

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# **MELATONİN'İN MİKROGLİAL HÜCRELERDE İNFLAMAZOM AKTİVASYONUNA ETKİSİ**

Burak İbrahim ARIÖZ

TEMEL SİNİRBİLİMLER  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2017

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2015970132

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# MELATONİN'İN MİKROGLİAL HÜCRELERDE İNFLAMAZOM AKTİVASYONUNA ETKİSİ

Burak İbrahim ARIÖZ

TEMEL SİNİRBİLİMLER  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Şermin GENÇ

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi tarafından 2015.KB.SAG.048 proje numarasıyla  
desteklenmiştir.

**TEZ KODU:** DEU.HSI.MSc-2015970132

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimler Anabilim Dalı, Temel Sinirbilimler Yüksek Lisans programı öğrencisi Burak İbrahim ARIÖZ ‘**MELATONİN’İN MİKROGLİAL HÜCRELERDE İNFLAMAZOM AKTİVASYONUNA ETKİSİ**’ konulu Yüksek Lisans tezini 06/07/2017 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



BAŞKAN

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



ÜYE

Yard. Doç. Dr. Duygu Sağ  
DEÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD.

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



YEDEK ÜYE

Yard. Doç. Dr. Mehtap Yüksel Eğrilmez  
DEÜ Tıp Fak. Mol. Tıp AD.

YEDEK ÜYE

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

## İÇİNDEKİLER

|                                                                              |     |
|------------------------------------------------------------------------------|-----|
| İÇİNDEKİLER.....                                                             | i   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                         | iv  |
| KISALTMALAR .....                                                            | v   |
| TEŞEKKÜR .....                                                               | vii |
| ÖZET .....                                                                   | 1   |
| ABSTRACT .....                                                               | 2   |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ .....                                                       | 3   |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                                       | 4   |
| 2.1. Mikroglial Hücreler.....                                                | 4   |
| 2.1.1. Mikroglia Tarihçesi ve Kökeni.....                                    | 4   |
| 2.1.2. Mikroglialın Fonksiyonları.....                                       | 5   |
| 2.1.2.1. Göç ve hareketlilik .....                                           | 5   |
| 2.1.2.2. Fagositoz .....                                                     | 6   |
| 2.1.2.3. Antijen Sunumu.....                                                 | 7   |
| 2.2. İnflamazom.....                                                         | 7   |
| 2.3. Melatonin .....                                                         | 9   |
| 2.3.1. Melatonin Sentezi .....                                               | 9   |
| 2.3.2. Melatonin Sinyallemesi .....                                          | 10  |
| 2.3.3. Melatonin ve İnflamazom.....                                          | 11  |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM .....                                                     | 12  |
| 3.1. Araştırmanın Tipi .....                                                 | 12  |
| 3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....                                        | 12  |
| 3.3. Çalışma Materyali .....                                                 | 12  |
| 3.4. Çalışmanın Değişkenleri .....                                           | 12  |
| 3.5. Veri Toplama Araçları .....                                             | 12  |
| 3.5.1. Hücre Kültürü .....                                                   | 12  |
| 3.5.2. In vitro Deneyler.....                                                | 13  |
| 3.5.2.1. Laktat Dehidrogenaz (LDH) ve WST-8 Ttesti İçin in vitro Deney ..... | 13  |

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5.2.2. İnflamazom İlintili Sitokinler (IL-1 $\beta$ ve IL-18) ve NLRP3 için mRNA Düzeyinin Belirlenmesi İçin in vitro Deney ..... | 14 |
| 3.5.2.3. İmmüno blot Yöntemiyle Kaspaz-1, NALP3 ve IL-1 $\beta$ Protein Düzeylerinin Tayini İçin in vitro Deney .....               | 14 |
| 3.5.2.4. ELISA Yöntemiyle IL-1 $\beta$ ve IL-18 Sitokinlerinin Tayini İçin in vitro Deney                                           | 15 |
| 3.5.2.5. Mitokondrial Reaktif Oksijen Türlerini Belirlenmesi için in vitro Deney ..                                                 | 16 |
| 3.5.2.6. Mitokondrial Reaktif Oksijen Türlerini İmünfloresan Boyamayla Belirlenmesi İçin in vitro Deney .....                       | 16 |
| 3.5.2.7. Mitokondriyal Membran Bütünlüğünü Belirlenmesi için in vitro Deney .....                                                   | 17 |
| 3.5.2.8. Piroptotik Ölümün Mikroglia Hücrelerinde Gösterimi İçin in vitro Deney ...                                                 | 17 |
| 3.5.2.9. Kaspaz Aktivite Testi İçin in vitro Deney .....                                                                            | 18 |
| 3.5.3. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Testi .....                                                                                        | 18 |
| 3.5.4. WST-8 Testi .....                                                                                                            | 19 |
| 3.5.5. İnflamazom İlintili Sitokinlerin (IL-1 $\beta$ ve IL-18) ve NLRP3 için mRNA Düzeyinin Belirlenmesi .....                     | 19 |
| 3.5.5.1. RNA İzolasyonu .....                                                                                                       | 19 |
| 3.5.5.2. cDNA Sentezi .....                                                                                                         | 20 |
| 3.5.5.3. qPCR Analizi .....                                                                                                         | 20 |
| 3.5.6. İmmüno blot Yöntemiyle Kaspaz-1, NALP3 ve IL-1 $\beta$ Proteinlerinin Tayini .....                                           | 21 |
| 3.5.7. ELISA Yöntemiyle IL-1 $\beta$ ve IL-18 Sitokinlerinin Tayini .....                                                           | 21 |
| 3.5.8. Mitokondrial Reaktif Oksijen Türlerini Mitosox Boya ile Belirlenmesi .....                                                   | 22 |
| 3.5.9. Mitokondrial Reaktif Oksijen Türlerini İmünfloresan Boyamayla Belirlenmesi                                                   | 22 |
| 3.5.10. Mitokondriyal Membran Bütünlüğünün JC-1 Boyama ile Belirlenmesi .....                                                       | 22 |
| 3.5.11. Piroptotik ölümün mikroglia hücrelerinde gösterimi .....                                                                    | 22 |
| 3.5.12. Kaspaz-1 Aktivite Testi .....                                                                                               | 23 |
| 3.6. Araştırma Planı ve Takvimi: .....                                                                                              | 23 |
| 3.7. Verilerin Değerlendirilmesi: .....                                                                                             | 23 |
| 3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları: .....                                                                                             | 23 |
| 3.9. Etik Kurul Onayı: .....                                                                                                        | 24 |
| 4. SONUÇLAR .....                                                                                                                   | 25 |

|                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1. Melatoninin Toksik Olan ve Olmayan Dozlarının Belirlenmesi .....                                                                   | 25 |
| 4.2. Melatoninin IL-1 $\beta$ ve IL-18 Sitokinlerinin Düzeyine Etkisinin ELISA Yöntemiyle Gösterilmesi.....                             | 25 |
| 4.3. Melatoninin Piroptotik Hücre Ölümüne Etkisi .....                                                                                  | 26 |
| 4.4. Melatoninin, LPS + ATP ile İndüklenmiş hücrelerde IL-1 $\beta$ , IL-18 ve NALP3 genlerinin mRNA Ekspresyon Seviyesine Etkisi ..... | 27 |
| 4.5. İmmüno blot Yöntemiyle İnflamazom ile İlişkili Proteinlerin Değişimlerinin Gösterilmesi.....                                       | 28 |
| 4.6. Kaspaz-1 Aktivite Testi.....                                                                                                       | 29 |
| 4.7. PI Boyama ile Piroptotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi.....                                                                          | 30 |
| 4.8. Mitokondrial Bütünlük ve Süperoksit Üretimi Tayini .....                                                                           | 31 |
| 5. TARTIŞMA.....                                                                                                                        | 33 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....                                                                                                              | 36 |
| 7. KAYNAKLAR.....                                                                                                                       | 37 |
| 8. EKLER .....                                                                                                                          | 43 |
| 8.1. EK-1 Etik Kurul Onayı.....                                                                                                         | 43 |
| 8.2. ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                                                     | 46 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. NLRP3 inflamazom kompleks oluşum mekanizmaları:.....                                                                                      | 8  |
| Şekil 2. MEL'in çeşitli dozlarının hücre ölümü üzerine etkisi:.....                                                                                | 25 |
| Şekil 3. MEL'in IL-1 $\beta$ ve IL-18 düzeyine etkisinin ELISA yöntemiyle ölçülmesi:.....                                                          | 26 |
| Şekil 4. MEL'in piroptotik hücre ölümüne etkisi:.....                                                                                              | 27 |
| Şekil 5. MEL'in inflamazom belirteci genlerin mRNA'ları üzerindeki baskılayıcı etkisi:.....                                                        | 28 |
| Şekil 6. MEL'in inflamazom ilintili IL-1 $\beta$ , Kaspaz-1 ve NLRP3'ün protein seviyesindeki etkisinin Western Blot yöntemiyle gösterilmesi:..... | 29 |
| Şekil 7. MEL'in Kaspaz-1 aktivitesi üzerine etkisinin gösterimi:.....                                                                              | 30 |
| Şekil 8. İnflamazom modelinde Piroptotik ölümün gösterilmesi:.....                                                                                 | 31 |
| Şekil 9. Mitokondrial ROS ve membran bütünlüğünün kontrolü:.....                                                                                   | 32 |

## KISALTMALAR

ARE: Antioksidan Cevap elementi (Antioxidant Responsive Element)

Arg1: Arginaz 1 (Arginase 1)

ATP: Adenozin Trifosfat

A $\beta$ : Amiloid- $\beta$

AH: Alzheimer hastalığı

ALS: Amyotrofik lateral skleroz

cAMP: Siklik Adenozin-Tri-Fosfat

cDNA: Komplementer DNA (Complementary DNA)

Cys: sistein (Cystein)

FBS: Fetal sığır serumu (Fetal bovine serum)

GAPDH: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz

HIV: İnsan immün yetmezliği virüsü (Human immunodeficiency virus)

HO-1: Heme oxygenase-1

HRP: Karaturp peroksidaz (Horseradish Peroxidase)

IFN: İnterferon

IL: İnterlökin

JNK: c-Jun-N-Terminal Kinaz

LDH: Laktat Dehidrogenaz

LPS: Lipopolisakkarit

miRNA: MikroRNA

mRNA: Messenger RNA

MS: Multiple Skleroz

MSS: Merkezi sinir sistemi

NAC: N-asetil sistein (N-acetyl cystein)

NF- $\kappa$ B: Nükleer Faktör Kappa-B

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

PH: Parkinson hastalığı

PI: (Propidium Iodide)

qPCR: Kantitatif PCR



ROS: Reaktif oksijen türleri (Reactive oxygen species)

SSS: Santral Sinir Sistemi

TLR: Toll-like reseptör

TNF- $\alpha$ : Tümör nekroz faktör  $\alpha$

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



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince tez çalışmalarının başından sonuna birebir ilgilenen, entelektüel ve bilimsel bilgi-birikim ve donanımıyla her türlü süreçte yol gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. Şermin GENÇ'e,

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

Çalışmalarım boyunca hem deneysel hem de manevi olarak yardımlarını sunan değerli ekip arkadaşlarım Dr. Kemal Uğur TÜFEKÇİ, Kamer Burak İŞCİ, Bora TAŞTAN'a,

Çok değerli dostlarım Ramazan YILDIZ, Cihat Furkan ŞENDİL, Gökhan GÜNAY'a

Ne yaparsam yapayım desteklerini hiç esirgemeyen, bana güvenen ve yardımcı olan aileme ve eşim İdil ARIÖZ'e,

Projeyi maddi açıdan destekleyen TÜBİTAK'a ve Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Burak İbrahim ARIÖZ

# MELATONİN'İN MİKROGLİAL HÜCRELERDE İNFLAMAZOM AKTİVASYONUNA ETKİSİ

Burak İbrahim ARIÖZ, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilimler  
Ana Bilim Dalı, 35340, İnciraltı, İzmir

## ÖZET

Doğal bağışıklık sistemi vücuda giren patojenik mikropların hızlı bir şekilde tanınıp tayin edilmesinde görevlidir. Gerek membrana bağlı gerekse sitozolik reseptörler bu süreçte görev almaktadır. İnflamazom aktivasyonu klasik inflamatuvar yanıtlardan farklıdır. Mikrobiyal ajanların yanı sıra metabolik stres ürünlerinin (ürik asit, ATP gibi) ve asbestos, silika gibi dışsal ajanların inflamazom aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir. İnflamazom aktivasyonu, inflamatuvar yanıtların başlatılmasında rolü olan bir süreçtir. Aktivasyon hücreden IL-1 $\beta$ , IL-18 sitokinlerinin salınımı ve Kaspaz-1 aktivasyonu ile sonlanır. Buna bağlı olan inflamazom başlangıcı ise inflamatuvar yanıtların harekete geçirmesi suretiyle piroptotik hücre ölümüne yol açar. Bu nedenle inflamazom aktivasyonunun baskılanması gereklidir.

Melatonin (MEL) sitoprotektif ve aynı zamanda anti-inflamatuvar bir moleküldür. Bu projede MEL'in N9 mikroglial hücre hattında inflamazom aktivasyonuna etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Projemizde N9 mikroglia hücrelerine LPS ve ATP verilerek inflamazom aktivasyonu sağlanmıştır. MEL'in inflamazom modelinde etkisi N9 mikroglial hücrelerde incelenmiştir. IL-1 $\beta$ , IL-18 ve Kaspaz-1 seviyeleri ELISA ve Western Blot yöntemleriyle; Hücre canlılığı WST-8 testi ile; Hücre toksisitesi LDH testiyle; Piroptotik ölüm PI boyamayla; Mitokondrial bütünlük ve süperoksit üretimi Mitosox ve JC-1 boyamayla; IL-1 $\beta$ , IL-18 ve NALP3 gen seviyelerindeki değişim rtPCR yöntemiyle bakıldı.

Çalışmamızda, MEL, LPS ve ATP ile IL-1 $\beta$ , IL-18 ve NLRP3 için protein ve gen düzeyindeki artışı istatistiksel anlamlılıkla önlemiştir. LDH ve WST testleriyle MEL'in, LPS ve ATP ile artan inflamazom aktivasyonu ile oluşan hücre ölümü üzerinde istatistiksel olarak anlamlı azaltıcı etkisi saptandı. Bunlara ek olarak uyaran ile artan mitokondrial ROS ve mitokondrial bütünlük bozulması LPS+ ATP grubuna göre MEL verildikten sonra yine istatistiksel anlamlılıkla azaldığı gözlemlendi. Sonuçlarımız MEL'in N9 mikroglial hücrelerde NLRP3 inflamazom aktivasyonunu baskıladığını ortaya koymuştur.

Bu çalışma MEL'in mikroglial hücrelerde inflamazom aktivasyonunu baskılaması üzerine etkili olduğu kanıtlayan ilk çalışmadır.

**Anahtar kelimeler:** Melatonin, mikroglia, inflamazom, piroptoz, LPS, ATP

# THE EFFECTS OF MELATONIN ON INFLAMMASOME ACTIVATION IN MICROGLIAL CELLS

Burak İbrahim ARIÖZ, Dokuz Eylul University, Institute of Health Sciences, Department of Neuroscience, 35340, Inciraltı, İzmir

## ABSTRACT

The natural immune system is responsible for the rapid identification and identification of pathogenic microbes entering the body. Both membrane-bound and cytosolic receptors are involved in this process. Inflammatory activation is different from classical inflammatory responses. In addition to microbial agents, metabolic stress products (such as uric acid, ATP) and exogenous agents such as asbestos and silica are known to cause inflammatory activation. Inflammatory activation is a process that has a role in the initiation of inflammatory responses. Activation results in the release of IL-1 $\beta$ , IL-18 cytokines and activation of Caspase-1 in the cell. Inflammatory activation may also result in inflammation of the inflammatory response, as well as pyrogenic death of the cell. Therefore, suppression of inflammatory activation is necessary.

Melatonin (MEL) is a cytoprotective and anti-inflammatory molecule at the same time. In this project, it is aimed to investigate the effect of MEL on N9 microglial cell line for inflammatory activation. In our protocol, N9 microglia cells were given LPS and ATP to activate inflammation. The effect of MEL in the inflammatory model was examined in N9 microglial cells. IL-1 $\beta$ , IL-18 and Caspase-1 levels by ELISA and Western Blot methods; Cell viability was assessed by WST-8 test; Cell toxicity by LDH assay; Piroptotic cell death with PI staining; Mitochondrial integrity and superoxide production Mitosox and JC-1 staining; Changes in IL-1 $\beta$ , IL-18 and NALP3 gene levels were assessed by rtPCR.

In our study, the increase in protein and gene levels for IL-1 $\beta$ , IL-18 and NLRP3 with MEL, LPS and ATP was statistically significant. LDH and WST tests showed statistically significant reductions in cell death due to increased inflammation of MEL, LPS and ATP. In addition, increased mitochondrial ROS and mitochondrial integrity deterioration with stimuli were observed to decrease with statistical significance after administration of MEL according to LPS + ATP group. Our results demonstrate that MEL suppresses NLRP3 inflammatory activation in N9 microglial cells. This is the first study to demonstrate that MEL is effective on suppressing inflammatory activation in microglial cells.

