



T.C.

SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNERLÖKİN - 1 RESEPTÖR ANTAGONİSTİ VE RNA  
POLİMERAZ İNHİBİTÖRÜNÜN HİPOKAMPAL HÜCRE  
HATTINDA NÖRODEJENERASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**MEHTAP ŞAHİN**

**0000-0003-4518-6489**

**DOKTORA TEZİ**

**FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**SİVAS**

**KASIM – 2023**

T.C.  
SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İTERLÖKİN – 1 RESEPTÖR ANTAGONİSTİ VE RNA  
POLİMERAZ İNHİBİTÖRÜNÜN HİPOKAMPAL HÜCRE  
HATTINDA NÖRODEJENERASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

MEHTAP ŞAHİN

DOKTORA TEZİ  
FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Ahmet Kemal FİLİZ

SIVAS – 2023

**“İnterlökün - 1 Reseptör Antagonisti ve RNA Polimeraz İnhibitörünün Hipokampal Hücre Hattında Nörodejenerasyon Üzerine Etkilerinin Araştırılması”** adlı **Doktora** Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Fizyoloji** Ana Bilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr.

Ahmet ALTUN

Üye Prof. Dr.

Ercan

ÖZDEMİR

Üye Dr. Öğretim

Üyesi Zeynep

Kasap

ACUNGİL

Üye Dr. Öğretim

Üyesi Ziya

ÇAKIR

Üye (Danışman)

Doç. Dr. Ahmet

Kemal FİLİZ

ONAY

Bu tez çalışması, ..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Özlem Pelin CAN

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 11.09.2014 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır. Bu tez çalışması Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

[Proje No: T-984]



## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin her aşamasında desteğini ve emeğini esirgemeyen tez danışman hocam Doç. Dr. Ahmet Kemal FİLİZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yine tezimin her aşamasında yardımcı olan Uzm. Dr. Fatih YULAK'a, Doç. Dr. Ahmet Şevki TAŞKIRAN'a ve Fizyoloji Bilim Dalının tüm çalışanlarına teşekkür ederim. Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Daire Başkanlığı'na projemize yaptıkları katkılardan dolayı teşekkür ederim.

Doktora eğitimi gibi yorucu ve uzun soluklu bir eğitim döneminde, her zaman desteğini yanımda hissettiğim, moral ve motivasyon kaynağım olan eşim Ali Şahin'e, daima varlıklarıyla mutlu olduğum çocuklarım Sedef'e ve Efe'ye...

Sivas, 2023

Mehtap ŞAHİN

## ÖZET

### İNERLÖKİN - 1 RESEPTÖR ANTAGONİSTİ VE RNA POLİMERAZ İNHİBİTÖRÜNÜN HİPOKAMPAL HÜCRE HATTINDA NÖRODEJENERASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mehtap ŞAHİN

Doktora Tezi, Fizyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ahmet Kemal FİLİZ

2023, 42+xiii sayfa

Glutamat, çeşitli nörofizyolojik fonksiyonlarda yer alan merkezi sinir sisteminin (CNS) ana uyarıcı nörotransmitteridir. Hem enfeksiyöz hem de enfeksiyöz olmayan durumlarda, aşırı hücre dışı serebral glutamat tarafından indüklenen eksitotoksitenin tetiklendiği bilinmektedir. Homeostazın bozulması nöronlara zarar verebilir ve bu da sonunda hücre ölümüne yol açabilir. Eksitotoksiste olarak adlandırılan bu patolojik süreç, spesifik iyonotropik reseptörleri üzerinde glutamatın aşırı uyarılmasını takiben nöral hücrelerin dejenerasyonunu indükleyebilir. Bu reseptörlerin aktivasyonu, serbest radikal üretimi, mitokondriyal disfonksiyon ve normal hücre gelişimi ve fonksiyonunda yer alan çeşitli enzimlerin aktivasyonunu içeren bir dizi olay aracılığıyla eksitotoksiste aracılık edebilen nöral  $Ca^{2+}$  akışı ile sonuçlanır ve hücrede zar, hücre iskeleti ve DNA da hasara neden olur.

Glutamata olan aşırı duyarlılığı nedeniyle hipokampal HT22 hücre hattı nörodegeneratif hastalıkları modelleme de kullanılmaktadır. Glutamatla çeşitli hücre hatlarında daha önce sitotoksitle ilgili çalışmalar yapılmıştır. İnterlökin-1 reseptör antagonisti (anakinra); birçok otoinflamatuvar hastalıkta inflamasyonun önlenmesinde kullanılmaktadır. Çalışmamızın amacı bir RNA polimeraz inhibitörü; favipravirin ve İnterlökin-1 reseptörü anakinranın, anti-nörodegeneratif etkilerini hipokampal hücrelerde glutamatla oluşturulacak sitotoksiste yanı sıra hücre canlılığı (viabilite) araştırılması amaçlandı. Bu açıdan da glutamata olan aşırı duyarlılığı nedeniyle HT22 hücre hattı kullanıldı.

Hücreler %10'luk fetal sığır serumu, %1'lik penisilin- streptomisin ve %1'lik L-glutamin içeren DMEM'de kültüre edildi. 37 C de % 5 CO<sub>2</sub> ile nemlendirilmiş inkübatörde çoğalması sağlandı. Hücreler % 80-90 yoğunluğa ulaşınca 3 kez pasajlama yapıp 96'lık platelere her bir kuyucukta  $1 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekim

yapıldı. Kontrol, glutamat (10 mM), anakinra (1, 10, 25, 50 ve 100 µg), favipravir (1, 10, 25, 50 ve 100 µg) ve anakinra+favipravir hücre grupları oluşturuldu Kontrol grubuna herhangi bir tedavi uygulanmadı. Glutamat ile indüklenen grubun hücrelerine 24 saat boyunca 10 mM glutamat verildi. Anakinra grubundaki hücrelere 24 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda (1,10, 25, 50 ve 100 µg) anakinra verildi. Favipravir grubundaki hücrelere 24 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda (1, 10, 25, 50 ve 100 µg) favipravir verildi. Anakinra+glutamat grubundaki hücreler, 1 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (1, 10, 25, 50 ve 100 µg) anakinra ile ön işleme tabi tutuldu ve ardından 24 saat boyunca 10 mM glutamat uygulandı. Favipravir+glutamat grubundaki hücreler, 1 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (1, 10, 25, 50 ve 100 µg) favipravir ile ön işleme tabi tutuldu ve ardından 24 saat boyunca 10 mM glutamat uygulandı. Ardından etkili dozlar belirlenerek anakinra+favipravir+glutamatın oluşan kombinasyonları uygulandı. Hücre canlılığı XTT testi kullanılarak değerlendirildi.

Favipravirin HT22 hücre hattında glutamat uygulaması sonrası hücre canlılığı yani viabilite üzerine etkinliğinin olmadığı gözlemlendi. Yani yalnızca favipravirin farklı dozlarının uygulanmasında viabilite üzerinde herhangi bir etkisi gözlenmedi ( $p < 0.01$  kontrole göre). Anakinranın HT22 hücre hattında glutamat uygulaması sonrası hücre canlılığı yani viabilite üzerine etkisine baktığımızda ise 100 µg anakinra uygulanan grupta hücre canlılığının diğer gruplara göre daha fazla olduğu gözlemlendi ( $p < 0.01$  glutamata göre). Yani yalnızca anakinranın farklı dozlarının uygulanmasında viabilite üzerinde herhangi bir etkisi gözlenmedi ( $p < 0.01$  kontrole göre). Fakat Glutamatla HT22 hücre hattında oluşturulan sitotoksitenin anakinra 100 µg uygulamasıyla önlediği gözlemlendi. Anakinranın bu dozda nörodejenerasyon üzerine koruyucu etkisi izlendi. Anakinra + favipravir+glutamat kombine uygulanan grupta ise anakinranın glutamat toksisitesine karşı koruyucu fakat anakinra+favipravir kombinasyonu bu etkiyi değiştirmediği gözlemlendi.

Ancak bu etkinin klinik yansımaları için daha kapsamlı hayvan model ve insan çalışmalarına ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Nörodejenerasyon, Hipokampal hücre hattı, interlekin-1 reseptör antagonisti, RNA polimeraz inhibitörü.

## ABSTRACT

### **EVALUATION OF THE EFFECTS OF INTERLEUKIN – 1 RECEPTOR ANTAGONIST AND RNA POLIMERASE INBITOR ON NEURODEGENERATION IN HIPPOCAMPAL CELL LINE**

Mehtap SAHIN

Doctorate's Thesis

Department of Physiology

Supervisor: Assoc. Prof. Ahmet Kemal FILIZ

2023, 42+xiii pages

Glutamate is the principal excitatory neurotransmitter in the central nervous system (CNS) involved in various neurophysiological functions. Both in infectious and non-infectious conditions, excessive extracellular cerebral glutamate-induced excitotoxicity is known to be triggered. Disruption of its homeostasis can be detrimental to neurons and ultimately lead to cell death. This pathological process, known as excitotoxicity, can induce neuronal cell degeneration following the overstimulation of glutamate on specific ionotropic receptors. Activation of these receptors results in neural calcium influx, which can mediate excitotoxicity through a cascade of events, including free radical production, mitochondrial dysfunction, and activation of various enzymes involved in normal cell development and function, leading to damage to the cell membrane, cytoskeleton, and DNA.

Due to their heightened sensitivity to glutamate, the hippocampal HT22 cell line is utilized for modeling neurodegenerative diseases. Previous studies have explored cytotoxicity related to glutamate in various cell lines. Interleukin-1 receptor antagonist (anakinra) is used for preventing inflammation in many autoinflammatory diseases. The aim of our study is to investigate the anti-inflammatory and/or anti-neurodegenerative effects of a RNA polymerase inhibitor, favipiravir, and anakinra. For this purpose, the HT22 cell line was employed, and cell cultures were maintained under appropriate conditions.

Five groups of cells were established to examine the effect of anakinra and favipiravir on glutamate-induced cytotoxicity. The control group received no

treatment. The group induced with glutamate received 10 mM of glutamate for 24 hours. The anakinra group was exposed to different concentrations (1, 10, 25, 50, and 100 µg) of anakinra for 24 hours. The favipiravir group was exposed to different concentrations (1, 10, 25, 50, and 100 µg) of favipiravir for 24 hours. The anakinra+glutamate group was pre-treated with anakinra at various concentrations (1, 10, 25, 50, and 100 µg) for 1 hour and then exposed to 10 mM of glutamate for 24 hours. The favipiravir+glutamate group was pre-treated with favipiravir at various concentrations (1, 10, 25, 50, and 100 µg) for 1 hour and then exposed to 10 mM of glutamate for 24 hours. Effective doses were subsequently determined, and combinations of anakinra+favipiravir+glutamate were applied. Cell viability was assessed using the XTT test.

The results indicate that favipiravir did not have any effect on cell viability after glutamate application in the HT22 cell line. Viability was not affected by the application of different doses of favipiravir alone ( $p < 0.01$  compared to the control group). When examining the effect of anakinra on cell viability after glutamate application in the HT22 cell line, it was observed that the group treated with 100 µg anakinra showed higher viability compared to other groups ( $p < 0.01$  compared to glutamate). Viability was not affected by the application of different doses of anakinra alone ( $p < 0.01$  compared to the control group). However, anakinra was observed to prevent the cytotoxicity induced by glutamate in the HT22 cell line when applied at 100 µg, exhibiting a protective effect on neurodegeneration at this dose. In the group where anakinra and favipiravir were combined and applied with glutamate, anakinra showed a protective effect against glutamate toxicity, but the combination of anakinra and favipiravir did not alter this effect.

However, for the clinical implications of these findings, more extensive animal models and human studies are required.

**Keywords:** Neurodegeneration, Hippocampal cell line, interleukin-1 receptor antagonist, RNA polymerase inhibitor.



## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	vii
TABLolar DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xii
<b>1.GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar Ve In-Vitro Hastalık Modelleri .....	3
2.1.1. Alzheimer Hastalığı Modeli .....	11
2.1.2. Parkinson Hastalığı Modeli .....	12
2.1.3. Huntington Hastalığı Modeli .....	13
2.1.4. Amiyotrofik Lateral Skleroz Modeli .....	14
2.2. Glutamat .....	15
2.2.1. Eksitotoksosite Kavramı.....	18
2.3.Anakinra .....	20
2.4. Favipravir .....	22
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>24</b>
3.1. İstatistiksel Analiz .....	25
3.2. Araştırmanın Etik Yönü .....	25
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>27</b>
<b>TARTIŞMA .....</b>	<b>31</b>
<b>SONUÇ.....</b>	<b>35</b>

<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>36</b>
<b>EKLER</b> .....	<b>42</b>
EK 1. Etik Kurul Kararı .....	42
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.



## TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Nörodejeneratif Hastalıklarla ilişkili proteinler (4). .....	4
Tablo 2.2. Nörodejeneratif hastalıkların hücresel ve moleküler patofizyolojik mekanizmaları, hedef yollar ve hücre modelleri (2). .....	10



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nörodejeneratif hastalıkların etiopatogenezi (4). .....	6
Şekil 2.2. Nörodejeneratif hastalıklarda biriken proteinler (15). .....	7
Şekil 2.3. Hücre kültürü çalışmalarında Tripan Mavisı Boyası ile Canlı ve Ölü Hücrelerin Boyanması.....	13
Şekil 2.4. Non-nöronal hücrelerden iPS hücre tekniğiyle nöronal hücrelerin elde edilmesi (4).....	14
Şekil 2.5. Nörodejeneratif hastalıkların hayvan modelleri (15).....	15
Şekil 2.6. Astrositler tarafından glutamat alımı ve metabolizması (27). .....	16
Şekil 2.7. Favipravirin kimyasal yapısı (42). .....	23
Şekil 2.8. Favipravirin etki mekanizması (42). .....	23
Şekil 4.1. Glutamat eksitotoksitesisi oluşturulan HT22 hücre hattının mikroskobik morfolojik görünümüleri. A; glutamat grubu, B; kontrol grubu. ....	27
Şekil 4.2. Glutamat eksitotoksitesisi oluşturulan HT22 hücre hattının mikroskobik morfolojik görünümüleri. A; Anakinra 100 µg uygulanan grup, B; Favipravir 100 µg uygulanan grup. ....	27
Şekil 4.3. Glutamat eksitotoksitesisi oluşturulan HT22 hücre hattının mikroskobik morfolojik görünümüleri. A; Anakinra 100 µg ve glutamat uygulanan grup, B; Favipravir 100 µg ve glutamat uygulanan grup, C; Anakinra 100 µg ve glutamat ve Favipravir 100 µg uygulanan grup. ....	28
Şekil 4.4. HT22 hücre hattında glutamatla oluşturulan eksitotoksitesite üzerine Anakinranın farklı dozlarının uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi. ( $\beta < 0.01$ glutamata göre). ( $\alpha < 0.01$ kontrole göre). ....	28
Şekil 4.5. HT22 hücre hattında glutamatla oluşturulan eksitotoksitesite üzerine Favipravirin farklı dozlarının uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi. ( $\alpha < 0.01$ kontrole göre). ....	29

Şekil 4.6. HT22 hücre hattında glutamatla oluşturulan eksitotoksiste üzerine  
Anakinra – Favipravir kombine uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki  
etkisi. .... 30



## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>AH</b>	Alzheimer hastalığı
<b>ALS</b>	Amiyotrofik Lateral Skleroz
<b>HH</b>	Huntington hastalığı
<b>FAP</b>	Ailesel amiloidiotik polinöropati
<b>LRRK2</b>	Leucine-rich repeat kinase 2
<b>MS</b>	Multipl Skleroz
<b>PH</b>	Parkinson Hastalığı
<b>NDH</b>	Nörodejeneratif Hastalık
<b>IL-1</b>	İnterlökin – 1
<b>PSEN1</b>	Presenilin 1
<b>PSEN2</b>	Presenilin 2
<b>TNF</b>	Tümör nekrozis faktör
<b>MPP+</b>	1-methyl-4-phenylpyridinium
<b>6-OHDA</b>	6-hydroxydopamine
<b>TDP-43</b>	Transactive response DNA-binding ribonucleoprotein-43
<b>SOD</b>	Süperoksid dismutaz
<b>MAO</b>	Monoamino oksidaz
<b>PKC</b>	Protein kinaz C
<b>ROS</b>	Reaktif oksijen radikalleri
<b>VCP</b>	Valosin içeren protein

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Nörodejeneratif hastalıklarda (NDH) yeni tedavi stratejileri geliştirmek için bu hastalıkların patogenezi ve hedef sitokin, moleküller üzerinde çalışmak önemlidir. İşte bu yüzden in-vitro hastalık modelleri özellikle hücre kültürü modelleri bu konuda devreye girmektedir. Normal dokuda veya NDH modellerinde hücre kültürü çalışmaları yapılabilmektedir.

