 2 mM L-Glutamin içeren RPMI 1640 deney ortamından eklendi. EP + LPS+ ATP grubuna 10 mM EP (Sigma Aldrich, Kat no: E47808) eklendi ve 37°C 'lik inkübatörde 1 saat ön işleme tabi tutuldu. Sürenin sonunda, LPS+ATP grubuna 1 µg/ml LPS (Invivo Gen, Kat No: tlr1-3pelps), EP+LPS+ATP grubuna da 10 mM EP ve 1 µg/ml LPS içeren deney ortamı eklenip, 37°C'lik inkübatörde 4 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda, LPS+ATP grubuna 1 µg/ml LPS ve 20 mM ATP (son konsantrasyon = 5 mM) (Sigma Aldrich, Kat no: A 6419 -5G) içeren deney ortamından eklendi. EP+LPS+ATP grubuna ise 10 mM EP, 1 µg/ml LPS ve 20 mM ATP (son konsantrasyon = 5 mM) içeren deney ortamından eklendi. Hücreler 1 saat boyunca 37°C'lik inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

Presto Blue ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

EP'nin farklı dozlarının (0-100 mM) hücre canlılığı üzerine olan bazal etkisi Presto Blue (ThermoFisher, Kat no: A13261) ile belirlendi. Deney süresi sonunda, plaktaki 200 µL supernatantın 110 µL'si çekilerek üzerine 10 µL Presto Blue eklendi. Hücreler 15 dakika

37°C’de inkübasyona bırakıldı. Ardından mikropalak okuyucu cihazda florimetrik okutma yapıp absorbands değeri elde edildi. Kontrol grubu %100 canlı kabul edildi ve örneklerin canlılığı kontrole oranlanarak verildi.

Propidium İyodür Boyaması ile Hücre Ölümünün Belirlenmesi

EP’nin inflamazon aktivasyonu ile oluşan hücre ölümüne karşı koruyucu etkisi Propidium İyodür (Invitrogen, Kat No: P1304MP) boyama yapılarak belirlendi. Deney süresinin sonunda plaktaki 200 µL supernatantın üstüne 50 µg/mL konsantrasyondaki PI boyasından 20 µL eklendi, 15 dakika sonra floresan mikroskop ile kuyular fotoğraflandı. Her bir kuyudan 20x büyütmede üçer fotoğraf alındı. Fotoğraf alanındaki tüm hücreler ve PI pozitif hücreler Image J programının hücre sayıcı eklentisi ile sayıldı. Kontrol grubu %100 canlı kabul edilip, sonuçlar PI pozitif hücre sayısı total hücre sayısına oranlanarak % şeklinde verildi.

ELISA ile IL-1β Sitokin Ölçümü

EP’nin inflamazon aktivasyonuna karşı mikroglia hücrelerinde IL-1β sitokin salınımına etkisinin belirlenmesi için sandviç ELISA (eBioscience, Kat No: 88- 7013- 86, ABD) yöntemini kullanıldı. In vitro deneyin bitiminde örneklerden supernatantlar toplandı. Kitin içinde mevcut olan Mouse IL-1β Lyophilizek Standart (Affymetrix, Ref: 29-8012-60) 1X ELISPOT ile çözülüp, konsantrasyonu 1000 pg/ml hale getirildi. Yine 1X ELISPOT ile seri dilüsyon yapılarak 500, 250, 125, 62.5, 31.2 ve 15.6 pg/ml konsantrasyonlar elde edildi. Bu standart örnekleri, standart eğrisini çizdirmek için kullanıldı. Örneklerin seyreltilmesi amacıyla kuyu başına 50 µl 1X ELISPOT eklendi. Örneklerin supernatantlarından 50 µl/kuyu, yüzeyi IL-1β antikoru ile kaplı plaklara eklenip +4 derecede bir gece inkübe edildi. Ertesi gün ELISA plağı 3 kere, 200 µl/kuyu eklenerek yıkama solüsyonu ile yıkandı. Sonra, kuyu başına 100µl biyotin konjuge solüsyonundan eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda tekrardan 3 kez 200 µl/kuyu yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yıkama bitince 100 µl/kuyu HRP-Avidin solüsyonu eklendi ve yarım saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Sürenin bitiminde 7 kere 200 µl/kuyu yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yıkama

işleminde sonra, 100 µl TMB kromojen eklenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta örneklerin rengi maviye dönene kadar inkübe edildi. Renk dönüşümü gözlenince 100 µl stop solüsyonundan eklenerek deney sonlandırıldı. Varioskan plak okuyucu cihazında 450/ 610 (eksitasyon/emisyon) nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Standart eğri yardımıyla IL-1β sonuçları hesaplandı.

EP'nin LPS + ATP ile İndüklenmiş N9 Mikroglia Hücrelerinde IL-1β, IL-18 ve NALP3 Genlerinin mRNA Ekspresyon Seviyesine Etkisi

RNA İzolasyonu

EP'nin inflamazom aktivasyonuna etkileri, Real time PCR (RT-PCR) yöntemi kullanılarak IL-1β, IL-18 ve NALP3 mRNA ekspresyonları belirlenerek incelendi. İzolasyona başlarken, öncelikle total RNA, Nucleospin RNA izolasyon kiti (Macherey –Nagel, Kat no: 740955.50) ile izole edildi. Her örneğin üzerine 350 µl LBP lizis solüsyonu eklendi ve pipetaj yapıldıktan sonra vortekslenerek iyice parçalandı. Kite mevcut olan gDNA temizleme kolonu kullanılarak lizise uğratılmış örnekler 11,000 x g'de 30 saniye boyunca santrifüj edildi. Sonrasında, kolondan geçen sıvıya 100 µl Binding solution eklenip vortekslenerek iyice karıştırıldı. Örnekler RNA Plus kolonuna aktarıldı ve 15 saniye boyunca 11,000 x g de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda kolondan geçen sıvı atık kabına döküldü ve kolonu yıkama aşamasına geçildi.

Mavi kolon 200 µl WB1 solüsyonu ile 5 saniye boyunca 11,000 g de santrifüj edildi. Daha sonra mavi kolon çıkartılıp, yeni bir koleksiyon tübüne yerleştirildi. Üzerine 600 µl WB2 solüsyonu eklendi ve 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 sona erince başka bir koleksiyon tübüne yerleştirilen mavi kolonun üzerine 30 µl nükleaz içermeyen su eklendi ve 1 dakika boyunca 11,000 g de santrifüj edildi. Sonrasında aynı işlem tekrarlanarak RNA'nın elüsyonu tamamlandı.

Elde edilen RNA'nın saflığını ve konsantrasyonunu ölçmek için spektrofotometrik ölçüm kullanıldı. A260/A230 oranları kontrol edilen RNA örneklerinden değerleri 1,8 ile 2,2 arasında olan örnekler seçildi ve bir dahaki kullanıma kadar -80°C ye kaldırıldı.

cDNA Sentezi

Elde edilen RNA örneklerinden iScript (Bio-Rad, ABD) Komplementer DNA (cDNA) sentez kitiyle cDNA sentezi yapıldı. Sentezleme için bir reaksiyon 1µg 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 oldu. 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.

Kantitatif PCR Analizi

cDNA sentezlenmesinden sonra, elde edilen cDNA'ler ile qPCR analizi yapıldı. qPCR analizi için GoTaq qPCR (Promega, ABD) kiti kullanıldı. Bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Kitin içinde bulunan qPCR master karışımı buz üzerinde çözülerek başlandı. Çözüldükten 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, 2µl cDNA ve de 6 µl nükleaz içermeyen su kullanıldı. qPCR analizi için Light Cycler 1.5 (Roche, Almanya) cihazı kullanıldı. İnflamazom belirteçlerinden olan IL-1β, ve NALP3 mRNA'larına spesifik primerler ile analiz yapıldı. Analiz yapılırken ayrıca Housekeeping gen olan Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) kullanılarak örnekler arasında normalizasyon yapıldı. Reaksiyon, 10 dakika 95°C, 10 saniye 60°C ve 30 saniye 72°C şeklinde 40 döngü şeklinde tamamlandı. RT-PCR analizi bittikten sonra, reaksiyonun kontrolü erime eğrisi analiziyle sağlandı. Daha sonra her bir örneğin kat değişimi $\Delta\Delta Ct$ yöntemi ile hesaplandı.

İmmunoblot Yöntemiyle İnflamazom ile İlişkili Protein Değişimlerinin Gösterilmesi

EP'nin inflamazom aktivasyonuna olan etkisini protein miktarı açısından göstermek amacıyla, inflamazomda rol alan proteinlerden olan NALP3' nin ve aktivasyonun sağlanmasında gerekli bir enzim olan IL-1β'nin spesifik antikoları kullanılarak analiz

yapıldı. IL-1 β sitokin düzeyi hem hücre içinde hem de süpernatantta her iki formunu tespit edebilen antikolar ile bakıldı.

In vitro deneyin sonunda, final hacmi 8 ml olan 75 cm²'lik flasklardan hücreler, hücre kazıyıcı yardımıyla kaldırıldı. Kaldırılan hücreler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Sonra örneklerin süpernatantı falkonlara aktarıldı ve liyofilizatör cihazında toz haline getirildi. Toz haline getirilen süpernatantlar %1 proteinaz inhibitör içeren 1 ml RIPA solüsyonu ile çözüldü. Santrifüjden sonra ortaya çıkan hücre pelleti ise %1 proteinaz inhibitörü içeren 1 ml RIPA solüsyonuna konuldu ve örnekler daha sonra kullanılmak üzere -80°C ye kaldırıldı.

Örnekler jele yüklenmeden önce, BCA protein analizi (BCA protein assay kit, Lot: QL227062, Thermo Scientific) yapılarak kullanılacak örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi. BCA için örnek hazırlarken lizatlar 1:30, süpernatantlar ise 1:50 olacak şekilde saf su ile seyreltildi. Öncelikle BCA standartları, daha sonra da örnekler 96 kuyucuklu plaklara konuldu. Bundan sonra, BCA solüsyonu 50:1 oranında hazırlanıp, standart ve örneklerin üzerine eklendi. Mikroplak 60⁰ etüvde inkübasyona bırakıldı. Standartların rengi koyu mora dönene kadar bekletildi, daha sonra mikroplak okuyucuda okutulup, absorbans değerleri elde edildi. Elde edilen standart eğri yardımıyla örneklerin konsantrasyonları hesaplandı. Örnek başına 50 μ g/ml yüklenecek olan proteinler, 5X LB yükleme boyası ile karıştırıldı. Daha sonra 95⁰' de 5 dakika boyunca bekletildi ve %10'luk SDS-PAGE jele yüklendi. Jelin başına marker olarak Opti Protein Express Marker (Cat: G494) yüklendi. SDS-PAGE jel ile ayrılan örnekler daha sonra PVDF (polivinilden difilorür) membranına transfer edildi. Transferin sonunda membran, 1X TBST içerisinde hazırlanmış %5'lik süt solüsyonu ile bloklandı ve söz konusu proteinlere özel primer antikolar ile (Tablo 2.) inkübe edildi. Kontrol proteini olarak Beta Aktin kullanıldı. Daha sonra örnekler, Horseradish Peroxidase (HRP) ile işaretlenmiş sekonder antikor ile muamele edildi. Görüntüleme kimyasal ışımaya yöntemine dayanan ECL solüsyonu kullanıldı. Görüntüler, Chemi-Smart 5100 jel dökümantasyon sistemi ile elde edildi. Bant yoğunluklarının dansitometrik analizi ise Image J adlı program kullanılarak yapıldı. Süpernatanttaki protein sonuçları dansitometrik olarak, hücre içi proteinler ise Aktin'e oranlanarak verildi.