**Keywords:** Melatonin, microglia, inflammasome, pyroptosis, LPS, ATP

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikroglia, beyin ve omurilik boyunca bulunan bir tip nöroglia hücresidir. Beyinde bulunan tüm hücrelerin %10-15'ini mikroglialar oluşturur. Yerleşik makrofaj hücreleri olarak, merkezi sinir sisteminde (MSS) aktif bağışıklık savunmasının ilk ve ana formunu oluştururlar. Mikroglia genel beyin bakımında anahtar hücrelerdir; plaklar, hasar görmüş veya gereksiz nöronlar ve sinapslar ve enfeksiyöz ajanlar için MSS'yi sürekli olarak dolandır ve süpürürler. Mikroglia'nın belirli nöronal popülasyonlarda progresif hücre kaybı ile karakterize nörodejeneratif bozukluklarda rolü vardır. Glia'nın normal trofik işlevlerinin birçoğu nörodejeneratif bozukluklarda hücreler kronik olarak aktive edildiğinde kaybolabilir veya bunları bastırabilir; çünkü bu gibi bozukluklarda, aktive olan glia'nın doğrudan ve dolaylı enflamatuvar saldırıyla yıkıcı rol oynadığına dair çok sayıda kanıt vardır. Nörodejeneratif bozukluklarda mikroglial hücrelerin rolünün belirgin örnekleri bulunmaktadır: Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar vb.

İnflamazom, Kaspaz 1, PYCARD, NALP ve bazen de kaspaz 5 (aynı zamanda kaspaz 11 veya ICH-3 olarak da bilinir) içeren çoklu proteinli bir oligomerdir. Miyeloid hücrelerde eksprese edilir ve doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir bileşenidir. Bir inflamazomun tam kompozisyonunu enflamasyon düzeneğini başlatan aktivatörler tarafından tetikler, örn dsDNA, asbest, ATP. İnflamazom enflamatuvar sitokinlerinden İnterlökin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ve İnterlökin 18'in (IL-18) olgunlaşmasını teşvik eder.

MEL hayvanlarda çoğunlukla pineal bez tarafından üretilen ve uyku ve uyanıklığı düzenleyen bir hormondur. MEL, oksidatif strese karşı ilk savunma hattı olarak işlev görmektedir, hatta bu işlevle bitkilerde de üretilir. Hayvanlarda MEL, uyku-uyanma zamanlaması, kan basıncının düzenlenmesi, mevsimlik üreme ve diğerleri dahil sirkadyen ritimlerin düzenlenmesi ile ilgilidir.

Bu çalışmada mikroglial hücrelerde MEL'in inflamazom aktivasyonuna etkisinin incelenmesi ve bu etkinin mekanizmasının incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma sonunda elde edilen bulgular MEL'in mikroglial hücrelerde inflamazom aktivasyonuna koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir.

**H1:** LPS + ATP ile uyarılan N9 fare mikroglial hücrelerinde MEL inflamazom aktivasyonunu azaltır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Mikroglial Hücreler

Merkezi sinir sisteminin (MSS) yerleşik bağışıklık hücreleri olan mikroglialar gelişme, erişkinlik ve yaşlanma sırasında CNS homeostazında önemli bir rol oynamaktadır (Prinz ve ark., 2014). Mikroglia, belirli bir gelişimsel nişten türetilir, uzun ömürlüdür, lokal olarak değiştirilir ve çevresel bağışıklık sistemi ile MSS arasında iletişim yolunun önemli bir bölümünü oluşturur; Mikroglia biyolojisinin tüm bu bileşenleri homeostazı korumaya katkıda bulunur (Kreutzberg, 1995). Mikroglia aynı zamanda güçlü bağışıklık düzenleyici ve rejeneratif bir kapasiteye sahiptir, bu nedenle onları terapötik manipülasyon için cazip hedefler haline getirir (Gehrmann, 1996).

#### 2.1.1. Mikroglia Tarihçesi ve Kökeni

Yunanca "tutkal" kelimesinden türetilen "glia" terimi, mikroglia'nın astroglia ve oligodendroglia ile beyin desteğinin ve özellikle de nöronların desteğini paylaştıklarını ortaya koyuyor (Ginhoux ve ark., 2013). Mikroglia, farklı gelişimsel kökene sahip MSS'de ayrı ve uzmanlaşmış bir makrofaj popülasyonu olarak resmen tanınması için 150 yıldan fazla araştırma aldı (Kettenmann ve Verkhratsky, 2008). Cajal 1913 yılında merkezi sinir sistemindeki nöronların ve nörogliaların yanı sıra hücresel bir "üçüncü unsur" un varlığını ilk kez açıkladı (Ginhoux ve ark., 2013). Bunun ardından ve gümüş karbonat lekesi ile del Rio-Hortega, mezodermal orijinli olduğunu ileri sürdüğü merkezi sinir sistemi içerisindeki küçük bir fagositik ve göç eden bir hücre popülasyonunu açık bir şekilde tanımlayan ilk kişidir (del Rio-Hortega, 1932). Bundan birkaç yıl sonra, "mikroglial hücre" terimini tanıttı ve bu hücrelerin tanımını, makro gliayı oluşturan nurektodermal oligodendroglia ve oligodendrositlerden farklı SSS'nin non-nöronal, nonastrositik elemanı olarak rafine etti (Rio-Hortega, 1939). Mikroglial çalışma tarihinde ya mezoderm veya ektodermden kaynaklanan bazı mikroglia tartışmalarına rağmen, birkaç araştırmacı del Rio-Hortega'nın hipotezini izledi ve makrofajlarla morfolojik ve fenotipik benzerliklerinin ışığında mikroglia'nın mezodermal bir kökenini destekleyen kanıtları sundu (Barron, 1995). İlk olarak, ışık/elektron mikroskopisinin ve immünohistokimyanın birleştirilmesi ile gelişmenin çeşitli aşamalarında makrofajların ve mikrogliaların paralel morfolojik özelliklerinin tanımlanmasına olanak sağlamıştır (Murabe ve Sano, 1983). İkincisi,

mikroglial hücrelerin, monosit/makrofaj antijenlerine karşı ortaya çıkan antiserumlar tarafından fark edildiğini göstererek olmuştur (Parpura ve Verkhratsky, 2012).

Mikroglia'nın kökeni hakkında iki tane ana hipotez bulunmaktadır. İlk hipotez, mikroglial prekürsörlerin nöronlar ve geriye kalan glial hücreler gibi nöroektodermal kökenli hücreler olduğuna işaret eder (Ginhoux ve Prinz, 2015). Diğer ise mezodermal hücrelerden ilerlemelerini ve dolayısıyla gelişmekte olan sinir dokusunun dışından kaynaklanmasını önermektedir (Masuda ve Prinz, 2016). İkinci teori doğruysa, mikroglia öncüllerinin sinir parankimine ne zaman ve ne zaman gireceği belirlenmelidir. Kökenleri ne olursa olsun, bu hücreler MSS'nin tamamında göç etmelidir (Cuadros ve Navascues, 1998).

Mikroglia'nın miyeloid kökenine ilişkin bir fikir birliği olmasına rağmen, mikroglial progenitörlerin kesin kökeni ile ilgili çok tartışmalar sürmektedir (Murray ve ark., 1992). İlk çalışmalar, erken gelişim sırasında mikroglial hücrelerin varlığını ortaya koyarak mikroglialın embriyonik progenitörlerden geldiğini düşündürdü. Del Rio-Hortega, mikroglia'nın embriyonik gelişim sırasında beynin içine nüfuz eden meningeal makrofajlardan kaynaklandığını önermiş olsa da del Rio-Hortega'nın da dahil olduğu birçok yazar, beyin parenkimal mikroglialın kan monositlerinden türetilebileceğini iddia etti (Nayak ve ark., 2014). Monositler gerçekten de yenidoğan ve erişkin beyne, ikinci durumda enflamatuar koşullar altında, bunlar mikroglia benzeri hücrelere ayırdıklarında göreve alınırlar (Tay ve ark., 2016). Bu bilgi uzun zamandır, dolaşımdaki kan monositlerinin embriyonik gelişim sırasında beynin tohumlarını değiştiren mikro-glial progenitörleri temsil ettikleri görüşünü destekledi (Ginhoux ve Merad, 2011). Nitekim, yakın zamana kadar en çok kabul gören hipotez, MSS'de mikroglial alımında ve farklılaşmasında embriyonik ve peri-natal hematopoietik dalgaların ortaya çıkmasıydı (Chan ve ark., 2007).

## **2.1.2. Mikroglialın Fonksiyonları**

### **2.1.2.1. Göç ve hareketlilik**

Mikroglial migrasyon, bağışıklık savunması da dahil olmak üzere birçok patofizyolojik süreç için gereklidir. Ramified (Dinlenme) formunda ki mikroglia hücre gövdesinin translokasyonu olmadan aktif olarak süreçlerini hareket ettirirler (Ling ve Wong, 1993). Dinlenme formundaki mikroglia'nın nöronların refahına katkıda bulunması muhtemel görünse de bu "nöronosentrik" görüş mikroglialın nöronal desteğinin önemini hafife alabilir (Leong ve

Ling, 1992). Bununla birlikte, amoeboid mikroglia, fetal beynin normal olarak yeniden şekillendirilmesi sırasında ölen, neokorteksdeki çok sayıdaki hücrenin çıkarılmasıyla, gelişmekte olan beyinde önemli bir temizleyici işlevine sahip olduğu düşünülmektedir. Doğum öncesi fare veya normal insan yetişkin beyinde mikro-gliada hücre yüzeyi proteininin bu sınıfı tespit edilmediği halde yenidoğan mürin mikrogramlarında çöpçü alıcıları tespit edilmiştir (Wu ve ark., 1997). Yaralı nöronların düzelmesinin aktive edilmiş mikroglia'nın trofik fonksiyonuna bağımlı olduğu fasial sinir aksotomi paradigmasında, mikroglialının destekleyici bir rolü olduğuna dair diğer kanıtlar gösterilmiştir (Aloisi, 2001).

Amoeboid formda, mikroglial hücreler süreçleri hareket ettirmekle kalmaz, tüm hücre beynin dokusundan geçebilir; göç gelişmekte olan monositlerin beyinden yayılmasıyla ortaya çıkar (Davis ve ark., 1994). Mikroglial aktivasyon durumu, *in vitro* çalışmalarla yansıtılan ve CD14'ü eksprese eden amfiboid mikroglialının hazırlanması ve kültürlenmesi sırasında nispeten ufak değişiklikler görülen (viral mikrogramda bulunmayan bir markör) bir sürekliliği temsil eder. Aktivasyon spektrumunun en uç noktasında belirgin değişiklikler, lipopolisakkarit (LPS) gibi mikrobiyal ürünlerle uyarıldıktan sonra görülür (Watkins ve ark., 2001). Aktive edilmiş mikroglia, MSS enfeksiyonlarının ve enflamatuar hastalıklarının savunması ve immünopatojenizde önemli bir hücre olduğu için mikroglial aktivasyona katılan düzenleyici faktörlerin sayısız *in vitro* çalışması rapor edilmiştir. Başka bir göç türü, dinlenme mikroglialının aktivasyona uğramasına neden olan patolojik bir hakaret tarafından tetiklenerek amoeboid forma dönüşürler ve yaralanma bölgesine göç ederler (Christensen ve ark., 2006).

#### **2.1.2.2. Fagositoz**

Mikroglial hücreler CNS dokusunun doğuştan gelen fagositleridir ve bu süreç beyin gelişimi ve patoloji ve yenilenme sırasında önemlidir (Lawson ve ark., 1992). MSG gelişmesinde mikroglial fagositoz apoptotik hücrelerin çıkarılmasında önemli bir araçtır ve gelişme sırasındaki sinaps çıkarılmasına ve postnatal beyindeki budama sinapslarında potansiyel olarak rol oynar (Kreutzberg, 1995). Bu süreç birçok nörolojik hastalıkla yakından ilgilidir. Lezyona cevap olarak, mikroglial hücreler hasar gören bölgede birikirler ve hücrenin enkazını veya hasar görmüş hücrelerin parçalarını bile çıkarırlar. Alzheimer hastalığında, örneğin fagositoz yoluyla, mikroglial hücreler,  $\beta$ -amiloid gibi farklı patolojik faktörler biriktirebilir (Knezevic ve Mizrahi, 2017). Çoklu faktörler, reseptörler ve sinyalleme kaskadları, mikroglial fagositik aktiviteyi düzenleyebilir.



### 2.1.2.3. Antijen Sunumu

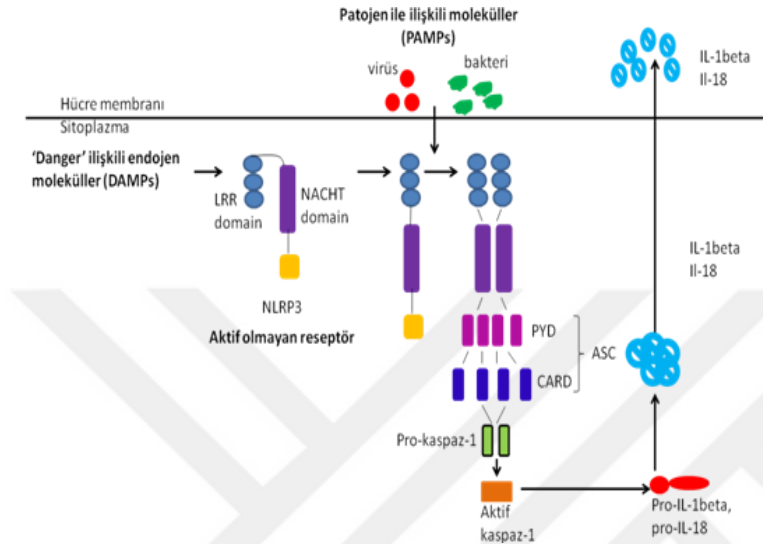
Mikroglial hücreler, sinir sistemindeki hücreleri sunan egemen antijendir. Yaralanma üzerine, bu süreçte yer alan moleküller yüksek oranda düzenlenir ve bu kompleksin ifadesi T lenfositleri ile etkileşim için gereklidir. Bu süreç çoklu sklerozda iyi çalışılmıştır. Mikroglial hücreler miyelin fagositozoz alır, bozunur ve miyelin proteinlerinin peptidlerini antijen olarak sunar. Bazı sitokinleri salarak, mikroglial hücreler MSS'de lökositlerin alınması için önemlidir. Bunlar T lenfositleri ile etkileşime girerler ve bu nedenle beyindeki bağışıklık tepkisine aracılık eder (Aloisi, 2001).

## 2.2. İnflamazom

İnflamazom, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir bileşenidir. Vücuda yabancı olan hücre veya moleküller bağışıklık sistemi hücreleri tarafından membrana bağlı ya da sitoplazmik reseptörler olan “patern tanıyan reseptörler (PRRs)” tarafından tanınırlar (Poon ve ark., 2010). Bu reseptörlerden birisi NOD-benzeri reseptörlerdir (NLR) (Krysko ve ark., 2011). NLR’ler N ucundaki bölgenin çeşitlerine göre (NLRA, NLRB, NLRC, NLRP ve NLRX olmak üzere beş ana grupta toplanır ve her bir grupta yer alan alt tipler farklı sinyalleri tanımak üzere özelleşmiştir (Kersse ve ark., 2011). NLRP3 inflamazomu, aynı zamanda kriyopirin olarak da bilinir, tüm inflamazom tipleri arasında en iyi karakterize edilenlerden biridir (Leemans ve ark., 2011). NLRP3 inflamazomu, NOD benzeri reseptör (NLR) NLRP3, ASC adaptör proteini ve pro-caspase-1 içeren çoklu protein kompleksidir. NLRP3 inflamazomu patojenler gibi etki eden patojenle ilişkili moleküler kalıplar (PAMP) ve iç ROS ürünleri, ürik asit kristalleri, silis, asbest ve şap gibi tehlike ile ilişkili moleküler kalıplar (DAMP) tarafından aktive edilebilir (Petrilli ve ark., 2007). NLRP3 inflamazomu RNA-DNA hibritleri ve birkaç viral, bakteri, mantar ve protozoan patojeni gibi patojenle ilişkili moleküler kalıplar (PAMP) ve iç ROS ürünleri gibi tehlike ile ilişkili moleküler kalıplar (DAMP) tarafından aktive edilebilir (Kumar ve ark., 2011). Sonuç olarak, bu sitokinler hücreleri piroptotik hücre ölümüne; hücrelerin şişmesine ve patlamasına götürür. NLRP3 aktivasyonu önemli bir bağışıklık yanıtı ve konuk savunma sistemi olmasına rağmen aşırı aktivasyonu iskemik inme, serebral hemoraji, Parkinson hastalığı (PD) ve Alzheimer hastalığı gibi enflamatuvar merkezi sinir sistemi rahatsızlıklarına neden olabilir (Halle ve ark., 2008). Bu sebepten ötürü, NLRP3 inflamazomunun bastırılması bu otoimmün ve otoenflamatuvar hastalıklar için umut verici bir tedavi adayıdır.

İnflamatuvar ligandın tanınması, sensör aktivasyonu, oligomerizasyonu ve ASC olarak bilinen, bir pirin alanı (PYD) ve bir kaspaz alım alanı (CARD) içeren bir adaptör proteininin

alınmasıyla sonuçlanır. Bu alanlar, ASC'nın üst akış inflamazm sensör molekülünü kaspaz-1 ile köprü kurmasına izin verir. Bu işlem, interlökin 1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) ve IL-18 salınımı da dahil olmak üzere aşağı akış yanıtlarını başlatan katalitik olarak aktif proteaz kaspaz-1'in oluşumuyla sonuçlanır. Bu süreç, litik bir hücre ölüm şekli olan piroptozu indükler (Guo ve ark., 2015).