Başlıca nörodejeneratif hastalıkların temel mekanizması, rasyonel tedaviler belirlenmeden önce üzerinde anlaşmaya varılması gerekir, ancak bu bilgi hala bir akış halindedir. Çoğu, on yıllardır hem enfeksiyöz hem de enfeksiyöz olmayan bu hastalık durumlarının, aşırı hücre dışı serebral glutamat tarafından indüklenen eksitotoksisiteyi suçlayan argümanları paylaştığı konusunda hemfikirdir.

Glutamat, çeşitli nörofizyolojik fonksiyonlarda yer alan merkezi sinir sisteminin (CNS) ana uyarıcı nörotransmitteridir. Homeostazının bozulması nöronlara zarar verebilir ve bu da sonunda hücre ölümüne yol açabilir (5). Eksitotoksisite olarak adlandırılan bu patolojik süreç, spesifik iyonotropik reseptörleri üzerinde glutamatın aşırı uyarılmasını takiben nöral hücrelerin dejenerasyonunu indükleyebilir. Bu reseptörlerin aktivasyonu, serbest radikal üretimi, mitokondriyal disfonksiyon ve normal hücre gelişimi ve fonksiyonunda yer alan çeşitli enzimlerin aktivasyonunu içeren bir dizi olay aracılığıyla eksitotoksisiteye aracılık edebilen nöral  $Ca^{2+}$  akışı ile sonuçlanır ve hücrede zar, hücre iskeleti ve DNA da hasara neden olur (6). İlginç bir şekilde, eksitotoksisitenin insanlarda Alzheimer hastalığı ve MS gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda yer aldığı bildirilmiştir (7).

Glutamat geri alımı fizyolojik hücre dışı glutamat konsantrasyonlarının düzenlenmesi için gereklidir ve esas olarak yüksek afiniteli sodyuma bağımlı taşıyıcılar aracılık eder. Nöronal veya glial hücrelerde ifade edilen en az beş farklı glutamat taşıyıcısı (GLT-1, GLAST, EAAC1, EAAT4 ve EAAT5) iyi karakterize edilmiştir (8) ve yetişkin SSS'de toplam glutamat geri alımının % 90' ına kadarı sağlanır (8). Birkaç nörolojik hastalıkta, GLT-1 ekspresyon seviyesinin bozulmasının glutamat alımındaki değişikliklerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (9).

Glutamata olan aşırı duyarlılığı nedeniyle hipokampal HT22 hücre hattı NDHları modelleme de kullanılmaktadır (2), (10), (7), (11). Glutamatla çeşitli hücre hatlarında daha önce sitotoksiteyle ilgili çalışmalar yapılmıştır (10), (7), (12), (13).

İnterlökin-1 reseptör antagonisti anakinra bir çok otoinflamatuvar hastalıkta inflamasyonun önlenmesinde kullanılmaktadır. NDHlarda da oluşan inflamasyon ve nörodejenerasyon üzerine muhtemel etkilerinin araştırılması bu çalışma da amaçlanmaktadır.

Yine bir RNA polimeraz inhibitörü; favipravirin antiinflamatuvar ve veya anti-nörodejeneratif etkilerini incelemek açısından da HT22 hücre hattı kullanılacaktır. Ayrıca glutamatla oluşturulacak sitotoksisite yanı sıra hücre canlılığı (viabilite) araştırılması amaçlanmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar Ve In-Vitro Hastalık Modelleri

Nörodejeneratif hastalık (NDH) terimi, santral sinir sisteminde (SSS) etkilenen bölgede proteinlerin yanlış katlanması, birikimi sonucu çözünmeyen agregatlar veya inklüzyonlar şeklinde birikiminin neden olduğu progresif nöron kaybıyla karakterize birbirinden klinik ve patolojik olarak farklı bir grup hastalığı içerir (1). NDHlar toplumda önemli mortalite nedenleri arasındadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2015 verisine göre tüm dünyadaki ölümlerin yaklaşık % 12'nin NDH'lardan kaynaklandığını bildirmiştir (2). NDH'ların başlıcaları; Alzheimer hastalığı (AH), Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS), Huntington hastalığı (HH), Parkinson hastalığı (PH) dır (2).

Yaşlanma; organizmanın fonksiyonlarında zamanla azalmaya yol açan biyolojik değişikliklerin birikimiyle karakterize evrensel bir süreç olarak tanımlanmıştır (3). Yaşlanmayla kognitif ve fiziksel bozulmanın yanısıra kanser, diyabet, kardiyovasküler, kas-iskelet sistemi ve nörodejeneratif hastalıkların gelişme riski de artar. Yaşlanma nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde en önemli risk faktörüdür. Alzheimer hastalığı (AH), Parkinson hastalığı (PH) sıklığı yaşla birlikte artmaktadır. Özellikle hücresel yaşlanmanın yanısıra bu protein birikimleri tipi, çeşidi hastalığa göre değişmektedir. Örneğin; amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) ve tau agregatları AH'de, yanlış katlanmış  $\alpha$ -synuclein PH'da, TAR-DNA-binding protein 43 (TDP43) ve süperoksid dismutaz (SOD1) ise ALS'de, mutata huntington (HTT) ise HH'de biriken proteinlerden bazılarıdır (Tablo 2.1), (Şekil 2.3), (4), (1).

Tüm dünyada halen yedinci ölüm nedenleri arasında yer alan AH'de çeşitli tedavi yaklaşımları bu oranı azaltamamıştır (2). NDHlarda yeni tedavi stratejileri geliştirmek için bu hastalıkların patogenezi ve hedef sitokin, moleküller üzerinde çalışmak önemlidir. İşte bu yüzden in-vitro hastalık modelleri özellikle hücre kültürü modelleri bu konuda devreye girmektedir. Normal dokuda veya NDH modellerinde hücre kültürü çalışmaları yapılabilmektedir. COS-7, HC2S2, HEK-293, HeLa, Neuro-2a, NSC-34, PC-12 ve SH-SY5Y gibi hücre hatlarında NDH modellerine örnek verilebilir (2).

**Tablo 2.1.** Nörodejeneratif Hastalıklarla ilişkili proteinler (4).

Protein	Özellik	Hastalık
A $\beta$	Amiloid plak komponenti	Alzheimer hastalığı
APP	A $\beta$ öncülü	Alzheimer hastalığı
$\alpha$ -synuclein	Lewy cisimciği komponenti	Parkinson hastalığı
DJ-1	Reaktif oksijen radikali sensör ve temizleyici	Parkinson hastalığı
HTRA2	Apopitoz faktör	Parkinson hastalığı
Huntingtin	Hastalığa yol açan poliglutamin mutasyonu	Huntington hastalığı
LRRK2	Kinaz	Parkinson hastalığı
Parkin	Ubiquitin E3 ligaz	Parkinson hastalığı
PINK1	Mitokondriyal kinaz	Parkinson hastalığı
PS1/2	APP işleyen $\gamma$ -sekretaz komponenti	Alzheimer hastalığı
SOD1	Cu/Zn Superoksid dizmutaz	Amiyotrofik lateral skleroz

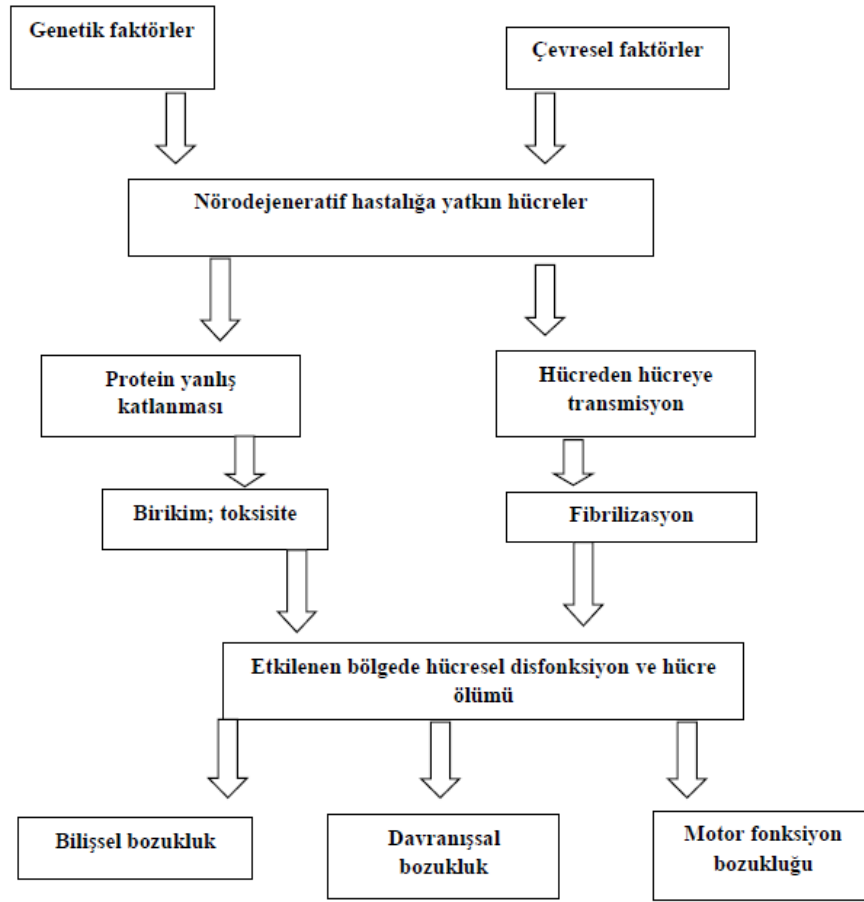
Hücre kültürü, doku veya organlardan, belirli şartlar altında hücrelerin alınıp in-vitro ortamda uygun şartlar altında yaşamasının sağlanması işlemidir. Amacımız elde ettiğimiz hücrelerin canlılığının devamı ve sonrasında çoğaltılmasını sağlamak ve çalışmalarda kullanılabilir hale getirmektir. Hücreler in-vitro ortamda genellikle diğer hücreler ile olan iletişim özelliğini doku özelliği göstermedikleri için kaybedebilirler. Bu sebeple canlılıkları ancak çok özel şartlar altında devam edebilir. Aynı zamanda çoğaltılması işlemi sonrası çok miktarda hücrede çalışma yapılması olanağı da vardır. Genetik olarak klonlama gibi teknikleri kullanarak farklı fenotip ve genotiplerde hücreler elde edilebilir. İlave olarak uygun şartlarda dondurulma işlemi ile uzun süre saklanabilme özelliğine de sahiplerdir (14).

Nörodejeneratif hastalıklar (NDH), tüm dünyada giderek artan sıklıkta görülen ve bilinen hastalıklardandır. Bu hastalıklarda progresif nöronal hasar, nöron yapısı ve fonksiyon kaybı ve özellikle apopitoz önemli patogenetik faktörlerdir. Klinik olarak ise bu durumlarda hayat kalitesi, öz bakım kaybı, mental ve motor fonksiyon kaybı, hayatı tehdit eden durumlar ve ölümle sonuçlanabilmektedir (2). NDHları diğer sinir sistemi hastalıklarından ayırtetmek önemlidir. Genetik faktörler, çeşitli kimyasal ve toksinler, alkolizm, stroke sinir hasarına yol açabilecek diğer faktörlerdir. NDHlarda ya bir kromozomda genetik defekt ya da protein yapısının degradasyonu başlıca rol oynar. NDHlar dediğimiz grup Alzheimer hastalığı (AH), Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS), Huntington hastalığı (HH), Parkinson hastalığı (PH) nı içerir.

Bunların yanısıra prion hastalıkları, spinal müsküler atrofi (SMA), spinoserebellar ataksi (SSA) NDH'lar grubuna dahil edilebilirler. Fakat sinir sistemindeki bütün patofizyolojik durumlar, örneğin, multipl skleroz, hipoksi ve metabolik bozukluklar nörodejenerasyon terimi altında ele alınmamalıdır.

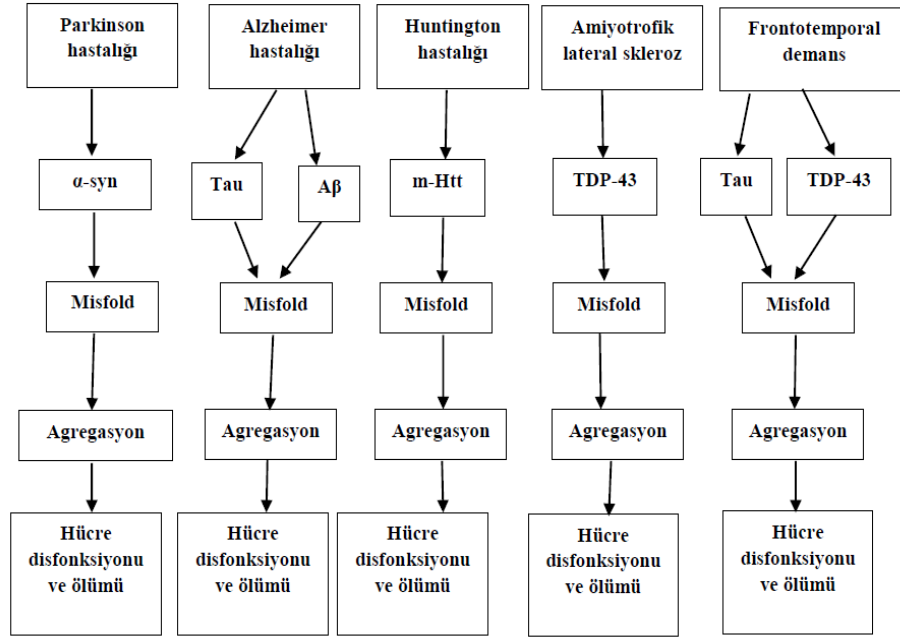
In-vitro hücre modelleri, NDHlar yanısıra respiratuvar, kardiyovasküler, hematolojik bozukluklar, çeşitli kanser tipleri, iskemi modelleri, bakteriyel ve viral hastalık modelleri, hüresel ve moleküler seviyedeki anormallikleri göstermede kolay, ucuz, ekonomik ve yapılabilecek hayvan ve insan deneylerine öncülük, önderlik edebilecek sonuçlar sağlaması bakımından önemlidir.