Tablo 2: Antikor Listesi

Antikoru Adı	Firma Adı	Katalog Numarası	Primer Antikor Dilüsyon Oranı	Sekonder Antikor Dilüsyon Oranı
IL-1 β	Abcam	Ab-9722	1:1000 (%3 BSA içinde)	1: 10000 (%5 süt içinde)
β -Aktin	Abcam	Ab-8727	1:1000(%3 BSA içinde)	1:10000 (%5süt içinde)



Mitokondriyal Reaktif Oksijen Türlerinin MitoSOX ile Belirlenmesi

Mitokondriyal ROS aktivasyonunun saptanması için mitoSOX boyası kullanıldı. 5 mM'lık mitoSOX elde etmek için toz halindeki 50 µg'lık mitoSOX indikatörü içeren vial (Thermoscientific, Kat No: M36008, ABD) 13 µL DMSO ile eklenip pipetleyerek çözüldü. Daha sonra PBS ile 1/200 oranında seyreltildi. Bu esnada konsantrasyon 25 µM oldu. Bu seyreltmeden her bir kuyuya 50 µl mitoSOX eklendi ve böylece kuyudaki son konsantrasyon 5 µM oldu. Hücreler 37°C'de 10 dakika enkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda Varioskan plak okuyucusunda 510/580 (eksitasyon/emisyon) nm dalga boylarında florimetrik okutma yapıldı. Sonuçlar kontrol verilerinin yüzde değişimi olarak verildi.

Hücrel Reaktif Oksijen Türlerinin CM-H₂DCFDA Yöntemi ile Belirlenmesi

Toz halinde 50µg'lık CM-H₂DCFDA (Invitrogen, Kat no: C6827) indikatörü içeren vial 86.5 µl DMSO (Applichem, Kat no: A3672-0250) ile çözüldü ve konsantrasyonu 1 mM oldu. Daha sonra PBS ile 1:100 oranında seyreltilip, kuyudaki son konsantrasyonu 10µM oldu. Bu işlem sırasında hava almamasına dikkat edildi. Seyreltilen DCFDA'dan kuyucuk başına 100 µl eklendi ve 1 saat inkübatörde bırakıldı. Daha sonra *in vitro* deney gerçekleştirildi. Deneyin bitiminde plate, Varioskan plak okuyucusunda 517/527 (eksitasyon/emisyon) nm dalga boylarında florimetrik okutma yapıldı. Sonuçlar kontrol verilerinin yüzde değişimi olarak verildi.

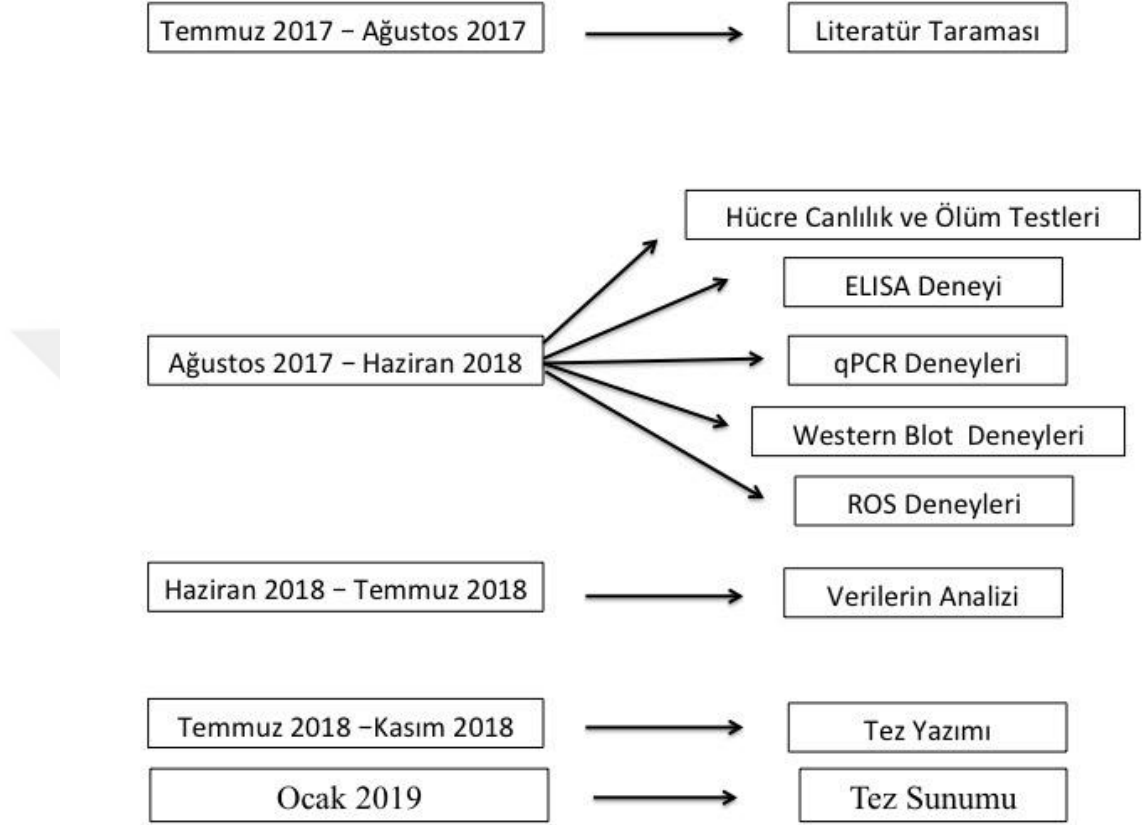
Mitokondriyal Membran Potansiyelinin JC-1 Boyaması ile Belirlenmesi

İnflamazom ile oluşan mitokondriyal membran bütünlüğünün belirlenmesi JC-1 boyası ile gerçekleştirildi. JC-1 zor çözünen bir boyadır. Bu nedenle ana stokta konsantrasyonu 5 mg/ml olan JC-1 boyası öncelikle 1:20 oranında DMSO ile seyreltilip 250 µg/ml konsantrasyonlu ara stok oluşturuldu. Daha sonra PBS ile 1:20 oranında seyreltme yapıldı (12,5 µg/ml) ve her bir kuyudaki son konsantrasyon 2,5 µg/ml oldu. Deney bittikten sonra hücrelerin üstüne son konsantrasyonu 2,5 µg/ml olacak şekilde JC-1 boyasından 50µl/ kuyu eklenerek 10 dakika boyunca inkübatörde bırakıldı. EP'nin mitokondriyal membran

potansiyeline etkisi JC-1 (Thermo Fisher, ABD) boyaması ile florimetrik okutularak gösterildi. Kontrol grubu 100'e eşitlendi ve örnekler kontrole oranlanarak verildi.



3.7. Araştırma Planı ve Takvimi:



3.8. 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.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları:

Tez alışmamızda 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 EP'nin gösterdiği etkileri hangi yolaklar üzerinden gerçekleştirdiği araştırılmamıştır. Bundan sonraki çalışmalarda bu yolaklar incelenmelidir.

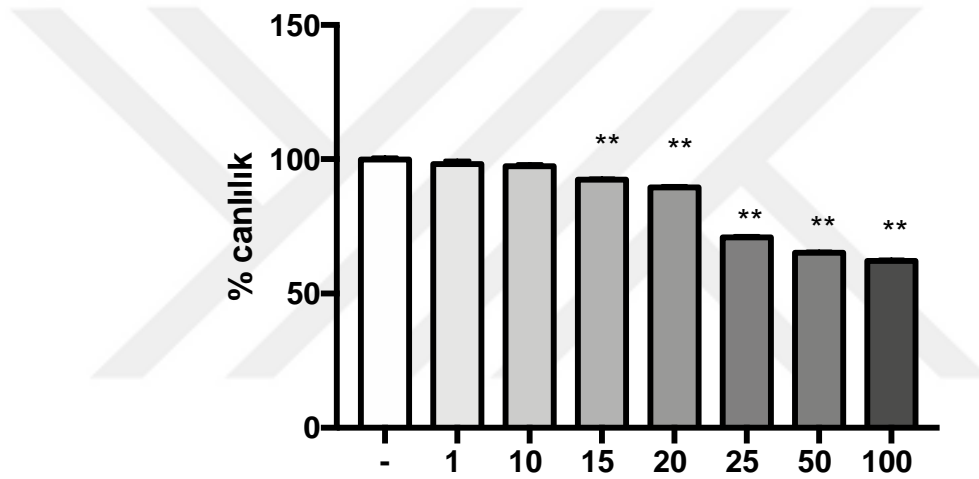
3.10. Etik Kurul Onayı:

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu 01. 03. 2018 tarih, 3827-GOA protokol numaralı 2018/06-09 karar numaralı kararında çalışmamızın etik açıdan uygun olduğu sonucu çıkmıştır.

4. SONUÇLAR

4.1. EP'nin Hücre Canlılığına Etkisi

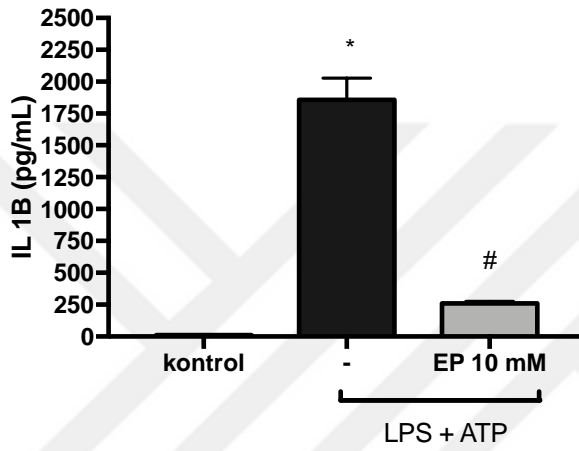
EP'nin 0-100 mM dozlarının hücre canlılığına etkisi Presto Blue testi ile belirlendi. Hücre canlılığının oranları, kontrol grubunda $100 \pm 1,1$ mM' da 98 ± 3 , 10 mM'da 97 ± 1 , 15 mM'da 92 ± 1 , 20 mM'da 89 ± 1 , 25 mM'da 70 ± 1 , 50 mM'da 65 ± 0 ve 100 mM'da 62 ± 1 şeklinde olup, 25mM'dan itibaren canlılığın istatistiksel olarak anlamlı azaldığı görüldü. Grupların p değerleri şu şekildedir; EP 1 mM için $p=0.3095$, 10 mM için $p=0.0952$ olup, 15 mM'dan itibaren p değeri 0.0079'dur (Şekil 2).