**Şekil 1. NLRP3 inflamazom kompleks oluşum mekanizmaları:** Sağlıklı hücresel koşullarda NLRP3'nin NACHT ve LRR domainlerinin internal etkileşimi reseptörlerin baskılanmasına neden olur ve inflamazom aktivasyonu gözlenmez. Bu baskılanma PAMP ya da DAMP'ların varlığıyla bozulur ve NACHT domaininin açıkta kalmasıyla ve LRR domaininin konformasyonel değişikliğe uğramasıyla sonuçlanır. NLRP3 oligomerize olur ve PYD-CARD domaininde bulunan CARD domaini pro-kaspaz-1 enzimini ortama çağırır. Kaspaz-1 enzimi aktive edilir ve pro-interleukin-1 $\beta$  (pro-IL-1 $\beta$ ) ve pro-interleukin-18 (pro-IL-18) sitokinleri kesilerek olgun formlarına getirilir. (NACHT (nöral apoptoz inhibitor protein (NAIP) kısaltması); CARD, kaspaz recruitment domain; LRRs, lizin zengin tekrarlar; PYD, pyrin domain.)

NLRP3 genindeki mutasyonlar, ağırlıklı olarak kriyopirin ile ilişkili periyodik sendrom (CAPS) adı verilen otoenflamatuar hastalıklardan oluşan bir spektrum ile ilişkilendirilmiştir. Ailesel soğuk otoenflamatuar sendrom (FCAS), Muckle-Wells sendromu (MWS), kronik infantil nörolojik kutanöz ve eklem (CINCA) sendromu ve neonatal başlangıçlı çok sistemli inflammatuar hastalık (NOMID) dahildir. Bu gendeki kusurlar aynı zamanda ailesel Akdeniz humması ile bağlantılıdır. Buna ek olarak, NALP3 inflamazomu, gut'un patogenezinde ve Alzheimer, Parkinson ve prion hastalıkları gibi protein misfolding hastalıklarda ortaya çıkan nöroinflamasyonda rol oynamaktadır (de Torre-Minguela ve ark., 2017).

### 2.3. Melatonin

MEL (N-asetil-5-metoksitriptamin) ilk olarak on dokuzuncu yüzyılda pineal bezin hormonu olarak keşfedilmiştir (Lerner ve diğerleri, 1958, 1959). Triptofan'dan belirli enzimatik reaksiyonlar sonucunda çoğunlukla pineal bezde üretilir. MEL'in salınımı ışığa duyarlı olan pinealosit hücreleri tarafından karanlıkta gerçekleşmektedir (Hardeland ve ark., 2015). MEL'in ana görevi vücudun sirkadyen ritminin ayarlanmasıdır. Bu görev tanımının içine uyku-uyanıklık zamanlaması, kan basıncı düzenlemesi, mevsimsel zamanlama, üremenin mevsimsel zamanlaması girmektedir. Kronobiyolojik fonksiyonları ön planda olsa da MEL'in anti-oksidan, anti-kanser, anti-aging ve immun modülatör etkileri söz konusudur (Macchi ve Bruce, 2004).

MEL'in santral sinir sisteminde anti-inflamatuar etkileri olduğunu gösteren çalışmalar bildirilmiştir. Sıçanlarda intravenöz MEL uygulanması fokal iskemine iskemi bölgesinde inflammatuar yanıtları baskılamaktadır. Aynı çalışmada MEL'in anti-inflamatuar etkisine klinik iyileşme ve infarkt hacminde azalmanın eşlik ettiği bildirilmiştir (Lee ve ark., 2007). Travmatik beyin hasarında da MEL hasarı azaltmakta, bu etkisi inflammatuar yanıtları mTOR yoluyla üzerinden baskılamasıyla gerçekleştirmektedir (Ding ve ark., 2014). Hücre kültürü çalışmalarında metamfetamin ile artan proinflammatuar sitokin salınımının MEL ile baskılandığı gösterilmiştir. Ayrıca MEL bu hücrelerde metamfetamine bağlı hücre ölümünü de önlemiştir (Tocharus ve ark., 2010).

#### 2.3.1. Melatonin Sentezi

Hayvanlarda MEL'in biyosentezi, hidroksilasyon, dekarboksilasyon, asetilasyon ve L-triptofandan başlayarak metilasyon yoluyla gerçekleşir. L-triptofan, shikimate yolağında koridattan üretilir veya protein katabolizmasından elde edilir. İlk olarak L-triptofan, 5-hidroksitriptofanın üretilmesi için indol halkasında triptofan hidroksilaz ile hidroksillenir. Bu ara madde (5-HTP), seridonin üretmek üzere piridoksal fosfat ve 5-hidroksitriptofan dekarboksilaz tarafından dekarboksilatlanır. Serotonin kendisi de önemli bir nörotransmitterdir, ancak serotonin N-asetiltransferaz ve asetil-CoA ile de N-asetilserotonin'e dönüştürülür. Hidroksiindol O-metil transferaz ve S-adenosil metiyonin, hidroksil grubunun metilasyonu yoluyla N-asetilserotonini MEL'e dönüştürür. (Ebihara ve ark., 1986; Roberts ve Fitzpatrick, 2013)

### 2.3.2. Melatonin Sinyallemesi

MEL, reseptörler vasıtasıyla veya reseptörlerden bağımsız olarak sinyal iletim kaskadlarını aktive edebilir veya inhibe edebilir. Hormon, membran reseptörlerine veya nükleer reseptörlere (RZR/ROR) ve ayrıca Calmodulin'e yüksek afinite ile bağlanır (Zawilska ve ark., 2009). MEL'in bağlayabileceği ve aktive edebileceği çoklu reseptör alt türleri mevcuttur. Membran MEL reseptör alt tiplerinden ikisi, GPCR'ler (G-Protein Bağlı Reseptörler) iken son zamanlarda afinite ile saflaştırılan üçüncü, kinon redüktaz ailesine aittir (Hardeland, 2009). MTNR1A (MEL Reseptör-1A) ve MTNR1B (MEL Reseptör-1B) olarak adlandırılan G proteine bağlı MEL reseptör alt tiplerinin her biri, çoklu sinyal iletim kaskadlarına bağlanabilirken üçüncü reseptörün yanıtlarına aracılık eden sinyal iletim kaskadları henüz aydınlatılmamıştır (Dawson ve van den Heuvel, 1998). Membran MEL reseptörleri esas olarak merkezi sinir sisteminde eksprese edilirken, RZR (Retinoid Z Reseptörleri) / ROR (Retinoid Orphan Reseptörleri) periferik ve beyinde belirgin olarak ifade edilir. Bu, nükleer ve membran reseptörleri vasıtasıyla sinyal vermenin MEL için üç vakanın ayırt edilmesini sağlar: Zar MEL reseptörlerini ve RZR'yi paralel olarak, sadece membran MEL reseptörlerini veya sadece RZR'yi ifade eden hücreler (Pandi-Perumal ve ark., 2008). RZR'nin oldukça yaygın olarak ifade edildiği için, ilk durum, merkezi sinir sisteminin çeşitli yapıları (SCN, retina, pars tuberalis ve pineal bez) için geçerli olabilir. Membran MEL reseptörlerinin ve spesifik agonistlerinin faaliyeti, sirkadiyen ritmiklik ile ilişkilendirilmiştir MEL'in çevredeki direkt etkileri, örneğin bağışıklık modülasyonu, hücresel büyüme ve kalsiyum ritmi dahil olmak üzere kemik farklılaşması RZR aracılık ettiği görülmektedir (Dawson ve van den Heuvel, 1998).

Membrana bağlı reseptörlerine bağlandıktan sonra, MEL spesifik hücre içi G proteinlerinin Alfa-altbiriminin konformasyonunu değiştirir. CAMP (Siklik Adenozin Monofosfat), Ca<sup>2+</sup>, cGMP (Siklik Guanozin Monofosfat), DAG (Diasilgliserol), PKC (Protein Kinaz-C) ve Araşidonik asit gibi hücre içi ikinci haberciler yoluyla hücre fonksiyonunu düzenler; bununla birlikte, MEL tarafından aktive edilen sinyal yolları farklı şekilde düzenlenmiş ve dokuya spesifik görünmektedir (Guillaume ve ark., 2008). MEL, MTNR1A'nın aktivasyonu yoluyla ve ardından G-AlfaI, CREB (cAMP-Responsive Element Bağlayıcı Protein) fosforilasyonunda azalma ile sonuçlanan cAMP oluşumunu, PKA (Protein Kinaz-A) aktivitesini inhibe eder (Dubocovich ve Markowska, 2005). MTNR1A, cAMP'ye bağlı kaskadın yanı sıra PLC'ye bağlı sinyal iletim kaskadlarının uyarılmasına, fosfoinositid ciro için doğrudan veya dolaylı olarak G-BetaGamma alt üniteleri vasıtasıyla eşlenebilir ve ayrıca PKC'yi de etkinleştirebilir (Levoye ve ark., 2006). Öte yandan, MTNR1A'nın aktivasyonu,

MAPK (Mitojen Aktive Protein Kinaz) veya MEK1 (MAPK / ERK Kinaz-1) ve MEK2 (MAPK / ERK Kinaz-2) ve ERK1 / 2'nin (Ekstraselüler Sinyal-Kontrollü Kinazlar 1 ve 2). Bu reseptörler ayrıca araşidonik asit ve JNK'lerin oluşumunu modüle edebilirler (c-Jun N-terminal Kinaz). C-Fosand c-Jun'ın erken erken gen ürünlerinden oluşan bir aktarım protein-1, MAPK yolu, özellikle ERK1, ERK2 ve JNK'ler yoluyla yoğun şekilde düzenlendiği gösterilmiştir (Rivara ve ark., 2005). Buna ek olarak, MEL'e karşı çeşitli işlevsel tepkiler, iyon kanallarının düzenlenmesiyle sağlanır (Chan ve ark., 2002). MTNR1A'sın aktivasyonu düz kasta kalsiyum ile aktive olan potasyum kanallarını bloke ederek vazokonstriksiyonunu güçlendirir. Bu blokaj, cAMP'deki azalmalardan ve PKA ile kalsiyum ile aktifleştirilmiş potasyum kanal kanallarının fosforilasyonundan kaynaklanabilir. MEL aynı zamanda kalsiyum ile aktive olan potasyum kanallarının inhibisyonu yoluyla serebral arterleri doğrudan vazokonstriksiyona uğratar. MTNR1A ayrıca GIRK'ya (G-protein ile aktive Edilmiş Dahili Doğrultucu Potasyum) / Kir 3 kanallarına bağlanır (Godson ve Reppert, 1997).

### 2.3.3. Melatonin ve İnflamazom

MEL'in hem antioksidatif hem de anti-inflamatuar etkilere sahip olduğuna dair yeterli kanıt bulunmaktadır (Macchi ve Bruce, 2004). MEL'in mikrogliya aktivasyonunu inhibe ettiği ve birçok deneysel modelde pro-inflamatuar sitokin seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Ding ve ark., 2014). Daha spesifik olarak, MEL'in inflamazom tipleri üzerine sınırlı miktarda çalışmalar mevcuttur. *In vitro* çalışma olarak makrofaj hücrelerinde MEL'in NLRP3 inflamazom aktivasyonu üzerine baskılayıcı etkisi rapor edilmiştir (Shim ve ark., 2015). Fareler üzerinde yapılan birkaç *in vivo* çalışmada da bu etki gösterilmiştir. Cao S. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada MEL aracılı mitofaji, NLRP3 inflamazom aktivasyonunun inhibisyonu ile subaraknoid kanamadan sonra erken beyin hasarına karşı koruduğu gösterilmiştir (Cao ve ark., 2017). Dong ve arkadaşları ise MEL'in NLRP3 inflamazomunu azaltarak subaraknoid kanamayla indüklenen erken beyin hasarını ve apoptoz sinyalini zayıflattığını göstermiştir (Dong ve ark., 2016). Rahim ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise vahşi tip farelere ve tedavi edilmemiş NLRP3 mutant farelerine uygulanan MEL'in, sepsis esnasında iltihap tepkisi üzerine benzer inhibisyonunu paylaştığını göstermiştir (Rahim ve ark., 2017). MEL'in piroptotik hücre ölümünü baskıladığı *in vitro* deneyler henüz gösterilmemiştir. *In vivo* olarak farelerde yağ dokusunda NF-κB / GSDMD sinyalini inhibe ederek NLRP3 inflamazomuna bağlı piroptozu hafiflettiği gösterilmiştir (Liu ve ark., 2017).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Araştırmanın Tipi

Çalışma deneysel (*in vitro*) bir çalışmadır.

#### 3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

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

#### 3.3. Çalışma Materyali

Araştırmada N9 fare mikrogial hücre hattı kullanılmıştır.

#### 3.4. Çalışmanın Değişkenleri

Bağımsız değişken: LPS + ATP ve MEL uygulaması

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

#### 3.5. Veri Toplama Araçları

##### 3.5.1. Hücre Kültürü

Fare N9 mikrogia hücreleri Dr. Paola Ricciardi-Castagnoli (Cellular Pharmacology Center, Milan, Italy) tarafından sağlandı. Hücreler inkübatörde 37°C ve 5% CO<sub>2</sub> seviyesinde 75 cm<sup>2</sup> lik flasklarda 10% Fötal Sığır Serum (FBS), 2 mM L-Glutamine, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren RPMI 1640 ortamında çoğaltıldı ve idame ettirildi. MEL, LPS ve ATP ile yapılan muamelelerde ise serumsuz, 2 mM L-Glutamine, 100 U/ml penisilin and 100 µg/ml streptomisin içeren RPMI 1640 ortamı kullanıldı. Komplet ortam hazırlanması: Tamamen steril veya önceden sterilize edilmiş bir şişe alındı. Gerekli miktarda RPMI 1640 ortamı konup ortama L-Glutamin eklendi. FBS 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek karışıma eklendi. Ortama 100 µg/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin eklenid. 5 defa pipetaj yapılarak homojenite sağlandı. Şişenin ağzı parafilmle sarılıp +40°C 'de saklandı.

İnkübatörden alınan hücreler ilk olarak mikropskopta kontrol edildi. Hücrelerin sağlıklı olduğuna kanaat getirildikten sonra flask dik konuma getirilerek, hücre tabakasının olduğu

yüzeye pipet değdirilmeden yavaşça ortam çekilerek atık kabına boşaltıldı. Flaska 5 ml PBS eklenerek yıkama yapıldıktan sonra fazla beklemeden uzaklaştırıldı. Sonrasında 5ml Tripsin-EDTA flaska eklendi ve 1-2 dakika inkübatörde tutuldu. İnkübatörden alınan flaskın tabanına hücre tabakası kalsın diye birkaç kez hızlıca vuruldu. Bütün hücrelerin kalktığını gözlemledikten sonra flasklar kabine getirildi ve yüzeye tekrar yapışmaması için dik olarak kondu. Komplet mediumdan 5 ml eklendi. Hücreler 15 ml falcon tüpüne aktarıldı. 1500 rpm, 5 dakika santrifüj edilerek, süpernatant atıldı. Hücrelere zarar vermemek için süpernatantın hepsi çekilmeyip 1ml kadarı bırakıldı. Peleti çözmek için tüpün dibine biraz vuruldu ve 1 ml ortam eklenerek toplam hacim 2 ml'ye tamamlandı. 1 ml'lik pipetle 10 kez pipetasyon yapıldı. Hücre sayımı için 100 µl hücre süspansiyonundan alınarak 1.5 ml ependorfa aktarıldı. Hücre sayımı için kullanıldı. Hücre sayımı yapılarak önerilen yoğunlukta ekim yapıldı. Hücre sayımı yapılmayacaksa 1/6 oranında pasajlanır. 2 ml daha ortam eklenerek pipetaj yapılır. Flaskın üzerine Hücre Hattı / Pasaj Numarası / Pasaj Oranı / Pasaj Tarihi yazıldı. Kültür + ortam, 75 cm<sup>2</sup>'lik flaska konarak (Toplam ortam miktarı 10ml'ye tamamlandı). Mikroskopta hücreler incelendi. Hücre yoğunluğu hala çok fazla ise yakın zamanda değilse tekrar pasajlama yapılır. Haftada en az 3 kez hücreler beslendi. Hücreler arttıkça flask sayısı arttırıldı. Flasklar inkübatöre kaldırıldı.

### **3.5.2. *In vitro* Deneyler**

#### **3.5.2.1. Laktat Dehidrogenaz (LDH) ve WST-8 Ttesti İçin *in vitro* Deney**

Deneyin 1. günü flaskta konfluent haldeki hücreler daha önce belirtildiği gibi pasajlama yapar gibi kaldırıldı. Thoma lamında hücre sayımı yapıldı ve kuyucuk başına 10<sup>5</sup> hücre ve toplam hacmi 200 µl olacak şekilde 96kuyucuklu plaklara ekildi. Gerekli koşul kadar, her bir koşul için 5 kuyucuğa ekim yapıldı. Ayrıca üç kuyucukta sadece ortam koyularak inkübatöre kaldırıldı. Bu kuyucuklar sonrasında boş kontrol olarak kullanıldı.

Deneyin 2. günü ilk olarak gerekli maddeler hazırlandı ve ortam ısıtıldı. Bu kısımdan itibaren FBS içermeyen, L-Glutamin, Penisilin ve Streptomisin içeren RPMI 1640 deney ortamı kullanıldı. Plak'ın her bir koşulunun (5'li sıralar) ortamı vakum yardımıyla çekildi. Kontrol ve maksimal grupları için sadece deney ortamı eklendi. MEL + LPS + ATP grubuna 500 µM MEL kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde eklenerek 1 saat süre ile inkübe edildi. Sonrasında LPS + ATP grubuna 1 µg/ml konsantrasyonunda LPS içeren 150 µl deney ortamı eklendi. MEL +

LPS + ATP grubuna ise 500  $\mu$ M MEL ve 1  $\mu$ g/ml LPS içeren 50  $\mu$ l deney ortamı eklendi ve 4 saat süreyle inkübe edildi. Bu sürenin sonunda MEL + LPS + ATP grubuna 500  $\mu$ M MEL, 1  $\mu$ g/ml LPS ve 5 mM ATP içeren 50  $\mu$ l deney ortamı eklendi. LPS + ATP grubuna ise 1  $\mu$ g/ml LPS ve 5 mM ATP içeren 50  $\mu$ l deney ortamı eklenerek 1 saat inkübe edildi. Son basamakta ATP eklendikten sonra bütün kuyucuklarda volüm toplam 200  $\mu$ l olmalıdır.

Daha sonra hücreler hücre ölümünün değerlendirilmesi için LDH yöntemi ile; hücre canlılığının değerlendirilmesi için WST-8 testi ile değerlendirildi.

#### **3.5.2.2. İnflamazom İlihtili Sitokinler (IL-1 $\beta$ ve IL-18) ve NLRP3 için mRNA Düzeyinin Belirlenmesi İçin *in vitro* Deney**

Deneyin 1. günü gerekli ortamlar hazırlandı ve ısıtıldı. Konflue olmuş 75 cm<sup>2</sup> lik flastaki hücreler daha önceden belirtildiği gibi pasaj yapılır gibi Tripsin-EDTA ile kaldırıldı. Sonra hücreler Tripan mavisi ile sayıldı. 6 kuyucuklu plaklara 3x 10<sup>5</sup> hücre %10 FBS, 2 mM L-Glutamine, 100 U/ml penisilin ve 100  $\mu$ g/ml streptomisin içeren RPMI 1640 ortamında ekildi.

Deneyin 2. günü gerekli maddeler hazırlandı ve ortam ısıtıldı. Bu aşamadan sonra serum içermeyen, L-Glutamin, Penisilin ve Streptomisin içeren RPMI 1640 deney ortamı kullanıldı. 6 kuyucuklu plaklardaki ortam vakum ile çekildi. Kontrol grubu için sadece deney ortamı eklendi. Hücreler öncelikle 1 saat 500  $\mu$ M MEL, 4 saat 1  $\mu$ g/ml LPS ve 1 saat 5 mM ATP ile muamele edildi. Muameleler bitince kuyucukların içlerinde ortam var iken hücre kazıyıcısı ile hücreler kaldırıldı. Hücrelerin kalkıp kalkmadığı mikroskopta kontrol edildi. 15 ml'lik falkon tüpüne hücreler ortam ile aktarıldı ve 1500 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atılarak RNA izolasyon kitinde bulunan RA1 solüsyonundan (liziz solüsyonu) 350  $\mu$ l eklendi. Lizat -80 °C' ye kaldırılır ve RNA izolasyonuna kadar burada saklandı.

#### **3.5.2.3. İmmünoblot Yöntemiyle Kaspaz-1, NALP3 ve IL-1 $\beta$ Protein Düzeylerinin Tayini İçin *in vitro* Deney**

Deneyin 1. günü flastka konfluent haldeki hücreler daha önce belirtildiği gibi pasajlama yapar gibi kaldırıldı. Thoma lamında hücre sayımı yapıldı ve 75cm<sup>2</sup>lik flastklara, flastk başına 3x10<sup>6</sup> hücre ve toplam hacmi 200  $\mu$ l olacak şekilde ekildi. Gerekli koşul kadar, her bir koşul için 5 flastka ekim yapıldı.



Deneyin 2. günü ilk olarak gerekli maddeler hazırlandı ve ortam ısıtıldı. Bu kısımdan itibaren FBS içermeyen, L-Glutamin, Penisilin ve Streptomisin içeren RPMI 1640 deney ortamı kullanıldı. Flaskların her bir koşulunun (5'li sıralar) ortamı vakum yardımıyla çekildi. Kontrol grubu için sadece deney ortamı eklendi. MEL + LPS + ATP grubuna 500 µM MEL flask başına 5 ml olacak şekilde eklenerek 1 saat süre ile inkübe edildi. Sonrasında LPS + ATP grubuna 1 µg/ml konsantrasyonunda LPS içeren 7.5 ml deney ortamı eklendi. MEL + LPS + ATP grubuna ise 500 µM MEL ve 1 µg/ml LPS içeren 2.5 ml deney ortamı eklendi ve 4 saat süreyle inkübe edildi. Bu sürenin sonunda MEL + LPS + ATP grubuna 500 µM MEL, 1 µg/ml LPS ve 5 mM ATP içeren 2.5 ml deney ortamı eklendi. LPS + ATP grubuna ise 1 µg/ml LPS ve 5 mM ATP içeren 2.5 ml deney ortamı eklenerek 1 saat inkübe edildi. Son basamakta ATP eklendikten sonra bütün flasklarda volüm toplam 10 ml olmalıdır.

Bittikten sonra hücreler kaldırılarak proteinaz inhibitörü içeren 1 ml RIPA solüsyonunda çözülerek protein izolasyonu için -80°C'de saklandı.

#### **3.5.2.4. ELISA Yöntemiyle IL-1β ve IL-18 Sitokinlerinin Tayini İçin *in vitro* Deney**

Deneyin 1. günü flaskta konfluent haldeki hücreler daha önce belirtildiği gibi pasajlama yapar gibi kaldırıldı. Thoma lamında hücre sayımı yapıldı ve kuyucuk başına 10<sup>5</sup> hücre ve toplam hacmi 200 µl olacak şekilde 96kuyucuklu plaklara ekildi. Gerekli koşul kadar, her bir koşul için 5 kuyucuğa ekim yapıldı.

Deneyin 2. günü ilk olarak gerekli maddeler hazırlandı ve ortam ısıtıldı. Bu kısımdan itibaren FBS içermeyen, L-Glutamin, Penisilin ve Streptomisin içeren RPMI 1640 deney ortamı kullanıldı. Plak'ın her bir koşulunun (5'li sıralar) ortamı vakum yardımıyla çekildi. Kontrol ve maksimal grupları için sadece deney ortamı eklendi. MEL + LPS + ATP grubuna 500 µM MEL kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde eklenerek 1 saat süre ile inkübe edildi. Sonrasında LPS + ATP grubuna 1 µg/ml konsantrasyonunda LPS içeren 150 µl deney ortamı eklendi. MEL + LPS + ATP grubuna ise 500 µM MEL ve 1 µg/ml LPS içeren 50 µl deney ortamı eklendi ve 4 saat süreyle inkübe edildi. Bu sürenin sonunda MEL + LPS + ATP grubuna 500 µM MEL, 1 µg/ml LPS ve 5 mM ATP içeren 50 µl deney ortamı eklendi. LPS + ATP grubuna ise 1 µg/ml LPS ve 5 mM ATP içeren 50 µl deney ortamı eklenerek 1 saat inkübe edildi. Son basamakta ATP eklendikten sonra bütün kuyucuklarda volüm toplam 200 µl olmalıdır.

Daha sonra hücreler protein miktarlarının ölçümü için sandviç ELISA kitleri kullanıldı.

### **3.5.2.5. Mitokondrial Reaktif Oksijen Türlerini Belirlenmesi için *in vitro* Deney**

Deneyin 1. günü flaskta konfluent haldeki hücreler daha önce belirtildiği gibi pasajlama yapar gibi kaldırıldı. Thoma lamında hücre sayımı yapıldı ve 96 kuyucuklu hücre kültürü plağına, flask başına  $10^5$  hücre ve toplam hacmi 200 µl olacak şekilde ekildi. Gerekli koşul kadar, her bir koşul için 5 kuyucuğa ekim yapıldı.

Deneyin 2. günü ilk olarak gerekli maddeler hazırlandı ve ortam ısıtıldı. Bu kısımdan itibaren FBS içermeyen, L-Glutamin, Penisilin ve Streptomisin içeren RPMI 1640 deney ortamı kullanıldı. Plak'ın her bir koşulunun (5'li sıralar) ortamı vakum yardımıyla çekildi. Kontrol ve maksimal grupları için sadece deney ortamı eklendi. MEL + LPS + ATP grubuna 500 µM MEL kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde eklenerek 1 saat süre ile inkübe edildi. Sonrasında LPS + ATP grubuna 1 µg/ml konsantrasyonunda LPS içeren 150 µl deney ortamı eklendi. MEL + LPS + ATP grubuna ise 500 µM MEL ve 1 µg/ml LPS içeren 50 µl deney ortamı eklendi ve 4 saat süreyle inkübe edildi. Bu sürenin sonunda MEL + LPS + ATP grubuna 500 µM MEL, 1 µg/ml LPS ve 5 mM ATP içeren 50 µl deney ortamı eklendi. LPS + ATP grubuna ise 1 µg/ml LPS ve 5 mM ATP içeren 50 µl deney ortamı eklenerek 1 saat inkübe edildi. Son basamakta ATP eklendikten sonra bütün kuyucuklarda volüm toplam 200 µl olmalıdır.

Daha sonra hücreler mitokondri tarafından üretilen ROS'u belirlemek için Mitosox kiti ile değerlendirildi.

### **3.5.2.6. Mitokondrial Reaktif Oksijen Türlerini İmünfloresan Boyamayla Belirlenmesi İçin *in vitro* Deney**

Deneyin 1. günü ilk olarak gerekli maddeler hazırlandı ve ortam ısıtıldı. Hücreler 48 kuyucuklu plaklara kuyucuk başına  $3 \times 10^5$  miktarda ekildi. Kuyucuk başına koyulan ortam totalde 400 µl olmalıdır.

Deneyin 2. günü ilk olarak gerekli maddeler hazırlandı ve ortam ısıtıldı. Bu kısımdan itibaren FBS içermeyen, L-Glutamin, Penisilin ve Streptomisin içeren RPMI 1640 deney ortamı kullanıldı. Plak'ın her bir koşulunun (5'li sıralar) ortamı vakum yardımıyla çekildi. Kontrol ve grubu için sadece 400 µl deney ortamı eklendi. MEL + LPS + ATP grubuna 500 µM MEL kuyucuk başına 200 µl olacak şekilde eklenerek 1 saat süre ile inkübe edildi. Sonrasında LPS + ATP grubuna 1 µg/ml konsantrasyonunda LPS içeren 300 µl deney ortamı eklendi. MEL +

LPS + ATP grubuna ise 500  $\mu$ M MEL ve 1  $\mu$ g/ml LPS içeren 100  $\mu$ l deney ortamı eklendi ve 4 saat süreyle inkübe edildi. Bu sürenin sonunda MEL + LPS + ATP grubuna 500  $\mu$ M MEL, 1  $\mu$ g/ml LPS ve 5 mM ATP içeren 100  $\mu$ l deney ortamı eklendi. LPS + ATP grubuna ise 1  $\mu$ g/ml LPS ve 5 mM ATP içeren 100  $\mu$ l deney ortamı eklenerek 1 saat inkübe edildi. Son basamakta ATP eklendikten sonra bütün kuyucuklarda volüm toplam 400  $\mu$ l olmalıdır.

Sonrasında hücreler mitokondri tarafından üretilen ROS'u belirlemek için Mitosox ile boyanarak floresan mikroskobu altında görüntüsü alındı.

#### **3.5.2.7. Mitokondriyal Membran Bütünlüğünü Belirlenmesi için *in vitro***

##### **Deney**

Deneyin 1. günü gerekli ortamlar hazırlandı ve ısıtıldı. Konflue olmuş 75 cm<sup>2</sup> lik flastaki hücreler daha önceden belirtildiği gibi pasaj yapılır gibi Tripsin-EDTA ile kaldırıldı. Sonra hücreler Tripan mavisi ile sayıldı. 25 cm<sup>2</sup> lik flasklara 10<sup>6</sup> hücre %10 FBS, 2 mM L-Glutamine, 100 U/ml penisilin ve 100  $\mu$ g/ml streptomisin içeren RPMI 1640 ortamında ekildi.

Deneyin 2. günü gerekli maddeler hazırlandı ve ortam ısıtıldı. Bu aşamadan sonra serum içermeyen, L-Glutamin, Penisilin ve Streptomisin içeren RPMI 1640 deney ortamı kullanıldı. 25 cm<sup>2</sup> lik flasklardaki ortam vakum ile çekildi. Kontrol grubu için sadece deney ortamı eklendi. Hücreler öncelikle 1 saat 500  $\mu$ M MEL, 4 saat 1  $\mu$ g/ml LPS ve 1 saat 5 mM ATP ile muamele edildi.

Bitince Mitokondriyal Membran Bütünlüğünü belirlemek için akış sitometrisinde analiz edildi.

#### **3.5.2.8. Piroptotik Ölümün Mikroglia Hücrelerinde Gösterimi için *in vitro***

##### **Deney**

Deneyin 1. günü ilk olarak gerekli maddeler hazırlandı ve ortam ısıtıldı. Hücreler 48 kuyucuklu plaklara kuyucuk başına 3x10<sup>5</sup> miktarda ekildi. Kuyucuk başına koyulan ortam totalde 400  $\mu$ l olmalıdır.

Deneyin 2. günü ilk olarak gerekli maddeler hazırlandı ve ortam ısıtıldı. Bu kısımdan itibaren FBS içermeyen, L-Glutamin, Penisilin ve Streptomisin içeren RPMI 1640 deney ortamı kullanıldı. Plak'ın her bir koşulunun (5'li sıralar) ortamı vakum yardımıyla çekildi. Kontrol ve grubu için sadece 400  $\mu$ l deney ortamı eklendi. MEL + LPS + ATP grubuna 500  $\mu$ M MEL

kuyucuk başına 200 µl olacak şekilde eklenerek 1 saat süre ile inkübe edildi. Sonrasında LPS + ATP grubuna 1 µg/ml konsantrasyonunda LPS içeren 300 µl deney ortamı eklendi. MEL + LPS + ATP grubuna ise 500 µM MEL ve 1 µg/ml LPS içeren 100 µl deney ortamı eklendi ve 4 saat süreyle inkübe edildi. Bu sürenin sonunda MEL + LPS + ATP grubuna 500 µM MEL, 1 µg/ml LPS ve 5 mM ATP içeren 100 µl deney ortamı eklendi. LPS + ATP grubuna ise 1 µg/ml LPS ve 5 mM ATP içeren 100 µl deney ortamı eklenerek 1 saat inkübe edildi. Son basamakta ATP eklendikten sonra bütün kuyucuklarda volüm toplam 400 µl olmalıdır.

#### **3.5.2.9. Kaspaz Aktivite Testi İçin *in vitro* Deney**

Deneyin 1. günü flaskta konfluent haldeki hücreler daha önce belirtildiği gibi pasajlama yapar gibi kaldırıldı. Thoma lamında hücre sayımı yapıldı ve kuyucuk başına  $10^5$  hücre ve toplam hacmi 200 µl olacak şekilde 96kuyucuklu plaklara ekildi. Gerekli koşul kadar, her bir koşul için 5 kuyucuğa ekim yapıldı.

Deneyin 2. günü ilk olarak gerekli maddeler hazırlandı ve ortam ısıtıldı. Bu kısımdan itibaren FBS içermeyen, L-Glutamin, Penisilin ve Streptomisin içeren RPMI 1640 deney ortamı kullanıldı. Plak'ın her bir koşulunun (5'li sıralar) ortamı vakum yardımıyla çekildi. Kontrol grubu için sadece deney ortamı eklendi. MEL + LPS + ATP grubuna 500 µM MEL kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde eklenerek 1 saat süre ile inkübe edildi. Sonrasında LPS + ATP grubuna 1 µg/ml konsantrasyonunda LPS içeren 150 µl deney ortamı eklendi. MEL + LPS + ATP grubuna ise 500 µM MEL ve 1 µg/ml LPS içeren 50 µl deney ortamı eklendi ve 4 saat süreyle inkübe edildi. Bu sürenin sonunda MEL + LPS + ATP grubuna 500 µM MEL, 1 µg/ml LPS ve 5 mM ATP içeren 50 µl deney ortamı eklendi. LPS + ATP grubuna ise 1 µg/ml LPS ve 5 mM ATP içeren 50 µl deney ortamı eklenerek 1 saat inkübe edildi. Son basamakta ATP eklendikten sonra bütün kuyucuklarda volüm toplam 200 µl olmalıdır.

#### **3.5.3. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Testi**

Zarara uğrayan veya ölen hücrelerden salınan LDH miktarlarının ölçümünde Cytotoxicity Detection Kiti (Roche, Germany) kullanıldı. Kontrol için hücrelere LPS, ATP veya MEL verilmedi. Maksimal LDH salınımını hesaplanması için maksimal kuyularındaki hücrelere kitten çıkan lizis solüsyonundan 10 µl verildi ve iyice pipetlenerek hücreler öldürüldü. Sonrasında ise bütün kuyucuklardan 100 µl süpernatant yeni plaklara alındı. Kitin içinden çıkan

LDH deteksiyon solüsyonundan ise örnek başına 100 µl verildi. 15-20 dk karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübe edildi.

Bitiminde ise çoklu plak okuyucusu Varioskan (Thermo, USA) 490 nm ve referans olarak da 600 nm dalga boyunda okutma yapıldı. Yüzde hücre ölümü aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\% \text{ Hücre Sitotoksitesi} = (\text{Bulunan absorbans} - \text{Kontrol absorbans}) / (\text{Maksimum absorbans} - \text{Kontrol absorbans}) \times 100$$

#### **3.5.4. WST-8 Testi**

Hücrelerin canlılık testi WST-8 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) ile yapıldı. WST-8 (veya CCK-8) testi, WST-8 (2- (2-metoksi-4-nitrofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-disülfofenil) -2H- Tetrazolyum, monosodyum tuzunun bir elektron taşıyıcısı olan 1-Metoksi PMS varlığında bioreduksiyon üzerine suda çözünür bir formazan boyası üretmektedir. WST-8, hücrel dehidrojenazlar tarafından doku kültürü ortamında çözünen turuncu formazan bir ürüne biyolojik olarak indirgenir.

Deneyin bitiminde 100 µl kadarı LDH testi için ayrılan plakta kuyucukların üstüne 10 µl WST-8 solüsyonu eklenir. 2-4 saat arası inkübatörde bekletilir. Renk değişimi çoklu plak okuyucusu Varioskan (Thermo, USA) 450 nm ve referans olarak da 630 nm dalga boyunda okutma yapıldı. Yüzde hücre ölümü aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = (\text{Bulunan absorbans} / \text{Kontrol absorbans}) \times 100$$

#### **3.5.5. İnflamazom İlintili Sitokinlerin (IL-1β ve IL-18) ve NLRP3 için mRNA Düzeyinin Belirlenmesi**

##### **3.5.5.1. RNA İzolasyonu**

Her numune için 350 µl LBP lizis solüsyonu eklendi ve numuneyi iyice vorteksleyerek hücreler parçalandı. NucleoSpin kitinin içinden çıkan gDNA Temizleme kolonunu (sarı halka) bir Toplama Tüpüne (2 mL, sağlanan) yerleştirildi. Bir önceki basamakta homojenize edilmiş lizati bu gDNA Temizleme kolonuna aktarın ve 11,000 x g'de 30 saniye boyunca santrifüjlendi. Kolon atıldı ve geçen sıvı ile devam edildi. Üstüne 100 µl Binding Solüsyonu (BS) eklendi ve vorteksleme veya birkaç kez yukarı aşağı pipetleyerek iyice karıştırıldı. Bütün lizati bir toplama

tüpü içine yerleştirilmiş RNA Plus kolonuna (açık mavi halka) aktarıldı. 11.000 x g'de 15 saniye boyunca santrifüjlendi. RNA Plus Kolonuna 200 µL WB1 solüsyonu eklendi. 11.000 x g'de 15 saniye boyunca santrifüjlendi. Toplama tüpü atıldı ve kolon bir 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirildi. RNA Plus Kolonuna 600 µL WB2 solüsyonu eklendi ve 11.000 x g'de 15 saniye boyunca santrifüjlendi. Kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. RNA Plus Kolonuna 250 µL WB2 solüsyonu eklendi ve 11.000 x g'de 2 dakika boyunca santrifüjlendi. Kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. 30 µL RNaz içermeyen H<sub>2</sub>O eklendi ve 1 dakika boyunca 11.000 x g'de santrifüjlendi. Bu işlem bir defa daha tekrarlanarak RNA elüte edildi.

Elüte edildikten sonra Elde edilen spektrofotometre cihazında (Thermo Scientific, ABD) RNA konsantrasyonları ölçüldü. RNA örneklerinin kontrolü A260/A280 ve A260/A230 oranlarıyla belirlendi. Sonuçları 1,8 ile 2,2 arasında olan RNA numuneleri kontrolü geçti kabul edildi.

#### **3.5.5.2. cDNA Sentezi**

Elde edilen RNA'lerden iScript cDNA sentez kitiyle (Bio-Rad, ABD) cDNA elde edildi. Reaksiyon başına 1µg RNA örneği, 4 µL iScript Reaksiyon Solüsyonu, 1 µL iScript Reverse Transcriptase ve 20 µl'ye kadar tamamlayana kadar Nükleaz içermeyen su eklendi. Toplam hacim 20 µl olmalıdır. Örnekler Thermal Cycler (Bio-Rad, ABD) cihazında 25°C'de 3 dk boyunca priming, 46°C'de 20 dk boyunca reverse transcription, 95°C'de 1 dk boyunca RT inactivation işlemleri yapıldı. Bitince örnekler -80 °C saklandı.

#### **3.5.5.3. qPCR Analizi**

GoTaq® qPCR karışımı oda sıcaklığında çözüldü. Yeterli derecede karıştırıldığından emin olmak için hafifçe vorteks uygulandı. Kullanana kadar buz üzerinde saklandı.

GoTaq® qPCR kiti (Promega, ABD) kullanıldı. Bunun için kitin içinde hazır bulunan 5X Master Mix hazırlanarak, kullanıldı. Örnek başına 10 µl 5X Master mix, 7 µl nükleaz-free dH<sub>2</sub>O, 0.5µl forward ve 0.5µl reverse primer, 2µl cDNA örneklerinden eklendi. Analiz LightCycler 1.5 cihazı kullanılarak yapıldı. Housekeeping gen olan GAPDH ve proinflamatuvar moleküllere ait (IL-1β, IL-18 ve NALP3) mRNAlarına özgül primerler ile qPCR analizi yapıldı. Housekeeping gen olan GAPDH normalizasyon sebebiyle incelendi. Cihazın analiz parametreleri: 95°C 10 dk., 60°C'de 10sn. ve 72°C'de 30 sn. ve toplamda 40 çevrim olarak

gerçekleştirildi. qPCR sonucunun kontrolü Erime eğrisi analiziyle yapıldı. Örnekler arası ekspresyon farklılığı  $\Delta\Delta Ct$  yöntemine göre analiz edildi.

### **3.5.6. İmmüno blot Yöntemiyle Kaspaz-1, NALP3 ve IL-1 $\beta$ Proteinlerinin Tayini**

Mikroglial hücrelerde inflamazom aktivasyonunun olduğunu göstermek için hem proinflamatuvar belirteçlerden IL-1  $\beta$ , inflamazomun kendisini (NALP3), hem de aktivasyon için gerekli kaspaz-1 enzimini tayin eden antikorlar kullanılarak immüno blot yapıldı. Ayrıca ELISA yöntemine ek olarak hem hücre içi hem de salınan IL-1 $\beta$  sitokini uygun antikor kullanılarak tayin edildi. Mikroglial hücrelere MEL'in verildiği ve verilmediği koşullarda ve/veya LPS+ATP muamelesi yapılmış hücrelerden sitoplazmik proteinler elde edildi. Protein konsantrasyonu BCA protein analiz yöntemi ile belirlendi. Protein örnekleri SDS-PAGE jel ile ayrımlanıp poliviniliden diflorür (PVDF) membranına transfer edildi. Bloklama işleminden sonra örnekler kaspaz-1, NALP3, IL-1 $\beta$  ve aktin antikoruyla enkübe edildi. Kaspaz-1 enzimi ve IL-1 $\beta$  sitokini için hem pro- formlarının hem de olgun formlarının tayin edilebileceği antikorlar kullanıldı. Örnekler HRP ile işaretli sekonder antikor ile enkübe edildi ve görüntüleme için kemiluminesans yöntemine dayanan ECL kiti kullanıldı. Görüntü UVP jel dökümantasyon sisteminde elde edildi. Band yoğunlukları dansitometrik olarak değerlendirildi.

### **3.5.7. ELISA Yöntemiyle IL-1 $\beta$ ve IL-18 Sitokinlerinin Tayini**

Mikroglial hücrelerde inflamazom aktivasyonu ve MELin inflamazom aktivasyonuna etkileri IL-1 $\beta$  ve IL-18 sitokin düzeylerinin tayini ile yapıldı. Bunun için sandwich ELISA yöntemini kullanan hazır kitlerle çalışıldı. Örnekler MEL ve LPS + ATP ile muamele edildikten sonra süpernatantları elde edilerek kit üreticisi firmanın kılavuzuna uygun şekilde IL-1 $\beta$  ve IL-18 sitokin düzeyleri ölçüldü.

Kitin içinden çıkan standart solüsyonu steril suda çözünce konsantrasyonu 1000 pg/ml olmaktadır. Bu solüsyondan yine steril suyla seri dilüsyonlarla 500, 250, 125, 62.5, 31.2 ve 15.6 pg/ml konsantrasyonlar hazırlandı. Bunlar standart eğrisi çizmekte kullanıldı. Örnekler ise 1:15 oranında seyreltilerek kullanıldı. Örneklerden 100  $\mu$ l yüzeyi IL-1 $\beta$  ve IL-18 antikorları ile kaplı plaklara eklenip 2 saat süreyle inkübe edildi. Bittikten sonra 3 kere kuyucuk başına 400  $\mu$ l kitin içinden çıkan yıkama solüsyonu eklenerek yıkandı. Yıkamadan sonra kuyucuk başına 100  $\mu$ l biyotin konjuge solüsyonundan eklenerek 1 saat boyunca inkübe edildi. Bitince tekrar 3 kere kuyucuk başına 400  $\mu$ l kitin içinden çıkan yıkama solüsyonu eklenerek yıkandı. Sonrasında

kuyucuk başına 100 µl HRP-Avidin solüsyonu eklendi ve 30 dk. boyunca inkübe edildi. Bittikten sonra 5 kere kuyucuk başına 400 µl kitin içinden çıkan yıkama solüsyonu eklenerek yıkandı. Bu işlemten sonra 100 µl stabil kromojen eklenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dk. Boyunca inkübe edildi. Bu sürenin sonunda ise 100 µl stop solüsyonundan eklenerek çoklu plak okuyucusunda 450 nm dalga boyunda okutma yapıldı. Standart eğri çizimiyle sonuçlar elde edildi.

#### **3.5.8. Mitokondrial Reaktif Oksijen Türlerini Mitosox Boya ile Belirlenmesi**

Mitokondrial süperoksit seviyesini ölçmek için hücreler MEL, LPS + ATP ile muamle edildikten sonra MitoSOX ile 15 dakika, boyandı. Bittikten sonra çoklu plak okuyucusunda 510 nm dalga boyunda, 580 nm referans dalga boyunca okutma yapıldı.

#### **3.5.9. Mitokondrial Reaktif Oksijen Türlerini İmünfloresan Boyamayla Belirlenmesi**

Mitokondrial süperoksit seviyesini ölçmek için hücreler MEL, LPS + ATP ile muamle edildikten sonra MitoSOX ile 15 dakika, boyandı ve Floresan Mikroskop altında her gruptan görüntüler alındı.

#### **3.5.10. Mitokondriyal Membran Bütünlüğünün JC-1 Boyama ile Belirlenmesi**

Mitokondriyal Membran Bütünlüğünü belirlemek için akış sitometrisinde analiz edildi.

Muameleler bitince kuyucukların içlerinde ortam var iken hücrelere zarar vermemek için Tripsin-EDTA ile hücreler kaldırıldı. Hücrelerin kalkıp kalkmadığı mikroskopta kontrol edildi. 15 ml'lik falkon tüpüne hücreler ortam ile aktarıldı ve 1500 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atılarak örnekler 1 ml PBS eklenerek çözüldü ve yıkama işlemi gerçekleştirildi. Bittikten sonra 1500 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atılarak hücrelere 500 µl 1X Binding Buffer eklenerek çözüldü. Sonrasında ise 5 µl JC-1 boyası eklenerek oda sıcaklığında 15 dk. boyunca inkübe edildi. Akış sitometrisi cihazında  $10^5$  hücre sayımı yapılarak sonuçlar elde edildi.

#### **3.5.11. Piroptotik ölümün mikroglia hücrelerinde gösterimi**

Deneyin bittikten sonra kuyucuk başına 50 µg/ml PI boya eklendi ve floresan mikroskopta görüntüsü alındı. Boyanan ve boyanmayan hücreler ImageJ programında sayıldı.



### 3.5.12. Kaspaz-1 Aktivite Testi

Kaspaz-1 özgülüğünü doğrulamak için Caspase-Glo® 1 Testi (Promega, ABD) kullanıldı. Bir Kaspaz-1 selektif inhibitörü olan Ac-YVAD-CHO içerir. Bu inhibitör, kaspaz-1 aktivitesinin %99'unu inhibe eder, ancak çapraz reaksiyona giren kaspazlardan herhangi birini büyük ölçüde engellemez. Bu yüzden bu kit kaspaz-1 aktivitesini spesifik olarak ölçmemizi sağladı.

96 kuyucuklu plakta bulunan total 200 µl süpernatanttan 100 µl miktarı dikkatlice mikropipet yardımıyla çekilip atıldı. Üstüne 100 µl Caspase-Glo® 1 Reagent eklenir ve oda sıcaklığında 30 dk. – 1 saat arası inkübe edildi. Bittikten sonra ise lüminometrik okutma yapıldı.

### 3.6. Araştırma Planı ve Takvimi:

Projelendirme Haziran 2016 – Ağustos 2016

Hücre Ölüm ve Canlılık Testleri Eylül 2016 – Ekim 2016

qPCR Deneyleri Kasım 2016 – Aralık 2016

ELISA Deneyleri Ocak 2017 – Şubat 2017

Western Blot Deneyleri Mart 2017

Reaktif Oksijen Türleri Deneyleri Nisan 2017

Tez Yazımı Mayıs 2017 – Haziran 2017

### 3.7. Verilerin Değerlendirilmesi:

Bu araştırmadan elde edilen bulguların analiz edilmesi için SPSS Windows istatistik programının 20.0 versiyonundan faydalanıldı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata formatında sunuldu. Gruplar arası istatistiksel analiz için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olabilmesi için  $p < 0.05$  seviyesi kabul edildi.

### 3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları:

Çalışmamızın ilk sınırlılığı sadece N9 mikrogial hücrelerinde gerçekleştirilmiş olmasıdır. Daha geçerli ve kapsamlı bir çalışma olması için primer mikrogia üzerinde de deneylerin yapılması gerekmektedir. Ek olarak, *in vivo* çalışmalar yapılarak *in vitro* deneylerde

bulunan sonuçların doğrulaması yapılması gerekmektedir. Bir diğer sınırlılık ise diğer inflamazom tiplerinin de dikkate alınıp çalışılmasıdır. Bu, projemizde çalışılan NLRP3 inflamazomunun ve diğer tiplerin toplamda etkisini belirlemek için gereklidir. Ayrıca inflamazomu aktive etmek için kullanılabilecek diğer uyaranların da incelenmesi gereklidir çünkü bu maddeler bizim kullandıklarımızdan farklı etki gösterebilirler. İleriki çalışmalarda, MEL'in mikrogial üzerindeki koruyucu etkisini hangi yollar üstünden yaptığı da incelenmelidir.

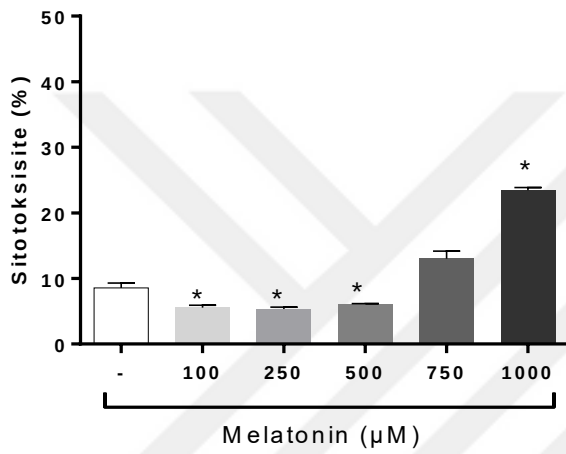
### **3.9. Etik Kurul Onayı:**

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu 12.01.2017 tarih 3103-GOA protokol numaralı 2017/01-23 karar no.lu kararında çalışmamızın etik açıdan uygun olduğu sonucu çıkmıştır.

## 4. SONUÇLAR

### 4.1. Melatoninin Toksik Olan ve Olmayan Dozlarının Belirlenmesi

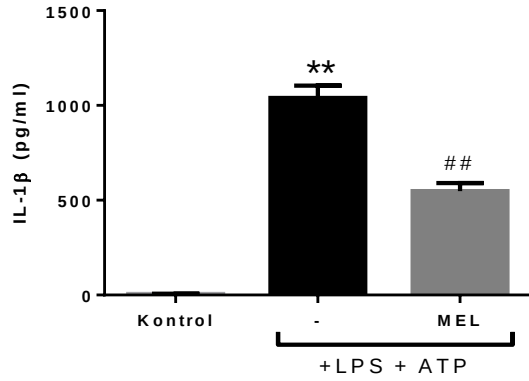
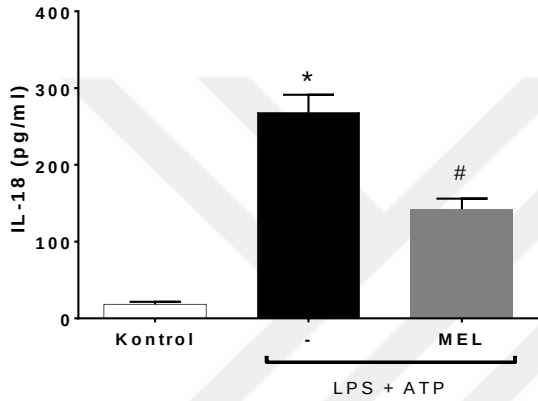
96 kuyucuklu plaklara  $10^4$  miktarda ekilen hücrelere MEL'in çeşitli dozları verildi ve MEL'in toksik olmadığı ve koruyuculuk gösterdiği en uygun dozu bulmak amacıyla LDH testi yapıldı. Elde ettiğimiz sonuçlar çerçevesinde, sitotoksikite testinde 500  $\mu$ M dozuna kadar toksisite göstermemiştir. Bu yüzden MEL'in en uygun dozun 500  $\mu$ M olduğuna karar verildi (Şekil 2).



**Şekil 2: MEL'in çeşitli dozlarının hücre ölümü üzerine etkisi. 500  $\mu$ M MEL verildiğinde hücre ölümü ise %6,108  $\pm$  0,177 olarak bulundu. Sonuçlar ortalama  $\pm$  S.D. olarak verildi.**

### 4.2. Melatoninin IL-1 $\beta$ ve IL-18 Sitokinlerinin Düzeyine Etkisinin ELISA Yöntemiyle Gösterilmesi

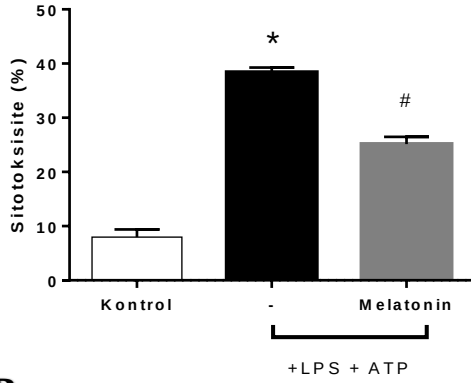
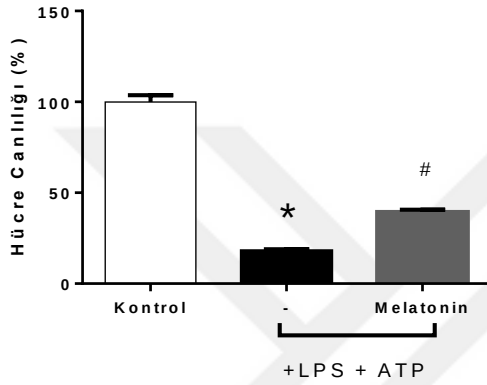
MEL'in toksik olmayan uygun dozu belirlendikten sonra ilk olarak inflamazom belirteçlerinden olan IL-1 $\beta$  ve IL-18 sitokinlerinin tayini ELISA yöntemiyle yapıldı. LPS + ATP verilen grubun IL-1 $\beta$  miktarı  $1039.45 \pm 144.27$  pg/ml olarak, MEL ön muamelesi yapılan grup olan MEL + LPS + ATP grubunda ise bu miktar  $547.8 \pm 94.5$  pg/ml seviyesinde saptandı ( $##p<0,01$ ;  $**p<0,01$ ) (Şekil 3A). MEL, LPS ve ATP ile artan IL-1 $\beta$  sitokin miktarını anlamlı olarak azaldığı saptandı. IL-18 için ise aynı sırayla. LPS + ATP verilen grubun  $268.1 \pm 46.33$  pg/ml seviyesinden MEL ön muamelesi yapılan grupta  $142.29 \pm 30.7$  pg/ml seviyesine indiği saptandı ( $\#p<0,05$ ;  $*p<0,05$ ) (Şekil 3B).

**A****B**

**Şekil 3. MEL'in IL-1β ve IL-18 düzeyine etkisinin ELISA yöntemiyle ölçülmesi.** LPS + ATP ile aktive edilmiş inflamazom grubuna göre MEL IL-1β ve IL-18 seviyesini anlamlı olarak azaltmıştır. Sonuçlar ortalama ± S.D. olarak verildi.

#### 4.3. Melatoninin Piroptotik Hücre Ölümüne Etkisi

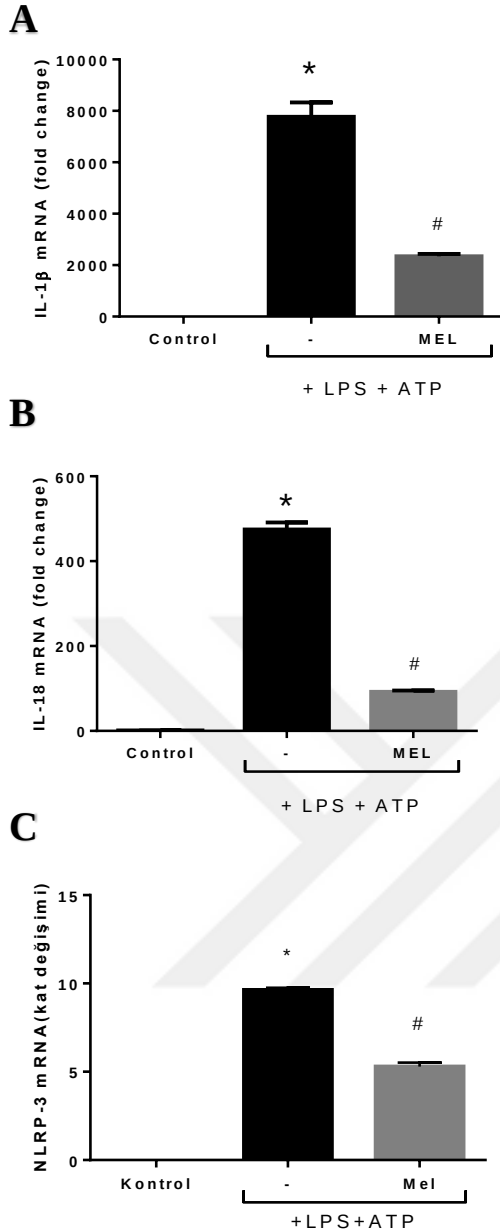
MEL, LPS ve ATP verilerek hücre ölümü ve canlılığı LDH ve WST testleriyle belirlendi. Sonuçlara göre, LPS ve ATP verilen grubun ölüm oranı  $38.39 \pm 1.79$  olarak saptandı ( $\#p<0,05$ ;  $*p<0,05$ ) (Şekil 4A) ve MEL ön muamelesi yapılan grup olan MEL + LPS + ATP grubunda ise  $25.15 \pm 2.7$  seviyesinde saptandı ( $\#p<0,05$ ;  $*p<0,05$ ) (Şekil 3B). Hücre canlılığı ise LPS ve ATP grubunda  $18.19 \pm 1.4$  ( $\#p<0,05$ ;  $*p<0,05$ ) (Şekil 4B), MEL + LPS + ATP grubunda ise  $39.4 \pm 2.5$  olarak saptandı ( $\#p<0,05$ ;  $*p<0,05$ ) (Şekil 4B). MEL, LPS ve ATP ile indüklenen hücre ölümünü anlamlı olarak azaltmış, hücre canlılığını ise anlamlı olarak arttırmıştır.

**A****B**

**Şekil 4. MEL'in piroptotik hücre ölümüne etkisi.** LPS + ATP ile aktive edilmiş inflamazom grubuna MEL eklenince her iki testte de görüldüğü üzere hücre ölümü azalmıştır. Sonuçlar ortalama  $\pm$  S.D. olarak verildi.

#### 4.4. Melatoninin, LPS + ATP ile İndüklenmiş hücrelerde IL-1 $\beta$ , IL-18 ve NALP3 genlerinin mRNA Ekspresyon Seviyesine Etkisi

Hücre ölüm ve canlılığına baktıktan sonra inflamazom yolağında ve sonucunda salgılanan proteinlerin (IL-1 $\beta$ , IL-18 ve NLRP3) mRNA seviyesindeki değişimleri incelendi. MEL ön muamelesi yapıldıktan sonra LPS + ATP verilen hücrelerin mRNA ekspresyon değişimine bakıldı. LPS ve ATP verildikten sonra IL-1 $\beta$  seviyesi  $7767,8 \pm 123,9$  kat arttığı, MEL verildikten sonra ise  $2346,6 \pm 202,4$  kata indirdiği saptandı (# $p < 0,05$ ; \* $p < 0,05$ ) (Şekil 5A). LPS ve ATP verildikten sonra IL-18 seviyesi  $10,31 \pm 1,53$  kat arttığı, MEL ön muamelesi yapılan grupta ise  $5,29 \pm 0,50$  kata indirdiği saptandı (# $p < 0,05$ ; \* $p < 0,05$ ) (Şekil 5B). LPS ve ATP verildikten sonra NALP3 seviyesi  $9,63 \pm 0,26$  kat arttığı, MEL verildikten sonra ise  $5,29 \pm 0,50$  kata indirdiği saptandı (# $p < 0,05$ ; \* $p < 0,05$ ) (Şekil 5C). MEL, LPS ve ATP ile indüklenen inflamazoma bağlı olarak artan IL-1 $\beta$ , IL-18 ve NALP3 genlerinin mRNA ekspresyonlarını anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır.

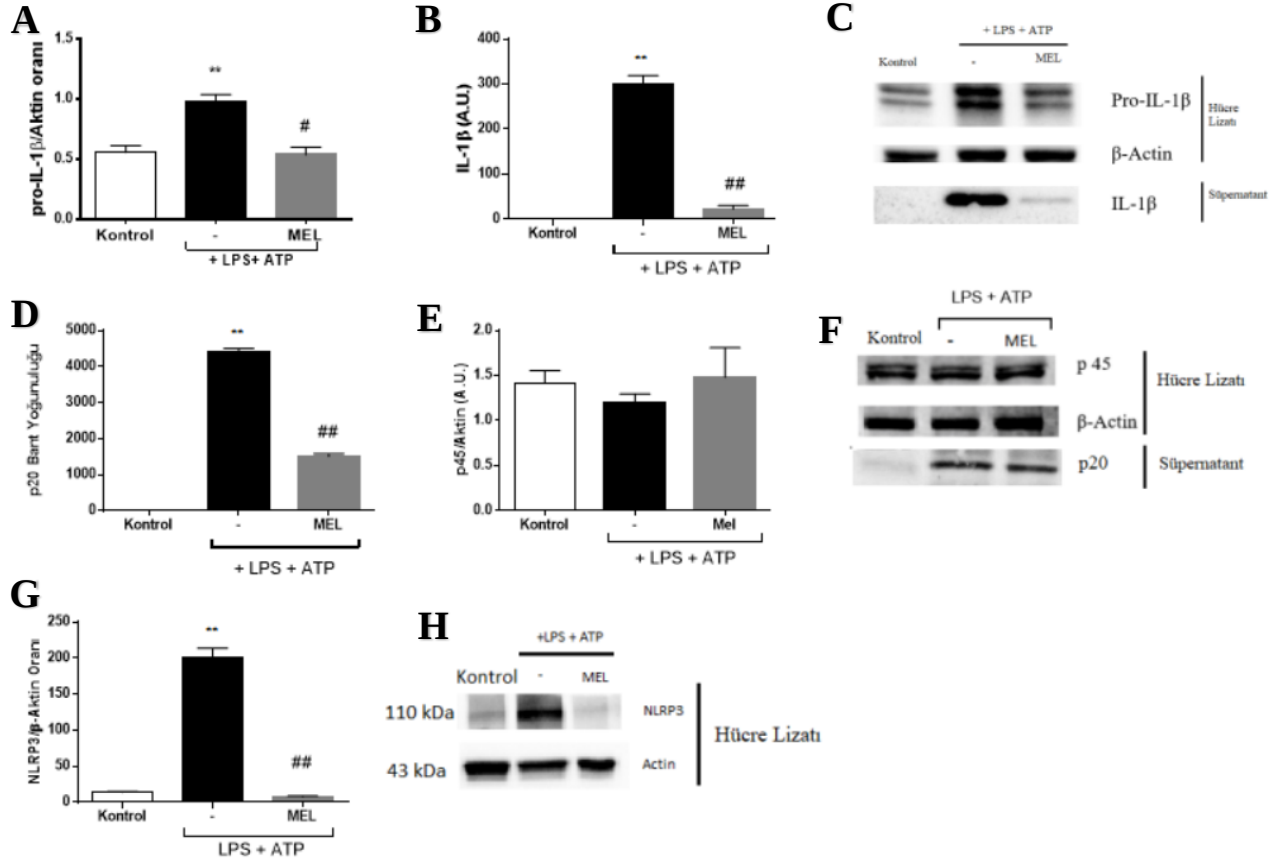


**Şekil 5. MEL'in inflamazom belirteci genlerin mRNA'ları üzerindeki baskılayıcı etkisi. IL-1 $\beta$ , IL-18 ve NLRP3 genlerinin inflamazom aktivasyonundan sonra MEL eklenmesiyle ekspresyonları anlamlı düzeyde azaldığı saptandı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  S.D. olarak verildi.**

#### 4.5. İmmünoBlot Yöntemiyle İnflamazom ile İlişkili Proteinlerin Değişimlerinin Gösterilmesi

Mikroglia hücreleri MEL ile ön muamele, LPS ve ATP ile muamele edildikten sonra total proteinleri izole edilerek IL-1 $\beta$ , Kaspaz-1 ve NLRP3 proteinlerinin miktarlarındaki değişime bakıldı. Lizatlardan bakılan LPS + ATP grubunda  $0,97 \pm 0,14$  olan pro-IL-1 $\beta$  oranı, MEL + LPS + ATP grubunda  $0,54 \pm 0,13$  oranına gerilediği saptandı (Şekil 6A, 6C). MEL, LPS ve ATP ile indüklenen pro-IL-1 $\beta$  protein miktarı anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır (# $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). Süpernatantlardan bakılan LPS + ATP grubunda  $2993,28 \pm 34,2$  A.U. IL-1 $\beta$ , MEL + LPS + ATP grubunda  $22,47 \pm 13,71$  A.U. gerilediği saptandı (Şekil 6B, 6C). Kaspaz-1

p20'nin süpernatanttaki miktarı  $4378.88 \pm 294.23$  A.U. seviyesinden  $1506.57 \pm 186.76$  A.U. seviyesine düştüğü saptanmıştır ( $##p<0,01$ ;  $**p<0.01$ ). Kaspaz-1 p45'in lizattaki miktarının istatistiksel anlamlı olarak değişmediği saptandı (Şekil 6E, 6F). NLRP3 için; süpernatantlardan bakılan LPS + ATP grubunda  $241.63 \pm 29.52$  A.U. olan NLRP3 seviyesinin, MEL + LPS + ATP grubunda  $6.35 \pm 2.701$  A.U. seviyesine gerilediği saptandı (Şekil 6G, 6H).

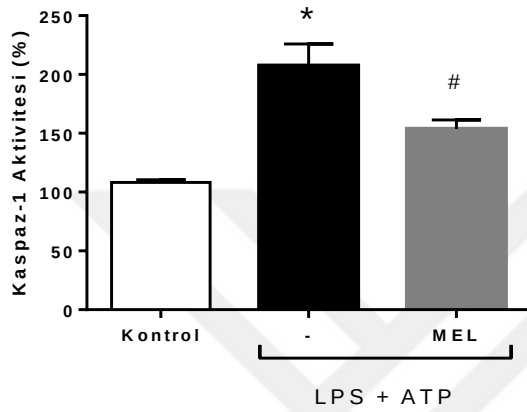


**Şekil 6. MEL'in inflamazom ilintili IL-1β, Kaspaz-1 ve NLRP3'ün protein seviyesindeki etkisinin Western Blot yöntemiyle gösterilmesi. IL-1β miktarı protein seviyesinde MEL ile ön muamele edilen grupta azaldığı saptandı. Kaspaz-1 miktarı ise anlamlı olarak değişmediği saptandı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  S.D. olarak verildi.**

#### 4.6. Kaspaz-1 Aktivite Testi

Mikroglia hücrelerinde aktive edilen inflamazomun önemli göstergelerinden birisi olan Kaspaz-1'in aktivitesi Kaspaz-1 Aktivite testi ile ölçüldü. Şekil 8A'da görüldüğü gibi LPS + ATP ile %207.475 seviyesinde olan Kaspaz-1 Aktivite oranı, MEL ile ön muamele edilmiş

grupta %153.151 seviyesine düştüğü saptandı (#p<0,05; \*\*p<0.01) (Şekil 7A). Bu sonuçlara bakılarak; MEL ön muamelesinin Kaspaz-1 aktivitesini, LPS ve ATP verilen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı azalttığı saptandı.

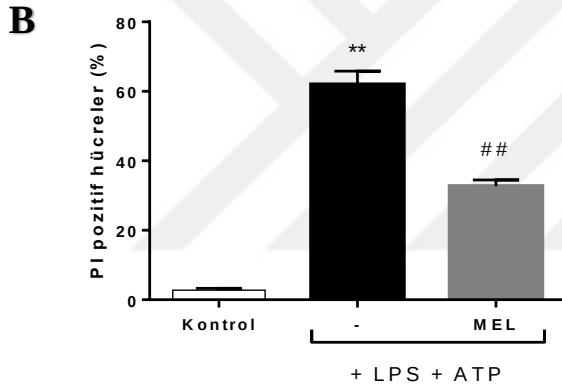
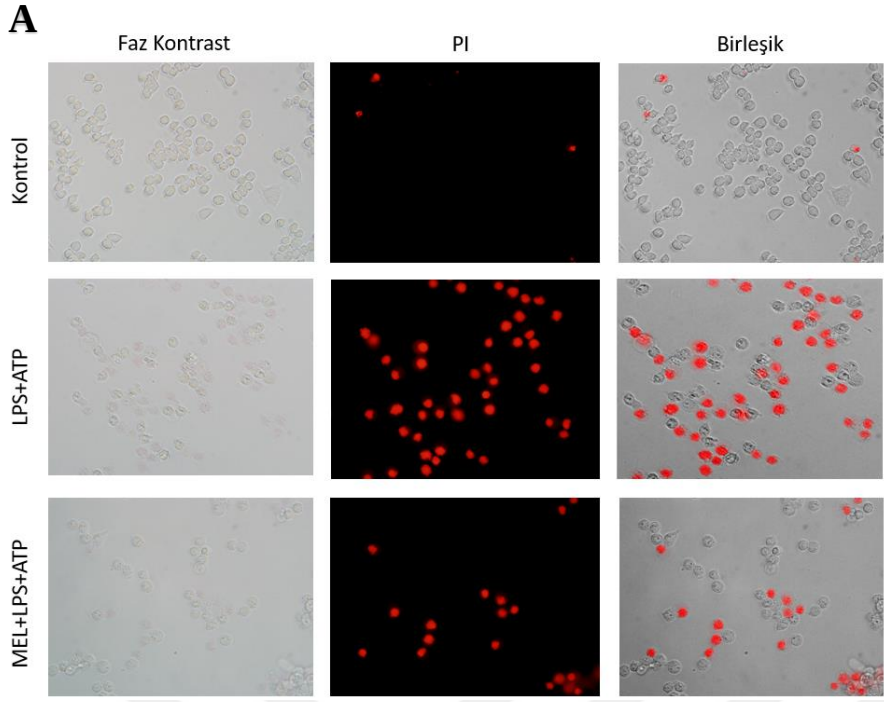


**Şekil 7. MEL'in Kaspaz-1 aktivitesi üzerine etkisinin gösterimi.** Kaspaz-1 aktivitesi MEL ile ön muamele edilen grupta LPS + ATP grubuna göre azaldığı saptanmıştır. Sonuçlar ortalama  $\pm$  S.D. olarak verildi.

#### 4.7. PI Boyama ile Piroptotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi

Mikroglia hücreleri LPS ve ATP ile muamele edildikten sonra PI boyası ile boyandı. Sonrasında ise floresan mikroskop altında görüntüleri alındı. LPS + ATP grubunda kırmızıya boyanan hücreler piroptotik yolla ölen hücreleri göstermektedir. MEL ön muamelesi yapılan grupta ise ölüm azalmakta olduğu da gözlemlendi (Şekil 8A). LPS ve ATP verildikten sonra canlı hücre oranı  $38,05 \pm 8.64$ , piroptotik yolla ölen hücre oranı  $61,95 \pm 8.64$  olarak bulundu. MEL ile ön muamele edilen grupta sonra ise canlı hücre oranı  $67,91 \pm 4.05$ , piroptotik yolla ölen hücre oranı  $32.72 \pm 3.92$  olarak saptandı (Şekil 8B). MEL, LPS ve ATP ile indüklenen piroptotik hücre ölümünü anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır.



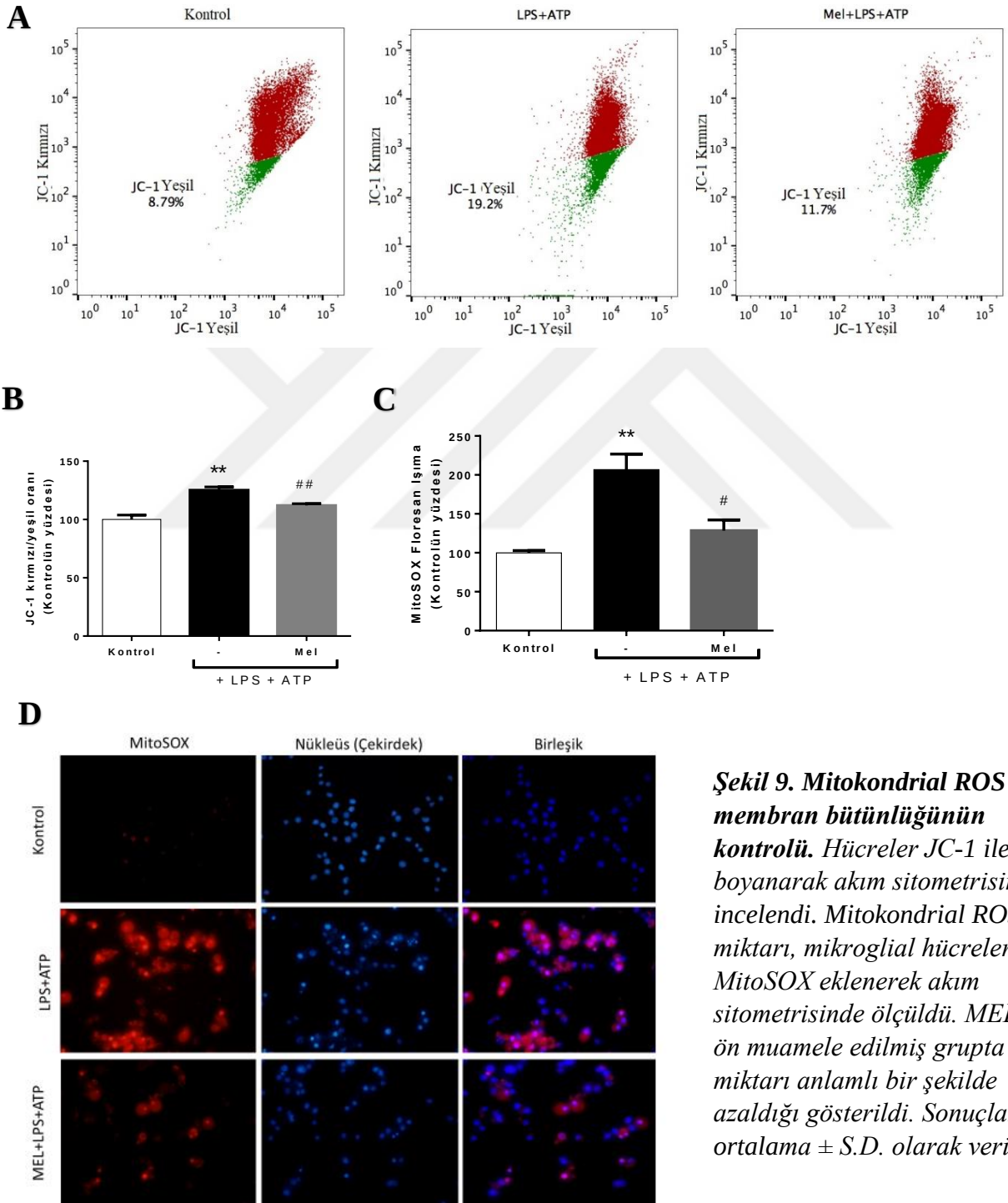


**Şekil 8: İnflamazom modelinde Piroptotik ölümün gösterilmesi.** Bu amaçla yapılan PI boyama sonuçlarına göre LPS + ATP eklenen hücrelerde piroptotik hücre ölümü artmakta, MEL verildiğinde ise piroptotik hücre ölümü istatistiksel anlamlı olarak azaldığı saptandı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  S.D. olarak verildi.

#### 4.8. Mitokondrial Bütünlük ve Süperoksit Üretimi Tayini

Mikroglia hücrelerine verilen ATP nin hücrede arttırdığı düşünülen Mitokondrial superoksit seviyesi MitoSOX ile; bozulan mitokondrial bütünlük ise JC-1 ile boyanarak gözlendi. Şekil 9A'da görüldüğü gibi LPS + ATP ile %19.2 seviyesinde olan oran MEL ön muamelesi yapılan grupta %11.7 seviyesine düştüğü saptandı. LPS + ATP eklendikten sonra ROS miktarı seviyesi  $206,7661 \pm 44,81$  seviyesine çıktığı, MEL ön muamelesi yapılan grupta ise  $128,53 \pm 30,64$

seviyesine indiği saptandı ( $\#p<0,05$ ;  $**p<0.01$ ) (Şekil 9C). MEL ile ön muamele edilen grupta hücrelerin mitokondrial membran bütünlüğü istatistiksel anlamı olarak daha az bozulduğu gözlemdi. LPS ve ATP verilen hücrelerin floresan mikroskobu altındaki Mitosox boyama görüntülerinde kırmızı renk ROS miktarında artış, MEL + LPS + ATP grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı azalış saptandı (Şekil 9D).



**Şekil 9. Mitokondrial ROS ve membran bütünlüğünün kontrolü.** Hücreler JC-1 ile boyanarak akım sitometrisinde incelendi. Mitokondrial ROS miktarı, mikroglial hücrelere Mitosox eklenerek akım sitometrisinde ölçüldü. MEL ile ön muamele edilmiş grupta ROS miktarı anlamlı bir şekilde azaldığı gösterildi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  S.D. olarak verildi.

## 5. TARTIŞMA

Doğal bağışıklık sisteminin bir çeşidi olan inflamazom, aktivasyonundan sonra IL-1 $\beta$  ve IL-18 sitokinlerini salgılayarak hücreleri piroptotik hücre ölümüne götürebilir. İnflamazomda meydana gelecek bozulmalar otoimmün hastalıkların, örn. Multipl Skleroz, gut, diyabet, ortaya çıkmasına ve ilerlemesine sebep olmaktadır (Wilson SP et al., 2010). İnflamazom baskılanması bu açıdan çok önemlidir. İnflamazom dış ve iç uyaranlar vasıtasıyla aktive olmaktadır. Aktivasyonların çeşidine göre oluşan inflamazom tipi farklıdır, bunlar; NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2 olarak adlandırılırlar (Franchi L et al., 2009). Daha önce mikrogliya hücrelerinde MEL'in NLRP3 inflamazomu üzerine etkisini gösteren bir çalışma belirtilmemiştir.

Projemizde inflamazom tipleri arasında en yaygın çalışılan NLRP3 yolu seçildi. NLRP3 inflamazom aktivasyonu için LPS ve ATP modeli kullanıldı. Daha önce BV-2 mikrogliya hücre hattında yapılan çalışmalarda 1  $\mu$ g/ml LPS ve 5mM ATP ile NLRP3 inflamazom aktivasyonu sağlandığı gösterilmiştir (Cai Y et al., 2016). LPS, inflamazomun ilk uyarımını (priming) sağlamakta, ATP ise inflamazom kompleksi oluşumunu ve IL-1 $\beta$  salınımını uyarmaktadır (Mao K. et al., 2013). MEL'in NLRP3 inflamazom kompleksinin oluşumunu baskıladığı farelerde in radyoterapi ile indüklenen ince bağırsak toksisitesinde ve sepsiste vivo bir çalışma olarak gösterilmiştir (Fernandez-Gil ve ark., 2017; Rahim ve ark., 2017). Elde ettiğimiz sonuçlar ışığında NLRP3 kompleksinin MEL ön muamelesiyle protein ve mRNA seviyesinde baskılandığını gösterdik. Bir diğer aşamada, NLRP3 inflamazom ilintili bir protein olan Kaspaz-1'de incelendi. Aktive edilmiş Kaspaz-1, pro-IL-1 $\beta$ 'yı ve pro-IL-18'i aktif biçimleri olan IL-1 $\beta$  ve IL-18'e proteolitik olarak parçalamaktadır. MEL'in, NLRP3 inflamazomunu inhibe ederek akut akciğer hasarını hafiflettiğini gösteren ALI fare modeliyle yapılan çalışmada kaspaz-1 seviyesini azalttığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2016). Ayrıca MEL'in transgenik ALS fare modelinde nöroprotektif olduğunu ve bunu kaspaz ailesini inhibe ederek olduğunu gösteren çalışmada mevcuttur (Zhang ve ark., 2013). Bizim sonuçlarımız da MEL'in kaspaz-1 üstünde inhibe edici ve baskılayıcı etkisi ortaya konmuştur.

IL-1 $\beta$  ve IL-18, inflamazom aktivasyonunun başlıca ürünleridir: NALP3 inflamazomu, hasar gören hücreler tarafından salınan tehlike sinyallerini tespit eder. Bu sinyaller, ASC proteinini ve Kaspaz-1'i o da inflamazom kompleksini aktiveleştirir. Aktive edilmiş NALP3 inflamazom kompleksi içindeki kaspaz-1, inflamatuvar sitokinleri IL-1 $\beta$  ve IL-18'i olgun formuna getirir. MEL'in inflamatuvar sitokinler olan IL-1 $\beta$  ve IL-18'i fare beyinde azalttığı *in*

*vivo* bir çalışmada gösterilmiştir (Cao ve ark., 2017). MEL'in LPS ile indüklenmiş inflamasyonda, IL-1 $\beta$  seviyesini azalttığı *in vitro* bir çalışma olarak BV-2 mikrogial hücrelerinde gösterilmiştir (Park ve Chun, 2017). Yine *in vitro* bir çalışmada mikrogial hücrelerle aynı kökenden (monosit) gelen makrofaj hücrelerinde , RAW 264.7, LPS ile inflamazom indüklenmesi yapılmış ve MEL'in IL-1 $\beta$  seviyesini azalttığı gösterilmiştir (Shim ve ark., 2015). Ayrıca, MEL mikrogial aktivasyonu ve pro-inflamatuar sitokinlerin azaltılması yoluyla nöronu dejenerasyona karşı koruduğu gösterilmiştir (Ding ve ark., 2014). Çalışmamızda bu sonuçlara paralel olarak MEL'in inflamazom aktivasyonu ile artan IL-1 $\beta$  ve IL-18 sitokinlerinin miktarını hem protein hem de mRNA seviyesinde azalttığı gösterildi.

İnflamazom, endojen veya eksojen zararları (PAMP veya DAMP) algılamak ve savaşmak için önemlidir (Lamkanfi, 2011). NLRP3 inflamazomu, patojenik, endojen ve çevresel kaynaklı çok çeşitli sinyallerle aktive edilir (Rathinam ve ark., 2012). NLRP3 inflamazom aktivasyonunda inflamazom indüktörlerinin çoğu mitokondriyal hasara neden olur ve mitokondriyal ROS üretir. Mitokondriyal ROS'ta NLRP3 inflamazom kompleksinin daha da fazla oluşumunu sağlar (Heidi et al., 2013; Zhou et al., 2011). MEL çok sayıda çalışmada reaktif oksijen türlerini tarayıp temizleyen güçlü bir madde olarak kabul gördüğünden (anti-oksidan), inflamasyonun aktivasyonu sırasında MEL'in mt-ROS üretimini engelleyip engelleyemediğini araştırıldı. İnflamazom aktivasyonu modelinde MEL'in ROS üstünde koruyucu etkisi *in vitro* çalışma olarak RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde (Shim ve ark., 2015), *in vivo* çalışma olarak postnatal fare beyinde gösterilmiştir (Cao ve ark., 2017). Benzer olarak HAPI Mikroglia (Highly Aggressively Proliferating Immortalized; Çok Agresif Olarak Çoğalan Ölümsüz) hücreleri üstünde yapılan bir çalışmada MEL, ROS ile bağlantılı sitotoksik faktör genlerini inhibisyonu aracılığıyla metamfetamin toksisitesini baskıladığı ve inhibe ettiği gösterilmiştir (Tocharus ve ark., 2010). *In vivo* bir çalışmada ise MEL'in postnatal fare beyinlerinde LPS ile indüklenmiş oksidatif strese karşı koruyuculuk sağladığı gösterilmiştir (Shah ve ark., 2017). Projemizde elde edilen bulgularımız da MEL'in LPS ve ATP ile indüklenen mt-ROS üretimini baskıladığı yönündedir.

MEL'in sitoprotektif etkisi Nöral kök hücrelerde yapılan deneylerde MEL'in LPS ile indüklenen inflamasyonu azalttığı, dolayısıyla hücre ölümünü de azalttığı gösterilmiştir (Song ve ark., 2015). Ayrıca fareler üzerindeki birçok *in vivo* çalışmada MEL'in hücre ölümünü azalttığı kanıtlanmıştır (Ahmed ve ark., 2010; Cisternas ve ark., 2010). Çalışmamızda, MEL'in inflamazom aktivasyonu ile beraber artan hücre ölümünü azalttığı, hücre canlılığını ise arttırdığını gösterdik.

Piroptoz, iç ve dış patojenlerle enfekte edildiğinde en sık meydana gelen ve antimikrobiyal yanıtın bir parçasını oluşturması muhtemel, programlanmış hücre ölümünün oldukça sık görülen bir şeklidir. Bu süreçte bağışıklık hücreleri kendi içinde yabancı tehlike sinyallerini tanır, pro-inflamatuvar sitokinleri serbest bırakır, şişer, patlar ve ölür. NLRP3 inflamazomu da bu ölüm tipiyle sonlanır (Miao EA et al., 2010). MEL'in farelerde adipoz dokuda inflamazoma bağlı piroptotik hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir (Liu ve ark., 2017). Çalışmamızda MEL'in mikrogial hücrelerde piroptotik ölümü önemli ölçüde azalttığını gösterdik.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Projemizde N9 mikroglial hücrelerinde MEL'in LPS ve ATP ile indüklenmiş inflamazom aktivasyonu üzerine etkisi incelendi. Hücre ölüm ve canlılık testleri LDH ve WST-8 yöntemleriyle incelendi ve MEL'in koruyucu etkisi tespit edildi. İnflamazom ile ilintili sitokinler olan IL-1 $\beta$  ve IL-18'i protein ve mRNA düzeyinde sırasıyla ELISA, Western Blot ve qPCR yöntemleriyle incelendi ve MEL'in bu sitokinleri azalttığı gösterildi. NLRP3 ve Kaspaz-1 gibi sadece NLRP3 inflamazom yolağında görev alan proteinlerin de MEL ön muamelesiyle azaltıldığını saptadık. Ayrıca MEL ön muamelesi, LPS ve ATP ile artışa geçen ROS miktarını da azalttığı gösterilmiştir. Öncelikle MEL'in bu koruyucu etkisinin hangi yollar üzerinden gösterdiği gösterilmeli sonra da *in vivo* çalışmalarla desteklenerek kanıtlanmalıdır. Sonuç olarak MEL, MEL'in, LPS ve ATP indüklenmiş NLRP3 inflamazom aktivasyonunu ve bunun sonucu olan piroptotik hücre ölümünü baskılamıştır ve MEL NLRP3 inflamazomunu azaltıcı bir terapötik ajan olarak kullanılabilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. del Rio-Hortega, P. (1932) Microglia. In: Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System, Vol. 2, pp. 483-534. Ed. W Pen®eld. Paul B. Hoeber, New York.(Rio-Hortega, 1939)
2. Ahmed HH, Elmegeed GA, el-Sayed el SM, Abd-Elhalim MM, ve ark. Potent neuroprotective role of novel melatonin derivatives for management of central neuropathy induced by acrylamide in rats. *Eur J Med Chem* 2010; 45(11): 5452-5459.
3. Aloisi F. Immune function of microglia. *Glia* 2001; 36(2): 165-179.
4. Barron KD. The microglial cell. A historical review. *J Neurol Sci* 1995; 134 Suppl:57-68.
5. Cao S, Shrestha S, Li J, Yu X, ve ark. Melatonin-mediated mitophagy protects against early brain injury after subarachnoid hemorrhage through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Sci Rep* 2017; 7(1): 2417.
6. Chan AS, Lai FP, Lo RK, Voyno-Yasenetskaya TA, ve ark. Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal* 2002; 14(3): 249-257.
7. Chan WY, Kohsaka S ve Rezaie P. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev* 2007; 53(2): 344-354.
8. Christensen RN, Ha BK, Sun F, Bresnahan JC, ve ark. Kainate induces rapid redistribution of the actin cytoskeleton in ameboid microglia. *J Neurosci Res* 2006; 84(1): 170-181.
9. Cisternas CD, Compagnucci MV, Conti NR, Ponce RH, ve ark. Protective effect of maternal prenatal melatonin administration on rat pups born to mothers submitted to constant light during gestation. *Braz J Med Biol Res* 2010; 43(9): 874-882.
10. Cuadros MA ve Navascues J. The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol* 1998; 56(2): 173-189.
11. Davis EJ, Foster TD ve Thomas WE. Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res Bull* 1994; 34(1): 73-78.
12. Dawson D ve van den Heuvel CJ. Integrating the actions of melatonin on human physiology. *Ann Med* 1998; 30(1): 95-102.
13. de Torre-Minguela C, Mesa Del Castillo P ve Pelegrin P. The NLRP3 and Pyrin Inflammasomes: Implications in the Pathophysiology of Autoinflammatory Diseases. *Front Immunol* 2017; 8: 43.

14. Ding K, Wang H, Xu J, Lu X, ve ark. Melatonin reduced microglial activation and alleviated neuroinflammation induced neuron degeneration in experimental traumatic brain injury: Possible involvement of mTOR pathway. *Neurochem Int* 2014; 76: 23-31.
15. Dong Y, Fan C, Hu W, Jiang S, ve ark. Melatonin attenuated early brain injury induced by subarachnoid hemorrhage via regulating NLRP3 inflammasome and apoptosis signaling. *J Pineal Res* 2016; 60(3): 253-262.
16. Dubocovich ML ve Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005; 27(2): 101-110.
17. Ebihara S, Marks T, Hudson DJ ve Menaker M. Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse. *Science* 1986; 231(4737): 491-493.
18. Fernandez-Gil B, Moneim AE, Ortiz F, Shen YQ, ve ark. Melatonin protects rats from radiotherapy-induced small intestine toxicity. *PLoS One* 2017; 12(4): e0174474.
19. Gehrmann J. Microglia: a sensor to threats in the nervous system? *Res Virol* 1996; 147(2-3): 79-88.
20. Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, ve ark. Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 45.
21. Ginhoux F ve Merad M. [Microglia arise from extra-embryonic yolk sac primitive progenitors]. *Med Sci (Paris)* 2011; 27(8-9): 719-724.
22. Ginhoux F ve Prinz M. Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; 7(8): a020537.
23. Godson C ve Reppert SM. The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 1997; 138(1): 397-404.
24. Guillaume JL, Daulat AM, Maurice P, Levoye A, ve ark. The PDZ protein mupp1 promotes Gi coupling and signaling of the Mt1 melatonin receptor. *J Biol Chem* 2008; 283(24): 16762-16771.
25. Guo H, Callaway JB ve Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med* 2015; 21(7): 677-687.
26. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, ve ark. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol* 2008; 9(8): 857-865.
27. Hardeland R. Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *Biofactors* 2009; 35(2): 183-192.
28. Hardeland R, Cardinali DP, Brown GM ve Pandi-Perumal SR. Melatonin and brain inflammaging. *Prog Neurobiol* 2015; 127-128: 46-63.



29. Kersse K, Bertrand MJ, Lamkanfi M ve Vandenabeele P. NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; 22(5-6): 257-276.
30. Kettenmann H ve Verkhratsky A. Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci* 2008; 31(12): 653-659.
31. Knezevic D ve Mizrahi R. Molecular imaging of neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2017.
32. Kreutzberg GW. Microglia, the first line of defence in brain pathologies. *Arzneimittelforschung* 1995; 45(3A): 357-360.
33. Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, Garg AD, ve ark. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol* 2011; 32(4): 157-164.
34. Kumar H, Kawai T ve Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011; 30(1): 16-34.
35. Lawson LJ, Perry VH ve Gordon S. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1992; 48(2): 405-415.
36. Lee MY, Kuan YH, Chen HY, Chen TY, ve ark. Intravenous administration of melatonin reduces the intracerebral cellular inflammatory response following transient focal cerebral ischemia in rats. *J Pineal Res* 2007; 42(3): 297-309.
37. Leemans JC, Cassel SL ve Sutterwala FS. Sensing damage by the NLRP3 inflammasome. *Immunol Rev* 2011; 243(1): 152-162.
38. Leong SK ve Ling EA. Amoeboid and ramified microglia: their interrelationship and response to brain injury. *Glia* 1992; 6(1): 39-47.
39. Levoye A, Dam J, Ayoub MA, Guillaume JL, ve ark. The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J* 2006; 25(13): 3012-3023.
40. Ling EA ve Wong WC. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 1993; 7(1): 9-18.
41. Liu Z, Gan L, Xu Y, Luo D, ve ark. Melatonin alleviates inflammasome-induced pyroptosis through inhibiting NF-kappaB/GSDMD signal in mice adipose tissue. *J Pineal Res* 2017.
42. Macchi MM ve Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol* 2004; 25(3-4): 177-195.

43. Masuda T ve Prinz M. Microglia: A Unique Versatile Cell in the Central Nervous System. *ACS Chem Neurosci* 2016; 7(4): 428-434.
44. Murabe Y ve Sano Y. Morphological studies on neuroglia. VII. Distribution of "brain macrophages" in brains of neonatal and adult rats, as determined by means of immunohistochemistry. *Cell Tissue Res* 1983; 229(1): 85-95.
45. Murray FT, Johnson RD, Sciadini M, Katovich MJ, ve ark. Erectile and copulatory dysfunction in chronically diabetic BB/WOR rats. *Am J Physiol* 1992; 263(1 Pt 1): E151-157.
46. Nayak D, Roth TL ve McGavern DB. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol* 2014; 32: 367-402.
47. Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, ve ark. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol* 2008; 85(3): 335-353.
48. Park E ve Chun HS. Melatonin Attenuates Manganese and Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Activation of BV2 Microglia. *Neurochem Res* 2017; 42(2): 656-666.
49. Parpura V ve Verkhratsky A. Neuroglia at the crossroads of homeostasis, metabolism and signalling: evolution of the concept. *ASN Neuro* 2012; 4(4): 201-205.
50. Petrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, ve ark. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 2007; 14(9): 1583-1589.
51. Poon IK, Hulett MD ve Parish CR. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death Differ* 2010; 17(3): 381-397.
52. Prinz M, Tay TL, Wolf Y ve Jung S. Microglia: unique and common features with other tissue macrophages. *Acta Neuropathol* 2014; 128(3): 319-331.
53. Rahim I, Djerdjouri B, Sayed RK, Fernandez-Ortiz M, ve ark. Melatonin administration to wild-type mice and nontreated NLRP3 mutant mice share similar inhibition of the inflammatory response during sepsis. *J Pineal Res* 2017.
54. Rio-Hortega P. THE MICROGLIA. *The Lancet* 1939; 233(6036): 1023-1026.
55. Rivara S, Lorenzi S, Mor M, Plazzi PV, ve ark. Analysis of structure-activity relationships for MT2 selective antagonists by melatonin MT1 and MT2 receptor models. *J Med Chem* 2005; 48(12): 4049-4060.
56. Roberts KM ve Fitzpatrick PF. Mechanisms of tryptophan and tyrosine hydroxylase. *IUBMB Life* 2013; 65(4): 350-357.

57. Shah SA, Khan M, Jo MH, Jo MG, ve ark. Melatonin Stimulates the SIRT1/Nrf2 Signaling Pathway Counteracting Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Oxidative Stress to Rescue Postnatal Rat Brain. *CNS Neurosci Ther* 2017; 23(1): 33-44.
58. Shim DW, Shin HJ, Han JW, Ji YE, ve ark. A novel synthetic derivative of melatonin, 5-hydroxy-2'-isobutyl-streptochlorin (HIS), inhibits inflammatory responses via regulation of TRIF-dependent signaling and inflammasome activation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015; 284(2): 227-235.
59. Song J, Kang SM, Lee KM ve Lee JE. The protective effect of melatonin on neural stem cell against LPS-induced inflammation. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 854359.
60. Tay TL, Hagemeyer N ve Prinz M. The force awakens: insights into the origin and formation of microglia. *Curr Opin Neurobiol* 2016; 39: 30-37.
61. Tocharus J, Khonthun C, Chongthammakun S ve Govitrapong P. Melatonin attenuates methamphetamine-induced overexpression of pro-inflammatory cytokines in microglial cell lines. *J Pineal Res* 2010; 48(4): 347-352.
62. Watkins LR, Milligan ED ve Maier SF. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci* 2001; 24(8): 450-455.
63. Wu CH, Wang HJ, Wen CY, Lien KC, ve ark. Response of amoeboid and ramified microglial cells to lipopolysaccharide injections in postnatal rats--a lectin and ultrastructural study. *Neurosci Res* 1997; 27(2): 133-141.
64. Zawilska JB, Skene DJ ve Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol Rep* 2009; 61(3): 383-410.
65. Zhang Y, Cook A, Kim J, Baranov SV, ve ark. Melatonin inhibits the caspase-1/cytochrome c/caspase-3 cell death pathway, inhibits MT1 receptor loss and delays disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 2013; 55: 26-35.
66. Zhang Y, Li X, Grailer JJ, Wang N, ve ark. Melatonin alleviates acute lung injury through inhibiting the NLRP3 inflammasome. *J Pineal Res* 2016; 60(4): 405-414.
67. Cai Y, Kong H, Pan YB, Jiang L, ve ark. Procyanidins alleviates morphine tolerance by inhibiting activation of NLRP3 inflammasome in microglia. *J Neuroinflammation*. 2016 Mar 1;13(1):53.
68. Mao K, Chen S, Chen M, Ma Y ve ark. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Cell Res*. 2013 Feb;23(2):201-12.

69. Miao EA1, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, ve ark. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. Nat Immunol. 2010 Dec;11(12):1136-42.



## 8. EKLER

### 8.1. EK-1 Etik Kurul Onayı



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

03.03.2017

Konu: Karar hk.  
Sayı: 1225

Sayın Prof.Dr.Kemal Kürşad GENÇ,

Kurulumuz tarafından 02.03.2017 tarih ve 3103-GOA protokol numaralı 2017/04-32 karar numarası ile görüşülen "Melatonin'in Mikroglial Hücrelerde 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**  
**GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI**

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

|                      |                                                               |                                                                                      |
|----------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| BAŞVURU<br>BİLGİLERİ | DOSYA NO:                                                     | 3103-GQA                                                                             |
|                      | ARAŞTIRMA                                                     | UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/> AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>      |
|                      | ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI                                         | Melatonin'in Mikroglial Hücrelerde İnflamasyon Aktivasyonuna Etkisi                  |
|                      | ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU                                       |                                                                                      |
|                      | SÖRÜMLÜ ARAŞTIRMACI<br>UNVANI ADI SOYADI ve<br>UZMANLIK ALANI | Prof.Dr.Kemal Kürşad GENÇ<br>Sağlık Bilimleri Ens.<br>Sinit Bilimleri A.D.           |
|                      | DESTEKLEYİCİ VE AÇIK<br>ADRESİ                                | -                                                                                    |
|                      | DESTEKLEYİCİNİN YASAL<br>TEMSİLCİSİ VE ADRESİ                 | -                                                                                    |
|                      | ARAŞTIRMAYA KATILAN<br>MERKEZLER                              | TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/> |

| DEĞERLENDİRİLEN<br>BELGELER | Belge Adı           | Tarihi     | Versiyon<br>Numarası | Dili                                       |                                    |                                |
|-----------------------------|---------------------|------------|----------------------|--------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
|                             | Araştırma Dilekçesi | 22.02.2017 |                      | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> | İngilizce <input type="checkbox"/> | Diğer <input type="checkbox"/> |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                        |                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| KARAR BİLGİLERİ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Karar No:2017/04-32                                                                                                    | Tarih:02.03.2017 |
| Prof.Dr.Kemal Kürşad GENÇ'in sorumlusu olduğu "Melatonin'in Mikroglial Hücrelerde İnflamasyon Aktivasyonuna Etkisi" isimli klinik araştırmaya ait 22.02.2017 tarihli araştırma dilekçesine ilişkin olarak;<br>-Çalışmanın sorumlusu araştırmacısının Prof.Dr.Şermin Genç olarak değiştirilmesi ile ilgili be'ge incelencrek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur. |                                                                                                                        |                  |
| ETİK KURUL BİLGİLERİ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                        |                  |
| ÇALIŞMA ESASI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu |                  |
| ETİK KURUL ÜYELERİ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                        |                  |

| Unvanı/Adı/Soyadı                            | Uzmanlık Alanı                                       | Kurumu                                                             | Cinsi yet | Araştırma ile ilişkili mi?                                       | İmza              |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------|------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Prof.Dr.Banu ONVURAL<br>(Başkan)             | Tıbbi Biyokimya                                      | DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı                    | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | <i>Banu</i>       |
| Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU<br>(Başkan Yardımcısı) | Halk Sağlığı                                         | DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.                                | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | <i>Ş.Reyhan</i>   |
| Prof.Dr.Nejat SARIOĞLU                       | Kalp Damar Cerrahisi                                 | DEÜ Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı               | Erkek     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | <i>N.Şermin</i>   |
| Prof.Dr.Sevinç ERASLAN                       | Endokrinoloji                                        | DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı                    | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | <i>Katılmadı</i>  |
| Prof.Dr.Mukaddes GÜMÜŞTEKİN                  | Tıbbi Farmakoloji                                    | DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı                  | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | <i>Katılmadı</i>  |
| Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKUTUK                   | Tıbbi Mikrobiyoloji                                  | DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı                | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | <i>Ayşe</i>       |
| Prof.Dr.Müge KIRAY                           | Fizyoloji                                            | DEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı                          | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | <i>Müge</i>       |
| Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER                    | Anesteziyoloji                                       | DEÜ Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.               | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | <i>S.Şermin</i>   |
| Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU                       | Patoloji                                             | DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D.                              | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | <i>Sülen</i>      |
| Prof.Dr.Bülge KARA                           | Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon                       | DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu                    | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | <i>Bülge</i>      |
| Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ                         | Tıbbi Biyoloji ve Genetik                            | DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.                   | Erkek     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | <i>S.Kizildağ</i> |
| Doç.Dr.Ayhan ABACI                           | Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları | DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı      | Erkek     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | <i>Ayhan</i>      |
| Doç.Dr.Murat BEKTAŞ                          | Hemşirelik Yönetimi                                  | DEÜ Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği | Erkek     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | <i>Katılmadı</i>  |
| Üzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN                      | Hukuk                                                | DEÜ Tıp Tarihi ve Etik A.D.                                        | Erkek     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | <i>Katılmadı</i>  |
| 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"/> | <i>M.Özkul</i>    |

## 8.2.ÖZGEÇMİŞ

### ÖZGEÇMİŞ BURAK İBRAHİM ARIÖZ

|                             |                                                    |
|-----------------------------|----------------------------------------------------|
| TC Kimlik No / Pasaport No: | 24391211036                                        |
| Doğum Yılı:                 | 17/07/1991                                         |
| Yazışma Adresi :            | İstihkam Loj. Ege Apt. A blok no:4 Narlıdere/İzmir |
| Telefon :                   | +905071235517                                      |
| Faks :                      |                                                    |
| e-posta :                   | burakiarioz@gmail.com                              |

#### EĞİTİM BİLGİLERİ

| Ülke    | Üniversite                       | Fakülte/Enstitü  | Öğrenim Alanı                 | Derece | Mezuniyet Yılı |
|---------|----------------------------------|------------------|-------------------------------|--------|----------------|
| Türkiye | İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü | Fen Fak.         | Moleküler Biyoloji ve Genetik | 2,71   | 20.06.2014     |
| 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 |
|                   |

#### DiĞER 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

|  |
|--|
|  |
|  |
|  |
|  |