NDHlar beynin farklı bölgelerinde lokalize olabilirler. Serebral korteks, bazal gangliyonlar, spinal kord kaynaklı görülebilirler. Serebral korteks etkilenince demanslı veya demanssız durumlar olabilir. Bazal gangliyon ilişkili, substansiya nigra, talamik veya beyin sapı nukleusları etkilenince hareket anormallikleri; hipokinetik veya hiperkinetik durumlar görülebilir. Spinal kord etkilendiği durumlar ise ALS veya SMA'dır (2). Apoptoz, hüresel yaşlanma, protein transmisyonu-agregasyonu, kalsiyum sinyal yolakları, oksidatif stress ve mitokondriyal disfonksiyon nörodejenerasyona yol açabilen patogenetik durumlardır (şekil 2.1), (4), (1), (2). Buna rağmen NDHların yaklaşık % 10'u herediter faktörlerle ilişkilidir.



**Şekil 2.1.** Nörodejeneratif hastalıkların etiopatogenezi (4).

Hücre dışı inklüzyonlar olarak amyloid- $\beta$  birikimi ve sitozolik tau proteinin aşırı fosforilasyonu AH'nda nörodejenerasyon ve hücre ölümünün temelini oluşturur (1), (2). ALS'de ise TDP-43 (transactive response DNA-binding ribonucleoprotein-43), SOD1 (süperoksit dismutaz) in alt ve üst motor nöron sitozolünde birikimi mevcuttur (Şekil 2.2), (15), (4). HH ise bir otozomal dominant NDH olup, HTT geni exon 1 in CAG (trinucleotid codon repeats) ün mutan Huntington protein (mHtt) yapısında poliglutamin zincirlerinin sentezine yol açması söz konusudur. PH'da ise substansiya nigrada dopaminerjik nöronların kaybını tetikleyen  $\alpha$ -synuclein (Lewy bodies) varlığı saptanmıştır (2). NDHların hücresel ve moleküler patofizyolojik mekanizmaları, hedef yollar ve hücre modelleri Tablo 2.1'de sunulmuştur (2).



**Şekil 2.2.** Nörodejeneratif hastalıklarda biriken proteinler (15).

İn-vitro hücre modellerinde nörodejenerasyon, kimyasallar (okadaik asit gibi), nörotoksinler (rotenon gibi), doğrudan protein metabolitleri (amyloid- $\beta$  gibi) ile oluşturulabilir (2). Farklılaştırıcıların çoğunun hedefi protein kinaz C (PKC) yolağıdır. Ayrıca farklı COS-7, HC2S2, HEK-293, HeLa, Neuro-2a, NSC-34, PC-12 ve SH-SY5Y gibi in-vitro nörodejeneratif hastalık modelleri oluşturulmuştur (2).

Özellikle nöronal hastalıklarda in-vitro çalışmalar, hücre kültürü modelleri, etik olarak bu dokulardan örnek almak ve fizyolojik çalışmalar yapmaktaki zorluğunda önüne geçmiş olmaktadır. İn-vitro çalışmalar da, hücre kültürü çalışmaları az sayıda çalışan ile daha az zamanda hemde ekonomik olarak daha pratik olmaktadır. Fakat in-vitro modellerin dezavantajları ise in-vivo ortamda insan vücudunda bu sistemleri etkileyebilecek diğer fizyolojik, kimyasal ve hormonal durumları hesaba katamıyor olmamızdır. Yinede in-vitro çalışmalar, in-vivo ve ileri faz çalışmalarına öncülük etmesi bakımından değerli çalışmalardır (2).

NDH'larda sınırlı sayıda hücre serisi mevcuttur. Bazen toksik veya mutant proteinleri göstermek için nöronal kaynaklı olmayan hücre serileri kullanmamız gerekebilir. Nöronal kaynaklı olmayan hücre serileri genellikle şunlardır; Afrika yeşil maymun böbrek hücresi COS-7 (ATCC, CRL-1651), HEK-293 (ATCC, CRL-1573), HeLa (ATCC, CCL-2) (2). İn-vitro çalışmalarda en sık kullanılan nöronal

hücre serilerine ise HC2S2, Neuro-2a, NSC-34, PC-12, SH-SY5Y hücre serileri örnek verilebilir (Tablo 2.2) (2).

HC2S2 (RRID: CVCL\_6A80); HH için kullanılan bu model ilk olarak ratlardan izole edilen nöronal projenitör hücrelerden oluşur. Bu hücre serisi için total büyüme medyum formülü; DMEM ve HAM'S F12 bazal medyum karışımı (1:1 hacim oranında) ve % 1 N2 saplement (x100) final konsantrasyonu ve ilave antibiyotik solüsyonu gerekmektedir (Tablo 2.2) (2).

Neuro-2a (N2a; ATCC, CCL-T3T); sıklıkla nörodejenerasyon ve toksikoloji çalışmalarında kullanılan fare beyin nöroblastom hücre hattından oluşur. N2a hücreleri için total büyüme medyum formülü; DMEM, bazal medyum %10 FCS ve % 1 penisilin-streptomisin antibiyotik solüsyonu içeren solüsyondur (Tablo 2.2).

Nöroblastom x spinal kord clone-34 (NSC-34; Cedarlane, CLUI40); spinal kord motor nöron ve fare nöroblastom hibrid motor nöron özellikleri taşır (asetilkolin sentez, depo ve salımı gibi) ve yüksek proliferasyon özelliği vardır. NSC-34 için, DMEM ve %10 FCS, antibiyotiksiz solüsyon gerektirir (Tablo 2.2) (2).

PC-12 (ATCC, CRL-1721); sıçan adrenal feokromasitoma hücre hattı nöronal morfolojiye indüklenebildiği için nörodejenerasyonu göstermede kullanılır (Tablo 2.2). Bunu nöronal büyüme faktörü (NGF) etkisiyle yapar. PC-12 hücrelerinin büyümesi için; RPMI-1640 bazal medyum ve nutrientleri; L-glutamin içeren %10 FCS, %5 ısı ile inaktive at serumu ve %1 penisilin-streptomisin antibiyotik solüsyonları gerektirir (2).

SH-SY5Y (ATCC, CRL-2266) nöroblastom hücre serisi; NDHlar için yaygın olarak kullanılan iyi bilinen hücre hattıdır (Tablo 2.2). Dopaminerjik nöronal aktivite, enzimatik profil nedeniyle farmakolojik çalışmalar için uygundur. Bu hücre hattı retinoik asitle farklılaşabilir. Büyüme medyum formülü; DMEM ve HAM'S F12 bazal medyum karışımı (1:1 volüm oranı ile), %10 fetal bovin serum (FCS) ve %1 penisilin-streptomisin antibiyotik karışımı içerir. Bu hücreler amyloid- $\beta$  ve  $\alpha$ -synuclein ekspresse eder ve AH ve PH etiyopatolojisini incelemek için çok uygun hücresel organizasyon ortamı sağlar (2).

NDH in-vitro modellerinde nörodejenerasyonu başlatacak, tetikleyip ortaya çıkaracak çeşitli "inducer"lar kullanılır. Bunların hücresel metabolik süreçler

üzerindeki etkilerini bilmek gerekir. Ayrıca hücre viabilitesi (canlılık) ve nöronal aktiviteyi azaltan ve apoptozu artıran çeşitli faktörler mevcuttur. Deneysel çalışmalarda çeşitli kiyasallar, toksinler, genetik modifikasyonlar ve ekzojenik mutant proteinler kullanılabilir. PC-12 hücreleri dopamin, epinefrin ve diğer nöronal kaynaklı proteinleri ekspresse ederler. NGF (NGF; N0513, Sigma) gibi nörotrofinler PC-12 hücrelerini diferansiye etmek için kullanılır, çünkü bu hücreler NGF reseptörüne sahiptir. NGF, protein kinaz-C (PKC) içeren sinyal kaskadını indükler ve hücre farklılaşmasını inhibe eder fakat nörit aşırı büyümesini tetikler (2).

PH'da, SH-SY5Y hücreleri triozin hidroksilaz ve dopamin- $\beta$ -hidroksilaz aktivitesini göstermede kullanılır. Doza ve zaman bağımlı retinoik asit ile inkübasyonu farklılaşmalarında kullanılır. PKC aktivatörü; forbol miristat asetat (PMA; P8T39 Sigma) ve inhibitörü staurosporin farklılaşma metodunda işe yarar (Tablo 2.2) (2).

**Tablo 2.2.** Nörodejeneratif hastalıkların hücresel ve moleküler patofizyolojik mekanizmaları, hedef yollar ve hücre modelleri (2).

Etkilenen sinir sistemi bölgesi	NDH tipi	Moleküler temeli	Benzer in-vitro modeli
<b>Hippokampus ve serebral korteks</b>	AH	B-sekretaz ve $\gamma$ -sekretaz ile amiloid prekürsör proteinin (APP) amyloid- $\beta$ 40 ve 42 ye dönüşümü. Hücre dışı presenilin-1 ve presenilin-2. Glikojen sentaz kinaz-3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ ) ve cyclin-dependent-like kinaz tip 5 (CDK-5) ile anormal hiperfosforile olan Tau proteini. Protein fosfataz 2 subtip A (PP2A) nın disregülasyonu.	PC-12 ve SH-SY5Y
<b>Spinal kord</b>	ALS	TDP-43 ribonükleoproteininin sitozolik birkimi ve yanlış katlanmış SOD1	Neuro-2a ve NSC-34
<b>Bazal gangliyonlar (substantia nigra, subtalamik çekirdek, caudat çekirdek, putamen ve globus pallidus gibi yapılar)</b>	HH (hiperkinetik veya kore) PH (hipokinetik)	HH için; HTT gen poliy(CAG)n ekspresyonuyla mutant huntington proteini. PH için; dopamin sekresyonu kaybı ve $\alpha$ -synucleinin Lewy body agregatı olarak birkimi.	HC2S2, Neuro-2a, PC-12 ve SH-SY5Y. Non-nöral; Cos-7, HEK-293, HeLa. PC-12 ve SH-SY5Y.

AH; Alzheimer hastalığı, ALS; amiyotrofik lateral skleroz, HH; Huntington hastalığı, NDH; nörodejeneratif hastalık, PH; Parkinson hastalığı.

### 2.1.1. Alzheimer Hastalığı Modeli

Alzheimer hastalığı (AH), en sık görülen nörodejeneratif hastalık tipi olup, en sık ölüm sebepleri arasında yedinci sırayı almaktadır ve etyopatogenezi halen tam olarak anlaşılamamıştır. Amyloid- $\beta$  fragmanlarının hücre dışı alanda birikimi ve hiperfosforile Tau proteinlerinin nörofibriler yumaklar halinde hücre içinde birikimi söz konusudur (2). Nöritik plaklar APP proteinin, amyloid- $\beta$  40 ve 42 aminoasitlik  $\beta$ - ve  $\gamma$ - şeklinde yarıklanması sonucu oluşur ve tau proteini aracılığıyla oluşan anormal mikrotübül hiperfosforilasyonu ile nörodejenerasyon ortaya çıkar (2). Okadaik asit, dinoflagellate toksin, protein fosfataz tip 1 ve 2A'yı inhibe ederek kimyasal olarak AH modeli oluşumunu indükler. Amyloid- $\beta$  proteini  $\beta$ - ve  $\gamma$ -sekretaz enzimleri ile toksik mutant metabolitlerine dönüştürülür.

Hastalığın temel patofizyolojisinde amiloidojenik ve non-amiloidojenik yollar önemlidir (16). Hücre dışı Amyloid- $\beta$  inkübasyonu ise kaspaz enzim aktivitesini başlatır ve mitokondriyal disfonksiyona yol açarak nöronal hücrelerde apoptozu indükler. PC-12 ve SH-SY5Y hücre hatlarında deneysel AH oluşturmak için farklı uzunlukta Amyloid- $\beta$  fragmanları (25-35, 1-40 ve 1-42 gibi) kullanılabilir (2).

AH hayvan modellerine baktığımızda, genetik temelli yapılan çalışmalarda amiloid öncül protein (APP) olarak presenilin 1 (PSEN1) ve presenilin 2 (PSEN2) birikimlerinin araştırıldığı fare modellerinde daha çoğunlukla A $\beta$  birikimine rastlanılmıştır (17). Bu farelerde davranışsal değişiklikler çok aşikar ortaya çıkmamıştır. Preklinik asemptomatik hastalık evresine benzer klinik bulgular saptanmıştır (17). Transjenik farelerde Tau inklüzyon patolojisi (tauopathy) araştırılmıştır. Ön beyin, hipokampus, entorinal korteksde tau ekspresyonu ve nörodejenerasyon fare modellerinde gösterilmiştir (17).

Çeşitli fare modellerinde amiloidojenik ve non-amiloidojenik olarak APP'nin  $\alpha$ -sekretazla parçalanması ve mikrotübül ilişkili tau proteinin (MAPT) hiperfosforilasyonu ile nörit oluşturulmuştur (4).

### 2.1.2. Parkinson Hastalığı Modeli

Parkinson hastalığı (PH), Alzheimer hastalığından sonra ikinci en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır. Başlıca substansia nigra pars compacta nöronları olmak üzere bazal gangliyonlarda dopaminerjik nöronların kaybı ve dopamin seviyelerinde eksilme ile karakterize bir nörodejeneratif hastalıktır (2). Altmış yaş üzeri yaşlı nüfusun yaklaşık % 1'ini etkilediği bildirilmiştir (2). Hastaların yaklaşık % 5'i ailesel yatkınlık sonucu hastalığa sahip olsa da, çoğu hasta da herediter olmayan (idiyopatik veya sporadik) şekilde multifaktöriyel nedenlerle; örneğin, Lewy bodilerin oluşumu, oksidatif stresin yıkıcı etkileri, mitokondriyal disfonksiyon sonucu hastalığın ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (18), (2). Bazı genetik mutasyonlar ailesel formundan sorumludur. Nörodejeneratif süreç  $\alpha$ -synuclein, parkin (PARK2), Parkinson disease protein 7 (DJ-1), PTEN tarafından indüklenen putatif kinaz 1 (PINK1), dardarin (LRRK2), ATP13A2 (PARK9) sonucu ortaya çıkar (2).

Bütün NDHlarda olduğu gibi PH'da da mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stress nöronal hücre kaybı ve nörodejenerasyonda suçlanan en önemli nedenlerdendir. Mitokondriyal kompleks 1 eksikliği bildirilmiştir. Mitokondriyal kompleks 1 i inhibe etmek için deneysel modellerde 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+), 6-hydroxydopamine (6-OHDA) ve rotenon kullanılabilir (2).

MPP+, monoamin oksidaz tip B (MAO-B) nin enzimatik aktivitesiyle üretilen 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine nin toksik metabolitidir ve selektif olarak substansia nigrada dopaminerjik nöronları öldürür (2). MPP+, mitokondriyal elektron kompleks chain 1 ve ATP sentezini bozarak ROS üretimini ve nöronal apoptozu indükler. MPP+ toksisitesi PC-12 ve SH-SY5Y dopaminerjik hücre hatlarında gösterilebilir (2).