Şekil 2. EP'nin mikroglial hücrelerde bazal canlılığa etkisi *Hücreler EP'nin 1, 10, 15, 20, 25, 50 ve 100 mM dozları ile 6 saat boyunca inkübe edildi. Hücre canlılığı Presto Blue solüsyonu ile belirlendi. EP 1 mM için $p=0.3095$, 10 mM için $p=0.0952$ olup, 15 mM'dan itibaren p değeri 0.0079.(n=5).*

4.2. EP'nin LPS +ATP ile indüklenmiş N9 mikroglia hücrelerinde IL-1 β protein ölçümü

Kontrol grubunda IL-1 β düzeyi 11 \pm 0 pg/ml, LPS + ATP grubunda 1857,8 \pm 294 pg/ml ve EP ön inkübasyon grubunda ise 259,7 \pm 33 pg/ml olarak bulundu. Buna göre IL-1 β salınım düzeyine bakıldığında, LPS+ATP grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir artış saptandı (p=0.0159). EP ön inkübasyon grubunda ise LPS+ATP grubuna kıyasla IL-1 β düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi. (p=0.0159)(Şekil 3).



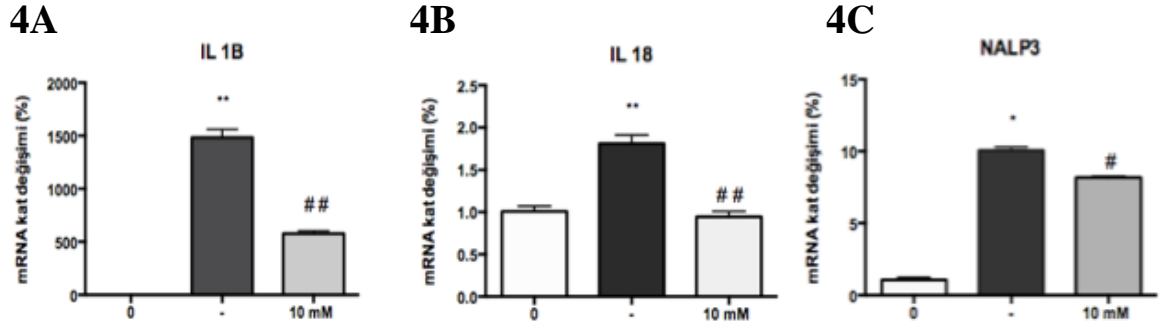
Şekil 3. LPS+ATP ile indüklenmiş mikroglial hücrelerden salınan IL-1 β protein seviyesine EP'nin etkisi. N9 mikroglia hücreleri Etil Piruvat'ın 10mM dozu ile 1 saat inkübe edildi. Sonra 4 saat 1 μ g/ mL LPS uygulandı, devamında 1 saat 5mM ATP ile inkübe edildi. IL-1 β seviyesi ELISA yöntemi ile saptandı. (n=5) (LPS + ATP için p=0.0159, EP 10 mM için p=0.0159)

4.3. EP'nin LPS + ATP ile İndüklenmiş N9 Mikroglia Hücrelerinde IL -1 β , IL-18 ve NALP3 Genlerinin mRNA Ekspresyon Seviyesine Etkisi

EP'nin LPS+ATP ile indüklenen mikroglial hücrelerde, inflamazom belirteci olan genlerin IL-1 β , IL-18 ve NALP3 mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi incelendi. Kontrol grubunda mRNA seviyesi $1,1 \pm 0,6$ kat bulundu. LPS+ATP grubunda IL-1 β mRNA seviyesi $1484,1 \pm 169,7$ kat değişimi gösterirken, EP ön inkübasyonunun bu oranı $578,2 \pm 55,7$ kata indirdiği saptandı. LPS+ATP grubunda, kontrole kıyasla istatistiksel anlamda artış saptandı ($p=0.0079$). EP, LPS+ATP ile indüklenen IL-1 β mRNA ekspresyon düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde baskıladı ($p=0.0079$) (**Şekil 4A**).

Kontrol grubunda mRNA seviyesi $1,0 \pm 0,1$ kat bulundu. LPS+ATP grubunda IL-18 mRNA seviyesi $1,8 \pm 0,2$ kat değişimi gösterirken, EP ön inkübasyonu ile bu seviyenin $0,9 \pm 0,1$ kata indiği görüldü. LPS+ATP grubunda, kontrole kıyasla istatistiksel anlamda artış saptandı ($p=0.0079$). EP, LPS+ATP ile indüklenen IL-18 mRNA ekspresyon düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde baskıladı ($p=0.0079$) (**Şekil 4B**).

NALP3 mRNA seviyesi kontrol grubunda $1,0 \pm 0,4$ kat bulundu. LPS + ATP grubunda NALP3 mRNA seviyesi $10,0 \pm 0,4$ kat değişimi gösterirken, EP ön inkübasyonunun etkisiyle bu seviyenin $8,1 \pm 0,1$ kata indiği saptandı. LPS + ATP grubunda, kontrole kıyasla istatistiksel anlamda artış saptandı ($p=0.0357$). EP, LPS+ATP ile indüklenen NALP3 mRNA ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde baskıladı ($p= 0.0179$) (**Şekil 4C**).



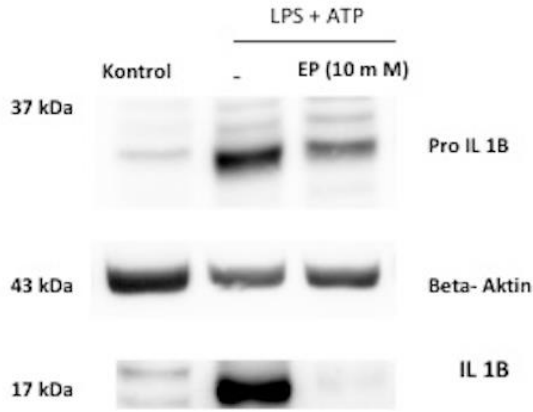
Şekil 4. EP'nin inflamazom belirteci genlerin mRNA'ları üzerindeki baskılayıcı etkisi. EP ön inkübasyonunun, inflamazom aktivasyonu ile ekspresyonları artan IL-1 β (A), IL-18 (B), NALP3 (C) genlerinin ekspresyon düzeylerini azalttığı saptandı (A: LPS+ATP için p=0.0079, EP 10 mM için p=0.0079 B: LPS + ATP için p=0.0079, EP 10 mM için p=0.0079 C:: LPS+ATP için p= 0.0357, EP 10 mM için p= 0.0179). (n=5) Sonuçlar ortalama \pm S.D. olarak verildi.

4.4. İmmüno blot Yöntemiyle İnflamazom ile İlişkili Protein Değişimlerinin Gösterilmesi

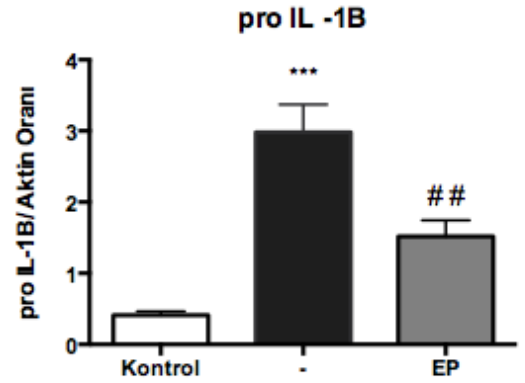
EP'nin, inflamazomda belirteç proteinler üzerine etkisini belirlemek için immun blot yöntemi ile pro IL-1 β ve IL-1 β 'nin protein miktarlarına bakıldı. Pro IL-1 β miktarları karşılaştırıldığında, pro IL-1 β bant yoğunluğu kontrol grubunda 4 \pm 0,10, LPS+ATP grubunda 20 \pm 0,87 ve EP 10 mM ön inkübasyon grubunda 11 \pm 0,5 bulundu. LPS+ATP grubunda, kontrol ile kıyaslandığında anlamlı bir artış görülmektedir (p=0.0159). EP'nin 10 mM'lık dozu ile ön inkübasyon yapılan grupta ise, LPS+ATP grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmektedir (p=0.0159) (**Şekil 5B**).

IL-1 β miktarları karşılaştırıldığında ise, kontrol grubunda 7,9 \pm 5234,8, LPS+ATP grubunda 26,63 \pm 14929,0 iken, EP ön inkübasyonu ile beraber bu yoğunluk 1,7 \pm 1307,3 seviyelerine inmiştir. LPS+ATP grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmektedir (p=0.0317). EP'nin 10 mM'lık ön inkübasyonu ile LPS+ATP ile artan IL-1 β oranı istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır (p=0.0079) (**Şekil 5C**).

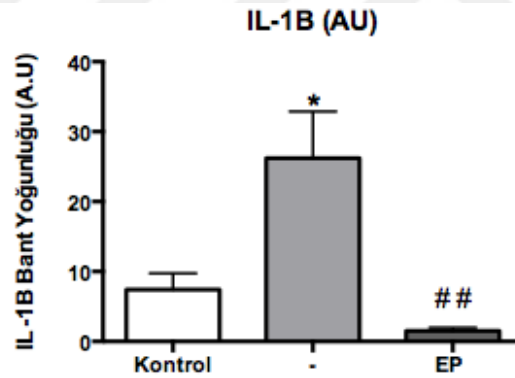
5A



5B



5C

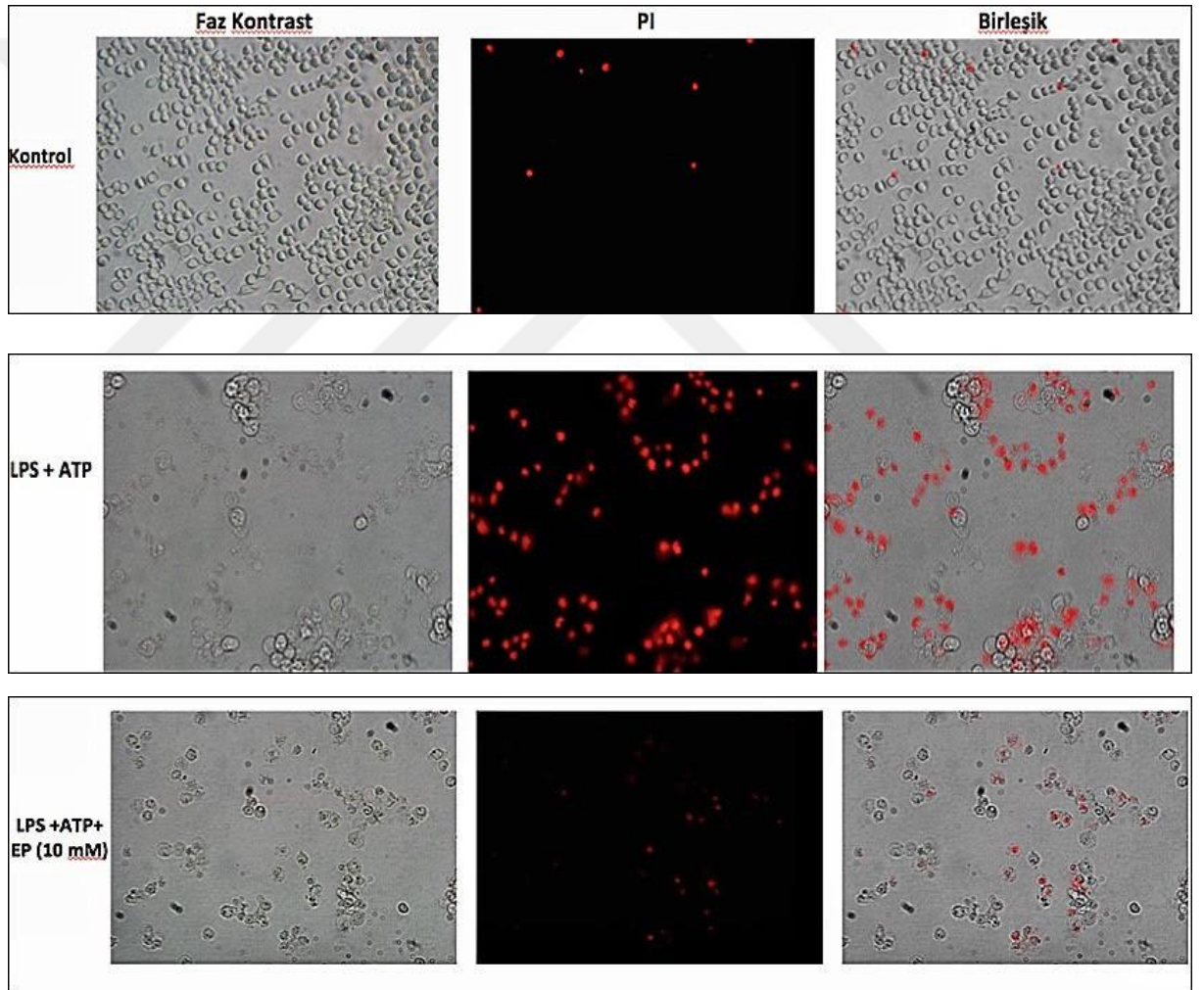


Şekil 5. LPS+ATP ile indüklenmiş mikroglial hücrelerde EP'nin IL-1 β protein seviyesindeki etkisinin immünoblotlama ile gösterilmesi. N9 mikroglia hücreleri EP'nin 10mM dozu ile 1 saat inkübe edildi. Sonra 4 saat 1 μ g/mL LPS uygulandı, devamında 1 saat 5 mM ATP ile inkübe edildi. IL-1 β protein seviyesi immünoblot yöntemi ile saptandı. (A:LPS+ATP için $p=0.0159$, EP 10 mM için $p=0.0159$; B:LPS+ATP için $p=0.0317$, EP 10 mM için $p=0.0079$); ** $p<0.01$; # $p<0,05$; * $p<0,05$).(n=5) Sonuçlar ortalama \pm S.D. olarak verildi.

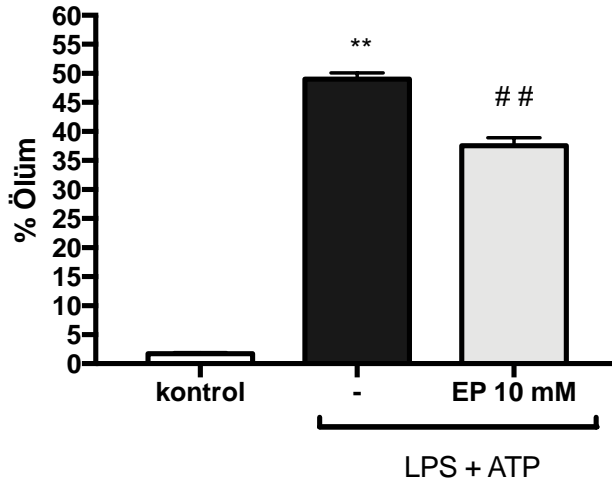
4.5. EP'nin LPS+ATP sitotoksitesinde N9 mikroglial hücre ölümü üzerine etkisi

EP'nin inflamazom aktivasyonudaki piroptotik hücre ölümüne etkisi PI boyaması ile incelendi. PI ile saptanan ölüm oranları, Kontrol grubunda 1 ± 0 , LPS+ATP grubunda 49 ± 2 bulundu. EP 10 mM ön inkübasyonda ise bu oran 37.5 ± 3 olarak bulundu. LPS+ATP grubunun hücre ölüm oranı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı arttırdığı görüldü ($p=0,0022$). EP'nin 10 mM dozu ile ön inkübasyon ise LPS+ATP grubuna göre hücre ölümü istatistiksel olarak anlamlı azalttığı görüldü. (10 mM $p=0,0022$) (Şekil 6B)

6A



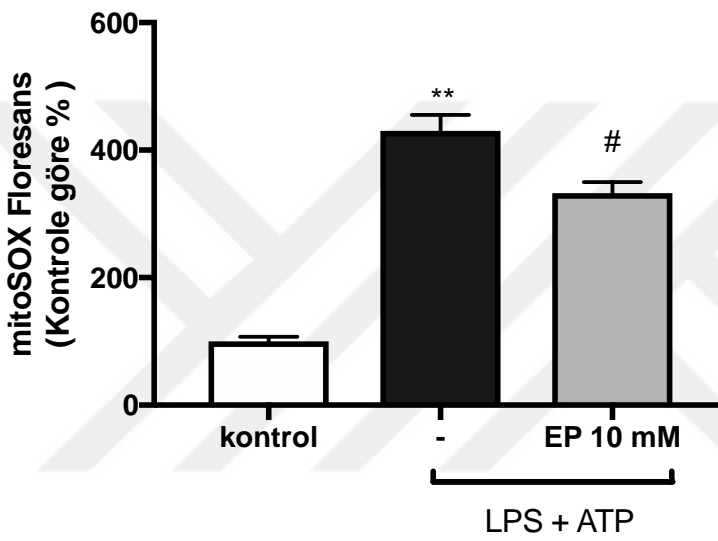
6B



Şekil 6. EP'nin LPS+ATP ile indüklenen hücre ölümü üzerine etkisi *N9 mikroglia hücreleri EP'nin 10 mM dozu ile 1 saat inkübe edildi. Sonrasında 1 µg/ mL LPS ile inkübe edilip, 5. saatin sonunda 5 mM ATP eklenip 1 saat daha inkübe edildi. Hücre ölümü PI testi ile değerlendirildi (n=6) (LPS+ATP için p=0,0022 ve 10 mM için p=0,0022)*

4.6. EP'nin LPS+ATP ile uyarılmış mikroglial hücrelerin mitokondrial ROS üretimlerine olan etkisi

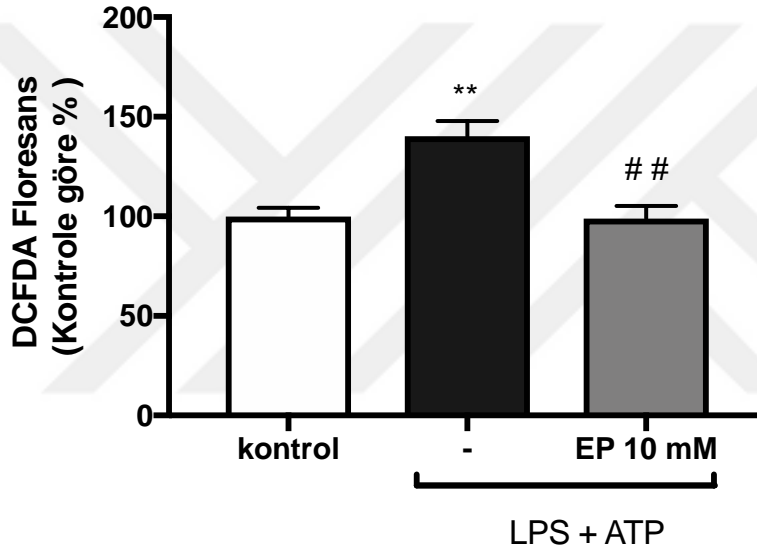
Kontrol grubunda mitokondrial ROS miktarı 100 ± 16 , LPS+ATP grubunda 430 ± 50 ve EP'nin 10 mM doz uygulanan grubunda 332 ± 34 olarak bulundu. LPS+ATP grubunda, kontrol grubuna kıyasla mitokondrial ROS üretiminde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p=0.0079$). EP'nin 10 mM dozu ile ön inkübasyonun, LPS+ATP ile uyarılmış mikroglial hücrelerde mitokondrial ROS üretimini istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalttığı görüldü ($p= 0.0159$) (Şekil 7).



Şekil 7. LPS+ATP ile indüklenen mikroglial hücrelerin mitokondrial ROS üretimine EP'nin etkisi. *N9* mikroglia hücreleri EP'nin tek dozu ile 1 saat inkübe edildi. Sonrasında $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ LPS ile 4 saat inkübe edilip, sürenin sonunda 5 mM ATP eklenip 1 saat daha inkübe edildi. Mitokondrial ROS seviyesi mitoSOX yöntemi ile belirlendi. ($n=5$) LPS+ATP için $p=0.0079$, EP 10 mM için $p= 0.0159$)

4.7. EP'nin LPS + ATP ile Uyarılmış Mikroglial Hücrelerin ROS Üretimlerine Olan Etkisi

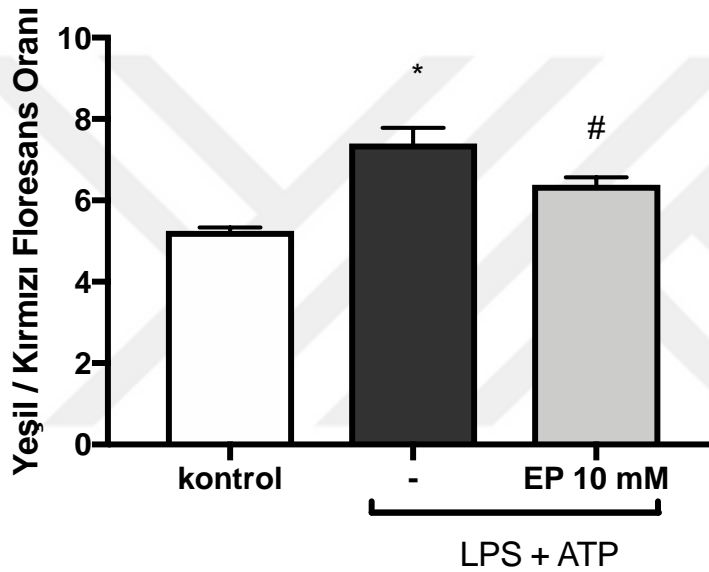
Kontrol grubunda reaktif oksijen türleri üretim miktarı 100 ± 9 , LPS+ATP grubunda 140 ± 15 olarak bulunmuştur. Buna karşın, EP 10 mM ön inkübasyon grubunun 6 saatlik inkübasyonunda 80 ± 14 , 1 saatlik uygulanmasında da 98 ± 12 olarak saptandı. LPS+ATP grubunda, kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ($p=0.0079$). EP'nin 10 mM ön inkübasyon grubunda, LPS+ATP grubuna kıyasla mikroglial hücrelerde ROS üretimi istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalmıştır ($p=0.0079$) (Şekil 8).



Şekil 8. LPS+ATP ile indüklenen mikroglial hücrelerin ROS üretimine etkisi N9 mikroglia hücreleri 10 mM EP ile ön uygulama yapıldı. Sonrasında $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ LPS ile enkübe 5. saatin sonunda 5mM ATP eklenip 1 saat daha inkübasyona bırakıldı. Üretilen ROS seviyesi CM-H₂DCFDA yöntemi ile belirlendi. ($n=5$), (LPS +ATP için $p=0.0079$, EP 10 mM 6 sa için $p=0.0079$, EP 10 mM 1 sa için $p=0.0079$)

4.8. EP'nin LPS + ATP ile Uyarılmış Mikroglial Hücrelerin Mitokondriyal Membran Potansiyeline Etkisinin Gösterilmesi

Kontrol grubunda 5 ± 0 , LPS+ATP grubunda 7 ± 0 oranında membran potansiyelinde bozulma görüldü. EP 10 mM ön inkübasyon grubunda ise 6 ± 0 bozulma saptandı. Kontrol grubunda, LPS+ATP grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ($p=0.0159$). EP'nin 10 mM dozu, LPS+ATP ile bozulan mitokondriyal membran potansiyelini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde geri döndürdü ($p=0.0159$) (Şekil 9).



Şekil 9. LPS+ATP ile indüklenen mikroglial hücrelerde EP'nin membran potansiyelinin gösterilmesi *N9* mikroglia hücreleri 10 mM EP ile ön uygulama yapıldı. Sonrasında 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS ile inkübe 5. saatin sonunda 5mM ATP eklenip 1 saat daha inkübasyona bırakıldı. Bozulan membran potansiyeline JC-1 boyası ile bakıldı. ($n=5$) (LPS+ATP için $p=0.0159$, EP 10 mM için $p= 0.015$).

5. TARTIŞMA

Doğal bağışıklık sisteminin bir sonucu olan inflamazom, inflamatuvar proteinlerin üretimini takiben vücudun eksojen ve endojen tehditlere karşı etkili bir şekilde yanıt vermesini sağlayan bir mekanizmadır (Herman & Pasinetti, 2018). İnflamazomun aktif hale gelmesi kaspaz-1 enziminin aktifleşmesine, daha sonra IL-1 β ve IL-18 gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımına ve de hücre ölümüne yol açmaktadır. Gereksiz yere gerçekleşen ya da gereğinden uzun süren inflamasyon, sağlıklı hücrelerin ölümüne yol açıp, sistemik lupus eritematozus (SLE), romatoid artrit (RA), sistemik skleroz (SSc) ve inflamatuvar barsak hastalığı (IBD) gibi otoimmün hastalıkların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (H. H. Shen et al., 2018). Bu nedenle inflamazom aktivasyonunun düzenlenmesi büyük önem arz etmektedir.

NLRP3 inflamazom modeli, en iyi bilinen ve en çok çalışılan inflamazom modelidir. NLRP3 inflamazomu bir multiprotein kompleks olup; NLRP3, ASC ve kaspaz-1 proteinlerinden oluşur (Agostini et al., 2004). PAMP ve DAMP moleküllerinin varlığı ile NLRP3 inflamazom kompleksinin oluşumu tetiklenir (C. S. Shi et al., 2012). Aktive olan NLRP3 inflamazom kompleksi kaspaz-1 proteini aracılığıyla, hücre içinde bulunan pro IL-1 β ve pro IL-18 sitokinlerini keser ve olgun hale gelmelerini sağlar. Olgun sitokinlerin hücre içinden salınımı gerçekleşir (Herman & Pasinetti, 2018).

Projemizde, NLRP3 aktivasyonu LPS ve ATP modeli ile gerçekleştirilmiştir. APP/PS1 transgenik farelerden elde edilen primer mikroglia kültürlerinde yapılan bir çalışmada, NLRP3 aktivasyonu 1 μ g/ml LPS ve 5mM ATP ile sağlanmıştır. LPS'in inflamazom aktivasyonu açısından ilk uyarıcı (priming) olduğu, ATP'nin ise NLRP3 inflamazom oluşumunu tetiklediği ve böylece IL-1 β ve IL-18 gen ekspresyonlarının artmasını sağladığı belirlenmiştir (Venegas & Heneka, 2017). Biz de çalışmalarımızda N9 fare mikroglial hücrelerinde, 4 saat 1 μ g/ml LPS ve 1 saat 5 mM ATP uygulaması ile NLRP3 inflamazom aktivasyonu gerçekleştirdik.

NLRP3 inflamazom aktivasyonunun en önemli çıktılarında biri inflamatuvar sitokinler olan IL-1 β ve IL-18' de olan artıştır (Song, Pei, Yao, Wu et al., 2017). PAMP ve DAMP molekülleri NLRP3 inflamazomunu aktive eder. Bu aktivasyon hücre içinde bulunan pro IL-1 β ve pro IL-18'in kaspaz-1 enzimi tarafından kesilip olgun halleri olan IL-1 β ve IL-18'e

dönüşümünü sağlar (Fleshner, Frank, & Maier, 2017). LPS+ATP modeli ile N9 mikroglial hücrelerinde inflamazom aktivasyonundan sonra, IL-1 β ve IL-18 sitokinlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu ELISA testiyle gösterilmiştir. IL-1 β ve IL-18 mRNA seviyelerinde de istatistiksel açıdan artış olduğu RT-PCR ile gösterilmiştir. Ayrıca IL-1 β sitokininin protein seviyesindeki istatistiksel olarak anlamlı artış immünblot testiyle de gösterilmiştir.

NLRP3 inflamazom aktivasyonundan sonra, piropitoz adı verilen hücre ölümü gerçekleşir. Düzenlenmiş bir hücre ölümü olan piropitoz, kaspaz-1 aktivasyonuna bağlıdır, bunun sonucunda da plazma membran bütünlüğünde bozulmalar meydana gelir (J. Shi et al., 2015) ve aynı zamanda inflamatuvar yanıt indüklenmiş olur (Tschopp & Schroder, 2010). NLRP3'ün protein seviyesinde artmasını ve ASC ve pro kaspaz-1'in birleşmesini içeren NLRP3 inflamazom aktivasyonu, aktif kaspaz-1 ile sonuçlanır (Miao et al., 2011). Aktif kaspaz-1, pro IL-1 β 'yi olgun formu olan IL-1 β 'ya dönüştürür (Okamoto et al., 2010) ve bu da daha sonra ekstremler alana salgılanarak piropitozise aracılık eder (Fernandes-Alnemri, Yu, Datta, Wu et al., 2009). Daha sonra kaspaz aktivitesinin sonucunda hücre şişer ve patlar (Chivero et al., 2017). LPS+ATP modeli ile N9 mikroglia hücrelerinde kaspaz-1 aktivitesi sonucunda gerçekleşen piropototik hücre ölümü, yapılan PI boyama yöntemiyle istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı ortaya konulmuştur.

NLRP3 inflamazomu, bir dizi çevresel ve endojen moleküller tarafından aktive edilir (L. Wang et al., 2017). İyon akıları, endozomal bozulma, ROS ve mitokondriyal disfonksiyon gibi belirli fizyolojik olayların, NLRP3 inflamazom aktivasyonunu tetiklediği gösterilmiştir (Walsh et al., 2014). Yapılan çalışmalara göre mitokondriyal disfonksiyonunun, artmış ROS üretimi ile ilgisi olduğu düşünülmektedir (Yao & Brownlee, 2010). Birçok çalışmada da NLRP3 inflamazom aktivasyonunu bloke etmek için ROS üretim inhibitörleri kullanılmıştır (Haslund-Vinding, McBean, Jaquet, & Vilhardt, 2017). Primer mikroglia kültürlerinde yapılan bir çalışmada, amiloid-beta peptidleri ile indüklenen NLRP3 inflamazom modelinde, JC-1 boyaması ile azalan mitokondriyal membran potansiyelinin, mitokondriyal ROS'u arttırdığı gösterilmiştir (L. Wang et al., 2017). Yaptığımız çalışmada, LPS+ATP modeli ile N9 mikroglial hücrelerinde indüklediğimiz NLRP3 inflamazom aktivasyonu sonucunda, mitokondriyal ROS seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı arttığı mitoSOX ve CM-H₂DCFDA boyamalarıyla gösterilmiştir. Ayrıca, LPS+ATP ile indüklenen N9 mikroglial hücrelerde mitokondriyal membran potansiyeline JC-1 boyaması yapılarak bakılmış olup,

NLRP3 inflamazom aktivasyonunun mitokondriyal membran potansiyelini bozduğu ortaya koyulmuştur.

Yaptığımız çalışmada, EP'nin LPS+ATP ile indüklenen inflamazom aktivasyonuna etkisi incelenmiştir. EP'nin mikroglial hücrelerde NLRP3 inflamazom aktivasyonu üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Ancak EP'nin mikroglial hücrelerde inflamatuvar sitokin ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir. EP ile inkübe edilen BV2 mikroglia hücreleri ile yapılan bir çalışmada, EP'nin inflamatuvar sitokinlerden olan TNF- α , IL-1 β ve COX-2'yi anlamlı düzeyde baskıladığı bildirilmiştir (Yu et al., 2005). Farenden alınan primer mikroglia üzerinde yapılan bir çalışmada inflamazom belirteçlerinden olan TNF- α , IL-1 β ve COX-2'nin mRNA düzeylerinin EP uygulaması ile anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (Kim ve ark., 2005). Farenden alınan primer mikroglia ile yapılan bir başka çalışmada ise, inflamazomda düzeyleri artan IL-1 β ve TNF- α gibi sitokinlerin, EP inkübasyonu ile protein düzeyinde anlamlı olarak azaldığı immunblot çalışmalarıyla belirlenmiştir (Lin, Chen, Li, & Fang, 2015). Çalışmamızda EP'nin, N9 mikroglial hücrelerde indüklenen inflamazomun belirteçlerinden olan IL-1 β ve IL-18 inflamatuvar sitokinlerini, mRNA düzeyinde miktarını istatistiksel olarak anlamlı azalttığı saptanmıştır. Ayrıca EP'nin inflamazomda artan IL-1 β protein düzeyini baskıladığı da immunblot testi ile gösterilmiştir.