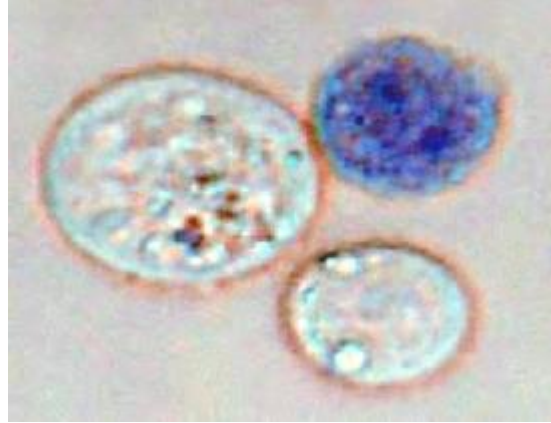
6-OHDA, nörotoksik katekolamin analogu (dopamin ve nörepinefrin) olup katekolaminerjik nöronları hedefler ve in-vivo PH modellerinde de kullanılabilir. Fakat kan-beyin bariyerini geçemediğinden stereotaktik yöntemlerle doğrudan beyin içine enjekte edilmelidir. Hücre membranını dopamin ve epinefrin taşıyıcılarıyla geçer ve hücre kültürü medyumunun 6-OHDA ile ünkübasyonu in-vitro PH modeli oluşturmak için oldukça elverişlidir (2). 6-OHDA'nın monoaminoksidaz tip A (MAO-A) ile enzimatik degradasyonu veya self-oksidasyonu ROS ve Quinone

oluşumu ile nöronal apoptozu tetikler. 6-OHDA'nın düşük konsantrasyonları selüler viabilite için pozitif etkilere sahip iken, yüksek seviyeleri (50-100  $\mu\text{M}$ ) intraselüler kalsiyum influksuna neden olarak ve ERK1/2 aşırı fosforillenmesine neden olarak hücre ölümünü indükler. Hücre kültürü çalışmalarında viabiliteyi gösterebilmek için Tripan Mavisi boyası canlı ve ölü hücrelerin boyanması amacıyla kullanılabilir (Şekil 2.3).

Rotenon, lipofilik yapıya sahip mitokondriyal elektron transport chain kompleks 1 inhibitörü olan bir tropikal bitki toksinidir. Aynı zamanda ROS üretiminde neden olur ve mitokondriyal membran potansiyelini değiştirerek apoptozu indükler (2).

SH-SY5Y ve PC-12 hücreleri doğal olarak  $\alpha$ -synuclein ekspresse ederler. Ayrıca, geçici veya stabil transfeksiyon metodları yalnızca HH ve ALS araştırmalarına sınırlı değildir. Aynı zamanda bunlar  $\alpha$ -synuclein aşırı ekspresyonu ile in-vitro PH modelleri için de kullanılabilir (2).

PH hayvan modellerinde, yetişkin farelerde, germline parkin, PINK1, DJ-1 knockout olanlarda nörodejenerasyonun indüklenmediği görülmüştür (17). Yine deneysel hayvan modellerinde LRRK2 ve  $\alpha$ -synuclein çalışılmıştır (18), (17).

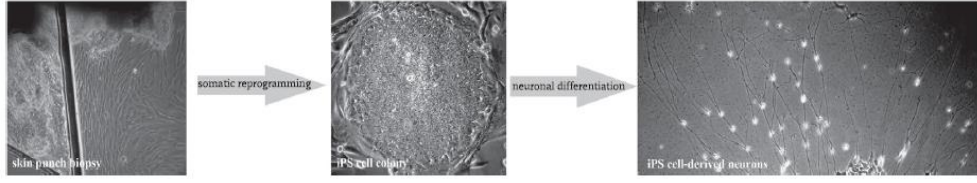


**Şekil 2.3.** Hücre kültürü çalışmalarında Tripan Mavisi Boyası ile Canlı ve Ölü Hücrelerin Boyanması.

### 2.1.3. Huntington Hastalığı Modeli

Huntington hastalığı (HH), monojenik otozomal dominant kalıtım özelliğine sahip epidemiyolojik çalışmalarda batı toplumlarında 1/7300 sıklıkta görüldüğü bildirilen bir nörodejeneratif hastalıktır (2). Mutant protein transfeksiyonu ile deneysel HH

oluşturulabilir. Nöronal hücre hatlarında mHtt protein ekspresyonunu indüklemek için kromozom 4 de lokalize HTT geninini exon 1 bölgesinde polinükleotid (CAG)n tekrarları kullanılır (2). PC-12 feokromasitoma ve SH-SY5Y human nöroblastom hücre hatları kullanılır. mHtt protein ekspresyonunu araştırmak için ise non-nöronal hücre hatları (COS-7, HEK-293 ve HeLa) kullanılabilir (2). Yine hücre kültürü çalışmalarında, özellikle uyarılmış pluripotent-kök hücre çalışmalarında non-nöronal hücrelerden spesifik nöronlar iPS hücre teknolojisiyle elde edilebilir (Şekil 2.4) (4).



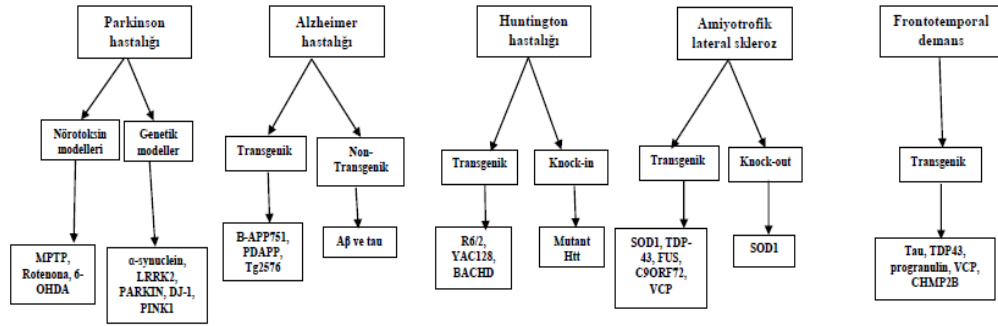
**Şekil 2.4.** Non-nöronal hücrelerden iPS hücre tekniğiyle nöronal hücrelerin elde edilmesi (4).

HH, hayvan modelleri çalışmalarına baktığımızda ise tranjenik fare ve knock-in (KI) fare modelleri çalışılmıştır (15). Fareler bu hastalıkları çalışmakta ekonomik, etkin ve kolaylıkla maniple edilebilmeleri açısından uygun modellerdir (15). Transjenik farelerde exon 1 de R6/1 (116 CAG tekrarları) ve R6/2 (144 CAG tekrarları) çalışılmıştır (19). YAC128 ve BACHD transjenik fare modellerinde 128 ve 97 poliglutamin içeren tam uzunlukta insan Htt ekspresse edilmiştir (20), (21), (22).

#### **2.1.4. Amiyotrofik Lateral Skleroz Modeli**

Amiyotrofik Lateral sklerozis (ALS), 21. Kromozomda SOD1 mutasyonları sonucu ilk olarak 1993 yılında Rosen tarafından otozomal dominant olarak ortaya çıkan bir hastalık olarak tanımlanmıştır (23). ALS modelinde nörodejenerasyonu oluşturmak için farklı endojen ve ekzojen faktörler kullanılır. Örneğin ROS, glutamat ile eksisitotoksite gibi kullanılabilir (2). ALS insidansının yaklaşık olarak 1-2.6/100.000 olduğu bildirilmiştir. Çeşitli deneysel genetik modifikasyonlar ile ALS de nörodejenerasyon oluşturulabileceği gösterilmiştir. Plazmid transfeksiyonu için SOD1 ve TDP-43 ekspresse eden hücre hattı kullanılabilir. Neuro-2a nöroblastoma ve NSC-34 motor nöron hücre hattı sıklıkla ALS modeli olarak kullanılır (2).

Çeşitli hayvan deney modellerinde, “seed” A $\beta$ , tau,  $\alpha$ -synuclein ve frontotemporal demans ve ALS ilişkili inklüzyon patolojileri rodentlerde (transjenik ve wild-tip) çalışılmıştır (17). Bununla birlikte sadece rodentler bu hastalık modellerinde kullanılabilir organizmalar değildir. Drosophila, Caenorhabditis elegans, Danio rerio, yeast (maya) modelleri ve diğer bazı organizmalar NDHların hücresel düzeyde bozukluklarının araştırılmasında kullanılmıştır (17). SOD1 transjenik farelerde, insan wild-tip TDP-43 aşırı ekspresyonunun nörodejenerasyona yol açtığı bildirilmiştir (24). Nörodejeneratif hastalıklarda kullanılan deneysel hayvan modelleri Şekil 2.5’de özetlenmiştir (15).



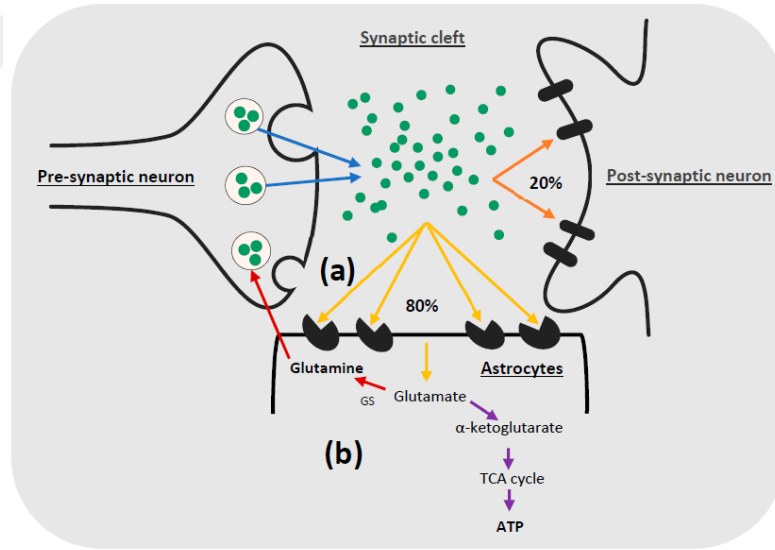
Şekil 2.5. Nörodejeneratif hastalıkların hayvan modelleri (15).

## 2.2. Glutamat

Glutamat santral sinir sisteminde sinyal iletiminde görevli bir uyarıcı nörotransmitterdir. Aynı zamanda esansiyel olmayan bir aminoasittir (25). Motor, kognitif, bilişsel fonksiyonlar, tat, koku ve görme entegrasyonu gibi duyu fonksiyonlar, solunum, kalp hızı gibi vital fonksiyonlarda görev alır. Bununla birlikte düşünme, öğrenme, hafıza, bellek, nöral plastisite, nöral gelişim gibi birçok hayati fizyolojik mekanizmada önemli rol oynar (26). Glutamat nöronlar arası sinyal iletimini sağlamanın yanında sinaptik boşluktan sızarak komşu nöronlarda da bir uyarı meydana getirebilir. Böylece ekstrasinaptik bir uyarı iletimi de sağlanmış olur (27). Glutamat kan beyin bariyerini geçebilir. Aynı şekilde Beyin Omurilik Sıvısı (BOS)’ndan sinir sisteminde yer alan hücrelere geçişi sağlanarak BOS içindeki miktarı sabit tutulmaya çalışılır. Glutamat aynı zamanda Gama-Aminobütrik asitin (GABA) sentezinde de öncü molekül olarak kullanılmaktadır (27).

Organizmada sentezlenmeyen gıdalarla alınan bir aminoasittir. Vücutta alfa – ketoglutarattan da sentezlenebilmektedir (25). Fakat Merkezi sinir sisteminde glutamaterjik nöronlar glukozdan glutamat üretmediği için presinaptik nöronların glutamat ihtiyacı glutamat-glutamin döngüsü ile karşılanır. Bu siklus presinaptik nöron ile komşu glial hücre arasında gerçekleşir (25).

Presinaptik ve postsinaptik nöronda bir miktar glutamat yıkımı gerçekleştirilir (şekil) (27). Ancak bunların haricinde en büyük mekanizma çevre astrositlere Eksitator amino asit taşıyıcılar (EAAT) ile gerçekleştirilen alımdır. Merkezi sinir sisteminde karbon ve azot kaybı olmaması için astrositlere alınan glutamat komşu kılcallarla dolaşıma geçmez (27). Bunun yerine, nöronlara bir etkisi olmayan glutamine dönüştürülür. Bu sayede glutamatın nöronlar üzerindeki eksitatorik etkisi ve aşırı depolarizasyonu önlenir. Tekrar glutamat sentezlenmesi gerektiğinde üretilen glutamin presinaptik nöronlara geçer ve burada glutaminaz enzimi ile glutamin-glutamat dönüşümü sağlanır (Şekil 2.6) (27).



**Şekil 2.6.** Astrositler tarafından glutamat alımı ve metabolizması (27).

Glutamatın bir diğer fonksiyonu nöral dokularda üretilen GABA'nın öncül molekülü olmasıdır. Glutamat ayrıca amonyağın zararsız hale getirilmesi için gerçekleşen detoksifikasyon işleminde de aracılık yapabilir (28). Glutamatı astrosit hücre membranı boyunca ya da intraselüler vezikül membranı içerisine taşıyan kanallara glutamat taşıyıcıları denir. Glutamat taşıyıcıları Eksitator amino asit taşıyıcı (EAAT) ailesi ve Veziküler glutamat taşıyıcı (VGLUT) ailesi olarak ikiye

ayrılır. EAAT grubu glutamayı sinaptik boşluktan uzaklaştırarak nöronal ve glial hücrelere geri alınmasını sağlar. VGLUT ailesinin görevi ise glutamatin sitoplazmadan veziküllere geçişini sağlamaktır (25). Glutamat taşıyıcıları aspartatın taşınmasında da görev alır. Beyin dışında birçok dokuda da bulunur. Bu dokularda glutamat ve diğer glutamaterjik maddelerin fizyolojik etkilerinde rolü vardır. Bu dokuların başlıcaları kalp, testis, karaciğer, kemik ve pankreas adacık hücreleridir.

EAAT grubu, membran üzerinde bulunan çoğunlukla  $\text{Na}^{+2}$  bağımlı ikincil aktif tranport gerçekleştiren kanalcıklardır. Ekstraselüler glutamat yoğunluğunun düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar (27). Sinaptik boşluğa salgılanan Glutamat, bu kanallar ile kısa sürede uzaklaştırılarak uyarı iletiminin durmasında görev alırlar. Bu kanalların faaliyetlerindeki azalma, glutamatin toksik etkiye neden olarak postsinaptik nöronda aşırı uyarım ve sonrasında bir grup biyokimyasal mekanizmanın aktifleştiği eksitotoksiste ile neticelenmektedir. Ayrıca bu kanalcıklar glutamatin yeniden sentezlenmesine ve kullanılmasına imkan sağlamaktadır (27). EAAT ailesi temelde başta Na iyonlarının elektrokimyasal geçişine bağlı olarak çalışmalarına rağmen potasyum ve hidrojen konsantrasyonuna bağlı olarak da çalışır. Bundan dolayı ‘‘Na ve K bağımlı glutamat taşıyıcıları’’ olarak da bilinirler. EAAT ailesinin alt tipleri glutamata farklı geçirgenlik gösterirler. Sodyuma bağımlı olarak çalışanlar yüksek affiniteli glutamat taşıyıcıları olarak da bilinmektedirler. EAAT’ler 1 molekül glutamayı 3 Na ve 1 H molekülle birlikte hücre içine alırken 1 K molekülünü ise hücre dışına çıkarırlar (27). İnsan hücrelerinde EAAT ailesinin 5 tipi mevcuttur. EAAT1 ve EAAT2 glial hücrelerin yüzeylerinde bulunur. EAAT2 (glial glutamat transporter) hipokampal bölgedeki CA3 nöronlarının akson terminalinde de tespit edilmiştir (27).

Veziküler glutamat taşıyıcıları VGLUT1, VGLUT2 ve VGLUT3 olmak üzere 3 adettir. Bu taşıyıcıların başlıca görevi hücre içine alınan glutamayı sinaptik veziküle aktarmak suretiyle sinaptik boşluğa salınması için depolanmasını sağlamaktır. VGLUT’lar veziküler sistemdeki proton geçişlerine bağlıdır. Glutamata olan geçirgenlikleri EAAT ailesine göre oldukça düşüktür. Ayrıca EAAT’lerin aksine aspartata afiniteleri yoktur (27). VGLUT’lardan en fazla bilgi VGLUT3 hakkında mevcuttur. VGLUT3’ün işitme sistemindeki hızlı glutamaterjik eksitasyonda rolü olduğu bilinmektedir (27). Glutamat ın iki tip reseptörü vardır. İyonotropik Glutamat

Reseptörleri; N-metil-D-aspartat reseptörleri, glutamat, glisin,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ve poliaminleri bağlayabilen karmaşık yapılardır. Yedi alt birimden (bir NR1, dört NR2 ve iki NR3) oluşan NMDAR'ların işlevleri, NR1 ve NR2 alt birimlerinin kombinasyonu ile belirlenir (29). Metabotropik glutamat reseptörleri; G-protein bağlı reseptörlerdir ve ikinci bir haberci kaskadını tetiklemesine neden olur (29). Hem presinaptik hem de postsinaptik nöronlarda bulunurlar, bununla birlikte metabotropik reseptörlerin alt birimleri mikroglia da mevcuttur. Sekiz farklı mGluR tipi vardır (mGluR1-8) ve yapılarına ve fizyolojik aktivitelerine göre (grup I, II ve III) üç ana gruba ayrılır. Grup I, mGluR1 ve mGluR5 reseptörlerinden oluşur. Grup II ise mGluR3 ve mGluR2 reseptörlerini içerir. Grup III, mGluR4, mGluR6, mGluR7 ve mGluR8 reseptörlerinden oluşur. Grup I mGluR'nin fosfolipaz C'yi aktive eder, siklik adenosin monofosfat (cAMP) oluşumunu tetikler. Grup II ve III mGluR'nin ise cAMP ve adenilat siklaz inhibe ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (27) .

### **2.2.1. Eksitotoksisite Kavramı**

Yapılan invitro ve invivo yapılan deneyler sonucunda, aşırı miktarlarda glutamat gibi eksitator amino asit ve bunların analoglarının nörodejenerasyona sebep olduğu bulunmuştur (29). Glutamat presinaptik nörondan salındığında NMDA ve AMPA reseptörlerinin ikisini de uyarır.  $Na^{+2}$ 'un hücreye girmesi depolarizasyona neden olur. NMDA reseptörü monovalan katyon ve kalsiyuma geçirgendir.  $Mg^{2+}$  ile kapatılan kanal, membranın depolarizasyonu ile blokajdan kurtulur (29).

AMPA reseptörü bağımlı kanallar aracılığı ile  $Na^{+}$  girişi hücrede depolarizasyona neden olur. Böylece NMDA kanallarından  $Ca^{2+}$  girişi olur. Kısaca ifade edilecek olursa glutamat reseptörlerinin aktivasyonu  $Ca^{2+}$  geçişi ile etkisini gösterir. Glutamat taşıyıcıları olan EAA'ların salınımı ve İGLUR'nin aktif hale gelmesi pek çok iyon karşı zar geçirgenliğinin artmasına neden olur (30).  $Ca^{2+}$  girişinden sonra reseptörlerin glutamatla aktive olduğu eksitator olaylar meydana gelir. EAA'lerin geri alınması ve inhibitör mekanizmalar bu eksitator olayların sonlanmasını sağlar. Gecikmiş hücre ölümü ise NMDAR'ların aşırı uyarımı ve buna bağlı  $Ca^{2+}$  fazlalığıyla meydana gelmektedir. Kalpain ve Fosfolipaz A2 gibi  $Ca^{2+}$ 'ye bağımlı enzim aktivitesi ve bazı serbest radikallerin üretimi de apoptozda etkilidir (25). Hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun artışı her zaman hücre ölümüne neden

olmaz. NMDA reseptörlerine bağılı bölgesel artışlar NO sentazın aşırı uyarımına da sebep olur ve böylece hücrede ölümcül olaylar tetiklenir (6), (7), (25).

mGluR1 hem de mGluR5, NMDA reseptör akımlarının Src'ye bağılı mekanizma yoluyla güçlendirilmesine yol açar. Alternatif olarak diğer görüşler, hem mGluR1 hem de mGluR5'in kalmodulin ile kalsiyum bağımlı bir şekilde etkileşime girebileceğini destekleyerek, PKC'nin yanı sıra diğer moleküllerin, Pyk2 / Src'nin, mGluR1 aracılı aktivasyonundan ve NMDARs akımlarının güçlendirmesinden sorumlu olabileceğini öne sürer (25).

Hücresele ve moleküler düzeyde yaşlanma, karmaşık bir süreçtir. DNA remodellingi, parçalanması, protein yapısal ve fonksiyonel değişiklikleri ve membran yapısal kusurları gibi değişiklikler için tetikleyici olayları bilinmemektedir. Yaşlanma sürecine giren bir hücrede ortaya çıkan moleküler anormalliklerin önceden programlandığını, bu nedenle hücre canlılığının, bir hücrenin miras aldığı genetik ve protein yapısı tarafından sınırlandırıldığını öne sürenler vardır. Hipokampal nöronlar, amiloid P ile indüklenen toksisiteye karşı oldukça savunmasızdır ve bu durum nöronlarda artan oksidatif stres ile ilişkilidir. Bu artmış oksidatif stres, proteinlerle reaksiyona giren ve işlevlerini değiştiren, lipid peroksidasyonunun aldehidik ürünü olan 4-hidroksinonenal (HNE) oluşumunun artmasına neden olur. Nöronların HNE'ye maruz kalması, Na<sup>+2</sup> ve Ca<sup>2+</sup> gibi iyonların hücre içi düzenlenmesini bozar ve NMDA reseptör antagonistleri tarafından zayıflatılabilen toksisiteye yol açar (29). Glutamatın akut veya kronik nörodejeneratif sorunlar meydana getirmek suretiyle hücre ölümünü başlattığı bilinmektedir. Dolayısıyla glutamat sinyal iletiminin sağlıklı olması nöronun korunmasında önemlidir. Ek olarak çoğu zaman glutamat nörotoksitesi glutamat reseptörlerinden NMDA'nın aşırı uyarılmasından kaynaklanabilir (29).

Eksitotoksisite fenomeni, yani yüzey reseptörlerinin aşırı glutamat aktivasyonundan kaynaklanan hücre nekrozu, nöbetler, iskemi, anoksi, hipoglisemi ve iltihaplanma gibi sinir sistemindeki çeşitli patolojik durumlarla ilişkilendirilmiştir (29). Eksitotoksisite fikrinin geliştirilmesinden bu yana, ana dogma, glutamata bağılı hücre hasarı ve ölümünün EAA reseptörlerinin aktivasyonunun bir sonucu olduğu ve bu etkilerin kompetitif veya kompetitif olmayan l-glutamat reseptör inhibitörlerinin

kullanılmasıyla bloke edilebileceği olmuştur (29). Nöronların yüksek hücre dışı glutamat konsantrasyonlarına maruz kalmasının ardından gelen nörotoksisite, iki farklı nöronal hasar ve ölüm mekanizması şeklinde oluşabilir. Glutamata kısa süreli maruz kalma (5-15 dakika), hücre dışı Na<sup>+</sup> ve Cl<sup>-</sup> konsantrasyonlarına bağlı olarak nöronların şişmesine, hücrelerin parçalanmasına ve laktat dehidrojenazın (LDH) salınmasına neden olur (29). Eksitotoksik hücre ölümü ile ilgili bu bilgiler, glutamatın iskemik veya hipoglisemik nöronal hasarlanmadaki rolü açısından çok önemlidir.

### **2.3.Anakinra**

IL-1, doğal bağışıklık ve inflamasyonun merkezi bir mediatörüdür. IL-1 ailesi, agonist aktiviteye sahip 7 ligand (IL-1 $\alpha$  ve  $\beta$ , IL-18, IL-33, IL-36 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), üç reseptör antagonisti (IL-1Ra, IL-36Ra, IL-38) ve bir anti-inflamatuar sitokin (IL-37) içerir. IL-1 Reseptör (IL-1R) ailesi 6 reseptör zinciri içerir. Bunlar 4 sinyal reseptör kompleksi, 2 tuzak reseptör (IL-1R2, IL-18BP) ve 2 negatif regülatör (TIR8 veya SIGIRR, IL-1RAcPb) içerir. Reseptör antagonistleri, tuzak reseptörleri ve sinyal inhibitörleri aracılığıyla, doğal bağışıklık ile kontrolsüz inflamasyon arasında bir denge sağlanır. Doğal bağışıklığın tüm hücreleri IL-1 ailesi üyelerinden etkilenir (31). IL-1 makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller, bazofiller ve mast hücreleri dahil hemen hemen tüm hücreleri ve organları etkiler. Otoinflamatuvar, otoimmün, bulaşıcı ve dejeneratif hastalıkların ana patojenik mediatörüdür.

IL-1'in patofizyolojik rolleri, inflamasyon, akut faz yanıtları, bakteriyel ve viral enfeksiyona karşı konak savunması, timosit olgunlaşması ve T helper 2 hücre proliferasyonu dahil olmak üzere immün sisteminin aktivasyonu, osteoklast aktivasyonu ve metalloproteazların salgılanması dahil kemik metabolizması, ateş gelişimi ve hipotalamopitüiter aks (HPA) ekseninin aktivasyonudur. Nöro-immüno-endokrin sistemdeki rolleri vücudun homeostazını sağlamada ve bağışıklık sisteminin merkezi sinir sistemi tarafından kontrolünde önemlidir (32). IL-1'in merkezi sinir sistemi üzerindeki etkileri ateş ve HPA aksın aktivasyonudur. Yüksek sıcaklıkta lökosit göçü artar. HPA aksının aşağısındaki kortizol, doğal bağışıklık ve inflamasyon üzerinde düzenleyici bir işleve sahiptir (32).

İki çeşit IL-1 tanımlanmıştır: IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ , farklı genler tarafından kodlanır, aynı reseptöre (IL-1R1) bağlanır ve benzer biyolojik özelliklere sahiptir. Bununla birlikte, bağışıklık, inflamasyon ve kanser üzerinde etkilerinde farklılıklar vardır. IL-1 $\alpha$  öncüsü, tüm gastrointestinal sistemin epitel tabakalarında, akciğer, karaciğer, böbrek, endotel hücreleri ve astrositlerde yapısal olarak bulunur. Miyokard enfarktüsü, inme, akut böbrek yetmezliği ve tümör nekrozu gibi iskemik hastalıklarda olan nekrozla hücre ölümü üzerine IL-1 $\alpha$  öncüsü salınır. IL-1 $\beta$  öncülünün aksine, IL-1 $\alpha$  öncülü tamamen aktiftir ve steril enflamasyonu oluşturan enflamatuar sitokin ve kemokinlerden oluşan bir kaskadı hızla başlatarak bir alarm olarak işlev görür. Dolayısıyla, IL-1 $\alpha$  steril enflamasyonun erken evrelerine aracılık eder. Nekrotik hücrelerden salınan IL-1 $\alpha$  öncüsüne ek olarak, aktive edilmiş monositlerde de IL-1 $\alpha$ 'nın bir membran formu mevcuttur. Bununla birlikte, dolaşımdaki IL-1 $\alpha$ , ciddi enfeksiyonları olan kişilerde bile nadiren tespit edilir. Ancak endotelial hücrelerden salınan apoptotik cisimlerde bulunur.

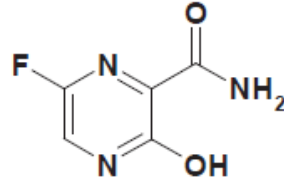
IL-1 $\beta$ , kan monositleri, doku makrofajları, deri dendritik hücreleri ve beyin mikrogliaları gibi hematopoetik hücreler tarafından TLR (toll like receptör)' ye, aktive edilmiş kompleman bileşenlerine, diğer sitokinlere (TNF- $\alpha$  gibi) ve IL-1'in kendisine yanıt olarak üretilir. IL-1 $\alpha$  prekürsörünün aksine, IL-1 $\beta$  prekürsörü aktif değildir. Kaspaz-1 tarafından parçalanarak aktif sitokini hücre dışı boşluğa bırakır. Kaspaz-1 hematopoetik hücrelerde bol miktarda bulunmasına rağmen, proenzim (prokaspaz-1) ilk olarak inflamazom tarafından parçalanmayı gerektirir. Bu makromoleküler kompleksin kilit bileşeni, kriyopirindir. Piryindeki tek amino asit fonksiyon mutasyonları, yüksek miktarda aktif olarak salgılanan IL-1 $\beta$  ile sonuçlanır. IL-1 $\beta$ 'nin yüksek miktarda salgılanması, otoinflamatuvar hastalıklar olarak adlandırılan bu mutasyonlara sahip hastalarda inflamasyonla bağlantılıdır. Ancak, IL-1 $\beta$  aracılı inflamasyonun tamamı NLRP3 veya kaspaz-1 aktivitesine bağlı değildir. İnaktif IL-1 $\beta$  prekürsörünün proteinaz-3 ve elastaz gibi nötrofil enzimleri tarafından hücre dışı parçalanması aktif IL-1 $\beta$  üretir (33). Çünkü parçalanma bölgesi kaspaz-1'inkine yakındır.

Mediterranean FeVer (MEFV) geni tarafından kodlanan pyrinin önemli bir rolü IL-1 $\beta$  sekresyonunu düzenlenmesidir. Otoinflamatuvar hastalıklardan biri olan Ailesel Akdeniz ateşi (familial Mediterranean fever, FMF)' nin inflamatuvar semptomlarının IL-1 $\beta$  tarafından tetiklendiği düşünülmektedir. Pyrinin C-terminal B30.2 alanındaki mutasyonlar tarafından IL-1 $\beta$  üretimi anormal şekilde indüklenir. IL-1  $\beta$  'nin blokajı, FMF için büyüleyici bir yardımcı tedavidir (36). Anakinra, rilonacept ve kanakinumab, IL-1 inhibitörleridir (35).

**Anakinra (insan IL-1 reseptörünün rekombinant homoloğu)**, IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ 'nin IL-1 reseptörüne bağlanmasını yarışmalı olarak inhibe eder (31). Escherichia coli'den rekombinant DNA teknolojisi ile üretilir. Aminoasit yapısı, N'-terminalinde ek bir metionin kalıntısı dışında, doğal IL-1RA' nınkiyle aynıdır. Anakinranın yarı ömrü 4 ila 6 saat arasında değişmektedir, bu nedenle günlük olarak subkutan enjeksiyonla, çocuklarda önerilen 1-2 mg/kg ve yetişkinlerde 100 mg ile uygulanır. İlaç esas olarak böbrek tarafından elimine edildiğinden şiddetli böbrek yetmezliği veya son dönem böbrek hastalığında (kreatinin klerensi 30 ml/dk'nın altında) verilen doz gün aşırı uygulanmalıdır (49). Birçok otoinflamatuvar hastalığın kullanımının yanısıra, günümüzde özellikle COVID-19 enfeksiyonunun tedavisinde de kullanılmıştır (33), (34), (35), (36), (37), (38), (39), (40).