Önceki çalışmalarda, EP'nin yalnızca anti inflamatuvar değil, anti oksidant etkileri olduğu da gösterilmiştir. Primer astrosit kültürlerinde yapılan bir çalışmada, EP ile inkübe edilen hücrelerde HO-1 anti oksidant savunma enzimin arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca EP'nin Nrf2 sinyal yolağını aktive ederek anti oksidant genlerden olan GST, NQO1 ve GCLM düzeylerinin arttığı gösterilerek, hücreleri oksidatif hasara karşı koruduğu belirlenmiştir (Woo et al., 2012). EP'nin hasar görmüş mitokondriyal yol açtığı oksidatif zararı azalttığı, yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir. LPS ile aktive edilmiş BV2 mikroglia hücrelerinde yapılan bir çalışmada, EP ile ön inkübe edilen hücrelerin ROS üretiminin azaldığı saptanmıştır (H. S. Kim et al., 2008). Çalışmamızda, EP'nin N9 mikroglia hücre hattında mitokondriyal ROS oluşumunu istatistiksel olarak anlamlı azalttığı saptanmıştır. Ayrıca EP'nin LPS+ATP ile mitokondriyal membran potansiyeli bozulmasını önlediği gösterilmiştir.

EP'nin mikroglial hücrelerde NLRP3 inflamazom aktivasyonu ile indüklenen piroptotik hücre ölümüne etkisi bilinmemektedir. Buna karşın daha önce fareler ile yapılmış bir çalışmaya göre, intraserebral-hemoraji hayvan modelinde hemoglobin ile hücre ölümü

indüklemiş olan primer kortikal nöron kültürlerine EP verildiğinde hücre ölümünün azaldığı bildirilmiştir. Aynı zamanda aktive mikroglia hücrelerine (Iba-1 immünreaktif hücreleri) bakıldığında, EP'nin aktive olmuş mikroglia sayısını azalttığı gösterilmiştir (Su et al., 2013). Farelerde yapılan bir başka çalışmada ise, kainik asit ile indüklenen hücre ölümünün, EP eklendikten sonra hipokampal hücre ölümünü azalttığı kaydedilmiştir (Cho et al., 2006). Yine farelerde denenen hepatic iskemi/reperfüzyon modeli ile oluşturulan hücre ölümünde, EP'nin apoptotik hücre sayısını azalttığı gösterilmiştir (M. Shen et al., 2013). Primer astrosit kültürlerinde yapılan *in vitro* bir çalışmada ise, hidrojen peroksit (H₂O₂) ile gerçekleşen hücre ölümünün, EP verildiğinde azaldığı tespit edilmiştir (Shin, Kim, Jin, Kim et al., 2012). Yaptığımız çalışmada da EP'nin piroptotik hücre ölümünü engellediğini gösterdik. Bundan sonraki çalışmalarda EP'nin bu etkiyi hangi yollar aracılığıyla gerçekleştirdiği incelenmelidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, EP'nin, mikroglial hücrelerde NLRP3 inflamazom aktivasyonu üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda LPS ve ATP maddeleriyle N9 mikroglia hücre hattında oluşturulan inflamazom modeline EP uygulanarak, EP'nin etkilerine bakılmıştır. Öncelikle EP'nin değişik dozları denenerek efektif doz bulunmuştur. Daha sonra EP'nin canlılığına Presto Blue testiyle analiz edilmiş ve EP'nin koruyuculuğu gösterilmiştir. İnflamazom aktivasyonu göstergelerinden olan IL-1 β ve IL-18 sitokinleri, mRNA ve protein seviyelerinde ELISA, RT-PCR ve immunblot yöntemleriyle incelenip, EP'nin bu proteinleri baskıladığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, EP, LPS ve ATP modeli ile NLRP3 inflamazom aktivasyonu gerçekleştirilen N9 mikroglial hücrelerinde, IL-1 β sitokin salınımını 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. EP, NLRP3 inflamazomunu baskılayıcı bir terapötik ajan olarak kullanılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M. F., Hawkins, P. N., & Tschopp, J. (2004). NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*, *20*(3), 319-325.
- Algieri, F., Rodriguez-Nogales, A., Garrido-Mesa, J., Camuesco, D., Veza, T., Garrido-Mesa, N., . . . Galvez, J. (2016). Intestinal anti-inflammatory activity of calcium pyruvate in the TNBS model of rat colitis: Comparison with ethyl pyruvate. *Biochem Pharmacol*, *103*, 53-63. doi:10.1016/j.bcp.2015.12.022
- Bisht, K., Sharma, K., & Tremblay, M. E. (2018). Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease: Roles of microglia-mediated synaptic remodeling, inflammation, and oxidative stress. *Neurobiol Stress*, *9*, 9-21. doi:10.1016/j.ynstr.2018.05.003
- Cai, B., Brunner, M., Wang, H., Wang, P., Deitch, E. A., & Ulloa, L. (2009). Ethyl pyruvate improves survival in awake hemorrhage. *J Mol Med (Berl)*, *87*(4), 423-433. doi:10.1007/s00109-009-0441-8
- Cano Sanchez, M., Lancel, S., Boulanger, E., & Neviere, R. (2018). Targeting Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in the Treatment of Impaired Wound Healing: A Systematic Review. *Antioxidants (Basel)*, *7*(8). doi:10.3390/antiox7080098
- Chen, B., Na, F., Yang, H., Li, R., Li, M., Sun, X., . . . Lu, Y. (2017). Ethyl pyruvate alleviates radiation-induced lung injury in mice. *Biomed Pharmacother*, *92*, 468-478. doi:10.1016/j.biopha.2017.05.111
- Chivero, E. T., Guo, M. L., Periyasamy, P., Liao, K., Callen, S. E., & Buch, S. (2017). HIV-1 Tat Primes and Activates Microglial NLRP3 Inflammasome-Mediated Neuroinflammation. *J Neurosci*, *37*(13), 3599-3609. doi:10.1523/jneurosci.3045-16.2017
- Cho, I. H., Kim, S. W., Kim, J. B., Kim, T. K., Lee, K. W., Han, P. L., & Lee, J. K. (2006). Ethyl pyruvate attenuates kainic acid-induced neuronal cell death in the mouse hippocampus. *J Neurosci Res*, *84*(7), 1505-1511. doi:10.1002/jnr.21052
- Cochet, F., & Peri, F. (2017). The Role of Carbohydrates in the Lipopolysaccharide (LPS)/Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Signalling. *Int J Mol Sci*, *18*(11). doi:10.3390/ijms18112318
- Crawford, R. S., Albadawi, H., Atkins, M. D., Jones, J. J., Conrad, M. F., Austen, W. G., Jr., . . . Watkins, M. T. (2011). Posts ischemic treatment with ethyl pyruvate prevents adenosine triphosphate depletion, ameliorates inflammation, and decreases thrombosis in a murine model of hind-limb ischemia and reperfusion. *J Trauma*, *70*(1), 103-110; discussion 110. doi:10.1097/TA.0b013e3182031ccb
- Dave, S. H., Tilstra, J. S., Matsuoka, K., Li, F., DeMarco, R. A., Beer-Stolz, D., . . . Plevy, S. E. (2009). Ethyl pyruvate decreases HMGB1 release and ameliorates murine colitis. *J Leukoc Biol*, *86*(3), 633-643. doi:10.1189/jlb.1008662
- Dong, W., Cai, B., Pena, G., Pisarenko, V., Vida, G., Doucet, D., . . . Ulloa, L. (2010). Ethyl pyruvate prevents inflammatory responses and organ damage during resuscitation in porcine hemorrhage. *Shock*, *34*(2), 205-213. doi:10.1097/SHK.0b013e3181cc0c63
- Eisenbarth, S. C., & Flavell, R. A. (2009). Innate instruction of adaptive immunity revisited: the inflammasome. *EMBO Mol Med*, *1*(2), 92-98. doi:10.1002/emmm.200900014
- Fang, R., Zheng, X., & Zhang, M. (2016). Ethyl pyruvate alleviates early brain injury following subarachnoid hemorrhage in rats. *Acta Neurochir (Wien)*, *158*(6), 1069-1076. doi:10.1007/s00701-016-2795-3
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J. W., Datta, P., Wu, J., & Alnemri, E. S. (2009). AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*, *458*(7237), 509-513. doi:10.1038/nature07710

- Fleshner, M., Frank, M., & Maier, S. F. (2017). Danger Signals and Inflammasomes: Stress-Evoked Sterile Inflammation in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology*, 42(1), 36-45. doi:10.1038/npp.2016.125
- Franchi, L., Eigenbrod, T., Munoz-Planillo, R., & Nunez, G. (2009). The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol*, 10(3), 241-247. doi:10.1038/ni.1703
- Gaikwad, S., Patel, D., & Agrawal-Rajput, R. (2017). CD40 Negatively Regulates ATP-TLR4-Activated Inflammasome in Microglia. *Cell Mol Neurobiol*, 37(2), 351-359. doi:10.1007/s10571-016-0358-z
- Genovese, T., Esposito, E., Mazzon, E., Di Paola, R., Meli, R., Caminiti, R., . . . Cuzzocrea, S. (2009). Beneficial effects of ethyl pyruvate in a mouse model of spinal cord injury. *Shock*, 32(2), 217-227. doi:10.1097/SHK.0b013e31818d4073
- Gilbert, D. F., Stebbing, M. J., Kuenzel, K., Murphy, R. M., Zacharewicz, E., Buttgerit, A., . . . Friedrich, O. (2016). Store-Operated Ca(2+) Entry (SOCE) and Purinergic Receptor-Mediated Ca(2+) Homeostasis in Murine bv2 Microglia Cells: Early Cellular Responses to ATP-Mediated Microglia Activation. *Front Mol Neurosci*, 9, 111. doi:10.3389/fnmol.2016.00111
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., . . . Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330(6005), 841-845. doi:10.1126/science.1194637
- Goldmann, T., Tay, T. L., & Prinz, M. (2013). Love and death: microglia, NLRP3 and the Alzheimer's brain. *Cell Res*, 23(5), 595-596. doi:10.1038/cr.2013.24
- Hanisch, U. K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*, 10(11), 1387-1394. doi:10.1038/nn1997
- Haslund-Vinding, J., McBean, G., Jaquet, V., & Vilhardt, F. (2017). NADPH oxidases in oxidant production by microglia: activating receptors, pharmacology and association with disease. *Br J Pharmacol*, 174(12), 1733-1749. doi:10.1111/bph.13425
- Herman, F. J., & Pasinetti, G. M. (2018). Principles of inflammasome priming and inhibition: Implications for psychiatric disorders. *Brain Behav Immun*. doi:10.1016/j.bbi.2018.06.010
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Kono, H., Rock, K. L., . . . Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*, 9(8), 847-856. doi:10.1038/ni.1631
- Hristova, M., Cuthill, D., Zbarsky, V., Acosta-Saltos, A., Wallace, A., Blight, K., . . . Raivich, G. (2010). Activation and deactivation of periventricular white matter phagocytes during postnatal mouse development. *Glia*, 58(1), 11-28. doi:10.1002/glia.20896
- Hu, X., Li, P., Guo, Y., Wang, H., Leak, R. K., Chen, S., . . . Chen, J. (2012). Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 43(11), 3063-3070. doi:10.1161/strokeaha.112.659656
- Huh, S. H., Chung, Y. C., Piao, Y., Jin, M. Y., Son, H. J., Yoon, N. S., . . . Jin, B. K. (2011). Ethyl pyruvate rescues nigrostriatal dopaminergic neurons by regulating glial activation in a mouse model of Parkinson's disease. *J Immunol*, 187(2), 960-969. doi:10.4049/jimmunol.1100009
- Jang, H. J., Kim, Y. M., Tsoyi, K., Park, E. J., Lee, Y. S., Kim, H. J., . . . Chang, K. C. (2012). Ethyl pyruvate induces heme oxygenase-1 through p38 mitogen-activated protein kinase activation by depletion of glutathione in RAW 264.7 cells and improves survival in septic animals. *Antioxid Redox Signal*, 17(6), 878-889. doi:10.1089/ars.2011.3994
- Jang, I. S., Park, M. Y., Shin, I. W., Sohn, J. T., Lee, H. K., & Chung, Y. K. (2010). Ethyl pyruvate has anti-inflammatory and delayed myocardial protective effects after regional ischemia/reperfusion injury. *Yonsei Med J*, 51(6), 838-844. doi:10.3349/ymj.2010.51.6.838
- Jin, C. Y., Lee, J. D., Park, C., Choi, Y. H., & Kim, G. Y. (2007). Curcumin attenuates the release of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Acta Pharmacol Sin*, 28(10), 1645-1651. doi:10.1111/j.1745-7254.2007.00651.x

- Jun, J. H., Song, J. W., Shin, E. J., Kwak, Y. L., Choi, N., & Shim, J. K. (2018). Ethyl pyruvate is renoprotective against ischemia-reperfusion injury under hyperglycemia. *J Thorac Cardiovasc Surg*, *155*(4), 1650-1658. doi:10.1016/j.jtcvs.2017.10.069
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M. J., Kreutzberg, G. W., Sher, A., & Littman, D. R. (2000). Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol*, *20*(11), 4106-4114.
- Kang, H., Mao, Z., Zhao, Y., Yin, T., Song, Q., Pan, L., . . . Zhou, F. (2016). Ethyl pyruvate protects against sepsis by regulating energy metabolism. *Ther Clin Risk Manag*, *12*, 287-294. doi:10.2147/tcrm.S97989
- Kao, K. K., & Fink, M. P. (2010). The biochemical basis for the anti-inflammatory and cytoprotective actions of ethyl pyruvate and related compounds. *Biochem Pharmacol*, *80*(2), 151-159. doi:10.1016/j.bcp.2010.03.007
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiol Rev*, *91*(2), 461-553. doi:10.1152/physrev.00011.2010
- Khare, S., Luc, N., Dorfleutner, A., & Stehlik, C. (2010). Inflammasomes and their activation. *Crit Rev Immunol*, *30*(5), 463-487.
- Kim, H. S., Cho, I. H., Kim, J. E., Shin, Y. J., Jeon, J. H., Kim, Y., . . . Chung, M. H. (2008). Ethyl pyruvate has an anti-inflammatory effect by inhibiting ROS-dependent STAT signaling in activated microglia. *Free Radic Biol Med*, *45*(7), 950-963. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.009
- Kim, S. W., Jeong, J. Y., Kim, H. J., Seo, J. S., Han, P. L., Yoon, S. H., & Lee, J. K. (2010). Combination treatment with ethyl pyruvate and aspirin enhances neuroprotection in the postischemic brain. *Neurotox Res*, *17*(1), 39-49. doi:10.1007/s12640-009-9075-4
- Kim, Y. M., Park, E. J., Kim, J. H., Park, S. W., Kim, H. J., & Chang, K. C. (2016). Ethyl pyruvate inhibits the acetylation and release of HMGB1 via effects on SIRT1/STAT signaling in LPS-activated RAW264.7 cells and peritoneal macrophages. *Int Immunopharmacol*, *41*, 98-105. doi:10.1016/j.intimp.2016.11.002
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, *19*(8), 312-318.
- Lassmann, H., van Horssen, J., & Mahad, D. (2012). Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol*, *8*(11), 647-656. doi:10.1038/nrneuro.2012.168
- Lauro, C., Catalano, M., Di Paolo, E., Chece, G., de Costanzo, I., Trettel, F., & Limatola, C. (2014). Fractalkine/CX3CL1 engages different neuroprotective responses upon selective glutamate receptor overactivation. *Front Cell Neurosci*, *8*, 472. doi:10.3389/fncel.2014.00472
- Lee, E. J., & Kim, H. S. (2011). Inhibitory mechanism of MMP-9 gene expression by ethyl pyruvate in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *Neurosci Lett*, *493*(1-2), 38-43. doi:10.1016/j.neulet.2011.02.016
- Li, H., Zhang, X., Chen, M., Chen, J., Gao, T., & Yao, S. (2018). Dexmedetomidine inhibits inflammation in microglia cells under stimulation of LPS and ATP by c-Fos/NLRP3/caspase-1 cascades. *Excli j*, *17*, 302-311. doi:10.17179/excli2017-1018
- Lim, H. M., Woon, H., Han, J. W., Baba, Y., Kurosaki, T., Lee, M. G., & Kim, J. Y. (2017). UDP-Induced Phagocytosis and ATP-Stimulated Chemotactic Migration Are Impaired in STIM1(-/-) Microglia *In vitro* and *In vivo*. *Mediators Inflamm*, *2017*, 8158514. doi:10.1155/2017/8158514
- Lin, Y., Chen, L., Li, W., & Fang, J. (2015). Role of high-mobility group box-1 in myocardial ischemia/reperfusion injury and the effect of ethyl pyruvate. *Exp Ther Med*, *9*(4), 1537-1541. doi:10.3892/etm.2015.2290

- Lowery, R. L., Tremblay, M. E., Hopkins, B. E., & Majewska, A. K. (2017). The microglial fractalkine receptor is not required for activity-dependent plasticity in the mouse visual system. *Glia*, 65(11), 1744-1761. doi:10.1002/glia.23192
- Martinez, F. O., Helming, L., & Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*, 27, 451-483. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132532
- Matsushita, Y., Nakajima, K., Tohyama, Y., Kurihara, T., & Kohsaka, S. (2008). Activation of microglia by endotoxin suppresses the secretion of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) through the action of protein kinase C alpha (PKCalpha) and mitogen-activated protein kinases (MAPKS). *J Neurosci Res*, 86(9), 1959-1971. doi:10.1002/jnr.21657
- McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (1995). The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev*, 21(2), 195-218.
- Meng, Y. Y., Liu, Y., Hu, Z. F., Zhang, Y., Ni, J., Ma, Z. G., . . . Tang, Q. Z. (2018). Sanguinarine Attenuates Lipopolysaccharide-induced Inflammation and Apoptosis by Inhibiting the TLR4/NF-kappaB Pathway in H9c2 Cardiomyocytes. *Curr Med Sci*, 38(2), 204-211. doi:10.1007/s11596-018-1867-4
- Miao, E. A., Rajan, J. V., & Aderem, A. (2011). Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev*, 243(1), 206-214. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01044.x
- Mildner, A., Schmidt, H., Nitsche, M., Merkler, D., Hanisch, U. K., Mack, M., . . . Prinz, M. (2007). Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci*, 10(12), 1544-1553. doi:10.1038/nn2015
- Miyaji, T., Hu, X., Yuen, P. S., Muramatsu, Y., Iyer, S., Hewitt, S. M., & Star, R. A. (2003). Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice. *Kidney Int*, 64(5), 1620-1631. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00268.x
- Nayak, D., Roth, T. L., & McGavern, D. B. (2014). Microglia development and function. *Annu Rev Immunol*, 32, 367-402. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120240
- Nguyen, B. N., Albadawi, H., Oklu, R., Crawford, R. S., Fink, M. P., Cambria, R. P., & Watkins, M. T. (2016). Ethyl pyruvate modulates delayed paralysis following thoracic aortic ischemia reperfusion in mice. *J Vasc Surg*, 64(5), 1433-1443. doi:10.1016/j.jvs.2015.06.214
- Okamoto, M., Liu, W., Luo, Y., Tanaka, A., Cai, X., Norris, D. A., . . . Fujita, M. (2010). Constitutively active inflammasome in human melanoma cells mediating autoinflammation via caspase-1 processing and secretion of interleukin-1beta. *J Biol Chem*, 285(9), 6477-6488. doi:10.1074/jbc.M109.064907
- Pelegrin, P., & Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *Embo j*, 25(21), 5071-5082. doi:10.1038/sj.emboj.7601378
- Pulathan, Z., Altun, G., Hemsinli, D., Mentese, A., Yulug, E., & Civelek, A. (2014). Role of ethyl pyruvate in systemic inflammatory response and lung injury in an experimental model of ruptured abdominal aortic aneurysm. *Biomed Res Int*, 2014, 857109. doi:10.1155/2014/857109
- Ransohoff, R. M., & Brown, M. A. (2012). Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest*, 122(4), 1164-1171. doi:10.1172/jci58644
- Relja, B., Omid, N., Konradowitz, K., Jurida, K., Oppermann, E., Stormann, P., . . . Marzi, I. (2014). Decreased inflammatory responses of human lung epithelial cells after ethanol exposure are mimicked by ethyl pyruvate. *Mediators Inflamm*, 2014, 781519. doi:10.1155/2014/781519
- Relja, B., Omid, N., Wagner, N., Mors, K., Werner, I., Juengel, E., . . . Marzi, I. (2016). Ethanol, ethyl and sodium pyruvate decrease the inflammatory responses of human lung epithelial cells via

- Akt and NF-kappaB *in vitro* but have a low impact on hepatocellular cells. *Int J Mol Med*, 37(2), 517-525. doi:10.3892/ijmm.2015.2431
- Roumier, A., Bechade, C., Poncer, J. C., Smalla, K. H., Tomasello, E., Vivier, E., . . . Bessis, A. (2004). Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. *J Neurosci*, 24(50), 11421-11428. doi:10.1523/jneurosci.2251-04.2004
- Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell*, 140(6), 821-832. doi:10.1016/j.cell.2010.01.040
- Shen, H., Hu, X., Liu, C., Wang, S., Zhang, W., Gao, H., . . . Chen, J. (2010). Ethyl pyruvate protects against hypoxic-ischemic brain injury via anti-cell death and anti-inflammatory mechanisms. *Neurobiol Dis*, 37(3), 711-722. doi:10.1016/j.nbd.2009.12.010
- Shen, H. H., Yang, Y. X., Meng, X., Luo, X. Y., Li, X. M., Shuai, Z. W., . . . Pan, H. F. (2018). NLRP3: A promising therapeutic target for autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*, 17(7), 694-702. doi:10.1016/j.autrev.2018.01.020
- Shen, M., Lu, J., Dai, W., Wang, F., Xu, L., Chen, K., . . . Guo, C. (2013). Ethyl pyruvate ameliorates hepatic ischemia-reperfusion injury by inhibiting intrinsic pathway of apoptosis and autophagy. *Mediators Inflamm*, 2013, 461536. doi:10.1155/2013/461536
- Shi, C. S., Shenderov, K., Huang, N. N., Kabat, J., Abu-Asab, M., Fitzgerald, K. A., . . . Kehrl, J. H. (2012). Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1beta production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol*, 13(3), 255-263. doi:10.1038/ni.2215
- Shi, H., Wang, H. L., Pu, H. J., Shi, Y. J., Zhang, J., Zhang, W. T., . . . Gao, Y. Q. (2015). Ethyl pyruvate protects against blood-brain barrier damage and improves long-term neurological outcomes in a rat model of traumatic brain injury. *CNS Neurosci Ther*, 21(4), 374-384. doi:10.1111/cns.12366
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., . . . Shao, F. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, 526(7575), 660-665. doi:10.1038/nature15514
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, Y., Gao, W., Ding, J., Li, P., . . . Shao, F. (2014). Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature*, 514(7521), 187-192. doi:10.1038/nature13683
- Shin, J. H., Kim, I. D., Kim, S. W., Lee, H. K., Jin, Y., Park, J. H., . . . Lee, J. K. (2015). Ethyl pyruvate inhibits HMGB1 phosphorylation and release by chelating calcium. *Mol Med*, 20, 649-657. doi:10.2119/molmed.2014.00039
- Shin, J. H., Kim, S. W., Jin, Y., Kim, I. D., & Lee, J. K. (2012). Ethyl pyruvate-mediated Nrf2 activation and hemeoxygenase 1 induction in astrocytes confer protective effects via autocrine and paracrine mechanisms. *Neurochem Int*, 61(1), 89-99. doi:10.1016/j.neuint.2012.04.005
- Simard, A. R., & Rivest, S. (2004). Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *Faseb j*, 18(9), 998-1000. doi:10.1096/fj.04-1517fj
- Sims, C. A., Wattanasirichaigoon, S., Menconi, M. J., Ajami, A. M., & Fink, M. P. (2001). Ringer's ethyl pyruvate solution ameliorates ischemia/reperfusion-induced intestinal mucosal injury in rats. *Crit Care Med*, 29(8), 1513-1518.
- Song, L., Pei, L., Yao, S., Wu, Y., & Shang, Y. (2017). NLRP3 Inflammasome in Neurological Diseases, from Functions to Therapies. *Front Cell Neurosci*, 11, 63. doi:10.3389/fncel.2017.00063
- Spindler, K. R., & Hsu, T. H. (2012). Viral disruption of the blood-brain barrier. *Trends Microbiol*, 20(6), 282-290. doi:10.1016/j.tim.2012.03.009
- Srikrishna, G., & Freeze, H. H. (2009). Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. *Neoplasia*, 11(7), 615-628.

- Stanisavljevic, S., Jevtic, B., Djedovic, N., & Miljkovic, D. (2015). Short term exposure to ethyl pyruvate has long term anti-inflammatory effects on microglial cells. *Biomed Pharmacother*, *72*, 11-16. doi:10.1016/j.biopha.2015.03.006
- Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., & Flavell, R. (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature*, *481*(7381), 278-286. doi:10.1038/nature10759
- Su, X., Wang, H., Zhu, L., Zhao, J., Pan, H., & Ji, X. (2013). Ethyl pyruvate ameliorates intracerebral hemorrhage-induced brain injury through anti-cell death and anti-inflammatory mechanisms. *Neuroscience*, *245*, 99-108. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.04.032
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, *140*(6), 805-820. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022
- Tao, J. H., Duan, J. A., Zhang, W., Jiang, S., Guo, J. M., & Wei, D. D. (2018). Polysaccharides From *Chrysanthemum morifolium* Ramat Ameliorate Colitis Rats via Regulation of the Metabolic Profiling and NF-kappa B/TLR4 and IL-6/JAK2/STAT3 Signaling Pathways. *Front Pharmacol*, *9*, 746. doi:10.3389/fphar.2018.00746
- Tschopp, J., & Schroder, K. (2010). NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol*, *10*(3), 210-215. doi:10.1038/nri2725
- Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., & Yamashita, T. (2013). Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci*, *16*(5), 543-551. doi:10.1038/nn.3358
- Venegas, C., & Heneka, M. T. (2017). Danger-associated molecular patterns in Alzheimer's disease. *J Leukoc Biol*, *101*(1), 87-98. doi:10.1189/jlb.3MR0416-204R
- Wagner, N., Dieteren, S., Franz, N., Kohler, K., Mors, K., Nicin, L., . . . Relja, B. (2018). Ethyl pyruvate ameliorates hepatic injury following blunt chest trauma and hemorrhagic shock by reducing local inflammation, NF-kappaB activation and HMGB1 release. *PLoS ONE*, *13*(2), e0192171. doi:10.1371/journal.pone.0192171
- Wake, H., Moorhouse, A. J., Jinno, S., Kohsaka, S., & Nabekura, J. (2009). Resting microglia directly monitor the functional state of synapses *in vivo* and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci*, *29*(13), 3974-3980. doi:10.1523/jneurosci.4363-08.2009
- Walsh, J. G., Reinke, S. N., Mamik, M. K., McKenzie, B. A., Maingat, F., Branton, W. G., . . . Power, C. (2014). Rapid inflammasome activation in microglia contributes to brain disease in HIV/AIDS. *Retrovirology*, *11*, 35. doi:10.1186/1742-4690-11-35
- Wang, G., Liu, K., Li, Y., Yi, W., Yang, Y., Zhao, D., . . . Yi, D. (2014). Endoplasmic reticulum stress mediates the anti-inflammatory effect of ethyl pyruvate in endothelial cells. *PLoS ONE*, *9*(12), e113983. doi:10.1371/journal.pone.0113983
- Wang, L., Chen, K., Wan, X., Wang, F., Guo, Z., & Mo, Z. (2017). NLRP3 inflammasome activation in mesenchymal stem cells inhibits osteogenic differentiation and enhances adipogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, *484*(4), 871-877. doi:10.1016/j.bbrc.2017.02.007
- Wang, L. W., Wang, L. K., Chen, H., Fan, C., Li, X., He, C. M., & Gong, Z. J. (2012). Ethyl pyruvate protects against experimental acute-on-chronic liver failure in rats. *World J Gastroenterol*, *18*(40), 5709-5718. doi:10.3748/wjg.v18.i40.5709
- Wirenfeldt, M., Clare, R., Tung, S., Bottini, A., Mathern, G. W., & Vinters, H. V. (2009). Increased activation of Iba1+ microglia in pediatric epilepsy patients with Rasmussen's encephalitis compared with cortical dysplasia and tuberous sclerosis complex. *Neurobiol Dis*, *34*(3), 432-440. doi:10.1016/j.nbd.2009.02.015
- Woo, J. M., Shin, D. Y., Lee, S. J., Joe, Y., Zheng, M., Yim, J. H., . . . Chung, H. T. (2012). Curcumin protects retinal pigment epithelial cells against oxidative stress via induction of heme oxygenase-1 expression and reduction of reactive oxygen. *Mol Vis*, *18*, 901-908.

- Wu, Y., Dissing-Olesen, L., MacVicar, B. A., & Stevens, B. (2015). Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends Immunol*, 36(10), 605-613. doi:10.1016/j.it.2015.08.008
- Xu, S., & Shinohara, M. L. (2017). Tissue-Resident Macrophages in Fungal Infections. *Front Immunol*, 8, 1798. doi:10.3389/fimmu.2017.01798
- Yang, R., Shaufli, A. L., Killeen, M. E., & Fink, M. P. (2009). Ethyl pyruvate ameliorates liver injury secondary to severe acute pancreatitis. *J Surg Res*, 153(2), 302-309. doi:10.1016/j.jss.2008.04.004
- Yang, R., Zhu, S., & Tonnessen, T. I. (2016). Ethyl pyruvate is a novel anti-inflammatory agent to treat multiple inflammatory organ injuries. *J Inflamm (Lond)*, 13, 37. doi:10.1186/s12950-016-0144-1
- Yang, R., Zou, X., Koskinen, M. L., & Tenhunen, J. (2012). Ethyl pyruvate reduces liver injury at early phase but impairs regeneration at late phase in acetaminophen overdose. *Crit Care*, 16(1), R9. doi:10.1186/cc11149
- Yao, D., & Brownlee, M. (2010). Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes*, 59(1), 249-255. doi:10.2337/db09-0801
- Yu, Y. M., Kim, J. B., Lee, K. W., Kim, S. Y., Han, P. L., & Lee, J. K. (2005). Inhibition of the cerebral ischemic injury by ethyl pyruvate with a wide therapeutic window. *Stroke*, 36(10), 2238-2243. doi:10.1161/01.Str.0000181779.83472.35
- Zhao, X., Liao, Y., Morgan, S., Mathur, R., Feustel, P., Mazurkiewicz, J., . . . Huang, Y. (2018). Noninflammatory Changes of Microglia Are Sufficient to Cause Epilepsy. *Cell Rep*, 22(8), 2080-2093. doi:10.1016/j.celrep.2018.02.004

8. EKLER

8.1. EK-1 Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

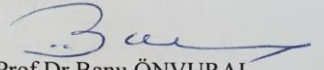
Konu: Karar hk.
Sayı : 206

01.03.2018

Sayın Prof.Dr.Şermin GENÇ,

Kurulumuz tarafından 01.03.2018 tarih ve 3827-GOA protokol numaralı 2018/06-09 karar numarası ile görüşülen “Etil Piruvat’ın Mikroglial Hücrelerde NLRP3 İnflamazom Aktivasyonuna Etkisi” konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan

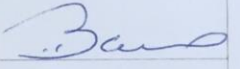
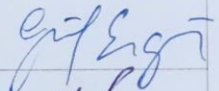

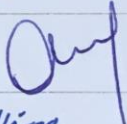

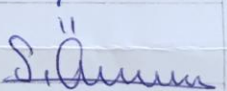
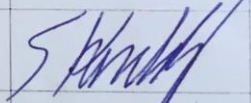



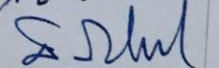
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232.4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

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

BASVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	3827-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/> AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/> ÖÇM <input type="checkbox"/> YÜKSEKLİSANS <input type="checkbox"/> DOKTORA <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Etil Piruvat'ın Mikroglial Hücrelerde NLRP3 İnflamazom Aktivasyonuna Etkisi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Şermin GENÇ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimler A.D
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input checked="" type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2018/06-09	Tarih:01.03.2018				
	Prof.Dr.Şermin GENÇ'in sorumlusu olduğu "Etik Piruvat'ın Mikroglial Hücrelerde NLRP3 İnflamazom Aktivasyonuna 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 <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Gül ERGÖR (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Prof.Dr.Sefa KIZILDAG	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Uzm.Dr.Ahmet Can BILGIN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu						

8.2. Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ

İREM NUR GÖKBAYRAK

TC Kimlik No / Pasaport No:	26047458680
Doğum Yılı:	14/04/1994
Yazışma Adresi :	Evka 3 Mahallesi, Şehitler Caddesi, No:1 Bornova/İzmir
Telefon :	+90 5433481805
Faks :	
e-posta :	iremnurgokbayrak@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fak.	Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji	2,36	22.09.2016
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, Mikrobiyoloji

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
<input type="checkbox"/>			

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar