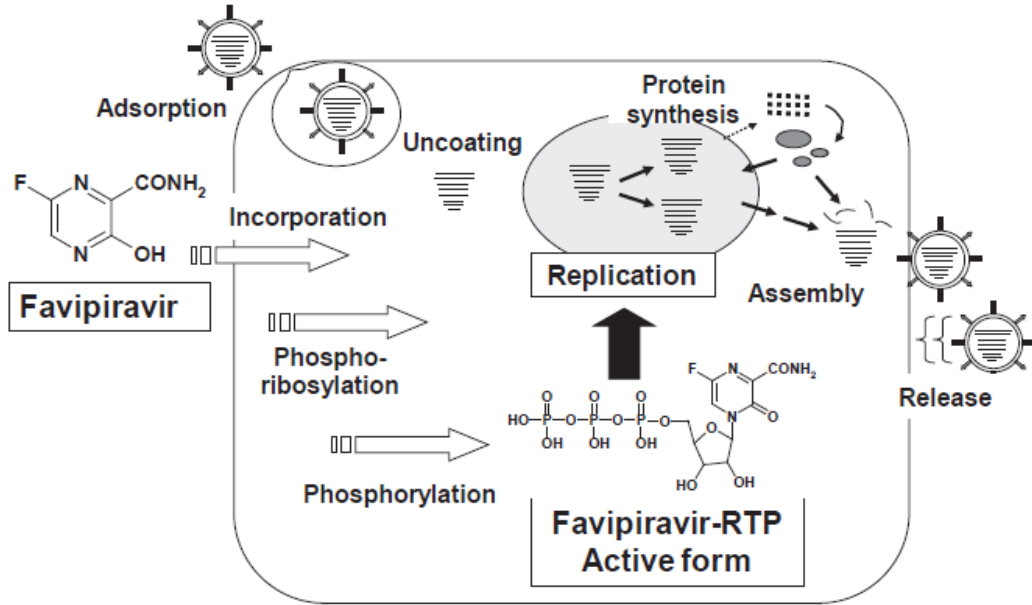
#### **2.4. Favipravir**

Favipravir (FPV, T-705), RNA bağımlı RNA polimerazı kompetitif inhibe ederek, viral transkripsiyon ve replikasyonu önleyen antiviral etkiye sahip bir RNA polimeraz inhibitörüdür (41), (42), (43) (Şekil 2.7). 2014 yılında Japonyada standard antiviral tedavilere dirençli influenza tedavisinde onay almıştır (41). FPV ayrıca Ebola virüs hastalığı ve özellikle coronavirus – 2 (SARS-CoV-2) nin neden olduğu şiddetli akut respiratuvar sendrom tedavisinde kullanılmaktadır (41). Moleküler yapısı C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> ve moleküler ağırlığı 157.1 g/mol olan bir pürin nükleozid öncülüdür. FPV nin aktif formu olan favipravir ribofuranosyl-triphosphate (FTP) RNA bağımlı RNA polimerazı (RdRp) inhibe ederek viral replikasyonu önleyerek etki eder (Şekil 2.8).



Şekil 2.7. Favipiravirin kimyasal yapısı (42).

COVID-19 da etkinliği ile ilgili 2 hipotez ortaya atılmıştır. İlkine göre FTP intraselüler olarak oluşmakta sonra nükleozid analogu gibi davranarak GTP/ATP yi stimüle etmekte ve sonuçta viral RNA ya inkorpore olarak RNA sentezi sonlanmaktadır. Diğer görüşe göre ise FTP viral RNA ya inkorpore olarak genom mutasyonunu indükler ve etkisiz ve inefektif viron oluşumuna yol açar (44) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Favipiravirin etki mekanizması (42).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

HT22 (SCC129) hücre Merck ® hücre koleksiyonundan elde edildi ve % 10'luk Fetal Sığır Serumunu (FBS) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA), % 1'lik penisilin/streptomisin (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, USA) ve % 1'lik L-glutamin içeren DMEM'de (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, UK) kültüre edildi. Uygun koşullar oluşturularak inkübatörde (37 °C ve % 5 CO<sub>2</sub> ile nemlendirilmiş atmosfer ortamı) bekletildi. Hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştınca pasajlandı. Üç defa pasajlama yapıldıktan sonra hücreler 96'lı plate her kuyucuktaki hücre yoğunluğu  $1 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekim yapıldı.

Anakinra, favipravir ve glutamat (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, ABD) DMEM içerisinde çözündürüldü ve işlem den önce stok çözeltiler oluşturuldu.

Anakinra ve favipravirin glutamat kaynaklı sitotoksosite üzerindeki etkisini incelemek için hücre grupları oluşturuldu. Kontrol grubuna herhangi bir tedavi uygulanmadı. Glutamat ile indüklenen grubun hücrelerine 24 saat boyunca 10 mM glutamat verildi. Anakinra grubundaki hücrelere 24 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda (1,10, 25, 50 ve 100 µg) anakinra verildi. Favipravir grubundaki hücrelere 24 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda (1, 10, 25, 50 ve 100 µg) favipravir verildi. Anakinra+glutamat grubundaki hücreler, 1 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (1, 10, 25, 50 ve 100 µg) anakinra ile ön işleme tabi tutuldu ve ardından 24 saat boyunca 10 mM glutamat uygulandı. Favipravir+glutamat grubundaki hücreler, 1 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (1, 10, 25, 50 ve 100 µg) favipravir ile ön işleme tabi tutuldu ve ardından 24 saat boyunca 10 mM glutamat uygulandı. Ardından etkili dozlar belirlenerek anakinra+favipravir+ glutamattan oluşan kombinasyonları uygulandı.

Hücre canlılığı, XTT testi (Roche Diagnostic, MA, USA) kullanılarak değerlendirildi. Başlangıçta HT22 hücreleri oyuk başına 100 µL DMEM içinde  $1 \times 10^4$  hücre yoğunluğunda 96 oyuklu plaklara ekildi ve 24 saat inkübe edildi. Glutamat kaynaklı sitotoksosite yöntemi, daha önce tarif edildiği gibi gerçekleştirildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından 96'lı plaka çıkarılıp oyuklar fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Daha sonra tüm kuyucuklara fenol kırmızısı içermeyen 100 µL DMEM ve 50 µL XTT solüsyonu ilave edildi ve ardından plakalar 4 saat 37 °C'de tutuldu.

Absorbans değerleri, 450 nm'de bir ELISA mikro plaka okuyucu (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, UK) kullanılarak tespit edildi. Tüm deneyler üç kez yapıldı ve hücre canlılığı, kontrol grubuna (tedavi uygulanmamış hücreler) kıyasla canlı hücre yüzdeleri olarak değerlendirildi. Kontrol grubu canlılığı yüzde yüz (%100) olarak kabul edildi.

### **3.1. İstatistiksel Analiz**

Çalışmada yapılan bütün ölçümler üç kez tekrar edildi. Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 23.0 paket programı dahilinde; verilerin her grupta normal dağılıma uygun olup olmadığı Shapiro Wilk testi, çalışmadan elde edilen veriler için tanımlayıcı istatistik olarak ortalama ve standart sapma değerleri olarak elde edildi. Normal dağılıma uyan verilerde tek yönlü ANOVA varyans analizi testi ve normal dağılım göstermeyen veriler de ise nonparametrik testler olan Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testi uygulandı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak kabul edildi.

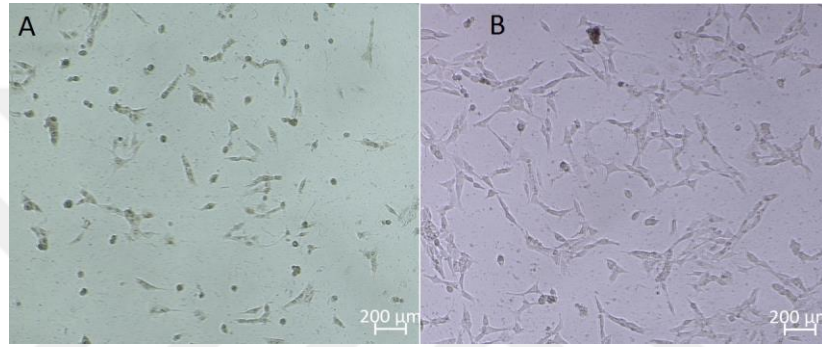
### **3.2. Araştırmanın Etik Yönü**

Araştırmanın her aşaması etik ilkeler doğrultusunda yürütülmüştür. Çalışmaya başlamadan önce Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'dan (20/10/2021 tarihli, 2021-10/39 sayılı) (EK.1) izin alınmıştır.

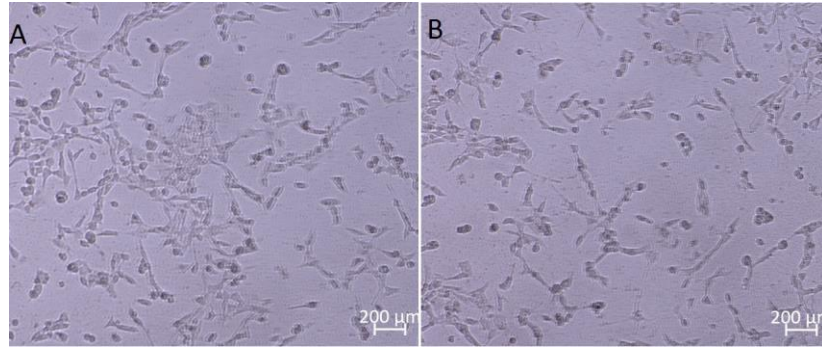


#### 4. BULGULAR

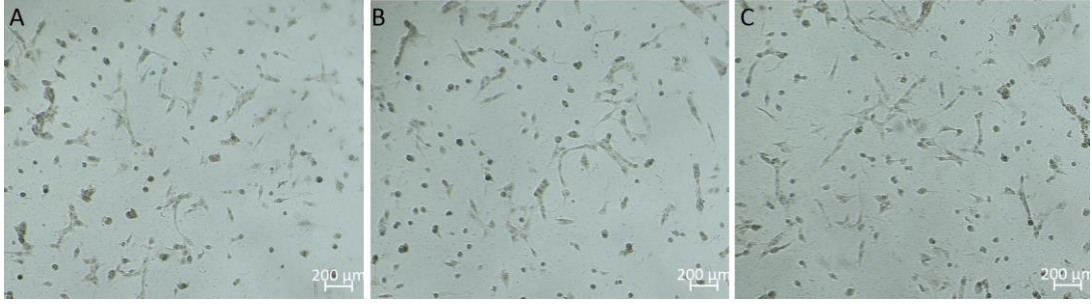
Glutamatla HT22 hipokampal hücre hattında oluşturulan eksitotoksisite sonrası anakinra ve favipravirin hücre canlılığı viabilite üzerine etkileri farklı konsantrasyonlarında ayrı ayrı ve anakinra – favipravir kombine uygulanarak incelendi (Şekil 4.1-3). Hücre viabilitesi herhangi bir şey uygulanmayan (anakinra – favipravir tek başına veya kombine) yani kontrol grubuna oranla canlı hücre yüzdeleri şeklinde değerlendirildi.



**Şekil 4.1.** Glutamat eksitotoksisitesi oluşturulan HT22 hücre hattının mikroskopik morfolojik görünümleri. A; glutamat grubu, B; kontrol grubu.

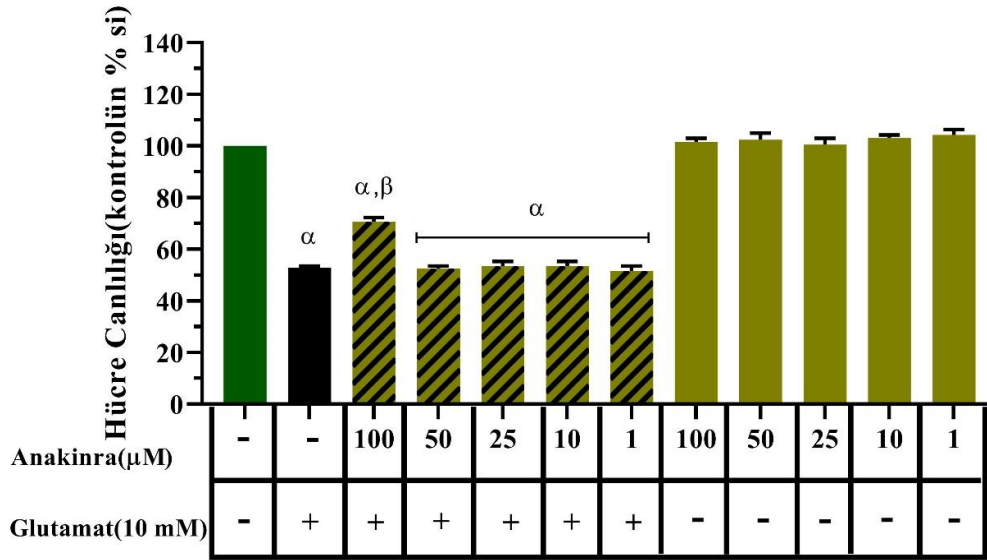


**Şekil 4.2.** Glutamat eksitotoksisitesi oluşturulan HT22 hücre hattının mikroskopik morfolojik görünümleri. A; Anakinra 100 µg uygulanan grup, B; Favipravir 100 µg uygulanan grup.



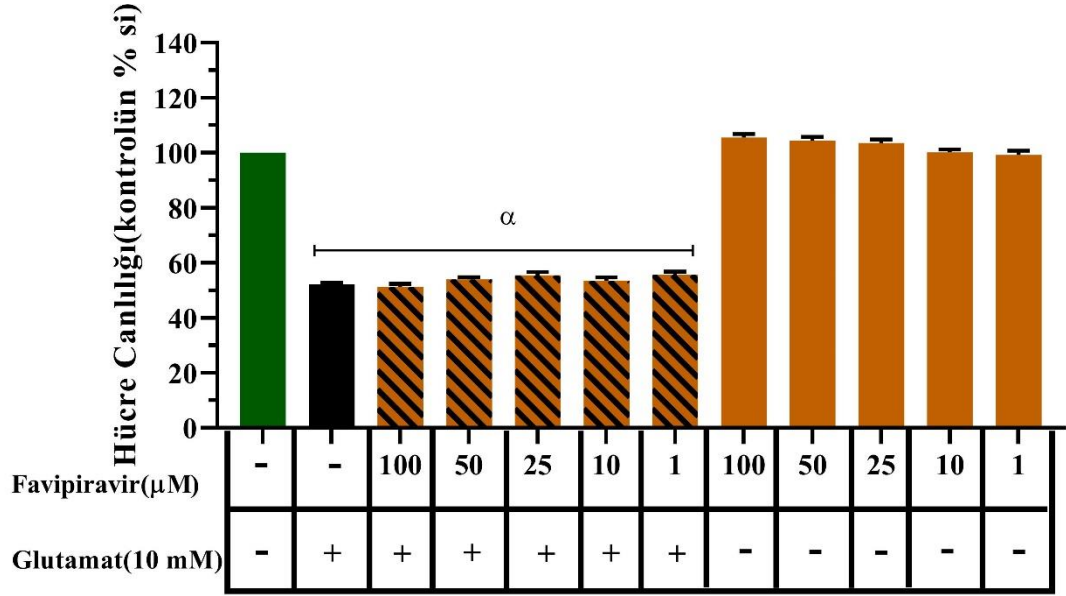
**Şekil 4.3.** Glutamat eksitotoksitesisi oluşturulan HT22 hücre hattının mikroskobik morfolojik görünüşleri. A; Anakinra 100 µg ve glutamat uygulanan grup, B; Favipravir 100 µg ve glutamat uygulanan grup, C; Anakinra 100 µg ve glutamat ve Favipravir 100 µg uygulanan grup.

Anakinranın 100, 50, 25, 10 ve 1 µM konsantrasyonlarının HT22 hücre hattında glutamat 10 mM uygulaması sonrası hücre canlılığı yani viabilite üzerine anakinranın farklı dozlarının etkisine baktığımızda ise 100 µM anakinra uygulanan grupta hücre canlılığının diğer gruplara göre daha fazla olduğu gözlemlendi ( $p < 0.01$  glutamata göre). Yani yalnızca anakinranın farklı dozlarının uygulanmasında viabilite üzerinde herhangi bir etkisi gözlenmedi ( $p < 0.01$  kontrole göre) (Şekil 4.4).



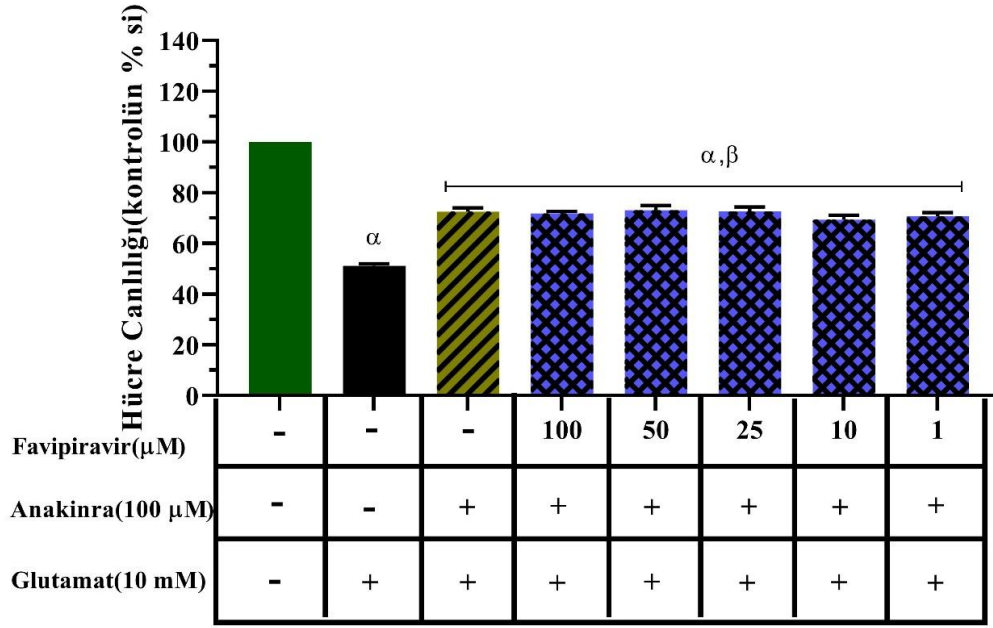
**Şekil 4.4.** HT22 hücre hattında glutamatla oluşturulan eksitotoksitesite üzerine Anakinranın farklı dozlarının uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi. ( $p < 0.01$  glutamata göre). ( $p < 0.01$  kontrole göre).

Fakat Glutamatla HT22 hücre hattında oluşturulan sitotoksitenin anakinra 100 µM uygulamasıyla önlendiği gözlemlendi. Anakinranın bu dozda nörodejenerasyon üzerine koruyucu etkisi izlendi (Şekil 4.4).



**Şekil 4.5.** HT22 hücre hattında glutamatla oluşturulan eksitotoksitenin üzerine Favipiravirin farklı dozlarının uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi. ( $p < 0.01$  kontrole göre).

Favipiravirin 100, 50, 25, 10 ve 1 µM konsantrasyonlarının HT22 hücre hattında glutamat 10 mM uygulaması sonrası hücre canlılığı yani viabilite üzerine favipiravirin farklı dozlarının etkinliğinin olmadığı gözlemlendi. Yani yalnızca favipiravirin farklı dozlarının uygulanmasında viabilite üzerinde herhangi bir etkisi gözlemlenmedi ( $p < 0.01$  kontrole göre) (Şekil 4.5).



α; p< 0.01 kontrole göre

β; p< 0.01 glutamata göre

**Şekil 4.6.** HT22 hücre hattında glutamatla oluşturulan eksitotoksisite üzerine Anakinra – Favipiravir kombine uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi.

Anakinra – favipiravir – glutamat kombine uygulanan grupta ise anakinranın 100 μM dozu ile favipiravirin 100, 50, 25, 10 ve 1 μM konsantrasyonları ve glutamat 10 M dozlarında; anakinra glutamate toksisitesine karşı koruyucu fakat anakinra – favipiravir kombinasyonu bu etkiyi değiştirmedir (Şekil 4.6).

## TARTIŞMA

Hipokampal hücreler glutamat toksisitesine hassas ve nörodejenerasyonu in-vitro modelleme açısından uygun hücre gruplarıdır. Bu çalışmada glutamatla HT22 hipokampal hücre hattında oluşturulan eksitotoksistede, anakinra ve favipiravirin hücre canlılığı viabilite üzerine etkileri farklı konsantrasyonlarında ayrı ayrı ve anakinra – favipiravir kombine uygulanarak incelemek amaçlandı.

Covid-19 tedavisinde yüksek dozda kullanılan antiviral ilaç olan favipiravir ve sitokin fırtınasında oksijen saturasyonu düşünce solunum yetmezliğine giren hastalara bakanlık onaylı kullanılan antiinflamatuvar ilaç kullanılan anakinra kullanılmaktadır.Geçirilen Covid-19 enfeksiyonu sonrası hastalarda unutkanlık, konsantrasyon eksikliği,hatırlama ve hafıza problemleri gibi birçok bilişsel fonksiyonda zorlanmayı da içeren beyin sisi görülmektedir.Bu beyin sisinin yoğun sitokin fırtınasında etkilenen glial hücreler,mikroglialar ve astrosit hücrelerini de içeren inflamasyon ve eşlik ettiği nörodejenerasyondan mı yoksa yüksek doz kullanılan bu ilaçların tekli veya kombine olarak kullanımının oluşturduğu toksisite ile ilişkili bir nörojenerasyondan mı oluştuğu bilinmemektedir. Bu konuyla ilgili yapılan çalışmalar bulunmamaktadır.

Nörodejeneratif hastalıklar (NDH) günümüzde giderek artan sıklıkta karşılaştığımız, tanı koyduğumuz bir grup hastalığı içerir. Bunların başlıcaları; Alzheimer hastalığı (AH), Amiyotrofik Lateral Sklerozis (ALS), Huntington hastalığı (HH) ve Parkinson hastalığı (PH) dır (46), (47). Frontotemporal demans ve spinoserebellar ataksileride bu gruba alan yayımlar mevcuttur (48). Bu hastalıkların bazılarında hafıza ve bilişsel bozukluklar oluriken bazılarında da hareket, konuşma ve hatta nefes almada zorluklar olabilmektedir (48). Bu hastalıkların hüresel ve moleküler düzeyde etiyopatogenezlerini anlamak için in-vivo çalışmaları yapmak çoğu zaman etik sorunlar, ekonomik – maliyet ve zaman kaybı, iş gücü ve daha kapsamlı laboratuvar ekipmanlarını gerektirebilmektedir. İşte bu yüzden NDH'larda in-vitro çalışmalar daha önem kazanmaktadır.

NDH'larla ilgili fare, meyve sineği, nematod solucanı ve maya kültürleri deneysel çalışmalarda kullanılmıştır (48). Yine son yıllarda pluripotent kök hücre çalışmaları bildirilmiştir (48). Bazı çalışmalarda protein agregatlarının nörondan

nörona farklı yollarla aktarıldığı ve NDH'ların patogeneğinde rolü olduğu bildirilmiştir. Yine son yıllarda çevresel toksinler ve endojen proteinlerin yanısıra NDH'ların ortaya çıkmasında mikrogliaların aşırı aktivasyonu ve reaktif oksijen radikalleri salınımının nörodejenerasyonda rol oynadığı bildirilmiştir (49), (50).

Yapılan çeşitli hayvan çalışmalarıyla pozitron emisyon tomografi (PET) ve manyetik rezonans (MR) görüntülemelerde kullanılarak NDH'ların fonksiyonel, nörokimyasal ve anatomik farklılıkları ortaya konmaya çalışılmıştır (51). Yine çeşitli fare modellerinde PET ve SPECT (single-photon emission computed tomography) ile prelinik görüntüleme ve nörovasküler komponentler incelenmiştir (52). Fakat bunlar pahalı tetkikler olup zamansal ve ortamsal, laboratuvarlar gibi, ilave yükler getirmektedir. Bunların yerini alabilecek daha ucuz ve daha moleküler çalışmalar mevcuttur. Bir çalışmada floresanla işaretlenmiş insan  $\alpha$ -synuclein fibrillerinin sinir hücresinden bir diğer sinir hücresine transmisyonu primer fare hücre kültüründe gösterilmiştir (53).

NDH'ların patogeneğinde rol oynayan TREM2 varyantları çalışılmıştır. TREM2 resptörleri çeşitli immün hücrelerde ekspresse edilir (54). Yine bir fare AH modelinde proinflamatuvar sitokin olan interlökin – 1 (IL-1) in etkisi araştırılmıştır (55). Bu çalışma hipokampal düzeyde artmış IL-1 düzeyi ile AH'ındaki hafıza problemlerinin ilişkili olabileceğini göstermiştir (55).

Bu çalışmada HT22 hipokampal hücrelerde glutamatla oluşturulan nörodejenerasyon (eksitotoksisite) üzerine anakinranın farklı dozları uygulanarak hücre canlılığına etkisi incelendi. Anakinra 100  $\mu$ M uygulanan grupta hücre canlılığının, anakinranın daha düşük dozları uygulanan gruplara kıyasla daha fazla olduğu gözlemlendi ( $p < 0.01$ , glutamata göre). Fakat anakinranın daha düşük ve farklı dozlarda uygulamasının viabilite üzerinde herhangi bir etkisi gözlenmedi.

İnterlökin – 1 antagonisti olan ankinra günümüzde birçok inflamatuvar hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (32). Gerek yaşlanmanın doğal sürecinde, günlük yaşamda farkına varılmayan apoptoz olayı ve gereksede çeşitli nedenlerde nöronal hücrelerde oluşan inflamasyonu baskılamak önemlidir.

Clíteur ve ark., faz 2, randomize klinik çalışmalarında spontan intraserebral hemorajili hastalarda oluşan mikrogliyal aktivasyonu, inflamasyonu ve beyin hasarını

önlemek için rekombinan insan IL-1ra (anakinra) uygulamışlar (56). Hastaları iki gruba ayırmışlar; birinci grupta yüksek doz anakinra 500 mg/gün ikinci grupta ise daha düşük doz 100 mg/gün anakinra kullanmışlar ve standart tedavi verilen hasta grubuyla karşılaştırmışlardır. Anakinranın yüksek dozlarının kan beyin bariyerini daha çok geçebildiği oluşabilecek sekonder nöroinflamasyonu önlemede işe yarayabileceğini göstermişlerdir (56). bu bulgular çalışmamızda da gösterdiğimiz yüksek doz anakinranın HT22 hipokampal hücre canlılığını daha iyi koruduğu sonucunu desteklemektedir.

Anakinra günümüzde COVID-19 enfeksiyonun da ortaya çıkan sitokin fırtınasında da kullanılmıştır (37). Hücre içi kaspaz aktivasyonu ve inflamazom kompleksi oluşumuyla giden inflamatuvar hadiselerde anakinranın etkinliği bilinmektedir (40).

Birçok NDH ta bozulmuş microRNA seviyelerinin hastalık patogenezi ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (57). Özellikle miR-9-5p, miR-21-5p, miR-29 ailesi, miR-132-3p, miR-124-3p, miR-146a-5p, miR-155-5p, and miR-223-3p ilişkili bulunmuştur (57). Ailesel frontotemporal demansta ise progranulin geninde fonksiyon kaybına yol açan genetik mutasyonların rol aldığı bildirilmiştir (58).

Alzheimer hastalığının patogenezinde proinflamatuvar mekanizmaların hastalığın erken evrelerinde bile rol oynadığı bildirilmiştir (59). Burada özellikle TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi sitokinlerin rolüne vurgu yapılmıştır. Rat AH amiloidoz modellerinde bu sitokinlerin sinaptik plastisideki bozukluk üzerine etkileri bildirilmiştir (59). NLRP3 inflamazom inhibitörü olarak Mcc950, IL-1 reseptör antagonisti (anakinra) ve anti-TNF- $\alpha$  ajan (etanercept) kullanılmıştır (59). İnflamasyonun nörodejeneratif hastalıklarda ve özellikle AH'da transtiretin (TTR) hücre dışı birikimini, apoptozu engelleyerek amilodozisin önlenmesinde anakinra ile IL-1 blokajının etkili olabileceği bildirilmiştir (40).

Ailesel amiloidiotik polinöropatinin (FAP) patogenezinde prefibriller transtiretin ve amiloid fibrillerin birikiminin rol oynadığı bildirilmiştir (60). FAP'de deneysel modellerinde (V30M FAP fare modelinde) anakinra ile IL-1 blokajının TTR birikimi ve toksisiteyi önleyebileceği bildirilmiştir (60). Yine bazı çalışmalarda nörodejeneratif hastalık modellerinde makrotofajinin genetik düzenlenmesi üzerine

yoğunlaşmıştır (61), (62). Bazı hayvan modellerinde NDH'larda kreatinin nöroprotektif etkisi olabileceği rapor edilmiştir (63). NDHların patogenezinin anlaşılmasında in-vitro microfluidic modellerin önemi üzerinde de durulmuştur (64).

SARS-CoV-2 enfeksiyonunda özellikle antiviral tedavide favipravir kullanılmıştır (44). Pirazin karboksamidden köken alan nükleozid analogu olan favipravir viral polimerazı inhibe etmektedir (44).

Çalışmamızda HT22 hücre hattında glutamat uygulaması sonrası hücre canlılığı yani viabilite üzerine favipravirin farklı dozlarının etkinliğinin olmadığı gözlemlendi. Farklı dozlarda anakinra ve favipravir kombinasyonlarında glutamatla oluşturulan eksitotoksite ve hücre canlılığı üzerine etkisinin olmadığı saptandı.

Anakinra ve favipravirin nöroinflamasyon ve nörodejenerasyon üzerine etkilerini daha iyi anlayabilmek için in-vitro ve invivo çalışmalara ihtiyaç vardır.

## SONUÇ

HT22 hücre hattında glutamat ile oluşturulan eksitotoksisite üzerine interlökin – 1 reseptör antagonisti anakinra ve RNA polimeraz inhibitörü olan favipravirin etkisi ve bu etkinin tek başına ve kombine olarak etkileri ile ilgili aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur:

- HT22 hücre hattında glutamat uygulaması sonrası hücre canlılığı yani viabilite üzerine favipravirin farklı dozlarının etkinliğinin olmadığı gözlemlendi.
- Anakinranın HT22 hücre hattında glutamat uygulaması sonrası hücre canlılığı yani viabilite üzerine anakinranın farklı dozlarının etkisine baktığımızda ise 100 µg anakinra uygulanan grupta hücre canlılığının diğer gruplara göre daha fazla olduğu gözlemlendi ( $\beta < 0.01$  glutamata göre).
- Yani yalnızca anakinranın farklı dozlarının (1, 10, 25, 50 µg) uygulanmasında viabilite üzerinde herhangi bir etkisi gözlemlenmedi.
- Fakat Glutamatla HT22 hücre hattında oluşturulan sitotoksisitenin anakinra 100 µg uygulamasıyla önlediği gözlemlendi. Anakinranın bu dozda nörodejenerasyon üzerine koruyucu etkisi izlendi.
- Anakinra – favipravir – glutamat kombine uygulanan grupta ise anakinranın 100 µg dozu ile favipravirin 100, 50, 25, 10 ve 1 µg konsantrasyonları ve glutamat 10 mM dozlarında; anakinra glutamate toksisitesine karşı koruyucu fakat anakinra – favipravir kombinasyonu bu etkiyi değiştirmede.

Sonuç olarak anakinranın yüksek doz uygulamasının HT22 hücre hattında glutamatla oluşturulan eksitotoksisite üzerine koruyucu etkisi gözlemlendi.

## KAYNAKLAR

1. Peng C, Trojanowski JQ, Lee VMY. Protein transmission in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2020;16(4):199–212. Available from:
2. ÖZ A. Experimental cell culture models for investigating neurodegenerative diseases. *J Cell Neurosci Oxidative Stress* [Internet]. 2019 Jun 23 [cited 2020 Dec 9];11(2):835–51. Available from:
3. Kritsilis M, Rizou S V., Koutsoudaki PN, Evangelou K, Gorgoulis VG, Papadopoulos D. Ageing, cellular senescence and neurodegenerative disease. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10).
4. Loeffler JP, De Aguilar JLG. Neurodegenerative Diseases: Unifying Principles [Internet]. Vol. 2, Neurodegenerative Diseases. 2016. 113–114 p. Available f  
90233563.001.0001/med-9780190233563
5. Mark LP, Prost RW, Ulmer JL, Smith MM, Daniels DL, Strottmann JM, et al. Pictorial Review of Glutamate Excitotoxicity: Fundamental Concepts for Neuroimaging. Vol. 22, *AJNR Am J Neuroradiol*.
6. Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. Vol. 78, *Journal of Molecular Medicine*. Springer Verlag; 2000. p. 3–13.
7. Dong XX, Wang Y, Qin ZH. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. Vol. 30, *Acta Pharmacologica Sinica*. 2009. p. 379–87.
8. Danbolt NC. Glutamate uptake [Internet]. Vol. 65, *Progress in Neurobiology*. 2001. Available from:
9. Tilleux S, Hermans E. Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. Vol. 85, *Journal of Neuroscience Research*. 2007. p. 2059–70.
10. Wang C, Cai X, Hu W, Li Z, Kong F, Chen X, et al. Investigation of the neuroprotective effects of crocin via antioxidant activities in HT22 cells and in

- mice with Alzheimer's disease. *Int J Mol Med*. 2019 Feb 1;43(2):956–66.
11. Park JS, Park JH, Kim KY. Neuroprotective effects of myristargenol A against glutamate-induced apoptotic HT22 cell death. *RSC Adv*. 2019;9(54):31247–54.
  12. Ergül M, Taşkıran AŞ. Thiamine Protects Glioblastoma Cells against Glutamate Toxicity by Suppressing Oxidative/Endoplasmic Reticulum Stress. Vol. 832, *Chem. Pharm. Bull*. 2021.
  13. Taskiran AS, Ergul M. The effect of salmon calcitonin against glutamate-induced cytotoxicity in the C6 cell line and the roles the inflammatory and nitric oxide pathways play. *Metab Brain Dis*. 2021 Oct 1;36(7):1985–93.
  14. Helmrich A BD. Animal cell culture equipment and techniques. *Methods Cell Biol*. 1998;57:3–17.
  15. Colpo GD, Ribeiro FM, Rocha NP, Teixeira AL. Animal Models for the Study of Human Neurodegenerative Diseases [Internet]. Second Edi. *Animal Models for the Study of Human Disease: Second Edition*. Elsevier Inc.; 2017. 1109–1129 p. Available from:
  16. Ribeiro FM, Camargos ER da S, De Souza LC, Teixeira AL. Animal models of neurodegenerative diseases. *Rev Bras Psiquiatr*. 2013;35(SUPPL.2):82–91.
  17. Dawson TM, Golde TE, Lagier-Tourenne C. Animal models of neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* [Internet]. 2018;21(10):1370–9. Available from:
  18. Visanji NP, Brotchie JM, Kalia L V., Koprach JB, Tandon A, Watts JC, et al.  $\alpha$ -Synuclein-Based Animal Models of Parkinson's Disease: Challenges and Opportunities in a New Era. *Trends Neurosci* [Internet]. 2016;39(11):750–62. Available from:
  19. Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, et al. Exon I of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*. 1996;87(3):493–506.

20. Gray M, Shirasaki DI, Cepeda C, André VM, Wilburn B, Lu XH, et al. Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *J Neurosci*. 2008;28(24):6182–95.
21. Slow EJ, van Raamsdonk J, Rogers D, Coleman SH, Graham RK, Deng Y, et al. Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet*. 2003;12(13):1555–67.
22. Menalled LB, Sison JD, Wu Y, Olivieri M, Li XJ, Li H, et al. Early motor dysfunction and striosomal distribution of huntingtin microaggregates in Huntington’s disease knock-in mice. *J Neurosci*. 2002;22(18):8266–76.
23. Pansarasa O, Bordoni M, Diamanti L, Sproviero D, Gagliardi S, Cereda C. Sod1 in amyotrophic lateral sclerosis: “ambivalent” behavior connected to the disease. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5):1–13.
24. McGoldrick P, Joyce PI, Fisher EMC, Greensmith L. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2013;1832(9):1421–36. Available from: 2013.03.012
25. Tapiero H, Mathé G, Couvreur P, Tew KD. II. Glutamine and glutamate [Internet]. 2002. Available from:
26. Gruenbaum BF, Zlotnik A, Fleidervish I, Frenkel A, Boyko M. Glutamate Neurotoxicity and Destruction of the Blood–Brain Barrier: Key Pathways for the Development of Neuropsychiatric Consequences of TBI and Their Potential Treatment Strategies. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
27. Mahmoud S, Gharagozloo M, Simard C, Gris D. Astrocytes maintain glutamate homeostasis in the CNS by controlling the balance between glutamate uptake and release. Vol. 8, *Cells*. MDPI; 2019.
28. Brosnan JT, Brosnan ME. Glutamate: A truly functional amino acid. *Amino Acids*. 2013 Sep;45(3):413–8.
29. Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and

- neurodegeneration. Vol. 460, Pflugers Archiv European Journal of Physiology. 2010. p. 525–42.
30. Atlante A, Calissano P, Bobba A, Giannattasio S, Marra E, Passarella S. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. Vol. 497, FEBS Letters. 2001. p. 1–5.
  31. Harrison SR, McGonagle D, Nizam S, Jarrett S, van der Hilst J, McDermott MF, et al. Anakinra as a diagnostic challenge and treatment option for systemic autoinflammatory disorders of undefined etiology. *JCI Insight*. 2016 May 5;1(6).
  32. Cavalli G, Dinarello CA. Anakinra therapy for non-cancer inflammatory diseases. *Front Pharmacol*. 2018 Nov 6;9(NOV).
  33. Buckley LF, Abbate A. Interleukin-1 Blockade in Cardiovascular Diseases: From Bench to Bedside. *BioDrugs*. 2018 Apr 1;32(2):111–8.
  34. Şahin A, Derin ME, Albayrak F, Karakaş B, Karagöz Y. Assessment of effectiveness of anakinra and canakinumab in patients with colchicine-resistant/unresponsive familial Mediterranean fever. *Adv Rheumatol*. 2020 Jan 30;60(1).
  35. Asan G, Derin ME, Dogan HO, Bayram M, Sahin M, Sahin A. Can calprotectin show subclinical inflammation in familial mediterranean fever patients? *J Korean Med Sci*. 2020 Mar 16;35(10).
  36. Bayram M, Derin ME, Doğan HO, Asan G, Şahin M, Şahin A. High prolidase levels in patients with Familial Mediterranean Fever (FMF). *Rom J Intern Med*. 2020 Mar 1;58(1):27–33.
  37. Soy M, Keser G, Atagündüz P, Tabak F, Atagündüz I, Kayhan S. Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. *Clin Rheumatol*. 2020;39(7):2085–94.
  38. Hentgen V, Vinit C, Fayand A, Georgin-Lavialle S. The Use of Interleukine-1 Inhibitors in Familial Mediterranean Fever Patients: A Narrative Review. Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2020.

39. Tufan A, Lachmann HJ. Familial mediterranean fever, from pathogenesis to treatment: A contemporary review. Vol. 50, Turkish Journal of Medical Sciences. *Turkiye Klinikleri*; 2020. p. 1591–610.
40. Gonçalves NP, Vieira P, Saraiva MJ. Interleukin-1 signaling pathway as a therapeutic target in transthyretin amyloidosis. *Amyloid*. 2014;21(3):175–84.
41. Łagocka R, Dziedziejko V, Kłos P, Pawlik A. Favipiravir in therapy of viral infections. Vol. 10, *Journal of Clinical Medicine*. MDPI; 2021. p. 1–16.
42. Furuta Y, Komeno T, Nakamura T. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. Vol. 93, *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*. Japan Academy; 2017. p. 449–63.
43. Geraghty RJ, Aliota MT, Bonnac LF. Broad-spectrum antiviral strategies and nucleoside analogues. Vol. 13, *Viruses*. MDPI AG; 2021.
44. Zhao L, Zhong W. Mechanism of action of favipiravir against SARS-CoV-2: Mutagenesis or chain termination? Vol. 2, *Innovation*. Cell Press; 2021.
45. Etc A-NMBAM. Human Skin Cell Culture and its Impact on Dermatology. *Egypt Dermatology Online J*. 1(2):2005.
46. Maher P. The potential of flavonoids for the treatment of neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20(12).
47. Cariccio VL, Samà A, Bramanti P, Mazzon E. Mercury Involvement in Neuronal Damage and in Neurodegenerative Diseases. *Biol Trace Elem Res*. 2019;187(2):341–56.
48. Gitler AD, Dhillon P, Shorter J. Neurodegenerative disease: Models, mechanisms, and a new hope. *DMM Dis Model Mech*. 2017;10(5):499–502.
49. Gentile A, Fresegna D, Musella A, Sepman H, Bullitta S, De Vito F, et al. Interaction between interleukin-1 $\beta$  and type-1 cannabinoid receptor is involved in anxiety-like behavior in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2016;13(1):1–14. Available from:

50. Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: Uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(1):57–69.
51. Strome EM, Doudet DJ. Animal models of neurodegenerative disease: Insights from in vivo imaging studies. *Mol Imaging Biol*. 2007;9(4):186–95.
52. Albanese S, Greco A, Auletta L, Mancini M. Mouse models of neurodegenerative disease: preclinical imaging and neurovascular component. *Brain Imaging Behav*. 2018;12(4):1160–96.
53. Woerman AL. The importance of developing strain-specific models of neurodegenerative disease. *Acta Neuropathol*. 2017;134(5):809–12.
54. Jay TR, Von Saucken VE, Landreth GE. TREM2 in Neurodegenerative Diseases. Vol. 12, *Molecular Neurodegeneration*. *Molecular Neurodegeneration*; 2017. 1–33 p.
55. Ben Menachem-Zidon O, Menahem Y Ben, Hur T Ben, Yirmiya R. Intra-hippocampal transplantation of neural precursor cells with transgenic over-expression of IL-1 receptor antagonist rescues memory and neurogenesis impairments in an alzheimer’s disease model. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2014;39 (2):401–14. Available from:
56. Cliteur M, van der Kolk A, Hannink G, Hofmeijer J, Jolink W, Klijn C, et al. Anakinra in cerebral haemorrhage to target secondary injury resulting from neuroinflammation (ACTION): Study protocol of a phase II randomised clinical trial. *Eur Stroke J*. 2023 Sep 15;
57. Juźwik CA, S. Drake S, Zhang Y, Paradis-Isler N, Sylvester A, Amar-Zifkin A, et al. microRNA dysregulation in neurodegenerative diseases: A systematic review. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2019;182(July):101664. Available from:
58. Petkau TL, Leavitt BR. Progranulin in neurodegenerative disease. *Trends Neurosci* [Internet]. 2014;37(7):388–98. Available from:
59. Qi Y, Klyubin I, Claudio Cuello A, Rowan MJ. NLRP3-dependent synaptic plasticity deficit in an Alzheimer’s disease amyloidosis model in vivo. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2018; 114 (October 2017):24–30. Available from:

60. Gonçalves NP, Teixeira-Coelho M, Saraiva MJ. Protective role of anakinra against transthyretin-mediated axonal loss and cell death in a mouse model of familial amyloidotic polyneuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2015;74(3):203–17.
61. Ejlerskov P, Ashkenazi A, Rubinsztein DC. Genetic enhancement of macroautophagy in vertebrate models of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2019;122(December 2017):3–8. Available from:
62. Djajadikerta A, Keshri S, Pavel M, Prestil R, Ryan L, Rubinsztein DC. Autophagy Induction as a Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases. *J Mol Biol* [Internet]. 2020;432(8):2799–821. Available from:
63. Bender A, Klopstock T. Creatine for neuroprotection in neurodegenerative disease: end of story? *Amino Acids.* 2016;48(8):1929–40.
64. Osaki T, Shin Y, Sivathanu V, Campisi M, Kamm RD. In Vitro Microfluidic Models for Neurodegenerative Disorders. *Adv Healthc Mater.* 2018;7(2):1–29.

## **EKLER**

### **EK 1. Etik Kurul Kararı**

<b>Görev Yeri</b>	<b>Ünvanı</b>	<b>Tarih</b>
İzmir Özel Kaskaşoğlu Göz Merkezi	Hemşire	Haziran-Eylül 2000

9 Eylül Üni. Tıp Fak. Anestezi Yoğun Bakım Ünitesi (YBÜ)	Hemşire	Eylül 2000- Kasım 2002
Erciyes Üni. Tıp Fak. Dahiliye YBÜ, Genel Cerrahi YBÜ, Yenidoğan YBÜ, Çocuk Cerrahisi AD	Hemşire	Aralık2002- Temmuz 2009
T.C. Sağlık Bakanlığı Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji EAH, G Cerrahi, Ortopedi, Beyin Cerrahi Bölümü	Hemşire	Temmuz 2009- Şubat 2011
T.C. Sağlık Bakanlığı Şanlıurfa Mehmet Akif İnan EAH, Fizik Tedavi Ünitesi Birim Sorumlusu	Hemşire	Şubat 2011-Aralık 2013
T.C. Sağlık Bakanlığı Sivas Numune Hastanesi Göz Polikliniği, Covid-19 takip merkezi, ESWT Birimi	Hemşire	Aralık 2013-

---

## **SERTİFİKALAR**

1. Onkoloji Eğitim Ve Araştırma Hemşireliği
2. Adli Tıp Hemşireliği
3. Hücre Kültürü Sertifikası
4. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası