



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**LİPOLİSAKKARİT İLE FARELERDE OLUŞTURULAN
ENFLAMATUVAR HİPERALJEZİYE RIPK1/RIPK3/MLKL
NEKROZOMUNUN KATKISININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEDA KURT

ECZACILIK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

MERSİN
OCAK-2023

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**LİPOLİSAKKARİT İLE FARELERDE OLUŞTURULAN
ENFLAMATUVAR HİPERALJEZİYE RIPK1/RIPK3/MLKL
NEKROZOMUNUN KATKISININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEDA KURT

ORCID ID: 0000-0001-7136-9866

DANIŞMAN

PROF. DR. BAHAR TUNÇTAN

ECZACILIK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

MERSİN

OCAK-2023

ÖZET

LİPOLİSAKKARİT İLE FARELERDE OLUŞTURULAN ENFLAMATUVAR HİPERALJEZİYE RIPK1/RIPK3/MLKL NEKROZOMUNUN KATKISININ ARAŞTIRILMASI

Bu tezde, lipopolisakkarit (LPS) ile farelerde oluşturulan enflamatuvar hiperaljeziye reseptör ile etkileşen serin/treonin protein kinaz (*receptor-interacting serine/threonine-protein kinase*; RIPK) 1/RIPK3/karışık kökenli kinaz benzeri psöodokinaz (*mixed lineage kinase domain like pseudokinase*; MLKL) nekrozomunun katkısı seçici RIPK1 inhibitörü nekrostatin (*necrostatin*; Nec)-1s kullanılarak araştırılmıştır. Deneyler 8 gruba ayrılan fareler üzerinde gerçekleştirilmiştir: (1) Serum fizyolojik (SF), (2) LPS, (3) SF ve dimetil sülfoksit, (4) SF ve Nec-1s (0.01 mg/kg), (5) LPS ve Nec-1s (0.001 mg/kg), (6) LPS ve Nec-1s (0.01 mg/kg), (7) LPS ve Nec-1s (0.1 mg/kg) ile (8) LPS ve Nec-1s (1 mg/kg). Nec-1s (10 ml/kg) SF (10 ml/kg) veya LPS (10 mg/kg; 10 ml/kg) ile aynı anda intraperitoneal yoldan uygulanmıştır. Farelerin 60 saniye içinde termal uyarıya tepki verme süreleri SF veya LPS enjeksiyonundan 6 saat sonra değerlendirilmiştir. Deneyler sonunda öldürülen farelerin beyinleri ve omurilikleri alınmıştır. Beyinler ve omuriliklerden hazırlanan doku homojenatı süpernatantlarında β -tübülin, *toll* benzeri reseptör (*toll-like receptor*; TLR) 4, RIPK1, fosforile RIPK1, RIPK3, fosforile RIPK3, MLKL, fosforile MLKL, *high-mobility-group-box* (HMGB) 1, kaspaz-11 p20, p30-gasdermin D (GSDMD), interlökin (*interleukin*; IL)-1 β , semaforin (SEMA) 3A ve miyelin proteolipit protein (PLP) ekspresyonu *immunoblotting* yöntemiyle ölçülmüştür. Farelerin termal uyarıya yanıt verme sürelerinde LPS'nin neden olduğu azalma yalnızca 0.01 mg/kg dozda Nec-1s ile önlenmiştir. Nec-1s etkili olan en düşük dozunda (0.01 mg/kg) uygulandığında, LPS'nin neden olduğu TLR4, fosforile RIPK1, fosforile RIPK3, fosforile MLKL, HMGB1, kaspaz-11 p20, p30-GSDMD, IL-1 β ve SEMA3A ekspresyonundaki artmanın yanı sıra, miyelin PLP ekspresyonundaki azalma önlenmiştir. Bu bulgular, Nec-1s'nin LPS/TLR4 yolu aracılığıyla gelişen enflamatuvar hiperaljeziyi önleyici etkisine santral sinir sisteminde RIPK1/RIPK3/MLKL nekrozomu aracılıklı nekropitoz ve kaspaz-11/GSDMD aracılıklı piropitoz ile SEMA3A ekspresyonundaki azalmanın yanı sıra, miyelin PLP ekspresyonundaki artmanın katkıda bulunabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Lipopolisakkarit; Nekrostatin-1s; Enflamatuvar hiperaljezi; Nekropitoz; Demiyelinizasyon; Remiyelinizasyon

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE CONTRIBUTION OF RIPK1/RIPK3/MLKL NECROSOME TO INFLAMMATORY HYPERALGESIA INDUCED BY LIPOPOLYSACCHARIDE IN MICE

In this thesis, by using the selective receptor-interacting serine/threonine-protein kinase (RIPK) 1 inhibitor necrostatin (Nec)-1s, the contribution of RIPK1/RIPK3/*mixed lineage kinase domain like pseudokinase*; MLKL) necrosome to inflammatory hyperalgesia induced by lipopolysaccharide (LPS) was investigated. Mice were divided into 8 groups: (1) saline, (2) LPS, (3) saline and dimethyl sulfoxide, (4) saline and Nec-1s (0.01 mg/kg), (5) LPS and Nec-1s (0.001 mg/kg), (6) LPS and Nec-1s (0.01 mg/kg), (7) LPS and Nec-1s (0.1 mg/kg), and (8) LPS and Nec-1s (1 mg/kg). Nec-1s (10 ml/kg) was administered simultaneously with saline (10 ml/kg) or LPS (10 mg/kg) intraperitoneally. Reaction time to thermal stimuli within 60 seconds was evaluated in mice that received either saline or LPS after 6 hours. At the end of the experiments, the brains and spinal cords of the mice were removed after they were killed. In tissue homogenate supernatants prepared from brains and spinal cords, expression of β -tubulin, toll-like receptor (TLR4), RIPK1, phosphorylated RIPK1, RIPK3, phosphorylated RIPK3, MLKL, phosphorylated MLKL, high-mobility-group-box (HMGB1), caspase-11 p20, p30-gasdermin D (GSDMD), interleukin (IL)-1 β , semaphorin (SEMA) 3A, and myelin proteolipid protein (PLP) proteins was measured by using the immunoblotting method. It was observed that LPS-induced decrease in the response time of mice to thermal stimulation was prevented with Nec-1s only at a dose of 0.01 mg/kg. When Nec-1s was injected at the lowest effective dose (0.01 mg/kg), it prevented the increase induced by LPS in expression of TLR4, phosphorylated RIPK1, phosphorylated RIPK3, phosphorylated MLKL, HMGB1, caspase-11 p20, p30-GSDMD, IL-1 β , and SEMA3A as well as decreased expression of myelin PLP. These results suggested that suppression of the RIPK1/RIPK3/MLKL necrosome-mediated necroptosis, caspase-11/GSDMD-mediated pyroptosis, and SEMA3A expression, in addition to increased expression of myelin PLP in the central nervous system contributes to the preventive effect of Nec-1s on inflammatory hyperalgesia mediated by the LPS/TLR4 pathway.

Keywords: Lipopolysaccharide; Necrostatin-1s; Inflammatory hyperalgesia; Necroptosis; Demyelination; Remyelination

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim boyunca sabır ve nezaketi ile benimle bilgi ve deneyimlerini paylaşan, her aşamada ilgi ve özveriyle desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince bilgilerini ve deneyimlerini paylaşmaktan çekinmeyen Sayın Prof. Dr. Seyhan ŞAHAN FIRAT ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Nihal SARI hocalarıma çok teşekkür ederim.

Laboratuvar deneylerim boyunca yanımda olup çalışmalarım sırasında gösterdikleri yakın ilgi ve yardımlarından dolayı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Şefika Pınar ŞENOL'a, Sayın Dr. Ecz. Dilşah Ezgi YILMAZ'a, Sayın Uzm. Ecz. Ömer BAHÇELİ'ye, Sayın Uzm. Ecz. Beyza Özgen'e ve Sayın Ecz. Zainab Ali Mohamud SABRİE'ye çok teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde beni destekleyen canım aileme ve canım arkadaşım Ecz. Büşra ŞEN'e çok teşekkür ederim.



Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2021-1-TP2-4395).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLOLAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR ve SİMGELER	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	7
2.1. Enflamatuvar Hiperaleji	7
2.2. RIPK1/RIPK3/MLKL Nekrozomu Aracılıklı Nekropitoz	21
2.2.1. Özellikleri	21
2.2.2. Düzenlenmesi	22
2.2.3. Enflamatuvar Hastalıkların Patojenezindeki Rolü	25
2.3. Kaspaz-11/GSDMD Aracılıklı Piropitoz	25
2.3.1. Özellikleri	25
2.3.2. Düzenlenmesi	28
2.3.3. Enflamatuvar Hastalıkların Patojenezindeki Rolü	35
2.4. SEMA3A	37
2.4.1. Özellikleri	37
2.4.2. Ekspresyonunun Düzenlenmesi	40
2.4.3. Enflamatuvar Hastalıkların Patojenezindeki Rolü	40
2.5. Miyelin PLP	40
2.5.1. Özellikleri	40
2.5.2. Ekspresyonunun Düzenlenmesi	42
2.5.3. Enflamatuvar Hastalıkların Patojenezindeki Rolü	42
3. MATERYAL ve YÖNTEM	43
3.1. Materyal	43
3.1.1. Etik Kurul Onayı	43
3.1.2. Deney Hayvanı	43
3.1.3. Sarf Malzemesi	43

	Sayfa
3.1.4. Teçhizat	45
3.2. Yöntem	46
3.2.1. Enflamatuvar Hiperaleji Modeli	46
3.2.2. Doku Homojenati Süpernatantlarının Hazırlanması	47
3.2.3. Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda Toplam Protein Düzeyinin Ölçülmesi	47
3.2.4. β -Tübülin, TLR4, RIPK1, Fosforile RIPK1, RIPK3, Fosforile RIPK3, MLKL, Fosforile MLKL, HMGB1, Kaspaz-11 p20, p30-GSDMD, IL-1 β , SEMA3A ve Miyelin PLP Protein Ekspresyonunun Ölçülmesi	47
3.2.5. Verilerin Analizi ve Sonuçların Yorumlanması	49
4. BULGULAR	52
4.1. Mortalite	52
4.2. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Termal Uyarıya Tepki Verme Süreleri Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi	52
4.3. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyinleri ve Omuriliklerinde β -Tübülin Protein Ekspresyonu Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi	53
4.4. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyinleri ve Omuriliklerinde TLR4 Protein Ekspresyonu Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi	54
4.5. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyinleri ve Omuriliklerinde RIPK1 Protein Ekspresyonu Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi	56
4.6. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyinleri ve Omuriliklerinde RIPK3 Protein Ekspresyonu Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi	56
4.7. Kontrol ve Endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde MLKL Protein Ekspresyonu Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi	58
4.8. Kontrol ve Endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde HMGB1 Protein Ekspresyonu Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi	60
4.9. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyinleri ve Omuriliklerinde IL-1 β Protein Ekspresyonu Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi	63
4.10. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyinleri ve Omuriliklerinde Kaspaz-11 p20 Protein Ekspresyonu Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi	65
4.11. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyinleri ve Omuriliklerinde p30-GSDMD Protein Ekspresyonu Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi	66
4.12. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyinleri ve Omuriliklerinde SEMA3A Protein Ekspresyonu Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi	68
4.13. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyinleri ve Omuriliklerinde miyelin PLP Protein Ekspresyonu Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi	69
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	71
KAYNAKLAR	76
EKLER (Etik Kurul Onay Belgesi)	98
ÖZGEÇMİŞ	102

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Akut ve kronik/sürekli ağrının başlıca özellikleri	9
Tablo 3.1. β -Tübülin, TLR4, RIPK1, fosforile RIPK1, RIPK3, fosforile RIPK3, MLKL, fosforile MLKL, HMGB1, kaspaz-11 p20, p30-GSDMD, IL-1 β , SEMA3A ve miyelin PLP protein ekspresyonunun ölçülmesinde kullanılan antikörlerin özellikleri	50
Tablo 4.1. Kontrol ve endotoksemik farelerin termal uyarıya tepki verme süreleri üzerinde Nec-1s'nin etkisi	52
Tablo 4.2. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde β -tübülin protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi	54
Tablo 4.3. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde TLR4 protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi	55
Tablo 4.4. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde RIPK1 protein ekspresyonu ve fosforilasyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi	57
Tablo 4.5. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde RIPK3 protein ekspresyonu ve fosforilasyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi	59
Tablo 4.6. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde MLKL protein ekspresyonu ve fosforilasyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi	61
Tablo 4.7. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde HMGB1 protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi	62
Tablo 4.8. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde IL-1 β protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi	64
Tablo 4.9. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde kaspaz-11 p20 protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi	65
Tablo 4.10. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde p30-GSDMD protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi	67
Tablo 4.11. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde SEMA3A protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi	68
Tablo 4.12. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde miyelin PLP protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Ağrının gruplandırılması ve temel özellikleri	8
Şekil 2.2. Ağrının nosisepsiyonundaki dönemler	10
Şekil 2.3. Sıçanlarda sistemik yoldan LPS uygulanmasının ardından allodini ve hiperaljezi ile sonuçlanan olaylara etkinleştirilmiş mikrogliyal ve astrositlerin katkısı	12
Şekil 2.4. Farelere sistemik yoldan LPS uygulanmasının ardından gelişen TLR4/MyD88'e bağımlı pro-enflamatuvar ve antiapoptotik sinyal ileti yolunun aracılık ettiği enflamatuvar hiperaljeziye RXR α 'nın katkısı	13
Şekil 2.5. Farelere sistemik yoldan LPS uygulanmasının ardından gelişen TLR4/MyD88/TAK1/NF- κ B yolunun aracılık ettiği enflamatuvar hiperaljeziye RXR α 'nın katkısı	14
Şekil 2.6. Farelere sistemik yoldan LPS uygulanmasının ardından gelişen enflamatuvar hiperaljeziye RIPK1/RIPK3/MLKL nekrozomunun katkısı	15
Şekil 2.7. Farelere sistemik yoldan LPS uygulanmasının ardından gelişen enflamatuvar hiperaljeziye NLRP3 inflamazomunun katkısı	16
Şekil 2.8. Farelere sistemik yoldan LPS uygulanmasının ardından gelişen enflamatuvar hiperaljeziye sEH'in katkısı	17
Şekil 2.9. Farelere sistemik yoldan LPS uygulanmasının ardından gelişen TRAF6/IKK/NF- κ B yolunun aracılık ettiği enflamatuvar hiperaljeziye NLRX1'in katkısı	18
Şekil 2.10. Farelere sistemik yoldan LPS uygulanmasının ardından gelişen TLR4/MyD88/PKC/I κ B yolu aracılıklı enflamatuvar hiperaljeziye TRPV1'in katkısı	19
Şekil 2.11. Farelere sistemik yoldan LPS uygulanmasının ardından gelişen TLR4/MyD88/TRAF6/TAK1/NF- κ B yolu aracılıklı nöroenflamasyon ve enflamatuvar hiperaljeziye MrgprD'nin katkısı	20
Şekil 2.12. RIPK'lerin yapısal özellikleri	21
Şekil 2.13. RIPK1/RIPK3 aracılıklı programlanmış hücre ölümü yolları	23
Şekil 2.14. Patojenin algılanmasına yanıt olarak RIPK1/RIPK3'ün rol oynadığı enflamatuvar yollar	24
Şekil 2.15. Memeli kaspazlarının yapısal ve işlevsel özellikleri	26
Şekil 2.16. Kaspaz-11'in yapısı ve LPS ile etkileşmesinin ardından gelişen olaylar	27
Şekil 2.17. Kaspaz-11'in yapısal alanları	27
Şekil 2.18. Gasderminlerin özellikleri	29
Şekil 2.19. Klasik ve klasik olmayan inflamazomlar tarafından GSDMD'nin etkinleşmesinin ardından gelişen ve piropitoz ile NEToz ile sonuçlanan olaylar	30
Şekil 2.20. Piropitozu tetiklemek üzere gasdermin ailesini etkinleştiren çeşitli etkenler	31
Şekil 2.21. Kaspaz-11'in ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan PAMP'lar ve/veya sitokinlerin aracılık ettiği sinyal ileti yolları	33
Şekil 2.22. Klasik olmayan inflamazom etkinleşmesi sonucunda gelişen piropitozda kaspaz-11/GSDMD'nin rolü	34

	Sayfa
Şekil 2.23. LPS ile uyarılmanın ardından kaspaz-11/GSDMD aracılıklı piropitozda gelişen olaylar	35
Şekil 2.24. Kaspaz-11'in efektör işlevleri	36
Şekil 2.25. Semaforinler ve ilişkili reseptörleri arasındaki etkileşimler	38
Şekil 2.26. Çeşitli semaforinler ve reseptörlerinin demiyelinizasyondaki rolüne ilişkin mekanizmalar	39
Şekil 2.27. Miyelin kılıfının yapısı ve PLP'nin yerleşimi	41
Şekil 2.28. Fare PLP/DM20 geninin yapısı	41
Şekil 4.1. Kontrol ve endotoksemik farelerin termal uyarıya tepki verme süreleri üzerinde Nec-1s'nin etkisi	53
Şekil 4.2. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde TLR4 protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi	55
Şekil 4.3. Kontrol ve endotoksemik farelerin (A) beyinleri ve (B) omuriliklerinde RIPK1 protein ekspresyonu ve fosforilasyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi	58
Şekil 4.4. Kontrol ve endotoksemik farelerin (A) beyinleri ve (B) omuriliklerinde RIPK3 protein ekspresyonu ve fosforilasyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi	60
Şekil 4.5. Kontrol ve endotoksemik farelerin (A) beyinleri ve (B) omuriliklerinde MLKL protein ekspresyonu ve fosforilasyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi	62
Şekil 4.6. Kontrol ve endotoksemik farelerin (A) beyinleri ve (B) omuriliklerinde HMGB1 protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi	63
Şekil 4.7. Kontrol ve endotoksemik farelerin (A) beyinleri ve (B) omuriliklerinde IL-1 β protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi	64
Şekil 4.8. Kontrol ve endotoksemik farelerin (A) beyinleri ve (B) omuriliklerinde kaspaz-11 p20 protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi	66
Şekil 4.9. Kontrol ve endotoksemik farelerin (A) beyinleri ve (B) omuriliklerinde p30-GSDMD protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi	67
Şekil 4.10. Kontrol ve endotoksemik farelerin (A) beyinleri ve (B) omuriliklerinde SEMA3A protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi	69
Şekil 4.11. Kontrol ve endotoksemik farelerin (A) beyinleri ve (B) omuriliklerinde miyelin PLP protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi	70
Şekil 5.1. Farelerde LPS ile oluşturulan enflamatuvar hiperaljezi modelinde, Nec-1s'nin TLR4 aracılığıyla gelişen RIPK1/RIPK3/MLKL nekrozomu aracılıklı nekropitoz ve kaspaz-11/GSDMD aracılıklı piropitozun yanı sıra, demiyelinizasyon ve remiyelinizasyona ilişkin olaylar üzerindeki etkisi ile ilgili olarak önerilen mekanizma	72

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
α	Alfa (<i>Alpha</i>)
β	Beta (<i>Beta</i>)
δ	Delta (<i>Delta</i>)
ϵ	Epsilon (<i>Epsilon</i>)
γ	Gama (<i>Gamma</i>)
κ	Kapa (<i>Kappa</i>)
aa	Amino asit (<i>Amino acid</i>)
ACS	Apoptozla ilişkili nokta benzeri protein içeren bir kaspaz biriktirici alan (<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain</i>)
AIM	<i>Absent in melanoma</i>
Aip	Aktin ile ilişkili protein (<i>Actin interacting protein</i>)
AP	Etkinleştirici protein (<i>Activator protein</i>)
ARM	<i>Armadillo</i>
ASC	Apoptozla ilişkili nokta benzeri protein içeren bir kaspaz biriktirici alan (<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain</i>)
ATP	Adenozin trifosfat (<i>Adenosine triphosphate</i>)
BBB	Kan-beyin engeli (<i>Blood-brain barrier</i>)
Bcl	B hücresi lenfoma protein (<i>B-cell lymphoma protein</i>)
C ucu	Karboksil ucu (<i>Carboxyl terminal; C-terminal</i>)
C3aR	C3a reseptörü (<i>C3a receptor</i>)
Ca ⁺⁺	Kalsiyum iyonu (<i>Calcium ion</i>)
Ca ²⁺	Kalsiyum iyonu (<i>Calcium ion</i>)
CARD	Kaspaz biriktirici ve etkinleştirici alan (<i>Caspase-recruitment and activation domain</i>)
Casp	Kaspaz (<i>Caspase</i>)
cbp	Siklik adenozin monofosfat yanıt elementi bağlayıcı proteini bağlayıcı protein (<i>Cyclic adenosine monophosphate-response element binding protein-binding protein</i>)
CCL	Kemokin (C-C) motif ligandı (<i>Chemokine [C-C motif] ligand</i>)
CD	Farklılaşma kümesi (<i>Cluster of differentiation</i>)

Kısaltma/Simgesi	Tanım
CDL	Kaspaz biriktirici ve etkinleştirici alan alanı bağlayıcı bölge (<i>Caspase-recruitment and activation domain domain linker region</i>)
c-FLIP	Hücrel Fas ile ilişkili ölüm alanı benzeri interlökin-1 β dönüştürücü enzim inhibitör protein (<i>Cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1β-converting enzyme-inhibitory protein</i>)
cIAP	Apopitozun hücrel inhibitörü (<i>Cellular inhibitor of apoptosis</i>)
CNS	Santral sinir sistemi (<i>Central nervous system</i>)
COR	Kompleks proteinlerin Ras'ın C ucu (<i>C-Terminal of Ras of complex proteins</i>)
COX	Siklooksijenaz (<i>Cyclooxygenase</i>)
CREB	Siklik adenzin monofosfat yanıt elementi bağlayıcı protein (<i>Cyclic adenosine monophosphate-response element binding protein</i>)
CYLD	Silindromatöz (<i>Cylindromatosis</i>)
CYP	Sitokrom P450 (<i>Cytochrome P450</i>)
DAI	Deoksiribonükleik aside bağımlı interferon düzenleyici faktör (<i>Deoxyribonucleic acid-dependent activator of interferon regulatory factor</i>)
DAMP	Zedelenmeyle ilişkili moleküler kalıp (<i>Damage-associated molecular pattern</i>)
DAMPs	Zedelenmeyle ilişkili moleküler kalıplar (<i>Damage-associated molecular patterns</i>)
DAP	DNAX etkinleştirici protein (<i>DNAX-activating protein</i>)
DC	Dentritik hücre (<i>Dendritic cell</i>)
DED	Ölüm efektör alanı (<i>Death effector domain</i>)
DFU	5,5-Dimetil-3-(3-florofenil)-4-(4-metilsülfonil)fenil-2(5H)-furanon
DHET	Dihidroksieikozatrienoik asit (<i>Dihydroxyeicosatrienoic acid</i>)
DMF	Dimetil fumarat (<i>Dimethyl fumarate</i>)
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dsDNA	Çift sarmallı deoksiribonükleik asit (<i>Double-stranded deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Ditiyotreytol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eCIRP	Ekstraselüler soğukla indüklenebilen ribonükleik asit bağlayıcı protein (<i>Extracellular cold-inducible ribonucleic acid-binding protein</i>)
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EET	Epoksieikozatrienoik asit (<i>Epoxyeicosatrienoic acid</i>)
ELANE	Nötrofil elastaz (<i>Neutrophil elastase</i>)

Kısaltma/Simgesi	Tanım
eNOS	Endotelial nitrik oksit sentaz (<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>)
ERK	Ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz (<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>)
ESCRT	Taşıma için gerekli endozomal sıralama kompleksi (<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>)
ESCRT	Taşıma için gerekli endozomal sıralama kompleksi (<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>)
F	Fosforilasyon; fosforile
FADD	Fas ile ilişkili ölüm alanı (<i>Fas-associated death domain</i>)
FVIIa	Pıhtılaşma faktörü VIIa (<i>Coagulation factor VIIa</i>)
Fx	Pıhtılaşma faktörü X (<i>Coagulation factor X</i>)
GAP	Guanozin trifosfataz etkinleştirici protein (<i>Guanosine triphosphatase activating protein</i>)
GBPs	Guanilat bağlayıcı proteinler (<i>Guanylate binding proteins</i>)
GPI	Glikozil-fosfatidil inozitol (<i>Glycosyl-phosphatidylinositol</i>)
GSDMA	Gasdermin A (<i>Gasdermin A</i>)
GSDMB	Gasdermin B (<i>Gasdermin B</i>)
GSDMC	Gasdermin C (<i>Gasdermin C</i>)
GSDMD	Gasdermin D (<i>Gasdermin D</i>)
GSDMD-C	Gasdermin D'nin C ucu (<i>C-Terminal gasdermin-D</i>)
GSDMD-N	Gasdermin D'nin N ucu (<i>N-Terminal gasdermin-D</i>)
GSDMD ^{NT}	Gasdermin D'nin N ucu (<i>N-Terminal gasdermin-D</i>)
GSDMD-NT	Gasdermin D'nin N ucu (<i>N-Terminal gasdermin-D</i>)
GSDME	Gasdermin E (<i>Gasdermin E</i>)
GTPase	Guanozin trifosfataz (<i>Guanosine triphosphatase</i>)
HCl	Hidroklorik asit (<i>Hydrochloric acid</i>)
HIV	İnsan bağışıklık yetersizliği virüsü (<i>Human immunodeficiency virus</i>)
HMGB	<i>High-mobility-group-box</i>
IASP	Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği (<i>International Association for the Study of Pain</i>)
IAV	Enflüanza A virüsü (<i>Influenza A virus</i>)
IDL	Alanlar arası bağlayıcı bölge (<i>Inter-domain linker region</i>)
IFN	İnterferon (<i>Interferon</i>)
IFNAR	İnterferon- α/β reseptörü (<i>Interferon-α/β receptor</i>)

Kısaltma/Simge	Tanım
IKK	κ B kinase inhibitörü (<i>Inhibitor of κB kinase</i>)
IKKs	κ B kinase inhibitörleri (<i>Inhibitors of κB kinase</i>)
IL	İnterlökin (<i>Interleukin</i>)
IL-1R	İnterlökin-1 reseptörü (<i>Interleukin-1 receptor</i>)
IPT	Pleksinler ve transkripsiyon faktörleri tarafından paylaşılan immüoglobulin benzeri alanlar (<i>Immunoglobulin-like domains shared by plexis and transcription factors</i>)
IRAK	İnterlökin-1 reseptörü ile ilişkili kinaz (<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>)
IRF	İnterferon düzenleyici faktör (<i>Interferon regulatory factor</i>)
IRGB	İmmünite ile ilişkili guanozin trifosfataz aile üyesi b10 (<i>Immunity-related guanosine triphosphatase family member b10</i>)
ISGF	İnterferon ile uyarılan büyüme faktörü (<i>Interferon stimulated growth factor</i>)
I κ B	κ B inhibitörü (<i>Inhibitor of κB</i>)
i.p.	İntraperitoneal
i.v.	İntravenöz
İ/R	İskemi/reperfüzyon
İ/R	İskemi/reperfüzyon
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (<i>Inducible nitric oxide synthase</i>)
JAK	Janus kinaz (<i>Janus kinase</i>)
JNK	c-Jun N-terminal kinaz (<i>c-Jun N-terminal kinase</i>)
K ⁺	Potasyum iyonu (<i>Potassium ion</i>)
K48 U	K48 ile bağlantılı ubikuitinlenmiş (<i>K48-linked ubiquitinated</i>)
K63 U	K63 ile bağlantılı ubikuitinlenmiş (<i>K63-linked ubiquitinated</i>)
KCl	Potasyum klorür (<i>Potassium chloride</i>)
kDa	Kilodalton
Kgp	Lizine özgü proteaz gingipain (<i>Lysine-specific protease gingipain</i>)
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat (<i>Potassium dihydrogenphosphate</i>)
L	Uzun form (<i>Long form</i>)
LBP	Lipopolisakkarit bağlayıcı protein (<i>Lipopolysaccharide-binding protein</i>)
LMP	Latent membran protein (<i>Latent membrane protein</i>)
L-NAME	N ^G -Nitro-L-arjinin metil ester
LPS	Lipopolisakkarit (<i>Lipopolysaccharide</i>)
LRR	Lösinden zengin yinelenen (<i>Leucine rich repeat</i>)

Kısaltma/Simgesi	Tanım
LRRs	Lösinden zengin yinelenenler (<i>Leucine rich repeats</i>)
LS	Büyük alt birim (<i>Large subunit</i>)
LUBAC	Doğrusal ubiikitin zincir montaj kompleksi (<i>Linear ubiquitin chain assembly complex</i>)
MAPK	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz (<i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
MAVS	Mitokondriyal antiviral sinyalleyici proteinler (<i>Mitochondrial antiviral signaling proteins</i>)
MBP	Miyelin temel protein (<i>Myelin basic protein</i>)
MCC950	N-[[[(1,2,3,5,6,7-hekzahidro-s-indasen-4-il)amino]karbonil]-4-(1-hidroksi-1-metiletil)-2-furansülfonamid (<i>N-[[[(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)amino]carbonyl]-4-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2-furansulfonamide</i>)
MD	Miyeloid farklılaşma (<i>Myeloid differentiation</i>)
MDA	Melanom farklılaşması ile ilişkili protein (<i>Melanoma differentiation-associated protein</i>)
MEK	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz (<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>)
Mg ⁺⁺	Magnezyum iyonu (<i>Magnesium ion</i>)
Mg ²⁺	Magnezyum iyonu (<i>Magnesium ion</i>)
MHC	Majör doku uygunluk kompleksi (<i>Major histocompatibility complex</i>)
MKK	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz (<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>)
MKKs	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinazlar (<i>Mitogen-activated protein kinase kinases</i>)
MLKL	Karışık kökenli kinaz benzeri psöodokinaz (<i>Mixed lineage kinase domain-like pseudokinase</i>)
MrgprD	Mas ile ilişkili G proteini ile kenetli reseptör D (<i>Mas-related G protein-coupled receptor D</i>)
mRNA	Ulak ribonükleik asit (<i>Messenger ribonucleic acid</i>)
MRSA	Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
mtDNA	Mitokondriyal deoksiribonükleik asit (<i>Mitochondrial deoxyribonucleic acid</i>)
mtROS	Mitokondriyal reaktif oksijen türleri (<i>Mitochondrial reactive oxygen species</i>)
MyD	Miyeloid farklılaşma faktörü (<i>Myeloid differentiation factor</i>)
MYD	Miyeloid farklılaşma faktörü (<i>Myeloid differentiation factor</i>)

Kısaltma/Simge	Tanım
n	Fare sayısı
N ucu	Amino ucu (<i>Amino terminal; N-terminal</i>)
Na ⁺	Sodyum iyonu (<i>Sodium ion</i>)
NACHT	Santral nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alanı (<i>Central nucleotide-binding oligomerization domain</i>)
NaCl	Sodyum klorür (<i>Sodium chloride</i>)
Nav	Voltaj kapılı sodyum kanalı (<i>Voltage-gated sodium channel</i>)
Nec	Nekrostatin (<i>Necrostatin</i>)
NEK	<i>Never in mitosis gene A</i> ile ilişkili kinaz (<i>Never in mitosis gene A-related kinase</i>)
NEMO	Nükleer faktör κ B esansiyel düzenleyicisi (<i>Nuclear factor κB essential modulator</i>)
NF	Nükleer faktör (<i>Nuclear factor</i>)
N-GSDMD	Gasdermin D'nin N ucu (<i>N-Terminal gasdermin-D</i>)
NLR	Nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alanı benzeri reseptör (<i>Nucleotide binding oligomerization domain-like receptor</i>)
NLRC	Kaspaz biriktirici ve etkinleştirici alan içeren nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alanı benzeri reseptör (<i>Caspase-recruitment and activation domain containing nucleotide binding oligomerization domain-like receptor</i>)
NLRP	Nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alan benzeri, lösinden zengin yinelenen ve pirin alanı içeren (<i>Nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing</i>)
NLRX	Nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alanı benzeri reseptör X (<i>Nucleotide binding oligomerization domain-like receptor X</i>)
NMDA	N-Metil-D-aspartik asit (<i>N-Methyl D-aspartic acid</i>)
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz (<i>Neuronal nitric oxide synthase</i>)
NO	Nitrik oksit (<i>Nitric oxide</i>)
NOX	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz (<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase</i>)
Nrp	Nöröpinin (<i>Neuropilin</i>)
Nsp	Yapısal olmayan protein (<i>Non-structural protein</i>)
O ₂	Moleküler oksijen (<i>Molecular oxygen</i>)
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali (<i>Superoxide radical</i>)
ODC	Oligodendrosit (<i>Oligodendrocyte</i>)

Kısaltma/Simgesi	Tanım
OLG	Oligodendrosit (<i>Oligodendrocyte</i>)
OMV	Dış membran vezikülü (<i>Outer membrane vesicle</i>)
OPC	Oligodendrosit projenitör hücre (<i>Oligodendrocyte progenitor cell</i>)
P	İstatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi (<i>Probability</i>)
P	Fosforilasyon; fosforile (<i>Phosphorylation; phosphorylated</i>)
P2X7R	Pürinerjik reseptör P2X 7 (<i>Purinergic receptor P2X 7</i>)
p30-GSDMD	Kaspaz-11 tarafından bölünen piropitotik delik oluşturuucu protein gasdermin D'nin N ucu p30 fragmanı
PAMP	Patojen ilişkili moleküler kalıp (<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>)
PF	Paeoniflorin (<i>Paeoniflorin</i>)
PFT	Delik oluşturuucu toksin (<i>Pore-forming toxin</i>)
PG	Prostaglandin
pH	Hidrojen iyonu derişiminin negatif logaritması
PI3K	Fosfoinozotit 3-kinaz (<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>)
PJVK	Pejvakin, DFNB59
PKC	Protein kinaz C (<i>Protein kinase C</i>)
PLC	Fosfolipaz C (<i>Phospholipase C</i>)
PLP	Proteolipit protein (<i>Proteolipid protein</i>)
PLP1	Proteolipit protein 1 geni (<i>Proteolipid protein 1 gene</i>)
PNS	Periferik sinir sistemi (<i>Peripheral nervous system</i>)
PON	Peroksinitrit (<i>Peroxyinitrite</i>)
PPAR	Peroksizom proliferatör ile etkinleştirilen reseptör (<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
PPRE	Peroksizom proliferatör ile etkinleştirilen reseptör yanıt elementi (<i>Peroxisome proliferator-activated receptor response element</i>)
PR	Proteaz (<i>Protease</i>)
PS	Fosfatidilserin (<i>Phosphatidylserine</i>)
PSI	Pleksin-semaforin-integrin (<i>Plexin-semaphorin-integrin</i>)
PSS	Periferik sinir sistemi (<i>Peripheral nervous system</i>)
PYD	Pirin alanı (<i>Pyrene domain</i>)
RHIM	Reseptör ile etkileşen protein homotipik etkileşme motifi (<i>Receptor-interacting protein homotypic interaction motif</i>)
RIG	Retinoik asit ile indüklenebilir gen (<i>Retinoic acid-inducible gene</i>)
rIL	Rekombinant interlökin (<i>Recombinant interleukin</i>)

Kısaltma/Simge	Tanım
RIP	Reseptör ile etkileşen protein (<i>Receptor-interacting protein</i>)
RIPK	Reseptör ile etkileşen serin/treonin protein kinaz (<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase</i>)
RNA	Ribonükleik asit (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNAi	Ribonükleik asit interferans (<i>Ribonucleic acid interference</i>)
Roc	Kompleks proteinlerin Ras'ı (<i>Ras of complex proteins</i>)
Ros	<i>Ras-of-complex</i>
RXR	Retinoit X reseptörü (<i>Retinoid X receptor</i>)
S	Kısa form (<i>Short form</i>)
SARS	Şiddetli akut solunum sendromu (<i>Severe acute respiratory syndrome</i>)
SDS	Sodyum dodesil fosfat
sEH	Çözünebilir epoksit hidrolaz (<i>Soluble epoxide hydrolase</i>)
SEMA	Semaforin (<i>Semaphorin</i>)
Sema	Semaforin (<i>Semaphorin</i>)
Ser	Serin (<i>Serine</i>)
SF	Serum fizyolojik
SIRS	Sistemik enflamatuvar yanıt sendromu (<i>Systemic inflammatory response syndrome</i>)
sr-DM20	Soma kısıtlı DM20 (<i>soma-restricted DM20</i>)
sr-PLP	Soma kısıtlı proteolipit protein (<i>Soma-restricted proteolipid protein</i>)
SS	Küçük alt birim (<i>Small subunit</i>)
SSA	Sığır serum albümini
ssRNA	Tek sarmallı ribonükleik asit (<i>Single-stranded ribonucleic acid</i>)
SSS	Santral sinir sistemi
STAT	Transkripsiyonun sinyal ileticisi ve etkinleştiricisi (<i>Signal transducer and activator of transcription</i>)
TAK	Dönüştürücü büyüme faktörü β ile etkinleştirilen kinaz (<i>Transforming growth factor β-activated kinase</i>)
TBK	Tümör nekrozlaştırıcı faktör reseptörü ile ilişkili faktör nükleer faktör κB etkinleştiricisi bağlayıcı kinaz (<i>Tumor necrosis factor receptor family member associated nuclear factor κB activator-binding kinase</i>)
TCR	T hücresi reseptörü (<i>T cell receptor</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilediamin (<i>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine</i>)
TF	Doku faktörü (<i>Tissue factor</i>)

Kısaltma/Simgesi	Tanım
TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü (<i>Transforming growth factor</i>)
Th	Yardımcı T (<i>T helper</i>)
TIM	T hücresi immünoglobulin ve müsin alanı (<i>T-Cell immunoglobulin and mucin domain</i>)
TIRAP	<i>Toll</i> -interlökin-1 reseptör alan içeren adaptör protein (<i>Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein</i>)
TLR	<i>Toll</i> benzeri reseptör (<i>Toll-like receptor</i>)
TMEM	Transmembran (<i>Transmembrane</i>)
TNF	Tümör nekrozlaştırıcı faktör (<i>Tumor necrosis factor</i>)
TNFR	Tümör nekrozlaştırıcı faktör reseptörü (<i>Tumor necrosis factor receptor</i>)
TPPU	(<i>Trifluoromethoxyphenyl-3-(1-propionylpiperidin-4-yl)urea</i>)
TRADD	Tümör nekrozlaştırıcı faktör reseptörü tip 1 ile ilişkili ölüm alanı (<i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein</i>)
TRAF	Tümör nekrozlaştırıcı faktör reseptörü ile ilişkili faktör (<i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor</i>)
TRAM	<i>Toll</i> -interlökin-1 reseptör alan içeren adaptör indükleyici interferon- β ile ilişkili adaptör molekül (<i>Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon-β-related adaptor molecule</i>)
TREM	Miyeloid hücresi üzerinde eksprese edilen tetikleyici reseptör (<i>Triggering receptor expressed on myeloid cell</i>)
TRIF	<i>Toll</i> -interlökin-1 reseptör alan içeren adaptör indükleyici interferon- β (<i>Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>)
TRPV	Geçici reseptör potansiyel vanilloit (<i>Transient receptor potential vanilloid</i>)
TTC	Tris tampon çözeltisi
Tyr	Tirozin (<i>Tyrosine</i>)
Ub	Ubikuitilasyon (<i>Ubiquitylation</i>)
WD	WD40/beta-transdusin yinelenmeleri (<i>WD40/beta-transducin repeats</i>)
YKTS	Yağsız kurutulmuş süt tozu (<i>Non-fat dry milk</i>)
yNOS	Yapısal nitrik oksit sentaz
YopJ	<i>Yersinia</i> dış proteini J (<i>Yersinia outer protein-J</i>)
ZBP	Z-Deoksiribonükleik asit bağlayıcı protein (<i>Z-Deoxyribonucleic acid-binding protein</i>)

1. GİRİŞ

Bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) ile oluşturulan deneysel endotoksemi modeli birçok antienflamatuvar ve analjezik ilacın etkisini araştırmak için model olarak sıklıkla kullanılmaktadır [1-3]. Ayrıca, LPS'nin termal uyarılara yanıt olarak, supraspinal ve spinal düzeylerde algılanan sıcak zemin testi ile değerlendirildiğinde, supraspinal düzeyde kontrol edildiği ileri sürülen akut ağrıyı artırdığı bildirilmiştir [4, 5]. LPS'nin neden olduğu hiperaljeziye beynin bazı bölgeleri ile omurilik düzeyinde oluşturduğu değişiklikler katkıda bulunmaktadır [6-11].

LPS immün yanıt oluşumunda rol oynayan periferik sinir sistemi ile santral sinir sistemi (SSS)'deki hücrelerin membranlarında bulunan reseptör proteini olan *toll* benzeri reseptör (*toll-like receptor*; TLR) 4'e bağlanmaktadır. TLR4 sinyal ileti yolu miyeloid farklılaşma birincil yanıt proteini (*myeloid differentiation primary response protein*; MyD88) ve interferon (*interferon*; IFN)- β 'ya bağlı olmak üzere ikiye ayrılmaktadır [10-17]:

(1) MyD88'e bağımlı yolda, *toll*-interlökin (*interleukin*; IL)-1 reseptörü (*IL-1 receptor*; IL-1R) alan içeren adaptör protein (*toll/IL-1R domain-containing adapter protein*; TIRAP) aracılığıyla MyD88'e iletilen uyarı IL-1R ile ilişkili kinaz (*IL-1R-associated kinase*; IRAK), tümör nekrozlaştırıcı faktör (*tumor necrosis factor*; TNF) reseptörü ile ilişkili faktör (*TNF receptor-associated factor*; TRAF), dönüştürücü büyüme faktörü (*transforming growth factor*; TGF) β ile etkinleştirilen kinaz (*TGF β -activated kinase*; TAK) 1, κ B kinaz inhibitörü (*inhibitor of κ B kinase*; IKK) α (IKK1), IKK β (IKK2), IKK γ (IKK3); nükleer faktör (*nuclear factor*; NF)- κ B esansiyel düzenleyicisi (*NF- κ B essential modulator*; NEMO) ve mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz (*mitogen-activated protein kinase*; MAPK)'ler gibi sinyalleme molekülleri (MAPK kinaz [MAPK kinaz; MEK] 1, MAPK kinaz [MAPK kinaz; MKK] 3/6 ve MKK4, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz [extracellular signal-regulated kinase; ERK] 1/2, p38 MAPK ve c-Jun N-terminak kinaz [c-Jun N-terminal kinase (JNK) 1/2]) aracılığıyla NF- κ B ve etkinleştirici protein (*activator protein*; AP)-1 gibi transkripsiyon faktörleri etkinleştirilmektedir. Nükleusa geçen NF- κ B ve AP-1 ise, hiperaljezik mediyatörlerden prostaglandin (PG) E₂ gibi prostaglandinlerin sentezini katalize eden siklooksijenaz (*cyclooxygenase*; COX) enzimleri ile IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu artırarak enflamasyonun oluşmasına ve yayılmasına yol açmaktadırlar.

(2) MyD88'den bağımsız yolda ise, *toll*-IL-1 reseptör alan içeren adaptör indükleyici IFN- β (*toll-IL-1 receptor domain-containing adapter-inducing IFN- β*) tarafından TRAF3 ve reseptör ile etkileşen protein (*receptor-interacting protein*; RIP)-1 etkinleştirilmektedir. TRAF3 ise, sırasıyla, tür 1 IFN'lerin oluşumu ile NF- κ B ve AP-1'in etkinleşmesinden sorumlu transkripsiyon faktörleri IFN düzenleyici faktör (*IFN regulatory factor*) 3 ve RIP-1'in etkinleşmesine neden olmaktadır.

Nekropitoz reseptör ile etkileşen serin/treonin protein kinaz (*receptor-interacting serine/threonine-protein kinase*; RIPK) 1 tarafından etkinleştirilen RIPK3 ve karışık kökenli kinaz benzeri psödokinaz (*mixed lineage kinase domain like pseudokinase*; MLKL)'ye bağımlı, ancak kaspaza bağımlı olmayan, litik türde bir hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır [18-25]. RIPK1/RIPK3/MLKL nekrozomu aracılığıyla nekropitozda plazma membranının zedelenmesi sonucunda yırtılması, hücrenin şişmesi ve parçalanması, enerjinin azalması ve başta *high-mobility-group-box* (HMGB) 1 gibi zedelenmeyle ilişkili moleküler kalıplar olmak üzere sitoplazma içeriğinin salıverilmesi gibi morfolojik/biyokimyasal değişiklikler görülmektedir [23, 26-29]. LPS/TLR4 veya TNF/TRAF sinyal yolunun etkinleşmesi sonucunda ortaya çıkan nekropitoz RIPK1, RIPK3 ve MLKL gibi deubiquitinazlar tarafından pozitif, kaspaz-8, FLICE inhibitör protein ve fas ile ilişkili ölüm alanı tarafından ise negatif yönde düzenlenmektedir [30-32].

Nekropitozun tersine piropitoz, antimikrobiyal yanıtın bir parçası olarak, sıklıkla hücre içi patojenler ile enfeksiyonlarda görülen ileri derecede enflamatuvar özellikte olan litik programlanmış hücre ölümünün bir türüdür. Günümüze dek piropitoza yol açan nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alan benzeri, lösinden zengin yinelenen ve pirin alanı içeren (*nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing*; NLRP) 3/apoptozla ilişkili nokta benzeri protein içeren bir kaspaz biriktirici alan (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*; ASC)/kaspaz-1 inflamazomu aracılığıyla klasik (*canonical*), kaspaz-3/5/11 aracılığıyla klasik olmayan ve kaspaz-3 aracılığıyla olmak üzere 3 değişik yol olduğu bildirilmiştir [33]. Piropitotik ölüm hücreSEL şişme ve yırtılma, parçalanma ve HMGB1, adenosin trifosfat (*adenosine triphosphate*; ATP), deoksiribonükleik asit (*deoxyribonucleic acid*; DNA), mitokondriyal DNA (*mitochondrial DNA*; mtDNA), IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, ekstraselüler soğukla indüklenebilen ribonükleik asit bağlayıcı protein (*extracellular cold-inducible ribonucleic acid-binding protein*; eCIRP) ile ASC noktaları gibi zedelenmeyle ilişkili moleküler kalıp (*damage-associated molecular pattern*; DAMP)'ların salıverilmesi ile sonuçlanmaktadır [18, 21, 24, 34].

RIPK1/RIPK3/MLKL nekrozomunun oluşması ve etkinleşmesine bağlı olarak gelişen nekropitoz başta enfeksiyöz ve nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere enflamasyon ile belirgin çok sayıdaki hastalığın patojenezinde rol oynamaktadır [20, 24, 25, 35-59]. Öte yandan, patojenezinde nekropitozun rol oynadığı bakteriyel sepsis, septik şok ve çoklu organ yetmezliği gibi durumlarda RIPK'leri hedefleyen klinik araştırmaların sayısı azdır [60]. Literatürde LPS'nin farelerde neden olduğu akut sistemik enflamatuvar yanıtlar, akut akciğer ve karaciğer zedelenmesi, sepsis ve septik şok patojenezinde RIPK1/RIPK3/MLKL nekrozomunun rolü olduğunu bildiren az sayıda klinik öncesi *in vivo* çalışma bulunmaktadır [55, 61-69]. Ayrıca, LPS'ye

yanıt olarak SSS'de gelişen enflamasyonun patojenezinde nekropitozun önemli rolü olduğuna ilişkin yapılan *in vivo* çalışmaların sayısı azdır [70-73]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, farelerde oluşturulan letal polimikrobiyal sepsis modelinde, RIPK3 aracılıklı nekropitoz ve gasdermin D (*gasdermin D*; GSDMD) aracılıklı piropitozun sepsis gelişmesine neden olan enflamatuvar sinyalde rol oynadığı ve doku zedelenmesini artırdığı gösterilmiştir [74]. Klinik olarak sepsisi taklit edilebildiği rodentlerde oluşturulan *cecal ligation and puncture* modelinde yapılan bir çalışmada ise, nekropitozun seçici inhibitörü olan nekrostatin (*nekrostatin*; Nec)-1'in sepsisin neden olduğu karaciğer zedelenmesini önlediği gösterilmiştir [75].

LPS veya LPS/D-galaktozamin ile fareler, sıçanlar ve domuzlarda oluşturulan sepsis, septik şok, akut akciğer ve karaciğer zedelenmesi ve nöroenflamasyon modellerinde yapılan çalışmalarda, hücre ölümü ve enflamasyona RIPK1'in katkısının araştırıldığı hastalık modellerinde sıklıkla kullanılan seçici bir nekropitoz inhibitörü Nec-1'in 1, 1.65, 1.8, 5, 10 veya 30 mg/kg intraperitoneal (i.p.) veya 5 mg/kg (transtrakeal) ya da 30 mg/kg intravenöz (i.v.) dozda uygulandığında yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir [61-65, 67-69, 76-80]. Tez konusu ile ilgili olarak rodentlerde yapılan *in vivo* çalışmalardan yalnızca birinde, farelerde LPS ile oluşturulan akut akciğer zedelenmesi modelinde, bronkoalveolar lavaj sıvısında ölçülen proenflamatuvar mediyatör düzeyleri ve NF- κ B etkinliğinin Nec-1 (10 mg/kg; i.p.) ile önlendiği bildirilmiştir [62].

Nec-1'in daha dayanıklı bir varyantı olmasına karşın, Nec-1'e göre çok daha seçici bir RIPK1 inhibitörü olan nekrostatin (*nekrostatin*; Nec)-1s (RIPK1 için ortanca inhibitör derişim değerleri Nec-1 ve Nec-1s için sırasıyla 494 nM ve 210 nM) [81, 82] ile farelerde yapılan *in vivo* çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmaların sonuçları, Nec-1s'nin 0.3, 1.6, 1.65, 2, 4, 6 veya 10 mg/kg (i.p.) ya da 4 mg/kg (i.v.) dozda uygulandığında patojenezinde enflamasyonun rol oynadığı TNF'nin neden olduğu sistemik enflamatuvar yanıt sendromu (*systemic inflammatory response syndrome*; SIRS) ve mortalite, iskemi/reperfüzyon (I/R)'nin neden olduğu miyokardiyal enflamasyon, hepatik enflamasyon, enterokolit, abdominal aortik anevrizma ve romatoid artrit gibi nekropitoz ile ilişkili çeşitli durumlarda yararlı etkileri olabileceğini göstermektedir [76, 82-89]. Ayrıca, Takahashi ve ark. [82] tarafından TNF ile SIRS modeli oluşturulan farelerde yapılan inhibitörlerin düşük ve yüksek (sırasıyla 0.6 ve 6 mg/kg; i.p.) dozlarda kullanıldığı *in vivo* bir çalışmada, paradoksik olarak, Nec-1 ve inhibitör analogu Nec-1i'nin düşük dozda mortaliteye karşı duyarlılaştırdığı, ancak Nec-1s'nin düşük dozda duyarlaştırmamasına ek olarak, yüksek dozda koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir. Nec-1s (30 mg/kg; i.v.) kullanılarak farelerde yapılan *in vivo* bir çalışmada, LPS'in neden olduğu akut sistemik enflamatuvar yanıtlarda RIPK1 ve RIPK3'ün önemli bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır [65]. Newton ve ark. [66] farelerde LPS ile oluşturulan

sepsis, TNF ile oluşturulan SIRS, dekstran sodyum sülfat ile oluşturulan kolit, imikimot ile oluşturulan psöriyaz, serülein ile oluşturulan pankreatit, hipoksi ile oluşturulan serebral ödem, miyokart enfarktüsü, böbrek İ/R ve orta serebral arter oklüzyonu modellerinde yaptıkları çalışmaların sonuçlarına göre, enflamasyon ve doku zedelenmesiyle belirgin nekropitotik hastalıklarda RIPK1'in etkisizleşmesi veya RIP3K eksikliğinden çok, MLKL eksikliğinin daha önemli olduğunu ileri sürmüşlerdir. Öte yandan, Kearney ve ark. [90] L929 hücrelerinde yaptıkları *in vitro* bir çalışmanın sonuçlarına göre, RIPK3'e bağımlı nekropitozu başlatmaktan çok, önlemek yönünde işlev gördüğü sonucuna varmışlardır. Ayrıca, ripoptotik sinyal kompleksi RIPK1/RIPK3 tarafından MLKL'nin aracılık ettiği nekropitozu etkin kaspaz-8'in önlediğine yönelik çalışmalar da bulunmaktadır [91]. Bunlara ek olarak, MLKL ve kaspaz-11/GSDMD tarafından NLRP3/ASC/prokaspaz-1 inflamazomunun etkinleştirilmesi kaspaz-1/GSDMD aracılıklı piropitoz ile sonuçlanmaktadır [92-95]. Öte yandan, literatürde Nec-1s'nin piropitoz üzerindeki etkisine yönelik olarak yapılan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Tez konusu ile ilgili olarak daha önce tarafımızdan yapılan çalışmaların sonuçları ise aşağıda özetlenmiştir:

(1) Farelere LPS (10 mg/kg) uygulanmasından sonra 24 saat içinde serum, böbrek ve akciğer nitrit, 6-keto-PGF_{1α} ve/veya tromboksan B₂ düzeylerindeki artışa mortalitenin eşlik ettiği gözlenmiştir [96-98]. Öte yandan, sıcak zemin testi kullanarak yaptığımız çalışmalarda ise [99], kontrol grubundaki farelere uygulanan termal uyarıdan 6 saat sonra tepki süresi değişmeksizin serum nitrit düzeylerinin arttığı, gerek bazal ağrı duyarlılığının ve gerekse serum nitrit düzeylerinin NF-κB inhibitörü N-asetilserotonin, nitrik oksit (*nitric oxide*; NO) prekürsörü L-arjinin, yapısal NO sentaz (yNOS) inhibitörü N^G-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME), indüklenebilir NO sentaz (iNOS) inhibitörü aminoguanidin, seçici olmayan COX inhibitörü indometasin ve seçici COX-2 inhibitörü 5,5-dimetil-3-(3-florofenil)-4-(4-metilsülfonil)fenil-2(5H)-furanon (DFU) ile değişmediği, öte yandan, poli adenozin difosfat riboz polimeraz sentaz inhibitörü 3-aminobenzamit ile serum nitrit düzeylerinde değişiklik olmaksızın tepki süresinin uzadığı gözlenmiştir. Bunlara ek olarak, LPS uygulanan farelerde N-asetilserotonin, L-arjinin, L-NAME, indometasin, DFU ve 3-aminobenzamit LPS'nin neden olduğu tepki süresindeki kısalmayı önlemişlerdir. Öte yandan, LPS'nin neden olduğu serum nitrit düzeylerindeki azalma N-asetilserotonin, L-arjinin, indometasin, DFU ve 3-aminobenzamit ile önlenmiştir. Ayrıca, LPS'nin neden olduğu serum 6-keto-PGF_{1α} olarak ölçülen PGI₂ düzeylerindeki artma yalnızca L-arjinin ve aminoguanidin ile önlenmiştir. LPS, böbrek nitrit düzeylerinde bir değişiklik oluşturmasa da, kalp, akciğer ve beyin nitrit düzeylerinde neden olduğu azalma N-asetilserotonin, L-arjinin, L-NAME, aminoguanidin, DFU ve 3-aminobenzamit ile

önlenmiştir. Bulgularımız, en azından böbrek, kalp, akciğer ve beyinde yNOS ve/veya iNOS aracılığıyla NO oluşumundaki azalmanın LPS'nin hiperaljezik etkisine katkıda bulunabileceğini, ayrıca NO'nun PGI₂ oluşumunu azaltarak LPS'nin neden olduğu hiperaljeziyi önleyebileceğini düşündürmüştür. Bunlara ek olarak, N-asetilserotonin, L-arjinin, L-NAME, aminoguanidin, DFU ve/veya 3-aminobenzamidin LPS ile azalan sistemik NO oluşumunu önleyen dozlarda kullanıldıklarında, LPS'nin neden olduğu böbrek, kalp, akciğer ve/veya beyinde miyeloperoksidaz etkinliği ve/veya malondialdehit düzeylerindeki azalmayı önledikleri, hatta bazı organlarda kontrol grubuna göre daha da artırdıkları gözlenmiştir. Bulgularımız, LPS'nin neden olduğu nötrofil infiltrasyonu ve lipit peroksidasyonundaki azalmanın NO ile önlenebileceğini göstermiştir.

(2) Hepatik NO oluşumu ile serum TNF- α ve PGE₂ düzeylerindeki azalmanın, ayrıca, beyin ve sistemik dolaşımdaki nitrit düzeylerindeki artma olduğu kadar doku nötrofil infiltrasyonu ve lipit peroksidasyonundaki değişikliklerin, bir TNF- α inhibitörü olan talidomidin LPS'nin neden olduğu hiperaljeziyi önleyici ve COX inhibitörlerinden indometasin, nimesulit ile parasetamolün analjezik etkinliğini artırıcı etkisine katkıda bulunduğunu düşündürmüştür [100].

(3) Seçici NLRP3 inflamazom inhibitörü olan N-[[[1,2,3,5,6,7-hekzahidro-s-indasen-4-il]amino]karbonil]-4-(1-hidroksi-1-metiletil)-2-furansülfonamid (*N-[[[1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl]amino]carbonyl]-4-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2-furansulfonamide*; MCC950) kullanarak yaptığımız bir çalışmada ise, NLRP3/ASC/pro-kaspaz-1 inflamazom oluşumu ve etkinliği inhibe edildiğinde, farelerde LPS'nin neden olduğu enflamatuvar hiperaljeziye eşlik eden beyin, kalp ve akciğer dokularında NF- κ B p65, kaspaz-11 p20, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxydase*; NOX) ve endotelial NOS/nöronal NOS (nNOS)/iNOS ekspresyonlarındaki/etkinliklerindeki değişikliklerin önlenebileceği sonucuna varılmıştır [101].

(4) Farelerde LPS'nin neden olduğu enflamatuvar hiperaljezinin yanı sıra, SSS'de pro-enflamatuvar, anti-enflamatuvar ve antiapoptotik yollarda rolü olan retinoit X reseptörü (RXR) α , fosfoinozitol 3-kinaz (*phosphoinositide 3-kinase*; PI3K) p85 α , Akt, siklik adenosin monofosfat yanıt elementi bağlayıcı protein (*cyclic adenosine monophosphate-response element binding protein*; CREB) 1, B hücre lenfoma protein (*B-cell lymphoma protein*; Bcl)-2 ve peroksizom proliferatör ile etkinleştirilen reseptör (*peroxisome proliferator-activated receptor*; PPAR) $\alpha/\beta/\gamma$ ekspresyonlarındaki/etkinliklerindeki azalma, TLR4, MyD88, TRAF6, TAK1, IKK $\alpha/\beta/\gamma$, I κ B- α , NF- κ B p65, MAPK, ERK1/2, c-Jun, COX-2 ve IL-1 β ekspresyonları/etkinlikleri ile nitrotirozin, PGE₂ ve IL-1 β düzeylerindeki artmanın seçici bir RXR agonisti olan beksaroten ile önlenebileceği gösterilmiştir [102, 103].

(5) SSS'de iNOS, nNOS ve kaspaz biriktirici ve etkinleştirici alan içeren nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alanı benzeri reseptör (*caspase-recruitment and activation domain containing nucleotide binding oligomerization domain-like receptor*; NLRC) 3 ekspresyonundaki azalmanın yanı sıra, 14,15-dihidroksieikozatrienoik asit, NLRC4, ASC, IL-1 β , kaspaz-1 p20, kaspaz-11 p20, süperoksit radikali (*superoxide radical*; O₂⁻) oluşturan bir adenin dinükleotit fosfat oksidaz enzimi (gp91^{phox}; NOX2), gp91^{phox}'un düzenleyici alt birimi (p47^{phox}; NOXO2) ve nitrozin ekspresyonlarındaki/etkinliklerindeki artmanın eşlik ettiği değişikliklere ilişkin bulgularımız, seçici bir çözünebilir epoksit hidrolaz (*soluble epoxide hydrolase*; sEH) inhibitörü olan triflorometoksifenil-3-(1-propiyonilpiperidin-4-il)üre (*trifluoromethoxyphenyl-3-(1-propionylpiperidin-4-yl)urea*); TPPU) nin farelerde LPS'nin neden olduğu enflamatuvar hiperaljeziyi önleyici etkisine katkısının bulunabileceğini düşündürmüştür [104].

(6) Mitokondriyal bir nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alanı benzeri reseptör (*nucleotide binding oligomerization domain-like receptor*; NLR) olan ve enflamasyonla belirgin durumlarda rol oynadığı gösterilen NLRX1 ligandı dokosaheksaenoik asidin enflamatuvar hiperaljeziyi önleyici etkisine, LPS'ye yanıt olarak SSS'de TRAF6'dan ayrılan NLRX1'in, K63 U bağlantısı üzerinden ubikuitinlenmesindeki artışın ardından IKK kompleksine bağlanması sonucunda IKK α /IKK β , IKK γ , κ B inhibitörü (*inhibitor of κ B*; I κ B)- α ve NF- κ B etkinliği ile IL-1 β protein ekspresyonundaki azalmanın katkıda bulunabileceğini düşündürmüştür [105].

(7) Seçici RIPK1 inhibitörü nekrosülfonamidin LPS'nin neden olduğu enflamatuvar hiperaljeziyi önleyici etkisine SSS'de kaspaz-11/GSDMD aracılıklı piropitoz, RIPK1/RIPK3/MLKL nekrozomu aracılıklı nekropitoz ve remiyelinizasyon inhibitörü semaforin (SEMA) 3A ekspresyonundaki azalmanın yanı sıra, miyelin membranının başlıca bileşeni olan proteolipit protein (PLP) ekspresyonundaki artmanın katkıda bulunabileceğini düşündürmüştür [106].

Güncel literatürden derlenmiş bilgiler ile daha önce yaptığımız çalışmalardan elde ettiğimiz bulgular birlikte değerlendirildiğinde [99-106], LPS'nin SSS'de tetiklediği olaylar sonucunda RIPK1/RIPK3/MLKL nekrozomu aracılıklı nekropitoz, kaspaz-11/GSDMD aracılıklı piropitoz ile demiyelinizasyonun da eşlik ettiği enflamatuvar hiperaljeziyle sonuçlanabilecek olayların önlenmesinde Nec-1s gibi seçici RIPK1 inhibitörlerin yararlı olabileceği düşünülmüştür. Dolayısıyla, LPS ile farelerde oluşturulan enflamatuvar hiperaljezi modeli kullanılarak gerçekleştirilmiş olan bu tezde, Nec-1s'nin RIPK1/RIPK3/MLKL nekrozomu aracılıklı nekropitoz ve kaspaz-11/GSDMD aracılıklı piropitoz üzerindeki etkisinin demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon ile ilişkilendirilerek araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Enflamatuvar Hiperaleji

Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği (*International Association for the Study of Pain; IASP*) tarafından 1979 yılında ağrı "gerçek veya olası doku zedelenmesi ile ilişkili veya buna benzer hoş olmayan bir duyuşsal ve duygusal deneyim" olarak tanımlanmıştır. Bu tanım, sağlık uzmanları ve ağrı alanındaki araştırmacılar tarafından geniş çapta kabul görmüş ve Dünya Sağlık Örgütü de dahil olmak üzere birçok profesyonel, resmi ve sivil toplum kuruluşu tarafından benimsenmiştir. Son yıllarda, bu alandaki bazı araştırmacılar, ağrının anlaşılmasındaki ilerlemelerin, tanımın yeniden değerlendirilmesini gerektirdiğini düşünerek değişiklikler önermişlerdir. Bu tanım, 2020 yılında "ağrı" sözcüğünün kökeni olarak Latince'de "ceza" anlamına gelen "*poena*" sözcüğü dikkate alınarak eklenen aşağıdaki 6 önemli not ile genişletilmiştir [107, 108]:

(1) Ağrı her zaman biyolojik, psikolojik ve sosyal etkenlerden değişen derecelerde etkilenen kişisel bir deneyimdir.

(2) Ağrı ve nosisepsiyon farklı fenomenlerdir; ağrı deneyimi duyuşsal yollardaki etkinliğe indirgenemez.

(3) Bireyler yaşam deneyimleri aracılığıyla ağrı kavramını öğrenirler.

(4) Bir kişinin acı olarak bir deneyimi olduğunu bildirmesine saygı gösterilmelidir.

(5) Ağrı genellikle uyum sağlayıcı bir role hizmet etse de, işlev ve sosyal ve psikolojik iyilik durumu üzerinde olumsuz etkileri olabilir.

(6) Sözlü betimleme, acıyı ifade eden birkaç davranıştan yalnızca biridir; iletişim kuramama, bir insanın veya insan olmayan bir hayvanın acı çekmesi olasılığını ortadan kaldırmaz.

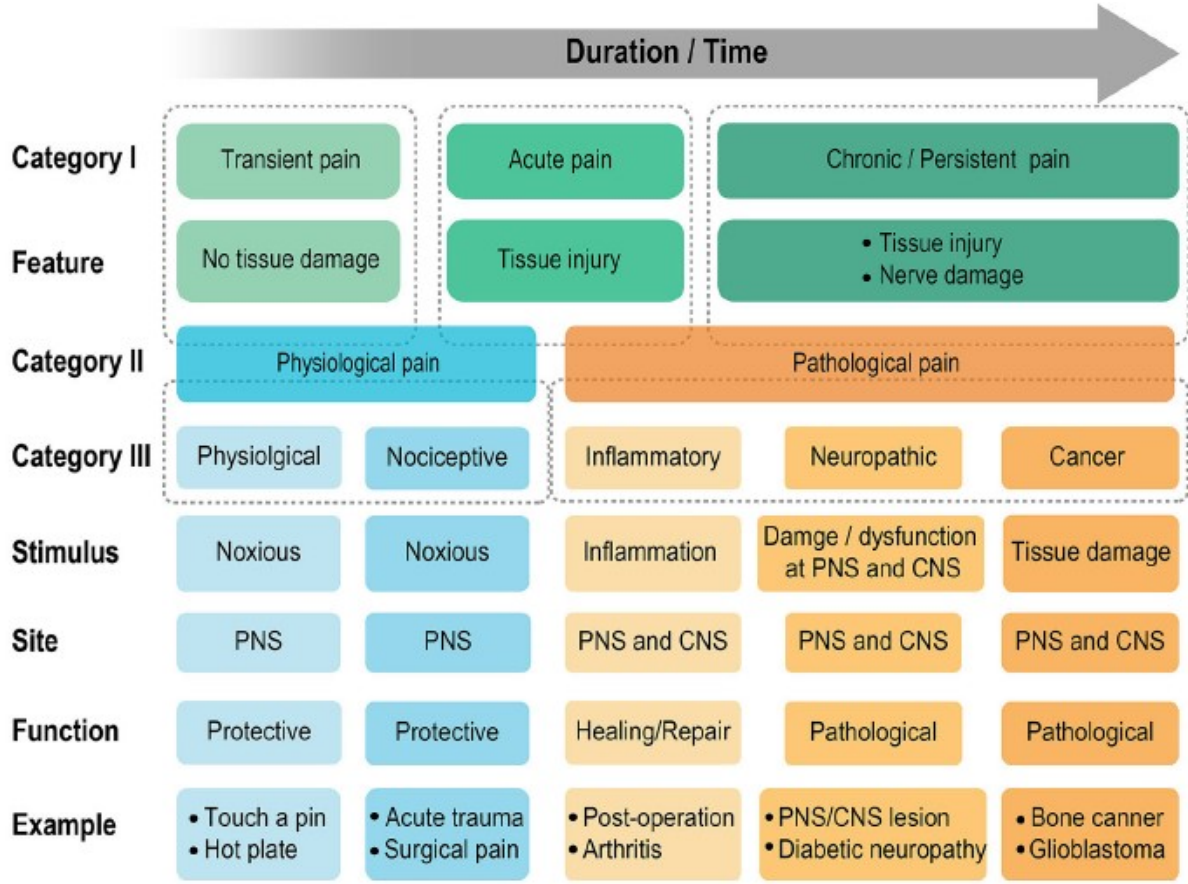
Ağrı özelliklerine göre 3 gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.1.) [109]:

(1) Grup I: Süresine göre doku zedelenmesinin olmadığı geçici, doku zedelenmesinin olduğu akut ağrı ile doku zedelenmesi ve/veya sinir zedelenmesinin olduğu kronik/sürekli ağrı

(2) Grup II: Başlatan uyarı ve işleve göre fizyolojik ve patolojik ağrı

(3) Grup III: (1) Fizyolojik ve nosiseptif ağrı olmak üzere 2 gruba ayrılan fizyolojik ağrı ve (2) enflamatuvar ve nöropatik ağrı ile kanser ağrısı olmak üzere 3 gruba ayrılan patolojik ağrı

Akut ve kronik ağrının başlıca özellikleri Tablo 2.1.'de özetlenmiştir [110].



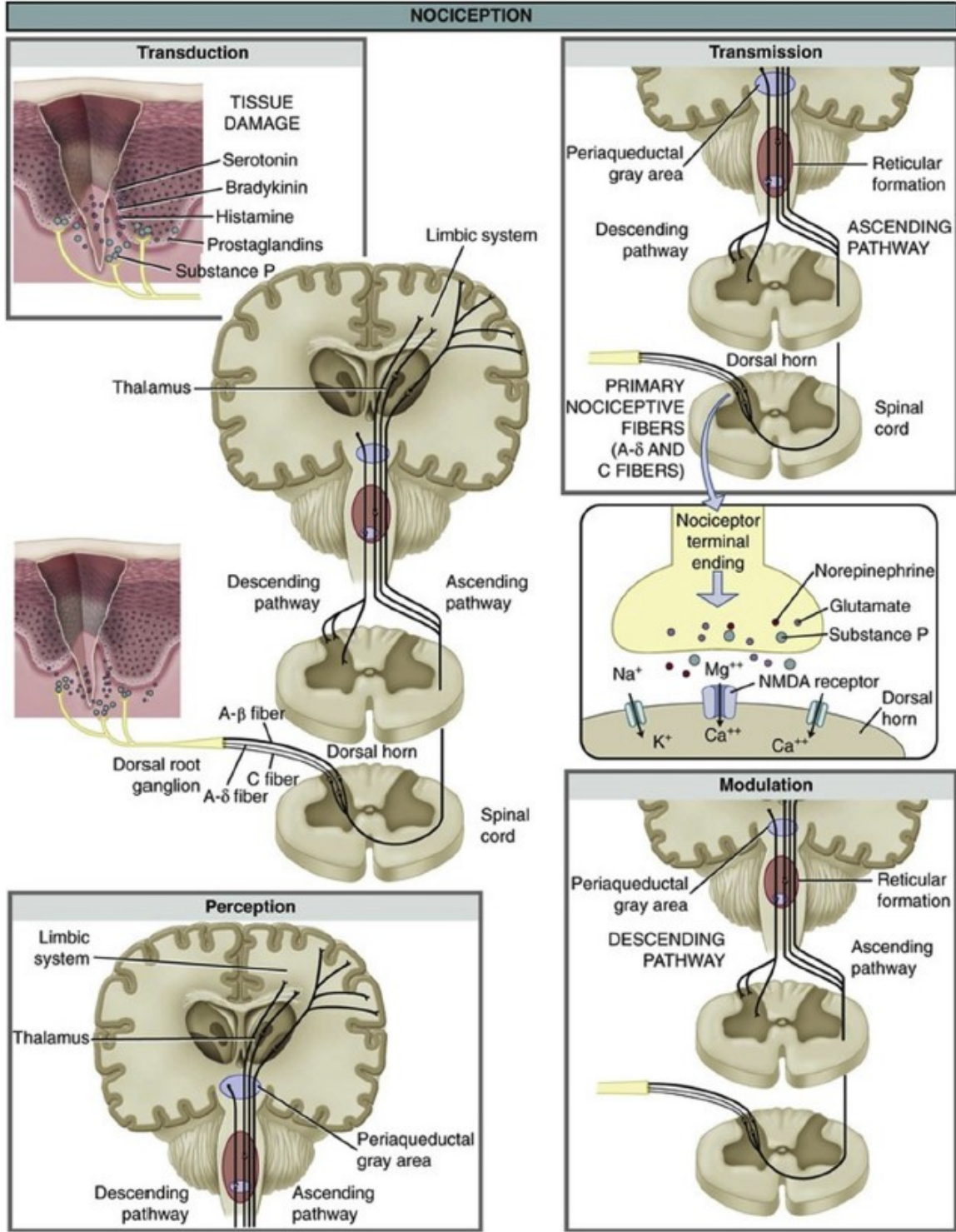
Şekil 2.1. Ağrının gruplandırılması ve temel özellikleri [109]. *PNS, periferik sinir sistemi (peripheral nervous system); CNS, santral sinir sistemi (central nervous system).*

İğne batması, sıcak zemin, akut travma ve cerrahi ağrı gibi durumlarda, zararlı uyarılar ile başlatılan ve periferik sinir sistemi (*peripheral nervous system; PSS*)'nin nöral substratlarının rol oynadığı fizyolojik ağrının koruyucu işlevleri bulunmaktadır. Patolojik ağrı ise, post-operatif, artrit, PSS/SSS lezyonu, diabetik nöropati, kemik kanseri ve gliyoblastom gibi durumlarda enflamasyon, PSS ve SSS'de zedelenme/işlev bozukluğu ile doku zedelenmesine bağlı olarak başlatılmaktadır [109].

Tablo 2.1. Akut ve kronik/sürekli ağrının başlıca özellikleri [110].

Akut ağrı	Kronik/sürekli ağrı
Nosiseptörleri etkinleştiren zararlı uyarılardan kaynaklanır.	Viseral veya somatik nosiseptörlerden kaynaklanır.
Cerrahi, travmatik yaralanma, doku zedelenmesi, miyokart enfarktüsü ve enflamatuvar süreçlere eşlik eder; genellikle iyileşme başladığında azalır.	Kronik hastalığa ve tedavi edilmeyen duruma eşlik eder; genellikle yavaş yavaş başlar ve zamanla daha çok acı çekilmesine yol açar.
Kendinden sınırlıdır, günler veya haftalar içinde düzelir, ancak 3 aya dek sürebilir.	Altta yatan neden olduğu sürece çözülmez; genellikle 3 aydan uzun (genellikle 6 aydan uzun süre) sürer.
Hafiften şiddetli dereceye dek değişebilir.	Hafiften şiddetli dereceye dek değişebilir.
Kaygı ve huzursuzluk eşlik edebilir.	Genellikle çoklu yaşam kalitesi ve depresyon, umutsuzluk, çaresizlik, tükenmişlik, mali yük, aile, arkadaşlar ve sağlık sistemine artan bağımlılık gibi işlevsel yan etkiler eşlik eder.
Tedavi edilmediğinde morbidite ve mortaliteyi artırabilir ve hastanede kalış süresini uzatabilir.	Aile üyeleri ve arkadaşların yaşam kalitesini etkileyebilir.
Kötü yönetilirse, iyileşmeye katılımı ve ardından engelliliğin artmasını engelleyebilir.	Fizyolojik yanıtlar kalıcı veya aralıklı olmasına bağlıdır; akut ağrıya olduğu gibi, aralıklı ağrılı fizyolojik yanıt taşıkardi, terleme ve hipertansiyon gibi ters etkiler eşlik eder.

"Nosisepsiyon" ağrının nasıl bilinçli bir deneyim durumuna geldiğini tanımlamak için kullanılan bir terimdir [111]. Nosiseptör ise, zararlı bir uyarana veya uzadığında zararlı duruma gelebilecek bir uyarana tercihen duyarlı bir serbest sinir ucudur. Nosiseptörler yalnızca ağrı uyarılarına yanıt veren ve uyarıyı, beynin ağrı duyumsamasını üretmek için yorumladığı sinir uyarılarına dönüştüren birincil duyu nöronlarının bir alt kümesini oluştururlar [112]. Nosiseptörler kimyasal, mekanik ve termal uyarı gibi tepki verdikleri uyarının türüne göre miyelinli veya miyelinsiz olarak gruplandırılırlar. Hücre gövdeleri dorsal kök gangliyon ile trigeminal gangliyonlarda bulunan ve doku zedelenmesine yanıt veren birincil aferent nöronların bir alt grubu olan nosiseptörler, hem miyelinsiz C lifleri hem de deri, kas, eklem ve iç organları inerve eden miyelinli A δ liflerinden oluşurlar [113-116]. Ağrının nosisepsiyonundaki transdüksiyon, iletim, algı ve modülasyon olmak üzere gelişen 4 dönem Şekil 2.2.'de özetlenmiştir [110, 111].



Şekil 2.2. Ağrının nosisepsiyonundaki dönemler [111]. Ca^{++} , Kalsiyum iyonu (calcium ion); K^+ , potasyum iyonu (potassium ion); Mg^{++} , magnezyum iyonu (magnesium ion); Na^+ , sodyum iyonu (sodium ion); NMDA, N-metil-D-aspartik asit (N-methyl D-aspartic acid).

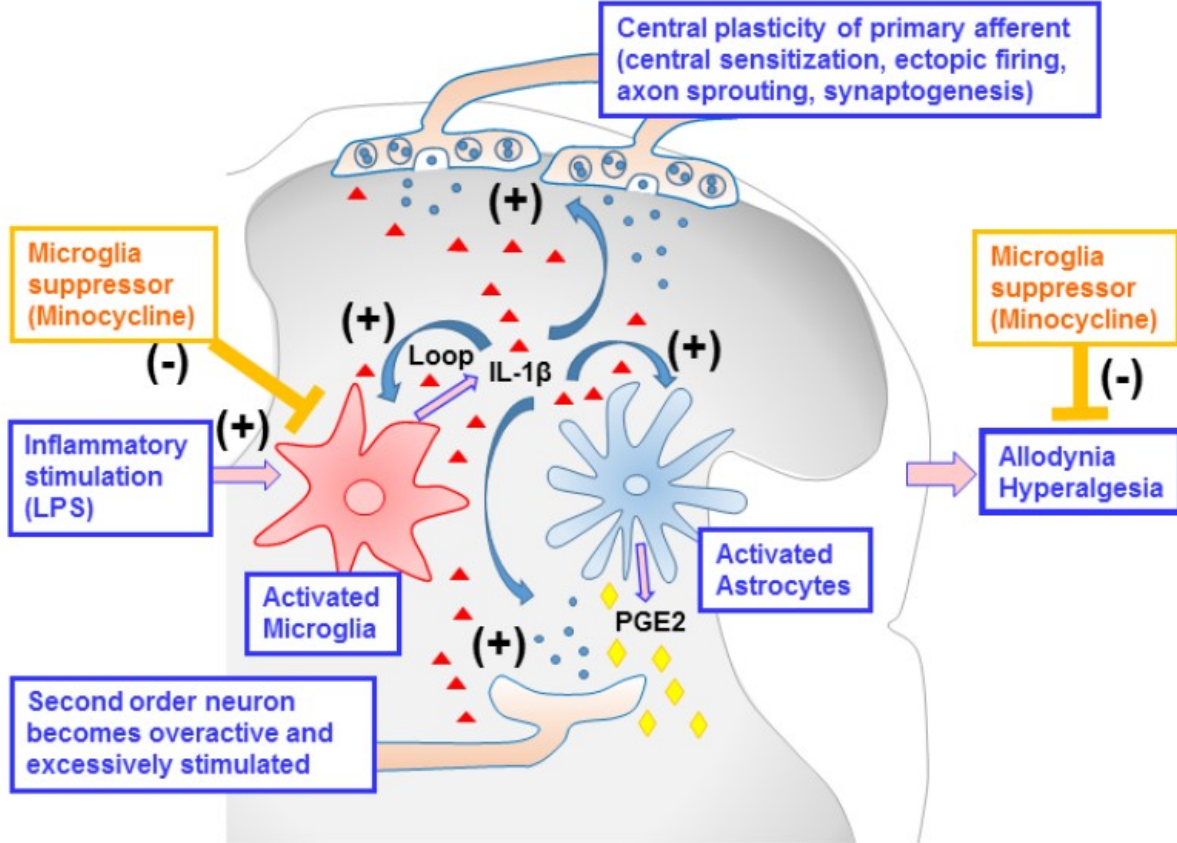
Doku zedelenmesine duyarlı olan miyelinsiz C lifleri ve miyelinli A δ lifleri sinir uçları ve hücre gövdelerinde bulunan G proteini ile kenetli reseptörler, iyonotropik reseptörler ve tirozin kinaz reseptörlerinin uyarılması veya sensitizasyonu yoluyla sinyali iletirler. Bu reseptörler bradikinin, PGE₂ gibi PG'ler, hidrojen iyonu, ATP, sinir büyüme faktörünün yanı sıra, TNF- α , IL-1 β ve kemokin (C-C) motif ligandı (*chemokine [C-C motif] ligand*; CCL) 2 gibi pro-enflamatuvar sitokinler ve kemokinler gibi çeşitli enflamatuvar mediyatörlerin doğrudan bağlanması nedeniyle uyarılırlar [117-121].

Doku zedelenmesi ve enflamasyonun bir sonucu olarak gelişen nosiseptörlerin aşırı duyarlılığı ve uyarılabilirliği ile belirgin periferik sensitizasyon fenomenine geçici reseptör potansiyel vanilloit (*transient receptor potential vanilloid*; TRPV) A1, TRPV1 ve TRPV4 gibi iyon kanalları [122, 123], voltaj kapılı sodyum kanalı (*voltage-gated sodium channel*; Nav) 1.7, Nav1.8 ve Nav1.9 gibi sodyum kanalları [124, 125] ve mekanosensitif *piezo* iyon kanallarının [126] etkinleşmesi neden olmaktadır. Bu reseptörler ile ilişkili sinyal ileti yollarının etkinleşmesinde MAPK'ler, protein kinaz (*protein kinase*; PK) A ve PKC gibi protein kinazların önemli rolü bulunmaktadır [127-130].

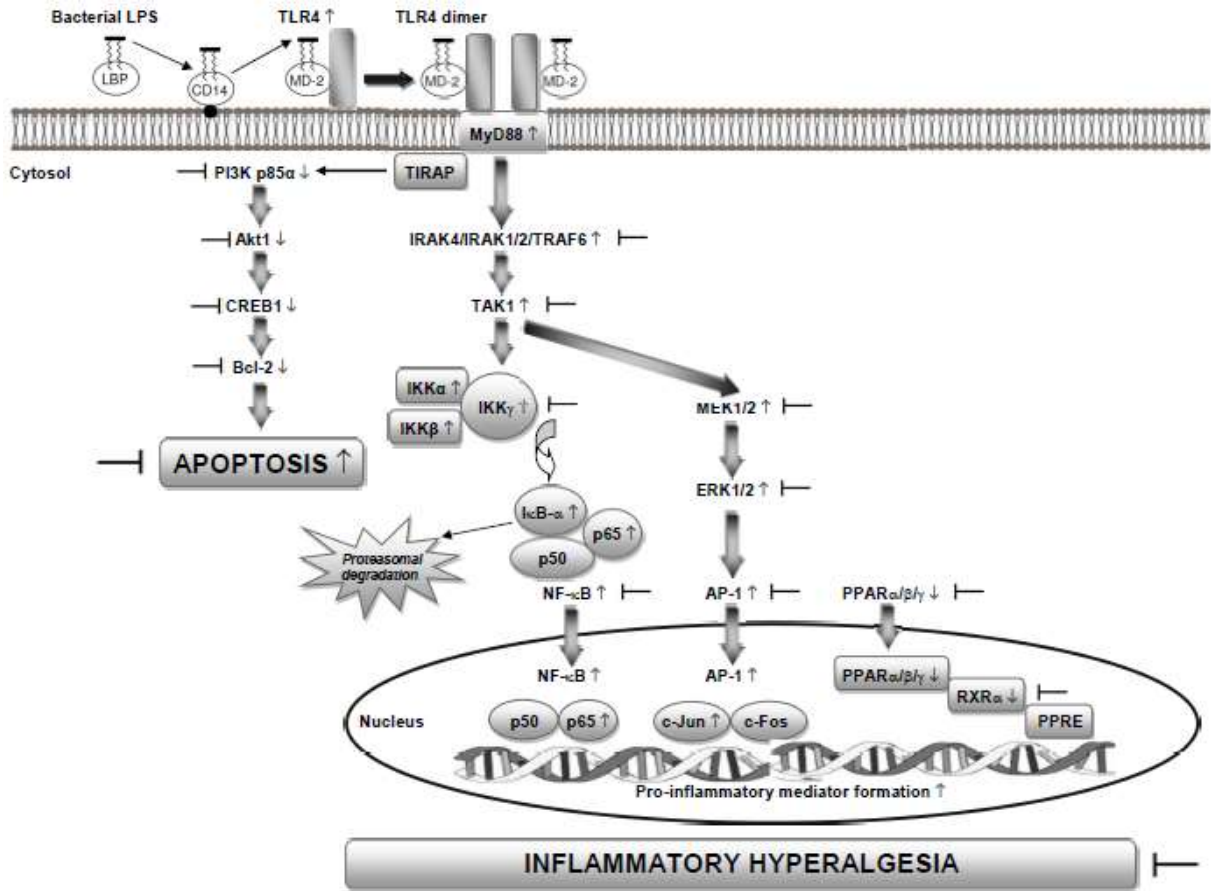
IASP tarafından allodini "normalde ağrıya neden olmayan bir uyarana bağlı ağrı", hiperaljezi "normalde ağrıya neden olan bir uyarana nedeniyle artan ağrı" ve hipoaljezi "normalde ağrılı bir uyarana yanıt olarak azalan ağrı" olarak tanımlanmıştır [107]. Enflamasyon, enfeksiyon veya doku zedelenmesinden kaynaklanan ağrıya karşı verilen aşırı duyarlılık yanıtı ise "enflamatuvar hiperaljezi" olarak adlandırılmıştır [131-133]. Çeşitli uyarılara karşı verilen immünolojik yanıt sırasında zararlı uyarıların algılanması ve bunlara karşı afektif bir yanıt gelişmesi enflamatuvar hiperaljeziye yol açar. Enflamasyona neden olan uyarılara yanıt olarak hiperaljezi gelişmesi santral ve periferik duyarlılıklardan kaynaklanır. Enflamatuvar zedelenmeye yanıt olarak immün/enflamatuvar hücrelerin toplanmasının ardından pro-enflamatuvar/aljezik mediyatörlerin salınması sonucunda periferik nosiseptörlerin uyarılması periferik duyarlılık gelişmesine yol açar [115, 133-136].

LPS, karagenin, seramit, tam Freund adjuvanı ve monosodyum iyodoastetat gibi maddeler kullanılarak fareler ve sıçanlarda oluşturulan deneysel enflamatuvar hiperaljezi modellerinde başta beyin ve omurilik olmak üzere çeşitli dokularda MEK1/2, ERK1/2, RIPK1 ve RIPK3 gibi kinazlar, NF- κ B ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörleri, NOS, COX, lipoksijenaz, sitokrom P450 (*cytochrome P450*), kaspaz-1 ve kaspaz-11 gibi enzimler, NLRC4, NLRP2, NLRP3 ve NLRX1 gibi NLR'ler, IL-1 β , IL-10, IFN- γ ve TNF- α gibi sitokinler, TRPV1 gibi iyon kanallarının yanı sıra, RXR α , PPAR α / β / γ ve Mas ile ilişkili G proteini ile kenetli reseptör D (*Mas-related G protein-coupled receptor D*; MrgprD)

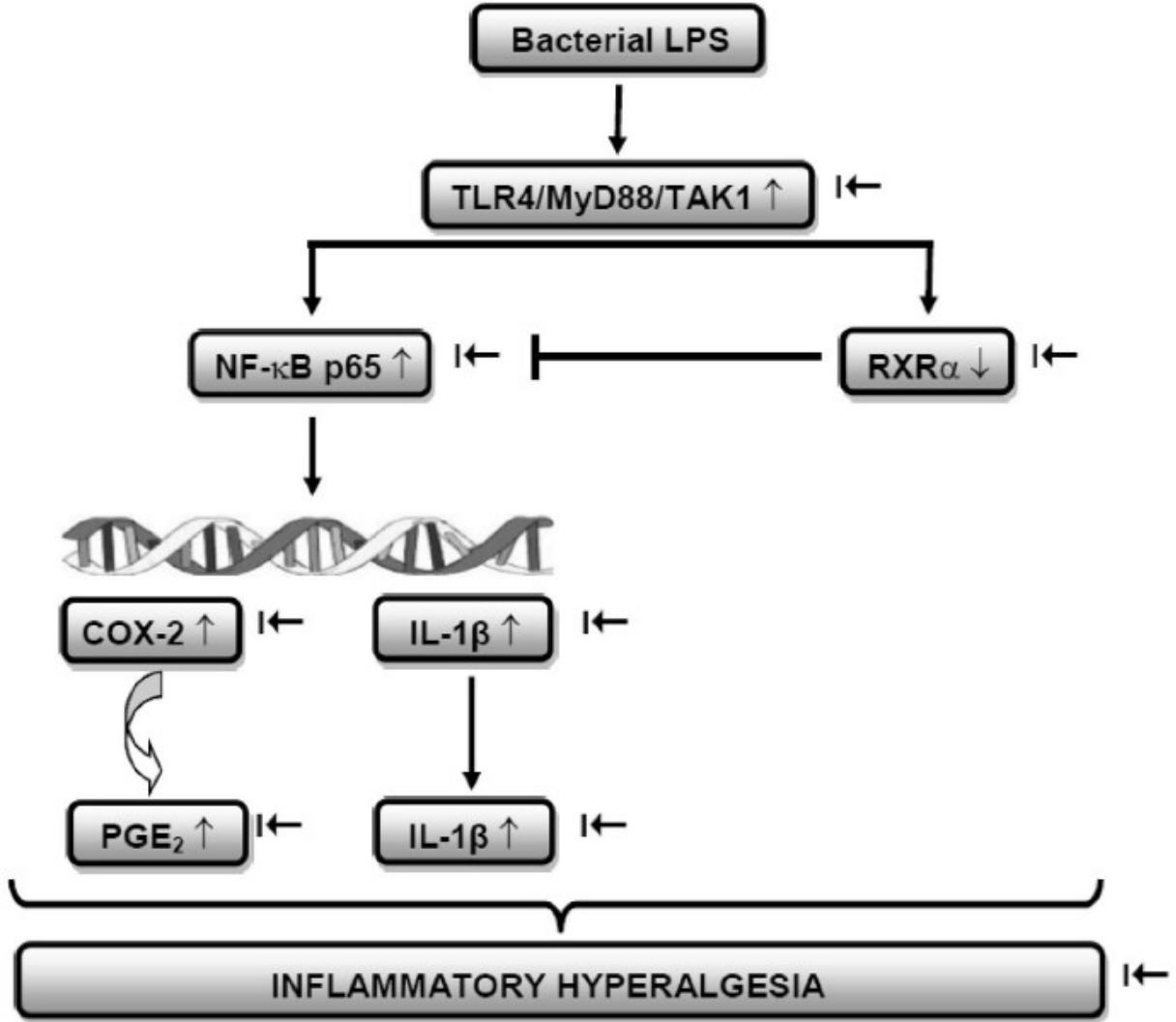
gibi G proteini ile kenetli reseptörlerin pozitif veya negatif yönde katkılarının olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır [99-106, 137-144]. LPS'nin neden olduğu allodini ve hiperaljeziye katkısı bulunan sinyal ileti yollarındaki mediyatörler Şekil 2.3., Şekil 2.4., Şekil 2.5., Şekil 2.6., Şekil 2.7., Şekil 2.8., Şekil 2.9., Şekil 2.10. ve Şekil 2.11.'de özetlenmiştir [99-106, 140, 141, 144].



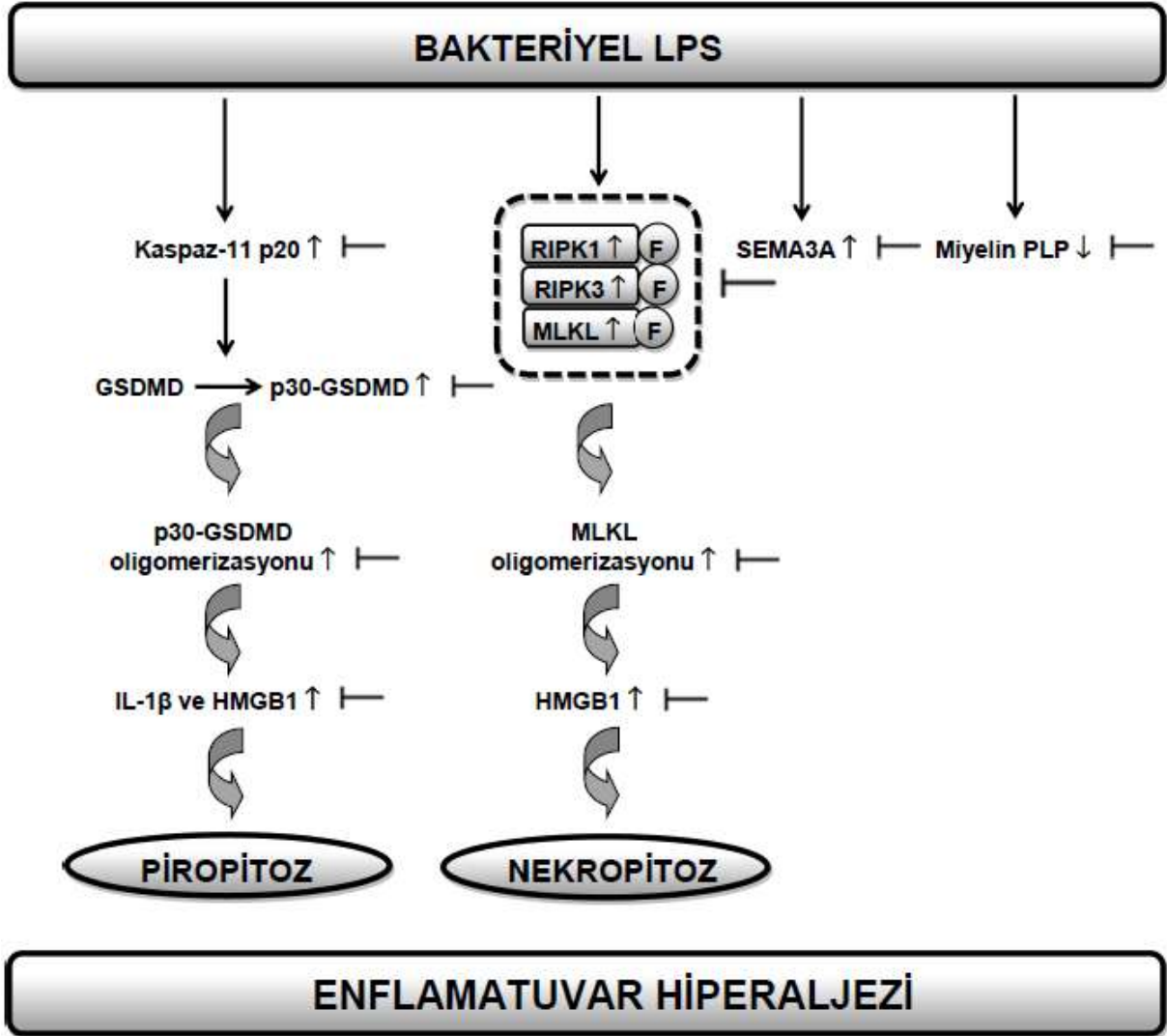
Şekil 2.3. Sıçanlarda sistemik yoldan LPS uygulanmasının ardından allodini ve hiperaljezi ile sonuçlanan olaylara etkinleştirilmiş mikrogliyalı ile astrositlerin katkısı [140]. (-) Önlüyor; (+), artırıyor. IL, İnterlökin (interleukin); LPS, lipopolisakkarit (lipopolysaccharide); PG, prostaglandin (prostaglandin).



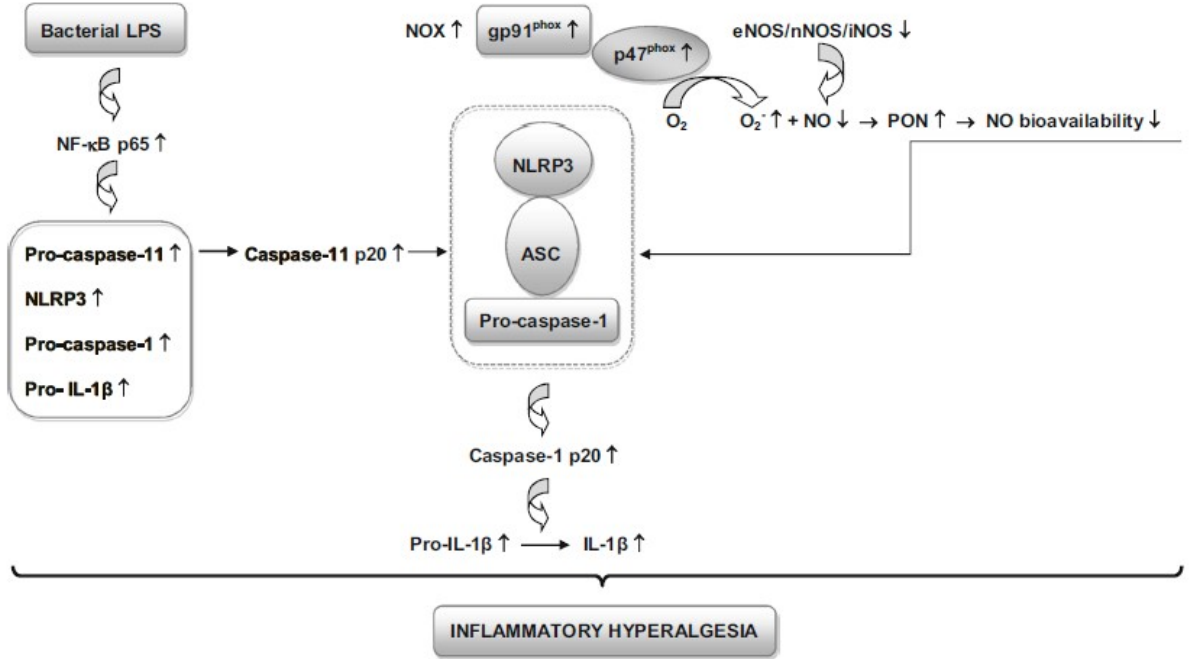
Şekil 2.4. Farelere sistemik yoldan LPS uygulanmasının ardından gelişen TLR4/MyD88'e bağımlı pro-enflamatuvar ve antiapoptotik sinyal ileti yolunun aracılık ettiği enflamatuvar hiperaljaziye RXRα'nın katkısı [102]. √, LPS ile azalıyor; ↑, LPS ile artıyor; —, RXR agonisti beksaroten önlüyor. AP, Etkinleştirici protein (activator protein); Bcl, B hücresi lenfoma protein (B-cell lymphoma protein; CD, farklılaşma kümesi (cluster of differentiation); CREB, siklik adenosin monofosfat yanıt elementi bağlayıcı protein (cyclic adenosine monophosphate-response element binding protein); ERK, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz (extracellular signal-regulated kinase); IKK, κB kinase inhibitörü (inhibitor of κB kinase); IκB, κB inhibitörü (inhibitor of κB); IRAK, interlökin-1 reseptörü ile ilişkili kinaz (interleukin-1 receptor-associated kinase); LBP, lipopolisakkarit bağlayıcı protein (lipopolysaccharide-binding protein); LPS, lipopolisakkarit (lipopolysaccharide); MD, miyeloit farklılaşma (myeloid differentiation); MEK, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz (mitogen-activated protein kinase kinase); MyD, miyeloit farklılaşma faktörü (myeloid differentiation factor); NF, nükleer faktör (nuclear factor); PPAR, peroksisom proliferatör ile etkinleştirilen reseptör (peroxisome proliferator-activated receptor); PPRE, peroksisom proliferatör ile etkinleştirilen reseptör yanıt elementi (peroxisome proliferator-activated receptor response element); retinoit X reseptörü (retinoid X receptor); PI3K, fosfoinozitol 3-kinaz (phosphoinositide 3-kinase); TAK, dönüştürücü büyüme faktörü β ile etkinleştirilen kinaz (transforming growth factor β-activated kinase); TIRAP, toll-interlökin-1 reseptör alan içeren adaptör protein (toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein); TLR, toll benzeri reseptör (toll-like receptor); TRAF, tümör nekrozlaştırıcı faktör reseptörü ile ilişkili faktör (tumor necrosis factor receptor-associated factor).



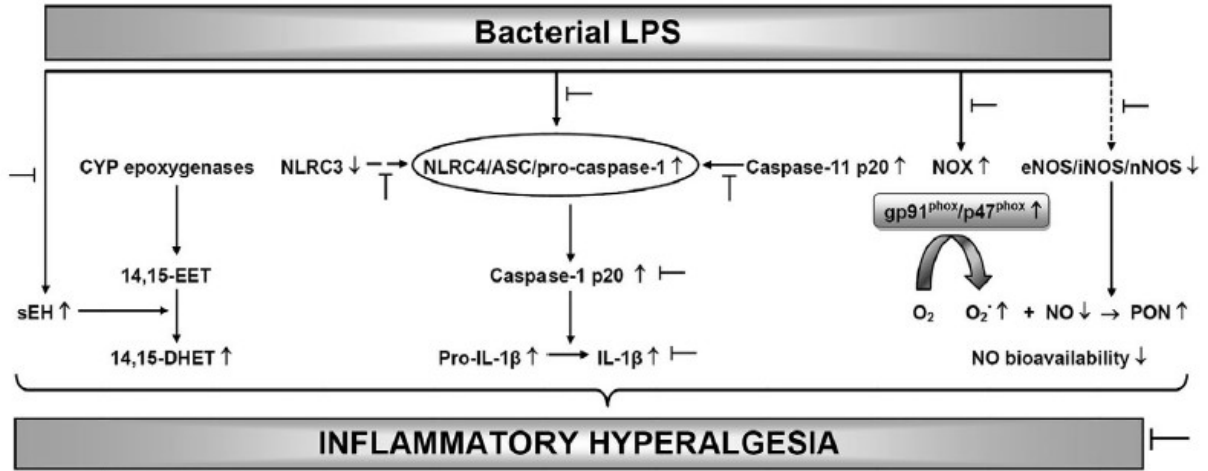
Şekil 2.5. Farelere sistemik yoldan LPS uygulanmasının ardından gelişen TLR4/MyD88/TAK1/NF-κB yolunun aracılık ettiği enflamatuvar hiperaljeziye RXRα'nın katkısı [103]. ↓, LPS ile azalıyor; ↑, LPS ile artıyor; ←, RXR agonisti beksaroten önüyor. COX, Siklooksijenaz (cyclooxygenase); IL, interlökin (interleukin); LPS, lipopolisakkarit (lipopolysaccharide); MyD, miyeloid farklılaşma faktörü (myeloid differentiation factor); nükleer faktör (nuclear factor); PG, prostaglandin (prostaglandin); retinoit X reseptörü (retinoid X receptor); TAK, dönüştürücü büyüme faktörü β ile etkinleştirilen kinaz (transforming growth factor β-activated kinase); TLR, toll benzeri reseptör (toll-like receptor).



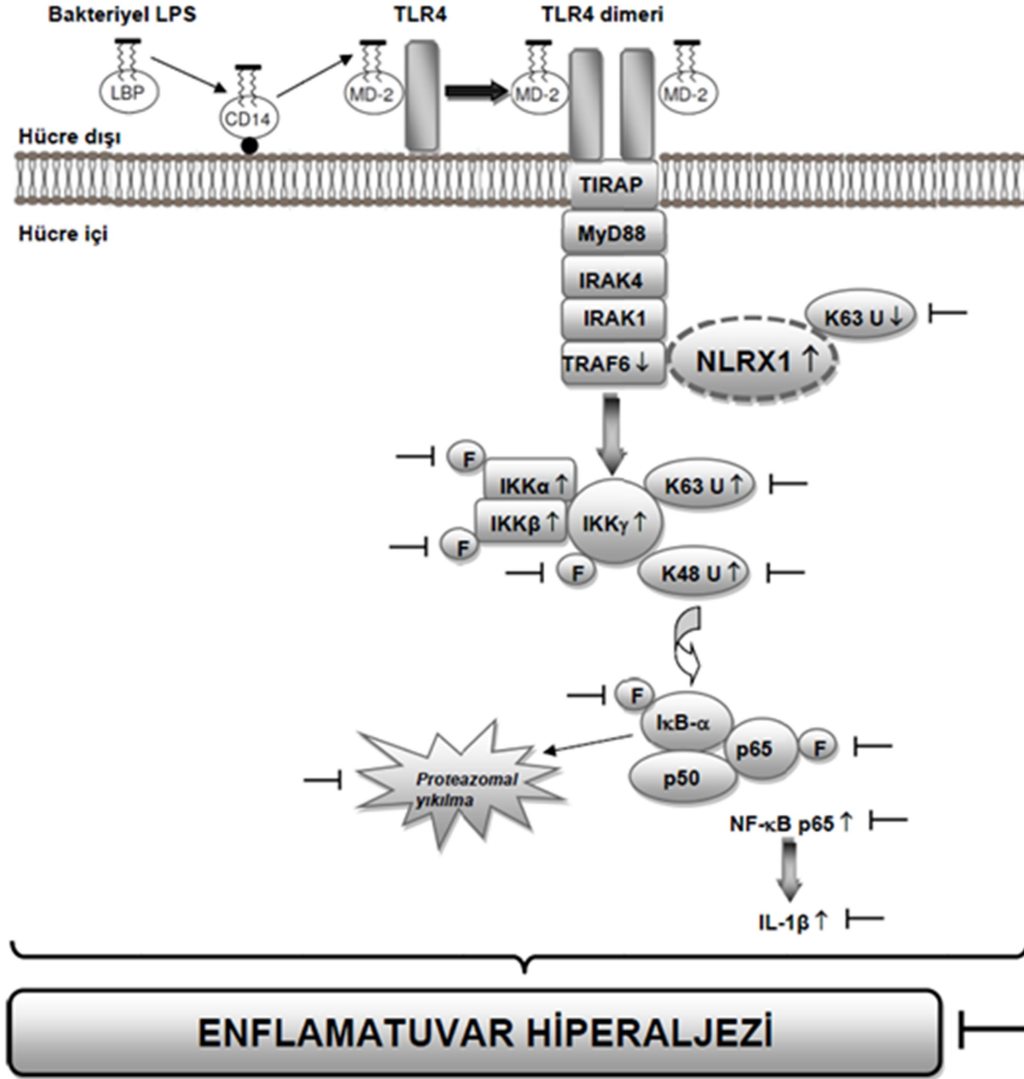
Şekil 2.6. Farelere sistemik yoldan LPS uygulanmasının ardından gelişen enflamatuvar hiperaljeziye RIPK1/RIPK3/MLKL nekrozomunun katkısı [106]. ↓, LPS ile azalıyor; ↑, LPS ile artıyor; ⊣, GSDMD ve MLKL inhibitörü NSA önüyor. F, Fosforilasyon; GSDMD, gasdermin D; HMGB, high-mobility-group-box; IL, interlökin (interleukin); LPS, lipopolisakkarit; MLKL, karışık kökenli kinaz benzeri psöodokinaz (mixed lineage kinase domain-like pseudokinase); p30-GSDMD, kaspaz-11 tarafından bölünen piroptotik delik oluşturucu protein GSDMD'nin N ucu p30 fragmanı; PLP, proteolipit protein; RIPK, reseptör ile etkileşen serin/treonin protein kinaz (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase); SEMA, semaforin.



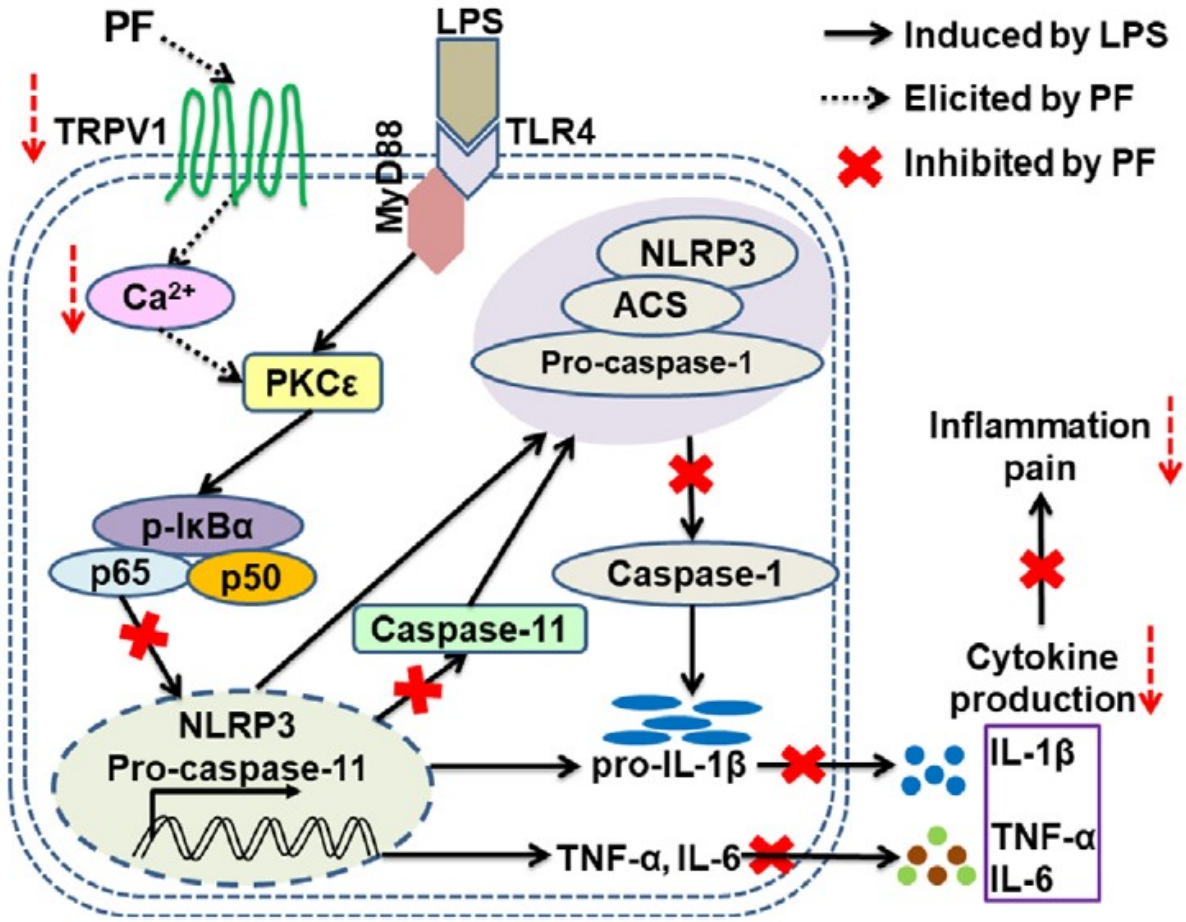
Şekil 2.7. Farelere sistemik yoldan LPS uygulanmasının ardından gelişen enflamatuvar hiperaljeziye NLRP3 inflamazomunun katkısı [101]. ↓, LPS ile azalıyor; ↑, LPS ile artıyor; MCC950 LPS'nin neden olduğu değişiklikleri önüyor. ASC, Apoptozla ilişkili nokta benzeri protein içeren bir kaspaz biriktirici alan (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain); eNOS, endotelial nitrik oksit sentaz (endothelial nitric oxide synthase); IL, interlökin (interleukin); iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (inducible nitric oxide synthase); LPS, lipopolisakkarit (lipopolysaccharide); MCC950, N-[[[(1,2,3,5,6,7-hekzahidro-s-indacen-4-il)amino]karbonil]-4-(1-hidroksi-1-metiletil)-2-furansülfonamid (N-[[[(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)amino]carbonyl]-4-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2-furansulfonamide); nNOS, nöronal nitrik oksit sentaz (neuronal nitric oxide synthase); NO, nitrik oksit (nitric oxide); NOX, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxydase); nükleer faktör (nuclear factor); NLRP, nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alan benzeri, lösinden zengin yinelenen ve pirin alanı içeren (nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing); O₂, moleküler oksijen (molecular oxygen); O₂⁻, süperoksit radikali (superoxide radical); PON, peroksinitrit (peroxynitrite).



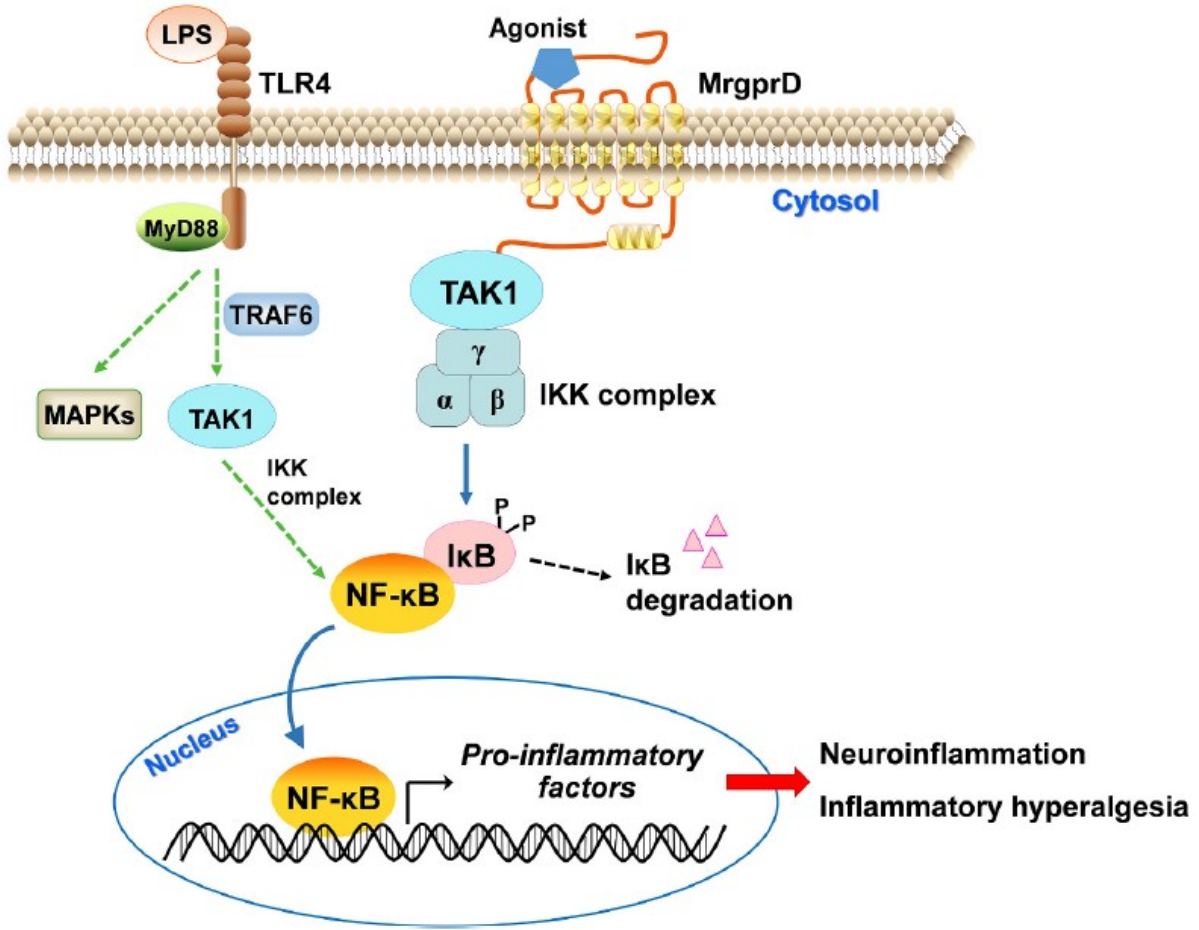
Şekil 2.8. Farelere sistemik yoldan LPS uygulanmasının ardından gelişen enflamatuvar hiperaljeziye sEH'in katkısı [104]. ↓, LPS ile azalıyor; ↑, LPS ile artıyor; —, sEH inhibitörü TPPU önlüyor. ASC, Apoptozla ilişkili nokta benzeri protein içeren bir kaspaz biriktirici alan (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain); CYP, sitokrom P450 (cytochrome P450); DHET, dihidroksieikozatrienoik asit (dihydroxyeicosatrienoic acid); EET, epoksieikozatrienoik asit (epoxyeicosatrienoic acid); eNOS, endotelial nitrik oksit sentaz (endothelial nitric oxide synthase); IL, interlökin (interleukin); iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (inducible nitric oxide synthase); LPS, lipopolisakkarit (lipopolysaccharide); nNOS, nöronal nitrik oksit sentaz (neuronal nitric oxide synthase); NO, nitrik oksit (nitric oxide); NOX, nikotinamit adenin dinükleotit fosfat oksidaz (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxydase); NLRC, kaspaz biriktirici ve etkinleştirici alan içeren nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alanı benzeri reseptör (caspase-recruitment and activation domain containing nucleotide binding oligomerization domain-like receptor); O₂, moleküler oksijen (molecular oxygen); O₂, süperoksit radikali (superoxide radical); PON, peroksinitrit (peroxynitrite); sEH, çözünebilir epoksit hidrolaz (soluble epoxide hydrolase); TPPU, triflorometoksifenil-3-(1-propiyonilpiperidin-4-il)üre (trifluoromethoxyphenyl-3-(1-propionylpiperidin-4-yl)urea).



Şekil 2.9. Farelere sistemik yoldan LPS uygulanmasının ardından gelişen TRAF6/IKK/NF-κB yolunun aracılık ettiği enflamatuvar hiperalejiye NLRX1'in katkısı [105]. ↓, LPS ile azalıyor; ↑, LPS ile artıyor; ⊣, NLRX1 ligandı dokozaheksaenoik asit önüyor. CD, Farklılaşma kümesi (cluster of differentiation); F, fosforilasyon; IKK, κB kinase inhibitörü (inhibitor of κB kinase); IκB, κB inhibitörü (inhibitor of κB); IL, interlökin (interleukin); IRAK, interlökin-1 reseptörü ile ilişkili kinaz (interleukin-1 receptor-associated kinase); K48, K48 ile bağlantılı ubiquitinlenmiş (K48-linked ubiquitinated); K63, K48 ile bağlantılı ubiquitinlenmiş (K48-linked ubiquitinated); LBP, lipopolisakkarit bağlayıcı protein; LPS, lipopolisakkarit; MD, miyeloit farklılaşma (myeloid differentiation); MyD, miyeloit farklılaşma faktörü (myeloid differentiation factor); NLRX, nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alanı benzeri reseptör X (nucleotide binding oligomerization domain-like receptor X); NF, nükleer faktör; TIRAP, toll-interlökin-1 reseptör alanı içeren adaptör protein (toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein); TLR, toll benzeri reseptör (toll-like receptor); TRAF, tümör nekrozaştırıcı faktör reseptörü ile ilişkili faktör (tumor necrosis factor receptor-associated factor).



Şekil 2.10. Farelere sistemik yoldan LPS uygulanmasının ardından gelişen TLR4/MyD88/PKC/İκB yolu aracılıklı enflamatuvar hiperaljeziye TRPV1'in katkısı [144]. ACS, Apoptozla ilişkili nokta benzeri protein içeren bir kaspaz biriktirici alan (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain); Ca²⁺, kalsiyum iyonu (calcium ion); İκB, κB inhibitörü (inhibitor of κB); IL, interlökin (interleukin); LPS, lipopolisakkarit (lipopolysaccharide); MyD, miyeloit farklılaşma faktörü (myeloid differentiation factor); NLRP, nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alan benzeri, lösinden zengin yinelenen ve pirin alanı içeren (nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing); PF, paeoniflorin (paeoniflorin); PKC, protein kinaz C (protein kinase C); TLR, toll benzeri reseptör (toll-like receptor); TNF, tümör nekrozlaştırıcı faktör (tumor necrosis factor); TRPV, geçici reseptör potansiyel vanilloit (transient receptor potential vanilloid).



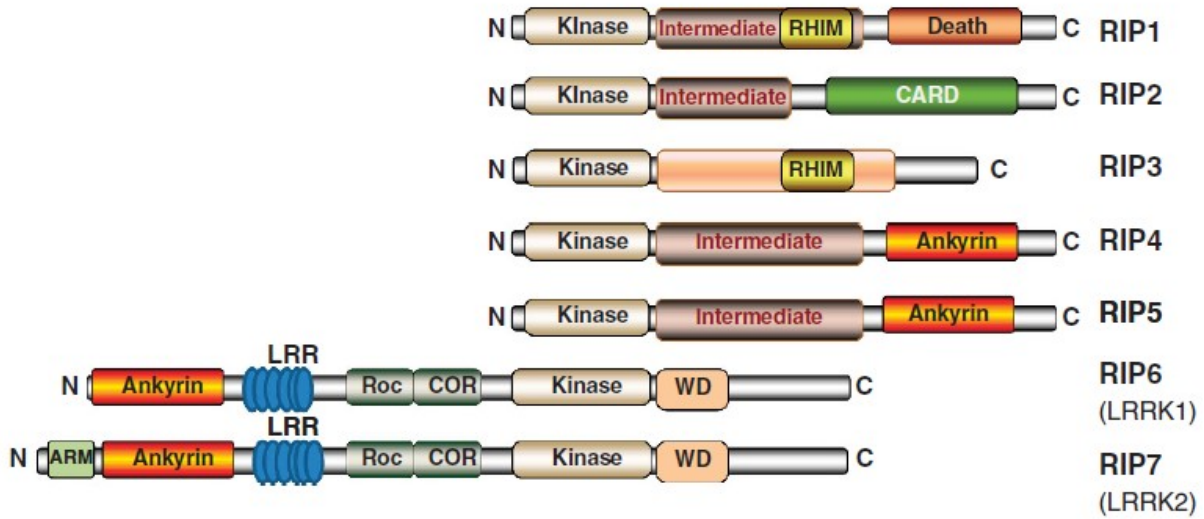
Şekil 2.11. Farelere sistemik yoldan LPS uygulanmasının ardından gelişen TLR4/MyD88/TRAF6/TAK1/NF-κB yolu aracılıklı nöroenflamasyon ve enflamatuvar hiperaljeziye MrgprD'nin katkısı [141]. *IκB*, *κB* inhibitörü (*inhibitor of κB*); *LPS*, lipopolisakkarit (*lipopolysaccharide*); *MAPKs*, mitojen ile etkinleştirilen protein kinazlar (*mitogen-activated protein kinases*); *MrgprD*, *Mas* ile ilişkili *G* proteini ile kenetli reseptör *D* (*Mas-related G protein-coupled receptor D*); *MyD*, miyeloid farklılaşma faktörü (*myeloid differentiation factor*); *NF*, nükleer faktör (*nuclear factor*), *P*, fosforilasyon (*phosphorylation*); *TAK*, dönüştürücü büyüme faktörü β ile etkinleştirilen kinaz (*transforming growth factor β -activated kinase*); *TLR*, toll benzeri reseptör (*toll-like receptor*); *TRAF*, tümör nekrozlaştırıcı faktör reseptörü ile ilişkili faktör (*tumor necrosis factor receptor-associated factor*).

LPS ile oluşturulan deneysel enflamatuvar hiperaljezi çeşitli antiinflamatuvar/analjezik ilaç adaylarının etkisini araştırmak için kısa süreli bir model olarak kullanılmaktadır [1-3]. Ayrıca, LPS'nin termal uyarılara yanıt olarak, supraspinal ve spinal düzeylerde algılanan sıcak zemin testi ile değerlendirildiğinde, supraspinal düzeyde kontrol edildiği ileri sürülen akut ağrıyı artırdığı bildirilen çalışmalar bulunmaktadır [4, 5]. Günümüzde çok çeşitli tedavi seçenekleri olmasına karşın, enflamatuvar hiperaljezinin kontrolünde sorunlar yaşandığından, son yıllarda yapılan çalışmalarda, yeni tedavi yaklaşımları üzerinde yoğunlaşmıştır [136, 145-150].

2.2. RIPK1/RIPK3/MLKL Nekrozomu Aracılıklı Nekropitoz

2.2.1. Özellikleri

RIPK ailesinin 7 üyesi bulunmaktadır: (1) RIPK1, (2) RIPK2, (3) RIPK3, (4) RIPK4, (5) RIPK5, (6) RIPK6 ve (7) RIPK7. RIPK ailesinin bütün üyeleri, yapısal ve işlevsel olarak, bir katalitik bölge taşıyan bir homolog serin-treonin kinaz alanı ile ek olarak tirozin kinaz etkinliği gösteren RIPK2'ye sahiptir [151, 152]. RIPK1'de bir C ucu ölüm alanı ile bir RIP homotipik etkileşme motifi (*RIP homotypic interaction motif*; RHIM) barındıran bir ara alan bulunmaktadır. RIPK2 bir karboksil ucu (*carboxyl terminal*; *C-terminal*; C ucu) kaspaz biriktirici ve etkinleştirici alan (*caspase-recruitment and activation domain*; CARD) ile bir ara alan içermektedir. RIPK3 amino ucu (*amino terminal*; *N-terminal*; N ucu) katalitik alanın yanında bir C ucu RHIM alanına sahiptir. RIPK4 ve RIPK5 C ucunda bulunan ankirin yinelenmeleri ile belirgindir. RIPK6 ve RIPK7 ise, bir lösinden zengin yinelenen (*leucine rich repeat*; LRR) motifi, ankirin yinelenmeleri, bir *Ras-of-complex* (Ros) alanı ve ardından bir kompleks proteinlerin *Ras* (*Ras of complex proteins*; Roc)'un C ucu (*C-terminal of Roc*; COR) alanı ile bir WD40/beta-transdusin yinelenmeleri (*WD40/beta-transducin repeats*; WD) alanına sahiplerdir (Şekil 2.12.) [21, 26, 36, 92].



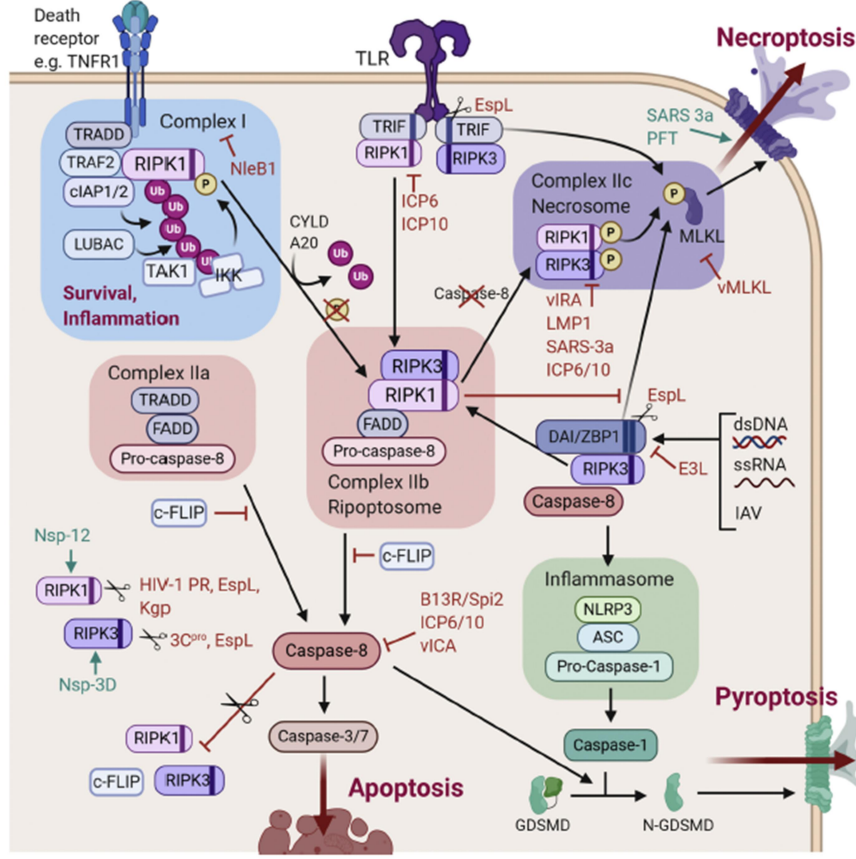
Şekil 2.12. RIPK'lerin yapısal özellikleri [26]. *ARM*, Armadillo; *C*, Karboksil ucu (*Carboxyl terminal*; *C-terminal*); *CARD*, kaspaz biriktirici ve etkinleştirici alan (*caspase-recruitment and activation domain*); *COR*, *Roc*'un C ucu (*C-terminal of Roc*); *LRR*, lösinden zengin yinelenen (*leucine rich repeat*); *N*, N ucu (*amino terminal*; *N-terminal*); *RHIM*, reseptör ile etkileşen protein homotipik etkileşme motifi (*receptor-interacting protein homotypic interaction motif*); *RIP*, reseptör ile etkileşen protein (*receptor-interacting protein*); *Roc*, kompleks proteinlerin *Ras*'ı (*Ras of complex proteins*); *WD*, *WD40/beta transdusin yinelenmeleri* (*WD40/beta-transducin repeats*).

2.2.2. Düzenlenmesi

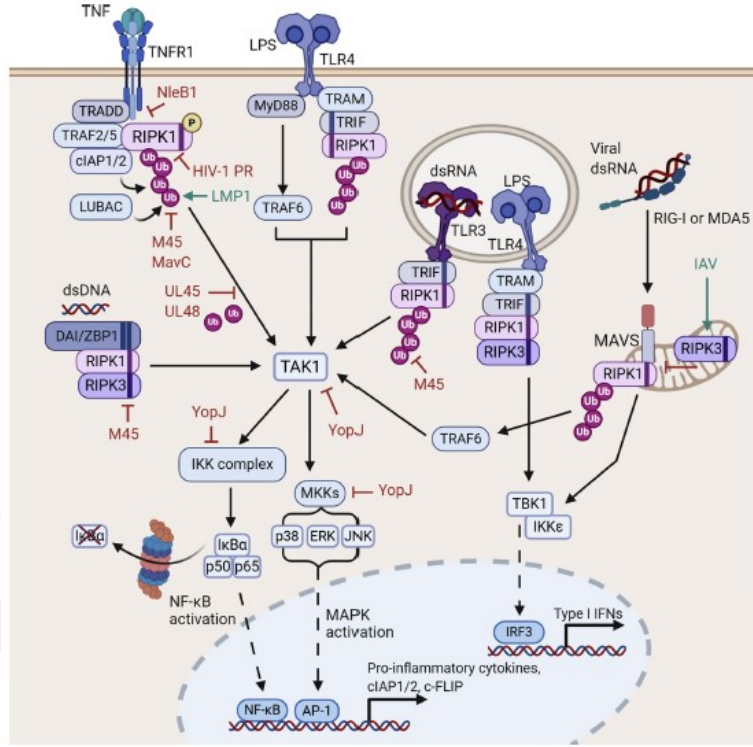
Nekropitozun morfolojik olarak 3 özelliği vardır: (1) Parçalanmış membranlar, şişmiş hücre gövdeleri ve organelleri ile parçalanmış kromatinin birlikte olduğu nekroz, (2) çok sayıda inflamazom ve (3) otofaji [153]. Moleküler düzeyde, intraselüler ve ekstraselüler uyarılar ile ölüm reseptör ailesinin ilişkili ligantları nekrozu tetiklemektedir [154]. Nekropitozda gelişen olaylar sonucunda salıverilen HMGB1, ATP, DNA, uzun genomik DNA, mtDNA, ribonükleik asit interferans (*ribonucleic acid [RNA] interference*; RNAi) IL-1 α , IL-33, histonlar, S100A49, ısı şok proteinleri, ürik asit, eCIRP, siklofilin A ve *spliceosome* ile ilişkili protein gibi DAMP'lar enflamasyona katkıda bulunmaktadır. Dolayısıyla, enflamasyonla sonuçlanan gerek TNF reseptörü (*TNF receptor*; TNFR) 1 gerekse TLR aracılıklı nekropitotik, apopitotik ve piropitotik programlanmış hücre ölümü yollarında özellikle RIPK1 ve RIPK3'ün önemli işlevleri bulunmaktadır (Şekil 2.13.) [21, 26, 35, 36, 42, 53, 55].

TNFR1 aracılıklı nekropitozda, TNF- α 'nın TNFR1'e bağlanması "kompleks I" olarak da adlandırılan TNFR tip 1 ile ilişkili ölüm alanı (*TNFR type 1-associated death domain protein*; TRADD), RIPK1, TRAF2, apopitozun hücre sel inhibitörü (*cellular inhibitor of apoptosis*; cIAP) 1, silindromatöz (*cylindromatosis*; CYLD) ve IKK κ olarak da bilinen NEMO gibi bir dizi proteinin birikmesine yol açmaktadır. NEMO ile IKK α /IKK β 'nin birleşmesi IKK aracılıklı bir biçimde I κ B α 'yı fosforillemektedir. Fosforillenen I κ B α ise, NF- κ B yolunu etkinleştirmektedir. NF- κ B etkinliği önlendiğinde, deubikuitinlenmiş RIPK1, Fas ile ilişkili ölüm alanı (*Fas-associated death domain*; FADD) ve pro-kaspaz-8 kompleks IIa'yı oluşturmaktadır. Kompleks IIa ise etkinleşmiş kaspaz-8 aracılıklı apopitozun yanı sıra, RIPK1'in bölünmesinde rol oynamaktadır. Kaspaz-8 eksikliğinde, kompleks I'deki cIAP'ın hızla RIPK1'i ubikuitinlemesi "kompleks IIb" olarak da adlandırılan RIPK1 ve RIPK3'ün birleşmesiyle sonuçlanmaktadır. Kompleks IIb ise, MLKL aracılıklı nekropitoza aracılık etmektedir (Şekil 2.14.) [21, 25, 26, 35, 36, 42, 53, 155, 156].

TNF aracılıklı nekropitozdan değişik olarak TLR'ler aracılığıyla düzenlenen nekropitozda ise, çift sarmallı DNA (*double-stranded DNA*; dsDNA) veya LPS'nin TLR3/TLR4 ile birleşmesi, RIPK1 ve RIPK3 ile birlikte olan *toll-IL-1* reseptör alanı içeren adaptör indükleyici IFN- β (*Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter-inducing IFN- β* ; TRIF) ve kompleks IIb arasındaki etkileşmeyi artırmaktadır. Kaspaz-8'in katalitik etkinliği bozulmuş ise, kompleks IIb MLKL'ye bağımlı nekropitozu tetiklemektedir. TRIF yalnızca TLR3'ün adaptör proteini iken, TLR4 yolu TRIF veya MyD88 tarafından etkinleştirilebilmektedir (Şekil 2.14.) [21, 25, 26, 35, 42, 53, 92, 157, 158].



Şekil 2.13. RIPK1/RIPK3 aracılıklı programlanmış hücre ölümü yolları [92]. ASC, Apoptozla ilişkili nokta benzeri protein içeren bir kaspaz biriktirici alan (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain); c-FLIP, hücrel Fas ile ilişkili ölüm alanı benzeri interlökin-1 β dönüştürücü enzim inhibitör protein (cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme-inhibitory protein); cIAP, apoptozun hücrel inhibitörü (cellular inhibitor of apoptosis); DAI, deoksiribonükleik aside bağımlı interferon düzenleyici faktör (deoxyribonucleic acid-dependent activator of interferon regulatory factor); dsDNA, çift sarmallı DNA (double-stranded DNA); FADD, Fas ile ilişkili ölüm alanı (Fas-associated death domain); GSDMD, gasdermin D (gasdermin D); HIV, insan bağışıklık yetersizliği virüsü (human immunodeficiency virus); IAV, enflüanza A virüsü (influenza A virus); Kgp, lizine özgü proteaz gingipain (lysine-specific protease gingipain); LUBAC, doğrusal ubikitin zincir montaj kompleksi (linear ubiquitin chain assembly complex); MLKL, karışık kökenli kinaz benzeri psöodokinaz (mixed lineage kinase domain-like pseudokinase); N-GSDMD, gasdermin D'nin N ucu (N-terminal gasdermin-D); NLRP, nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alan benzeri, lösinden zengin yinelenen ve pirin alanı içeren (nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing); Nsp, yapısal olmayan protein (non-structural protein); P, fosforile (phosphorylated); PFT, delik oluşturuucu toksin (pore-forming toxin); PR, proteaz (protease); RIPK, reseptör ile etkileşen serin/treonin protein kinaz (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase); SARS, şiddetli akut solunum sendromu (severe acute respiratory syndrome); ssRNA, tek sarmallı ribonükleik asit (single-stranded ribonucleic acid); TAK, dönüştürücü büyüme faktörü β ile etkinleştirilen kinaz (transforming growth factor β -activated kinase); TLR, toll benzeri reseptör (toll-like receptor); TNFR, tümör nekrozlaştırıcı faktör reseptörü (tumor necrosis factor receptor); TRADD, tümör nekrozlaştırıcı faktör reseptörü tip 1 ile ilişkili ölüm alanı (tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein); TRAF, tümör nekrozlaştırıcı faktör reseptörü ile ilişkili faktör (tumor necrosis factor receptor-associated factor); TRIF, toll-interlökin-1 reseptör alan içeren adaptör indükleyici interferon- β (toll-interleukin-1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon- β); Ub, ubikuitilasyon (ubiquitylation); ZBP, Z-deoksiribonükleik asit bağlayıcı protein (Z-deoxyribonucleic acid-binding protein).



Şekil 2.14. Patojenin algılanmasına yanıt olarak RIPK1/RIPK3'ün rol oynadığı enflamatuvar yollar [92]. AP, Etkinleştirici protein (activator protein); c-FLIP, hüresel Fas ile ilişkili ölüm alanı benzeri interlökin-1 β dönüştürücü enzim inhibitör protein (cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme-inhibitory protein); cIAP, apoptozun hüresel inhibitörü (cellular inhibitor of apoptosis); DAI, deoksiribonükleik aside bağımlı interferon düzenleyici faktör (deoxyribonucleic acid-dependent activator of interferon regulatory factor); dsDNA, çift sarmallı DNA (double-stranded DNA); dsRNA, çift sarmallı ribonükleik asit (double-stranded ribonucleic acid); ERK, ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz (extracellular signal-regulated kinase); HIV, insan bağışıklık yetersizliği virüsü (human immunodeficiency virus); I κ B, κ B inhibitörü (inhibitor of κ B); IFN, interferon (interferon); IKK, κ B kinase inhibitörü (inhibitor of κ B kinase); IRF, interferon düzenleyici faktör (interferon regulatory factor); JNK, c-Jun N-terminal kinaz (c-Jun N-terminal kinase); LMP, latent membran protein (latent membrane protein); LPS, lipopolisakkarit (lipopolysaccharide); LUBAC, doğrusal ubiuitin zincir montaj kompleksi (linear ubiquitin chain assembly complex); MAPK, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz (mitogen-activated protein kinase); MAVS, mitokondriyal antiviral sinyalleme proteinleri (mitochondrial antiviral signaling proteins); MDA, melanom farklılaşması ile ilişkili protein (melanoma differentiation-associated protein); MKKs, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinazlar (mitogen-activated protein kinase kinases); MyD, miyeloid farklılaşma faktörü (myeloid differentiation factor); NF- κ B, nükleer faktör κ B (nuclear factor κ B); P, fosforile (phosphorylated); PR, proteaz (protease); RIG, retinoik asit ile indüklenebilir gen (retinoic acid-inducible gene); RIPK, reseptör ile etkileşen serin/treonin protein kinaz (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase); TAK, dönüştürücü büyüme faktörü β ile etkinleştirilen kinaz (transforming growth factor β -activated kinase); TLR, toll benzeri reseptör (toll-like receptor); TNF, tümör nekrozlaştırıcı faktör (tumor necrosis factor); TNFR, tümör nekrozlaştırıcı faktör reseptörü (tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein); TRAF, tümör nekrozlaştırıcı faktör reseptörü ile ilişkili faktör (tumor necrosis factor receptor-associated factor); TRAM, toll-interlökin-1 reseptör alan içeren adaptör indükleyici interferon- β ile ilişkili adaptör molekül (toll-interleukin-1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon- β -related adaptor molecule); TRIF, toll-interlökin-1 reseptör alan içeren adaptör indükleyici interferon- β (toll-interleukin-1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon- β); Ub, ubiuitilasyon (ubiquitylation); YopJ, Yersinia dış proteini J (Yersinia outer protein-J); ZBP, Z-deoksiribonükleik asit bağlayıcı protein (Z-deoxyribonucleic acid-binding protein).

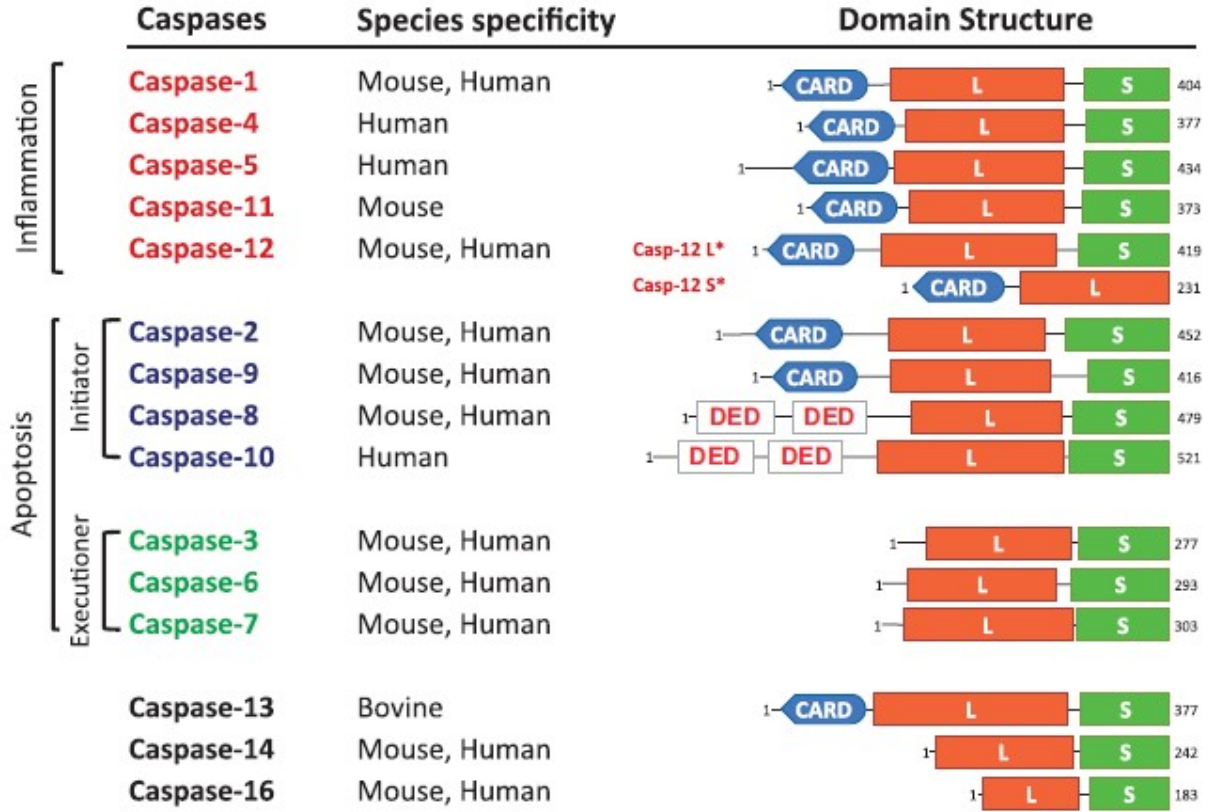
2.2.3. Enflamatuvar Hastalıkların Patojenizindeki Rolü

Son yıllarda, özellikle Alzheimer hastalığı, inme, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, multipl skleroz, *status epilepticus*, amyotrofik lateral skleroz, omurilik zedelenmesi, diyabet, ateroskleroz, miyokart enfarktüsü, aortik anevrizma, akut böbrek zedelenmesi, pulmoner arteriyel hipertansiyon, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, akut solunum sıkıntısı sendromu, astım, akut akciğer zedelenmesi, idiyopatik pulmoner fibroz, karaciğer sirozu, kronik hepatit, alkolik karaciğer hastalığı, akut karaciğer zedelenmesi, pankreatit, çölyak hastalığı, enflamatuvar bağırsak hastalığı, psöriyaz, gut, osteoartrit ve romatoid artrit ile çeşitli türdeki kanserler olmak üzere, patojenezinde enflamasyon ve/veya otoimmünitenin rol oynadığı hastalıkların tedavisinde kullanılmak amacıyla RIPK1/RIPK3/MLKL nekrozomu aracılıklı nekropitozu önleyen ilaçların geliştirilmesine yönelik çalışmalar üzerinde yoğunlaşmıştır [24, 25, 33, 35-38, 40-43, 45, 47-56, 59].

2.3. Kaspaz-11/GSDMD Aracılıklı Piroptoz

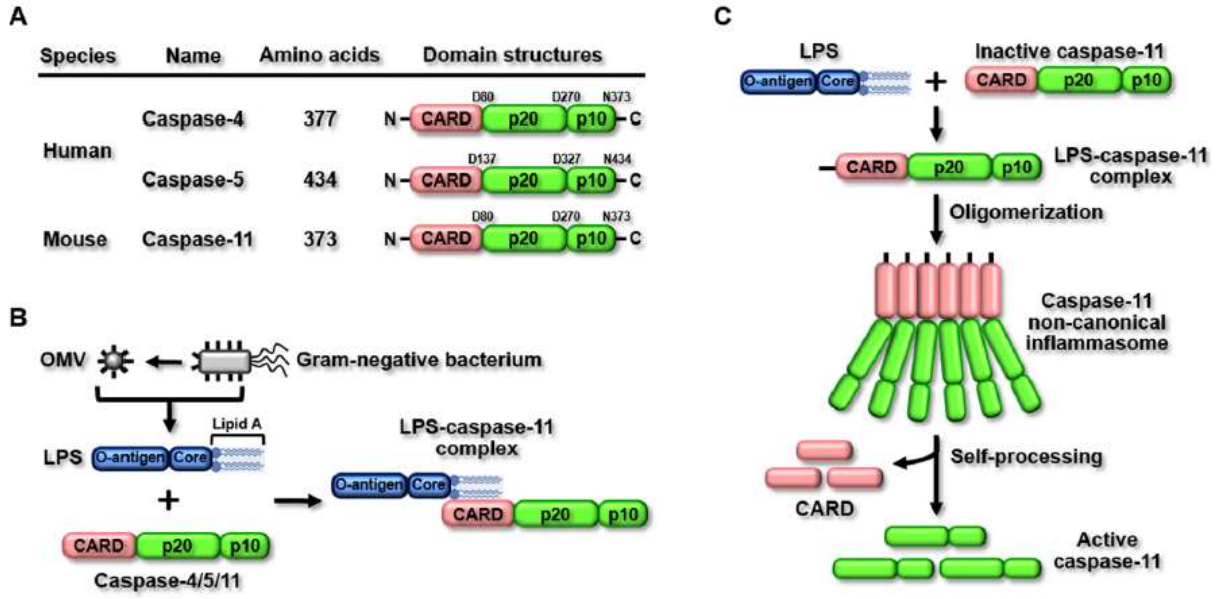
2.3.1. Özellikleri

Kaspazlar (sistein-aspartik proteazlar) sitokinlerin olgunlaşması, enflamasyon ve başta apoptoz, piropitoz ile nekropitoz olmak üzere hücre ölümü ile sonuçlanan süreçlerde sinyallerin koordine edilmesi ve bütünleştirilmesinde önemli rolleri olan proteolitik enzimlerdir [159-166]. İşlevlerine bağlı olarak, kaspaz-2, kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-10 apoptotik kaspazlardır. Kaspaz-1, kaspaz-4, kaspaz-5, kaspaz-11 ve kaspaz-12 ise başlıca enflamasyonda rol oynamaktadırlar. Apoptotik kaspazlar N ucuna doğru özgül protein etkileşim alanlarının varlığına veya yokluğuna bağlı olarak "başlatıcılar" ve "efektörler" olarak 2 alt gruba ayrılmışlardır. Başlatıcı kaspazlar, etkinleştirilmelerini kolaylaştırmak için, dimerizasyonları ve/veya daha büyük komplekslere birikmelerine aracılık eden ölüm efektör alanları (kaspaz-8 ve kaspaz-10) veya kaspaz biriktirici alanları (kaspaz-2, kaspaz-9, kaspaz-1 ve kaspaz-11) içerirler (Şekil 2.15. ve Şekil 2.16.) [164, 167].

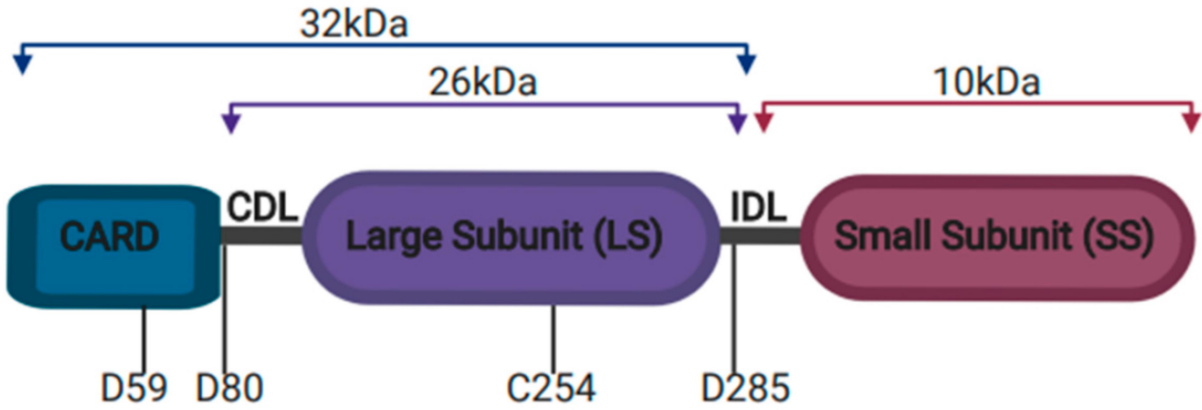


Şekil 2.15. Memeli kaspazlarının yapısal ve işlevsel özellikleri [164]. CARD, kaspaz biriktirici ve etkinleştirici alan (caspase-recruitment and activation domain); Casp, kaspaz (caspase); DED, ölüm efektör alanı (death effector domain); L, uzun form (long form); S, kısa form (short form).

"Ich-3" veya "kaspaz-4" olarak da bilinen fare kaspaz-11'i, fare kaspaz-1'i ile %46 oranında özdeşlik paylaşan, proteaz 5'in kaspaz-1 alt ailesinin bir üyesidir [168]. Kaspaz-11 yapısal CARD, büyük alt birim (26 kDa [kilodalton]) ve küçük alt birim (10 kDa) olmak üzere 3 alandan oluşmaktadır. N ucu CARD alanı bir CARD alanı bağlayıcı bölge tarafından büyük alt biriminden ayrılmıştır. Büyük alt birim ve C ucu küçük alt birim alanlar arası bağlayıcı bölge (*inter-domain linker region*; IDL) ile ayrılan katalitik alanlardır. Büyük ve küçük katalitik alanlar P10 ve P26 veya P32 alt birimlerini oluşturmak üzere D285'te IDL'nin işlenmesiyle ayrılmışlardır. Etkin sistein rezidüsü olan C254 büyük alt birimin enzimatik etkin bölgesi içinde yer almaktadır (Şekil 2.17.) [159, 163, 169].



Şekil 2.16. Kaspaz-11'in yapısı ve LPS ile etkileşmesinin ardından gelişen olaylar [167]. *CARD*, kaspaz biriktirici ve etkinleştirici alan (*caspase-recruitment and activation domain*); *LPS*, lipopolisakkarit (*lipopolysaccharide*); *OMV*, dış membran vezikülü (*outer membrane vesicle*).



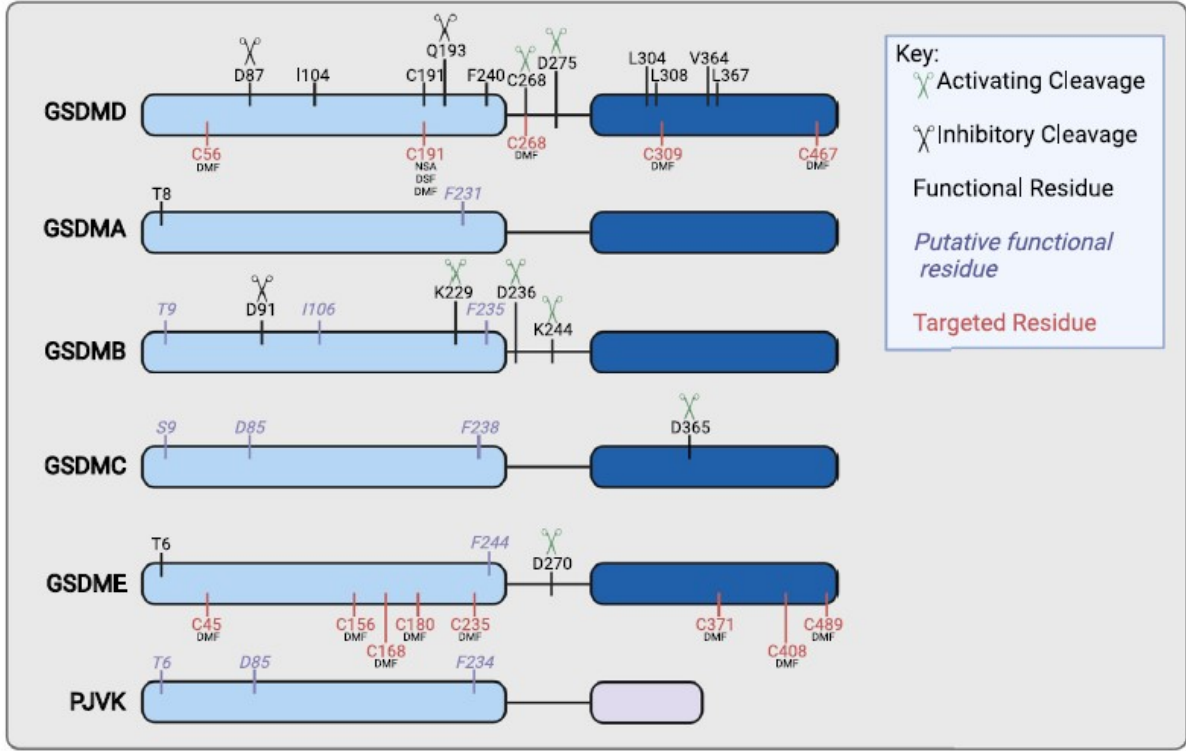
Şekil 2.17. Kaspaz-11'in yapısal alanları [159]. *CARD*, kaspaz biriktirici ve etkinleştirici alan (*caspase-recruitment and activation domain*); *CDL*, kaspaz biriktirici ve etkinleştirici alan alanı bağlayıcı bölge (*caspase-recruitment and activation domain domain linker region*); *IDL*, alanlar arası bağlayıcı bölge (*inter-domain linker region*); *LS*, büyük alt birim (*large subunit*); *SS*, küçük alt birim (*small subunit*).

2.3.2. Düzenlenmesi

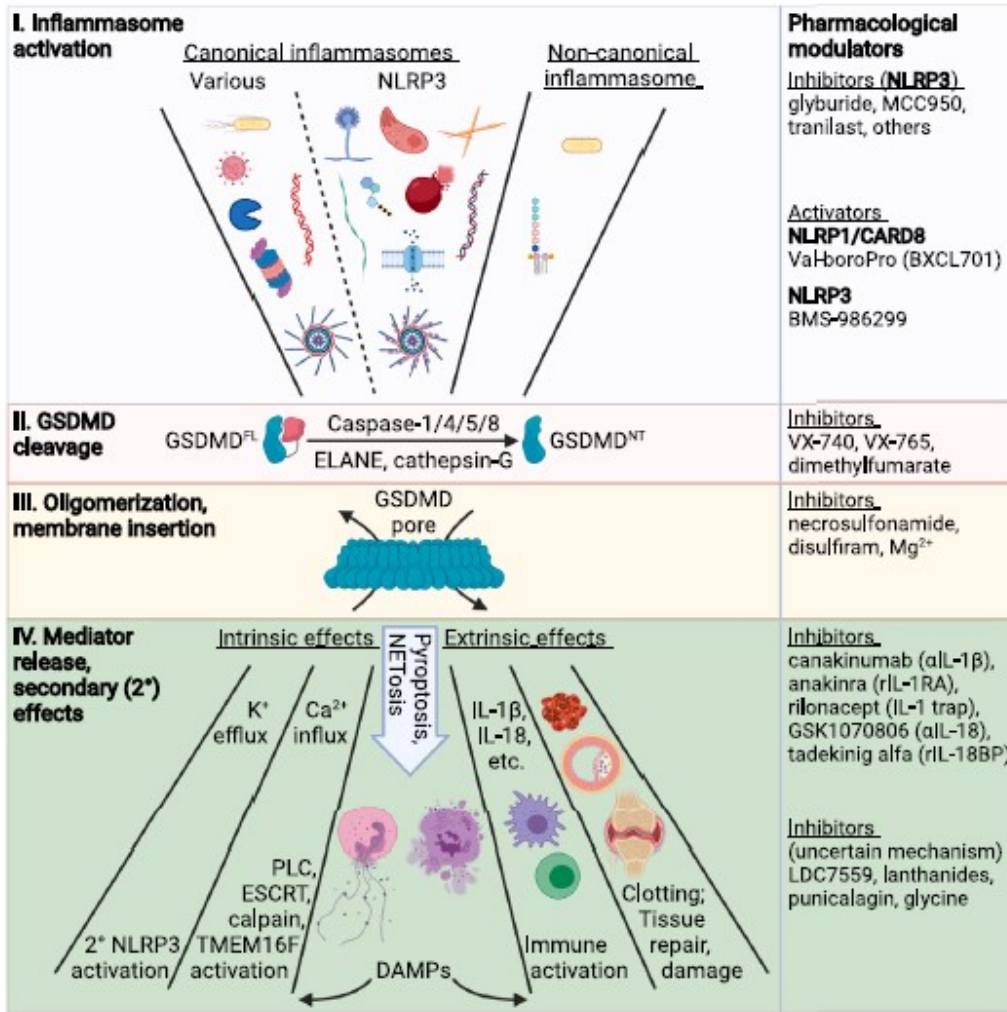
Kaspazlar, çoğu hücrede, etkinliklerini kolaylaştırmak için işleme ve heterodimerizasyon gerektiren, etkisiz monomerik zimojenler (pro-kaspazlar) olarak eksprese edilirler [159]. Fare kaspaz-11'in ortoloğu, insanlarda amino asit dizisi homolojisine dayalı olarak ya kaspaz-4 ya da kaspaz-5'tir ve çeşitli kaynaklarda "kaspaz-4/5/11" olarak da geçmektedir. Öte yandan, yalnızca kaspaz-5'in LPS ve IFN'ler gibi hücre dışı uyaranlara yanıt olarak fare kaspaz-11'ine benzer biçimde düzenlendiği ileri sürülmüştür [170]. Kaspaz-11 43 ve 38 kDa öncülleri olarak sentezlenmektedir; ancak, öteki kaspazların tersine, pro-kaspaz-11'in ekspresyonu enflamatuvar uyarı gerektirmektedir [166]. LPS'nin farelere uygulanması timus, dalak, karaciğer ve akciğerin yanı sıra, özellikle dalak makrofaj ve B hücrelerinde pro-kaspaz-11'in protein ekspresyonunu hızla indüklemektedir [171, 168].

Gasdermin ailesi insanlarda gasdermin A-E ve DFNB59 olmak üzere 6 üyeden oluşmaktadır. Fareler, GSDMB dışında, 3 GSDMA (GSDMA1-A3) ve 4 GSDMC (GSDMC1-4) homoloğuna sahiplerdir. Pejvakin (PJVK, DFNB59) dışında, aile üyelerinde bir peptit bağlayıcısı ile bağlanmış N ve C ucu olmak üzere iki alan bulunmaktadır. Benzer yapıya sahip olan gasderminlerin bu alanları ~ %45 homolojiye sahiplerdir. N ucu alanlarının transmembranal delik oluşturma yeteneğine sahip efektör alanlar olduğu düşünülmektedir. GSDMDA/D/E'nin C ucu alanlarının ise, otoinhibitör rolü bulunmaktadır (Şekil 2.18.) [171-179].

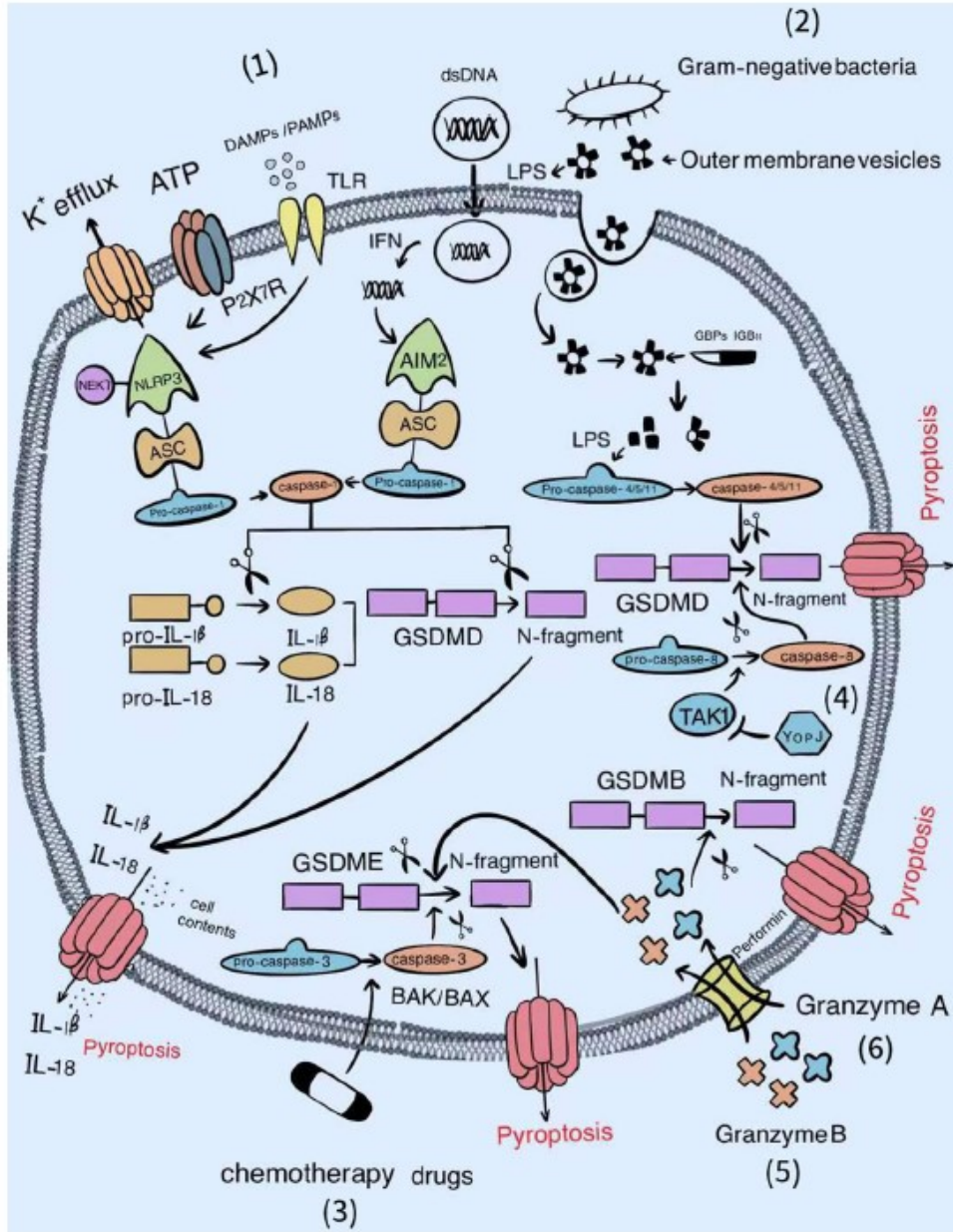
GSDMD bir peptit bağlayıcı molekül ile birbirine bağlanmış 31 kDa N ucu (GSDMD-N) ve 22 kDa C ucu (GSDMD-C)'den oluşan bir proteindir. Etkinleşmesinin ardından, bu peptit bağlayıcı molekül otoinhibitör alan olan GSDMD-C'den GSDMD-N'yi ayırmaktadır [180-182]. GSDMD-N ise, IL- β ve IL-18 gibi sitokinlerin salıverilmesinin yanı sıra, iyonlar ve suyun düzenlenmesini bozan bir transmembranal delik oluşmasının sonucunda piropitoza yol açmaktadır (Şekil 2.19.) [171-176, 178, 179, 183-186]. Piropitozu tetiklemek üzere gasdermin ailesini etkinleştiren çeşitli etkenler Şekil 2.20.'de gösterilmiştir [179].



Şekil 2.18. Gasderminlerin özellikleri [178]. DMF, Dimetil fumarat (dimethyl fumarate); GSDMA, gasdermin A (gasdermin A); GSDMB, gasdermin B (gasdermin B); GSDMC, gasdermin C (gasdermin C); GSDMD, gasdermin D (gasdermin D); GSDME, gasdermin E (gasdermin E); PJVK, pejvakin, DFNB59.



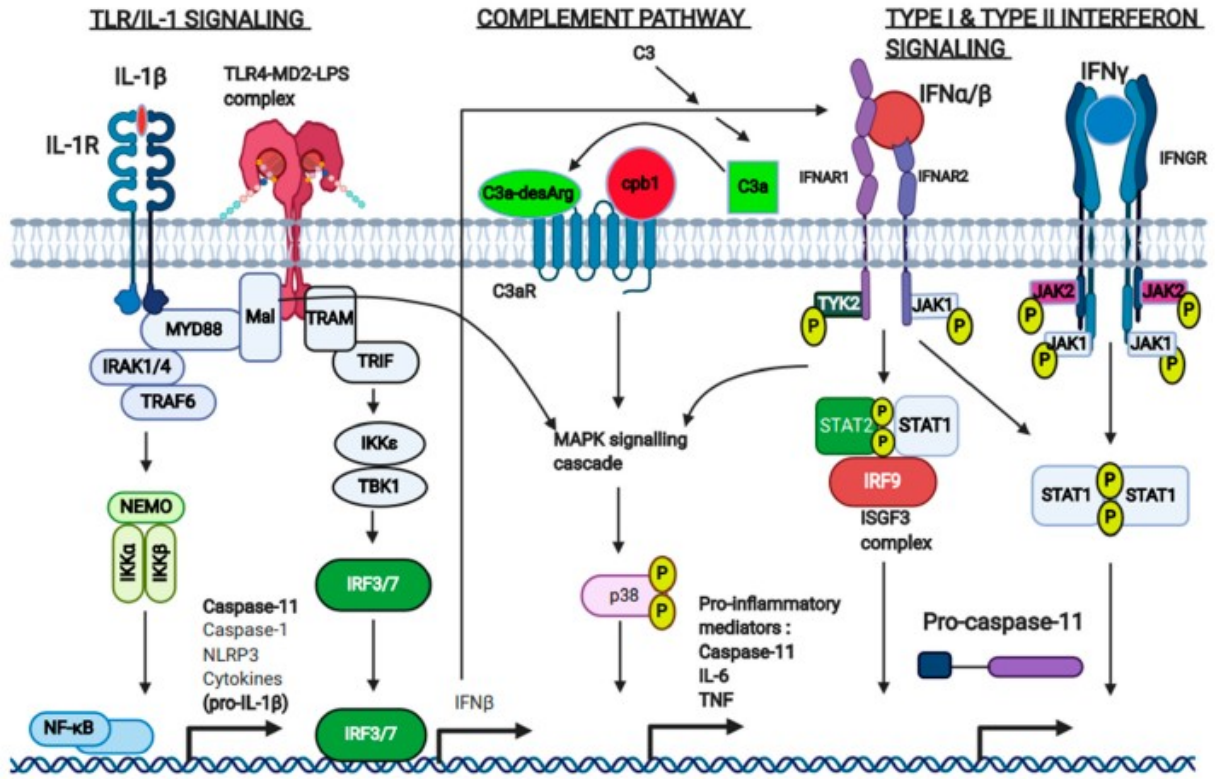
Şekil 2.19. Klasik ve klasik olmayan inflamazomlar tarafından GSDMD'nin etkinleşmesinin ardından gelişen ve piropitoz ile NEToz ile sonuçlanan olaylar [179]. Ca²⁺, Kalsiyum iyonu (calcium ion); CARD, kaspaz biriktirici ve etkinleştirici alan (caspase-recruitment and activation domain); DAMPs, zedelenmeyle ilişkili moleküler kalıplar (damage-associated molecular patterns); ELANE, nötrofil elastaz (neutrophil elastase); ESCRT, taşıma için gerekli endozomal sıralama kompleksi (endosomal sorting complex required for transport); GSDMD, gasdermin D (gasdermin D); GSDMD^{NT}, gasdermin D'nin N ucu (N-terminal gasdermin-D); IL, interlökin (interleukin); K⁺, potasyum iyonu (potassium ion); Mg²⁺, magnezyum iyonu (magnesium ion); NLRP, nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alan benzeri, lösinden zengin yinelenen ve pirin alanı içeren (nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing); PLC, fosfolipaz C (phospholipase C); rIL, rekombinant interlökin (recombinant interleukin); TMEM, transmembran (transmembrane).



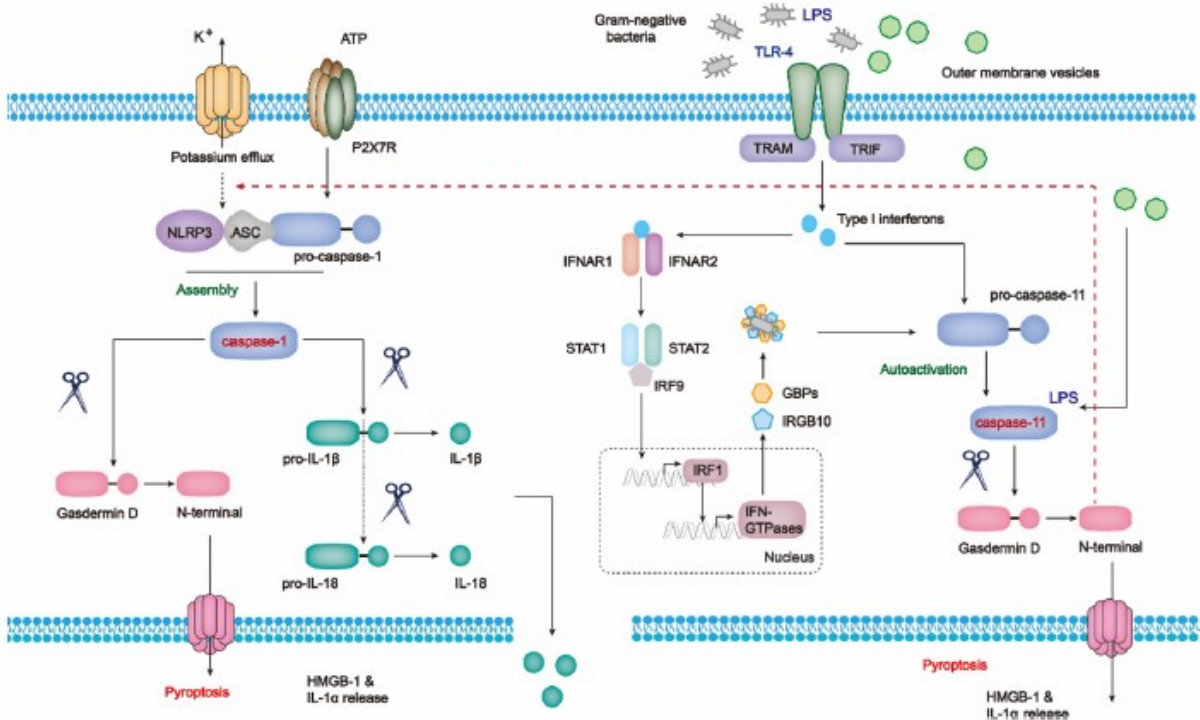
Şekil 2.20. Piropitozu tetiklemek üzere gasdermin ailesini etkinleştiren çeşitli etkenler [179]. *AIM*, *Absent in melanoma*; *ASC*, *apoptozla ilişkili nokta benzeri protein içeren bir kaspaz biriktirici alan (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain)*; *ATP*, *adenozin trifosfat (adenosine triphosphate)*; *GBPs*, *guanilat bağlayıcı proteinler (guanylate binding proteins)*; *GSDMB*, *gasdermin B (gasdermin B)*; *GSDMD*, *gasdermin D (gasdermin D)*; *GSDME*, *gasdermin E (gasdermin E)*; *IFN*, *interferon (interferon)*; *IL*, *interlökin (interleukin)*; *K⁺*, *potasyum iyonu (potassium ion)*; *LPS*, *lipopolisakkarit (lipopolysaccharide)*; *NEK*, *never in mitosis gene A ile ilişkili kinaz (never in mitosis gene A-related kinase)*; *NLRP*, *nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alan benzeri, lösinden zengin yinelenen ve pirin alanı içeren (nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing)*; *P2X7R*, *pürinerjik reseptör P2X 7 (purinergic receptor P2X 7)*; *TAK*, *dönüştürücü büyüme faktörü β ile etkinleştirilen kinaz (transforming growth factor β-activated kinase)*; *TLR*, *toll benzeri reseptör (toll-like receptor)*; *YopJ*, *Yersinia dış proteini J (Yersinia outer protein-J)*.

Klasik ve klasik olmayan yollarda kaspaz-11'in ekspresyonu ve etkinliğini artıran başlıca uyarıcılar LPS gibi patojen ilişkili moleküler kalıp (*pathogen-associated molecular pattern*; PAMP)'lar ve pro-enflamatuvar sitokinlerdir (Şekil 2.21., Şekil 2.22. ve Şekil 2.23.) [18, 159, 162, 167, 169, 187]. İntraselüler bir LPS reseptörü olarak da bilinen kaspaz-11 gibi enflamatuvar bir kaspazı içeren klasik olmayan inflamazom endotoksini tanımaktadır [18, 19, 25, 162, 166, 169, 188-194]. Kaspaz-11 ekspresyonunun TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 ve TLR9 reseptörleri aracılığıyla TLR sinyal ileti yolları, IL-1R aracılığıyla IL-1 sinyal ileti yolu, IFN- α/β reseptörü (*IFN- α/β receptor*; IFNAR) ve IFN- γ reseptörü aracılığıyla IFN sinyal ileti yolu, mtDNA reseptörü aracılığıyla mitokondriyal DNA zedelenmesi ile C3a reseptörü (*C3A receptor*; C3aR) aracılığıyla kompleman yolunun etkinleşmesinin yol açtığı olaylar sonucunda ekspresyonu ve/veya etkinliği artan NF- κ B, tür I ve II IFN'ler ve/veya p38 MAPK ile *up-regüle* olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır [159, 166, 194]. Kaspaz-11'in oto-proteolizi etkinleşmesi ve sonraki olayların düzenlenmesi için gereklidir. Aşırı ekspresyonu veya sitoplazmik LPS ile uyarılmasıyla deneysel olarak indüklenen kaspaz-11'in etkinleşmesi N ucu CARD alanının büyük alt birimden çıkarılması ile büyük ve küçük katalitik alanların ayrılmasıyla sonuçlanan iki oto-proteoliz olayının başlamasına yol açmaktadır [192, 195]. Gram-negatif bakteri veya intraselüler LPS tarafından kaspaz-11'in etkinleştirilmesinin ardından oligomerize olması ve substratı olan GSDMD'nin katalitik N ucu alanı kaspaz-11 tarafından bölünen piropitotik delik oluşturucu protein GSDMD'nin N ucu p30 fragmanı (p30-GSDMD) gibi delik oluşturucu peptitlere bölünmesi, DAMP'lardan biri olan HMGB1 aracılığıyla IL- β gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin salıverilmesinin aracılık ettiği piropitoz ile sonuçlanmaktadır [160, 165, 166, 169, 172, 184, 187].

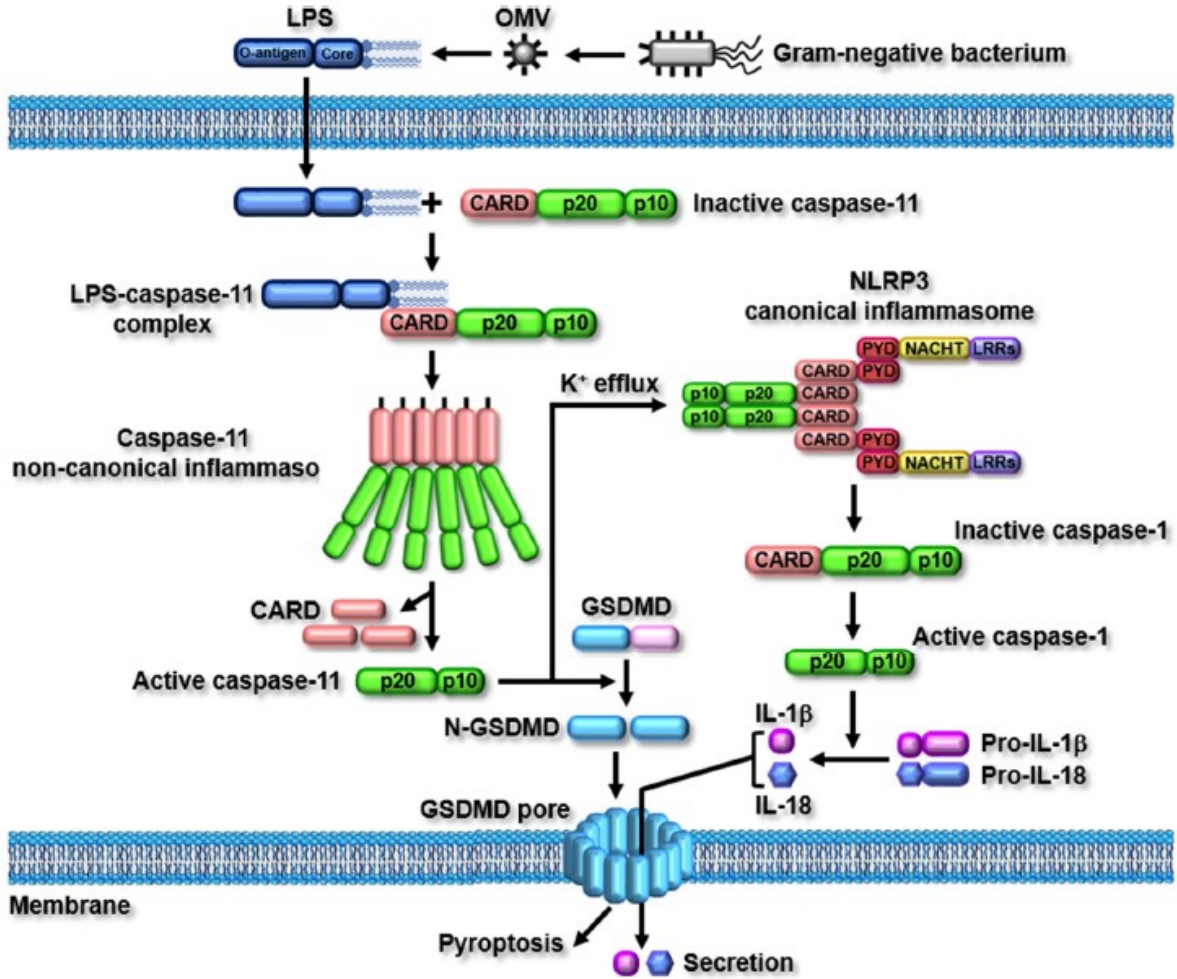
Ayrıca, son yıllarda yapılan çalışmaların sonuçları, LPS'nin neden olduğu kaspaz-11'in etkinliğindeki artmanın guanilat bağlayıcı proteinler, HMGB1, L-adrenalin ve oksitlenmiş fosfolipitler gibi mediyatörler tarafından negatif veya pozitif yönde düzenlenebileceğini göstermektedir [159, 165, 194]. Örneğin, kan dolaşımındaki HMGB1 LPS'yi bağlamakta, ilerlemiş glikasyon son ürünleri reseptörü aracılığıyla endositoz yoluyla makrofajlar/endotelial hücrelere girmekte ve lizozomal yırtılma ile LPS salıverilmesine neden olmaktadır; bu olayın, bakteriyel sepsise karşı direnç gelişmesinde rolü olduğu ileri sürülmüştür [196]. L-Adrenalinin α_{2B} -adrenerjik reseptöre bağlanarak etkinleştirdiği protein kinaz A kaspaz-11 fosforilasyonunu kolaylaştırmakta ve böylece kaspaz-11 etkinliğini azaltmaktadır [197]. Oksitlenmiş fosfolipitler ise, düşük miktarlarda LPS ile yarışarak kaspaz-11 etkinliğini azaltırlarken [198, 199], yüksek miktarlarda kaspaz-11'in oligomerizasyonu ve etkinleşmesine neden olabilmektedirler [200].



Şekil 2.21. Kaspaz-11'in ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan PAMP'lar ve/veya sitokinlerin aracılık ettiği sinyal ileti yolları [159]. *C3aR*, *C3a* reseptörü (*C3a* receptor); *cbp1*, siklik adenosin monofosfat yanıt elementi bağlayıcı proteini bağlayıcı protein (*cyclic adenosine monophosphate-response element binding protein-binding protein*); *IFN*, interferon (*interferon*); *IFNAR*, interferon- α/β reseptörü (*interferon- α/β receptor*); *IKK*, κB kinase inhibitörü (*inhibitor of κB kinase*); *IKKs*, κB kinase inhibitörleri (*inhibitor of κB kinases*); *IL*, interlökin (*interleukin*); *IL-1R*, interlökin-1 reseptörü (*interleukin-1 receptor*); *IRAK*, interlökin-1 reseptörü ile ilişkili kinaz (*interleukin-1 receptor-associated kinase*); *IRF*, interfeon düzenleyici faktör (*interferon regulatory factor*); *ISGF*, interferon ile uyarılan büyüme faktörü (*interferon stimulated growth factor*); *JAK*, Janus kinaz (*Janus kinase*); *LPS*, lipopolisakkarit (*lipopolysaccharide*); *MAPK*, mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz (*mitogen-activated protein kinase*); *MD*, miyeloid farklılaşma (*myeloid differentiation*); *MYD*, miyeloid farklılaşma faktörü (*myeloid differentiation factor*); *NEMO*, nükleer faktör κB esansiyel düzenleyicisi (*nuclear factor κB essential modulator*); *NF- κB* , nükleer faktör κB (*nuclear factor κB*); *NLRP*, nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alan benzeri, lösinden zengin yinelenen ve pirin alanı içeren (*nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing*); *P*, fosforile (*phosphorylated*); *STAT*, transkripsiyonun sinyal ileticisi ve etkinleştiricisi (*signal transducer and activator of transcription*); *TBK*, tümör nekrozlaştırıcı faktör reseptörü ile ilişkili faktör nükleer faktör κB etkinleştiricisi bağlayıcı kinaz (*tumor necrosis factor receptor family member associated nuclear factor κB activator-binding kinase*); *TLR*, *toll* benzeri reseptör (*toll-like receptor*); *TNF*, tümör nekrozlaştırıcı faktör (*tumor necrosis factor*); *TRAF*, tümör nekrozlaştırıcı faktör reseptörü ile ilişkili faktör (*tumor necrosis factor receptor-associated factor*); *TRAM*, *toll*-interlökin-1 reseptör alan içeren adaptör indükleyici interferon- β ile ilişkili adaptör molekül (*toll-interleukin-1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon- β -related adaptor molecule*); *TRIF*, *toll*-interlökin-1 reseptör alan içeren adaptör indükleyici interferon- β (*toll-interleukin-1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon- β*).



Şekil 2.22. Klasik olmayan inflamazom etkinleşmesi sonucunda gelişen piropitozda kaspaz-11/GSDMD'nin rolü [194]. ASC, apoptozla ilişkili nokta benzeri protein içeren bir kaspaz biriktirici alan (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain); ATP, adozin trifosfat (adenosine triphosphate); GBPs, guanilat bağlayıcı proteinler (guanylate binding proteins); GTPase, guanozin trifosfataz (guanosine triphosphatase); HMGB, high-mobility-group-box; IFN, interferon (interferon); IFNAR, interferon- α/β reseptörü (interferon- α/β receptor); IL, interlökin (interleukin); IRF, interferon düzenleyici faktör (interferon regulatory factor); IRGB, immünite ile ilişkili guanozin trifosfataz aile üyesi b10 (immunity-related guanosine triphosphatase family member b10); K⁺, potasyum iyonu (potassium ion); LPS, lipopolisakkarit (lipopolysaccharide); NLRP, nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alan benzeri, lösinden zengin yinelenen ve pirin alanı içeren (nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing); P2X7R, pürinerjik reseptör P2X 7 (purinergic receptor P2X 7); STAT, transkripsiyonun sinyal ileticisi ve etkinleştiricisi (signal transducer and activator of transcription); TLR, toll benzeri reseptör (toll-like receptor); TRAM, toll-interlökin-1 reseptör alan içeren adaptör indükleyici interferon- β ile ilişkili adaptör molekül (toll-interleukin-1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon- β -related adaptor molecule); TRIF, toll-interlökin-1 reseptör alan içeren adaptör indükleyici interferon- β (toll-interleukin-1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon- β).

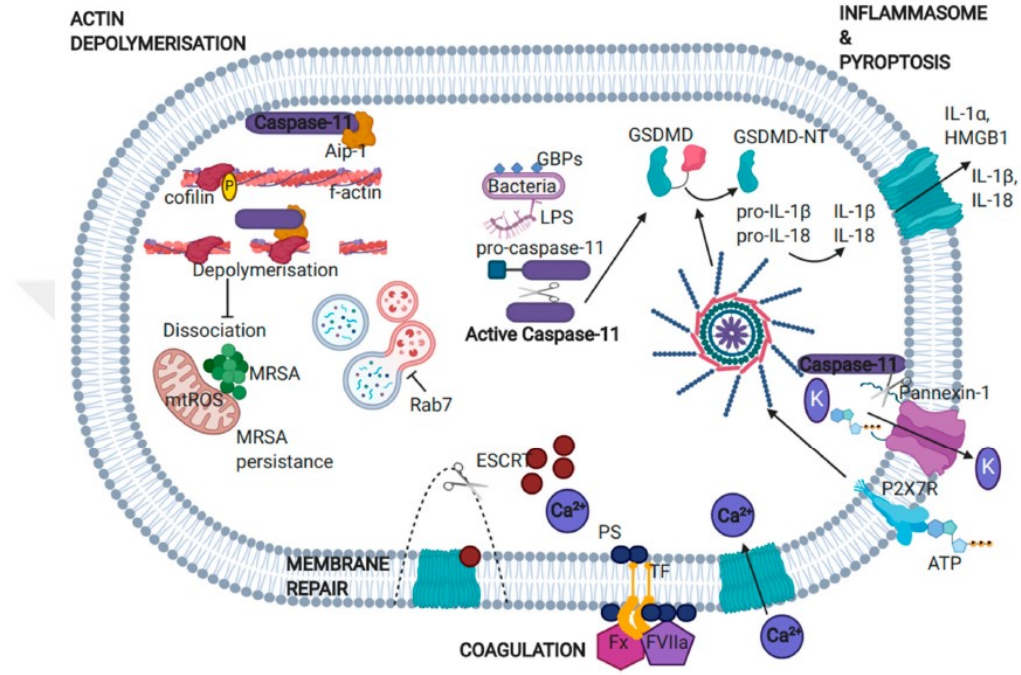


Şekil 2.23. LPS ile uyarılmanın ardından kaspaz-11/GSDMD aracılıklı piropitozda gelişen olaylar [169]. *CARD*, kaspaz biriktirici ve etkinleştirici alan (*caspase-recruitment and activation domain*); *GSDMD*, *gasdermin D* (*gasdermin D*); *IL*, interlökin (*interleukin*); *K⁺*, potasyum iyonu (*potassium ion*); *LPS*, lipopolisakkarit (*lipopolysaccharide*); *LRRs*, lösinden zengin yinelenenler (*leucine rich repeats*); *NACHT*, santral nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alanı (*central nucleotide-binding oligomerization domain*); *NLRP*, nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alan benzeri, lösinden zengin yinelenen ve pirin alanı içeren (*nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing*); *OMV*, dış membran vezikülü (*outer membrane vesicle*); *PYD*, pirin alanı (*pyrine domain*).

2.3.3. Enflamatuvar Hastalıkların Patojenizindeki Rolü

Pro-enflamatuvar kaspaz alt ailesinin nekrotik hücre ölümüne aracılık ettiği iyi bilinmektedir [159, 169, 187, 193, 201]. Klasik olmayan inflamazom oluşumundan sorumlu olan kaspaz-11'in birincil efektör işlevleri alarmin salıverilmesi ve GSDMD aracılıklı piropitoz ile sonuçlanan enflamatuvar etkinlik ile ilgilidir; ardından, enflamatuvar ve komşu hücrelerde klasik inflamazom etkinleşmesine yol açarak IL-1 β ve IL-18 salıverilmesine neden olmaktadır [18, 19,

159, 162, 163, 165-169, 172, 187]. Kaspaz-11'in, ayrıca, aktin dinamiklerini modüle etme, mitokondriyal solunumu değiştirme, apoptozu indüklemeye ve bakteriyel enfeksiyon veya sepsis bağlamında kan pıhtılaşmasını tetikleme yeteneği de olmak üzere ek işlevleri olduğu da bildirilmiştir (Şekil 2.24.) [159, 163].



Şekil 2.24. Kaspaz-11'in efektör işlevleri [159]. *Aip*, Aktin ile ilişkili protein (*actin interacting protein*); *ATP*, adenosin trifosfat (*adenosine triphosphate*); Ca^{2+} , kalsiyum iyonu (*calcium ion*); *ESCRT*, taşıma için gerekli endozomal sıralama kompleksi (*endosomal sorting complex required for transport*); *FVIIa*, pıhtılaşma faktörü VIIa (*coagulation factor VIIa*); *Fx*, pıhtılaşma faktörü X (*coagulation factor X*); *GBPs*, guanilat bağlayıcı proteinler (*guanylate binding proteins*); *GSDMD*, gasdermin D (*gasdermin D*); *GSDMD-NT*, gasdermin D'nin N ucu (*N-terminal gasdermin-D*); *HMGB*, high-mobility-group-box; *IL*, interlökin (*interleukin*); *K*, potasyum iyonu (*potassium ion*); *LPS*, lipopolisakarit (*lipopolysaccharide*); *MRSA*, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*); *mtROS*, mitokondriyal reaktif oksijen türleri (*mitochondrial reactive oxygen species*); *P2X7R*, pürinerjik reseptör P2X 7 (*purinergic receptor P2X 7*); *PS*, fosfatidilserin (*phosphatidylserine*); *TF*, doku faktörü (*tissue factor*).

Son yıllarda, özellikle Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, multipl skleroz, *status epilepticus*, amyotrofik lateral skleroz, omurilik zedelenmesi, *myastenia gravis*, polimiyozit, diyabet, pulmoner arteriyel hipertansiyon, ateroskleroz, iskemik kalp hastalığı, miyokart enfarktüsü, akut akciğer zedelenmesi, enflamatuvar karaciğer hastalıkları, otoimmün hepatit, birincil biliyer kolanjit, alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı, alkolik olmayan steatohepatit, akut pankreatit, çölyak hastalığı, enflamatuvar bağırsak hastalığı, jinjivit, Sjögren sendromu, sistemik lupus eritematöz, lupus nefriti, Goodpasture sendromu, psöriyaz, gut, juvenil idiyopatik artrit, otoimmün orşit ve romatoid artrit ile çeşitli türdeki kanserler olmak üzere,

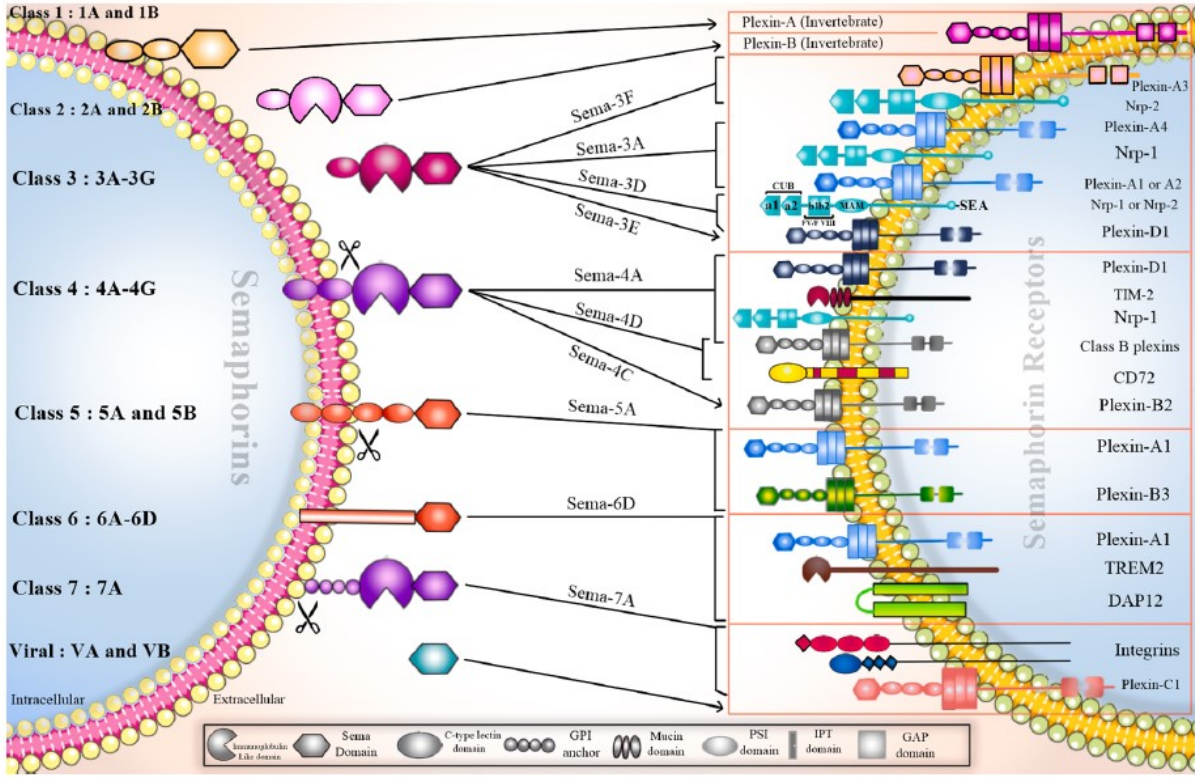
patojenezinde enflamasyon ve/veya otoimmüitenin rol oynadığı hastalıkların tedavisinde kullanılmak amacıyla kaspaz-11/GSDMD aracılıklı piropitozu önleyen ilaçların geliştirilmesine yönelik çalışmalar üzerinde yoğunlaşmıştır [24, 33, 36, 38, 41, 47, 49, 52, 54, 57, 167, 169, 171, 172, 174-176, 178, 179, 185, 194, 201-205]. Bunlara ek olarak, sitoplazmadaki organeller, proteinler ve makromolekülleri parçalayarak hücrenin canlı kalması ve korunmasında önemli bir rol oynayan otofajinin, DAMP'lar ve PAMP'ları uzaklaştırmasının yanı sıra, piropitozun temel bileşenlerini inhibe ederek, kaspaz-11 aracılıklı piropitozu negatif yönde düzenlediğine ilişkin çalışmaların bulgularına göre, alkolik yağlı olmayan karaciğer hastalığında piropitozun koruyucu rolü olabileceği ileri sürülmüştür [57].

2.4. SEMA3A

2.4.1. Özellikleri

Semaforinler sinir sisteminin gelişimi sırasında önemli işlevleri olan glikoproteinlerden oluşmuş büyük bir ailedir [206-209]. Semaforinlerin yapılarında yaklaşık 500 amino asitten oluşmuş SEMA alanı, bir veya daha çok sayıda sisteinden zengin pleksin-semaforin-integrin alanları ile pleksinler ve transkripsiyon faktörleri tarafından paylaşılan immünoglobuline benzeyen alanlar bulunmaktadır (Şekil 2.25.) [210].

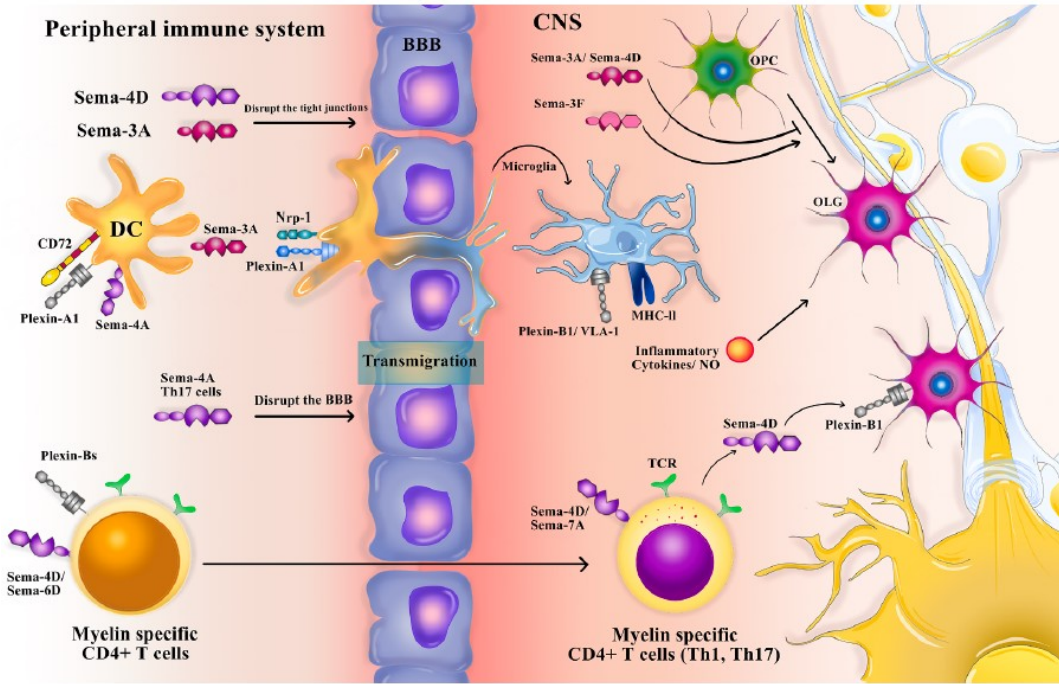
Semaforinler 8 alt gruba ayrılmışlardır: omurgasızlarda (1) Grup 1 (SEMA1A ve SEMA1B), (2) grup 2 (SEMA2A ve SEMA2B) ve SEMA5C ile omurgalılarda (3) grup 3 (SEMA3A-SEMA3G), (4) grup 4 (SEMA4A-SEMA4G), (5) grup 5 (SEMA5A ve SEMA5C), (6) grup 6 (SEMA6A-SEMA6D) ve (7) grup 7 (SEMA7A) ile (8) çeşitli DNA virüsleri tarafından kodlanan grup 8 (SEMAVA ve SEMA5V). Pleksinler ve nöropilinler semaforinlerin aracılık ettikleri sinyal ileti yollarındaki başlıca reseptörlerdir [211].



Şekil 2.25. Semaforinler ve ilişkili reseptörleri arasındaki etkileşimler [210]. *CD*, Farklılaşma kümesi (cluster of differentiation); *DAP*, DNAX etkinleştirici protein (DNAX-activating protein); *GAP*, guanozin trifosfataz etkinleştirici protein (guanosine triphosphatase activating protein); *GPI*, glikozil-fosfatidil inozitol (glycosyl-phosphatidylinositol); *IPT*, pleksinler ve transkripsiyon faktörleri tarafından paylaşılan immüoglobulin benzeri alanlar (immunoglobulin-like domains shared by plexis and transcription factors); *Nrp*, nöropilin (neuropilin); *PSI*, pleksin-semaforin-integrin (plexin-semaphorin-integrin); *Sema*, semaforin (semaphorin); *TIM*, T hücresi immüoglobulin ve müsin alanı (T-cell immunoglobulin and mucin domain); *TREM*, miyeloid hücresi üzerinde eksprese edilen tetikleyici reseptör (triggering receptor expressed on myeloid cell).

Keşfedildiği yıllarda "kolapsin" olarak adlandırılan SEMA3A omurgalılarda bilinen ilk SEMA'ydı [212-214]. Günümüzde ise, SEMA3A'nın yalnızca sinir sisteminin değil, aynı zamanda multipl skleroz gibi nörodejeneratif hastalıkların patojenezinde de rol oynadığı iyi bilinmektedir [215]. Örneğin, kimyasal olarak oluşturulan deneysel demiyelinizasyon modellerinde, SSS'nin miyelizan hücreleri olan aksonların veya oligodendrosit (*oligodendrocyte*; ODC)'lerin yenilenmesine SEMA3A'nın katkıda bulunduğu gösterilmiştir [216, 217]. Ayrıca, bir fare deneysel otoimmün ensefalomyelit modelinde, hastalığın ilerlemesi süresince, bağışıklık hücrelerinde SEMA3A'nın ulak ribonükleik asit (*messenger ribonucleic acid*; mRNA) ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik olmamasına karşın, bağışıklık sisteminde protein ekspresyonu azalmış ve SSS'de artmıştır. Transkripsiyon sonrası düzenlemelerin bu çelişkili bulguların nedeninin olduğu ileri sürülmüştür [218]. İlginç olarak, yetişkin bir fare demiyelinizasyon modelinde yapılan çalışmanın

sonuçlarına göre, SEMA3A ODC öncü hücrelerinin demiyelinizan bölgeye alınmasını bozmaktadır [213]. Benzer biçimde, SEMA3A'nın lezyon bölgesine doğru ODC öncü hücrelerinin göçü üzerindeki engelleyici etkisi veya zedelenmiş nöronların büyümesini önleyen itici etkinliği nedeniyle SSS'de zararlı bir rolü olduğu bildirilmiştir [215]. SEMA3A, ayrıca, endotel hücrelerinin sıkı bağlantılarını bozarak ve geçirgenliklerini artırarak kan-beyin engelinin bütünlüğü zayıflatmakta, sonuçta, SSS'ye çok daha yüksek oranda bağışıklık hücrelerinin geçişine neden olmaktadır [219]. Bunlara ek olarak, SEMA3A, ODC öncü hücrelerinin *in vitro* farklılaşmasını önleyebilmektedir. Sıçanların SSS'indeki demiyelinizan lezyonlara rekombinant SEMA3A enjeksiyonu ise remiyelinizasyonun başarısız olmasına neden olmaktadır. Bu bulgulara göre, multipl skleroz lezyonlarında görülen hem SSS remiyelinizasyonu hem de ODC öncü hücrelerinin farklılaşmasında SEMA3A'nın varlığının çok önemli bir rolü olduğunu göstermektedir [214]. Başta SEMA3A olmak üzere, çeşitli semaforinler ve reseptörlerinin demiyelinizasyondaki rolüne ilişkin mekanizmalar Şekil 2.26'da özetlenmiştir [210].



Şekil 2.26. Çeşitli semaforinler ve reseptörlerinin demiyelinizasyondaki rolüne ilişkin mekanizmalar [210]. BBB, Kan-beyin engeli (blood-brain barrier); CD, farklılaşma kümesi (cluster of differentiation); CNS, santral sinir sistemi (central nervous system); DC, dentritik hücre (dendritic cell); MHC, majör doku uygunluk kompleksi (major histocompatibility complex); NO, nitrik oksit (nitric oxide); OLG, oligodendrosit (oligodendrocyte); OPC, oligodendrosit projenitör hücre (oligodendrocyte progenitor cell); Sema, semaforin (semaphorin); TCR, T hücresi reseptörü (T cell receptor); Th, yardımcı T (T helper).

2.4.2. Ekspresyonunun Düzenlenmesi

SEMA3A'nın başta nöronlar, farklılaştırıcı makrofajlar, düzenleyici T ve B hücreleri, etkinleştirilmiş dentritik hücreler ile T hücreleri olmak üzere, böbrek, kemik, bağ ve kartilaj dokusunda da eksprese edildiği bildirilmiştir [220-223].

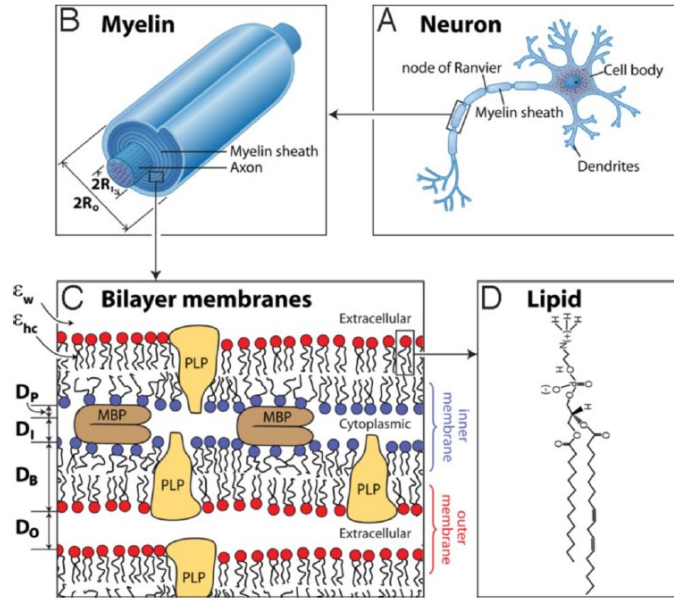
2.4.3. Enflamatuvar Hastalıkların Patojenezindeki Rolü

SEMA3A'nın, bağışıklık tepkisini sonlandırdığından dolayı, bağışıklık sistemini olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir [215]. Öte yandan, SEMA3A'nın bağışıklık sistemi üzerinde olumsuz etkisi olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Bağışıklık tepkileri üzerinde birden çok sayıda etkiye sahip bir SEMA olarak, SEMA3A, T hücresi aracılıklı adaptif bağışıklığı negatif, doğuştan gelen bağışıklığı ise pozitif yönde düzenlemektedir [209]. Son yıllarda, remiyelinizasyon işlemini önleyen bir molekül olan SEMA3A'nın, başta multipl skleroz olmak üzere, sistemik lupus eritematöz, sistemik skleroz, romatoid artrit, nöronal plastisite, SSS tümörleri, alerjik rinit ve kütanöz yara iyileşmesi gibi hastalıkların patojenezindeki rolüne ilişkin klinik öncesi ve klinik çalışmaların sayısı giderek artmaktadır [210, 211, 222-225].

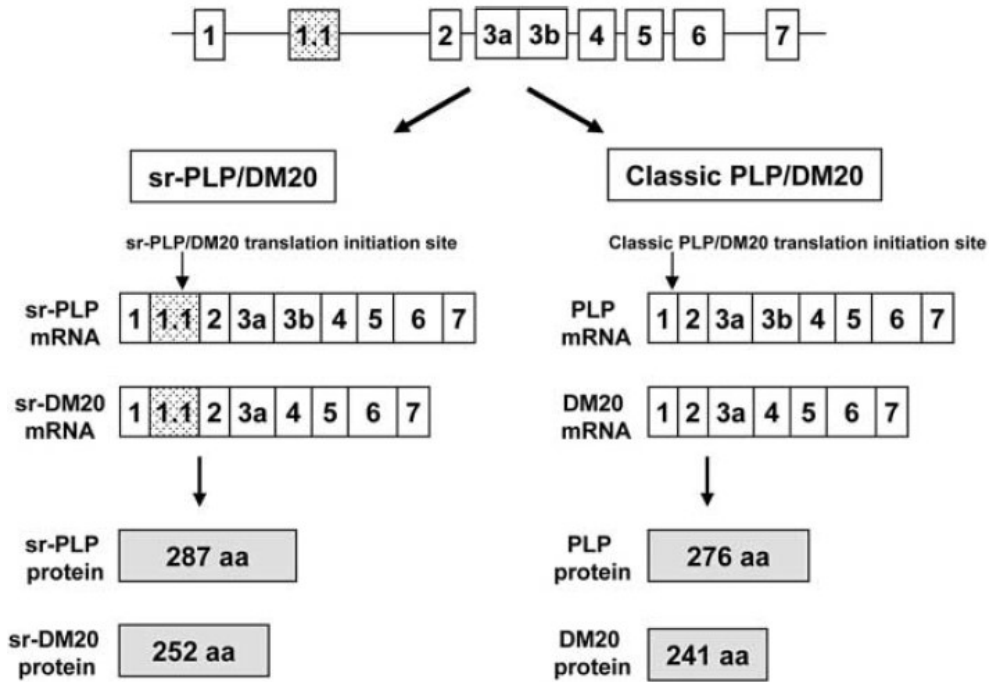
2.5. Miyelin PLP

2.5.1. Özellikleri

Miyelin kılıfının yapısı ve PLP'nin yerleşimi Şekil 2.27.'de gösterilmiştir [226]. PLP ile birlikte miyelin temel protein (*myelin basic protein*; MBP) tüm miyelin protein içeriğinin yaklaşık %60-80'ini oluşturmaktadır. PLP geni 1 (PLP1) X kromozomunun (Xq21-q22) proksimal uzun kolunu haritalayan 7 ekzonlu 17 kb'lik bir genidir [227, 228]. Ürünü olan PLP, alternatif ekleme ürünü DM20 proteini ile birlikte, miyelinin en çok miktarda bulunan proteinlerinden biridir [229]. Fare PLP/DM20 geninin yapısı Şekil 2.28.'de gösterilmiştir [230]. Ekzon 3'teki ikinci bir 5' ekleme verici alanından birinde alternatif ekleme ile oluşturulan tetraspaninlerden olan PLP1 ve DM20 aynı ekleme alıcı bölgesine katılırlar [229]. Proteinlerin 4 transmembran alanı 1 sitozolik halka ve sitozolik N ve C uçları ile 2 sistein köprüsü içeren 2 hücre dışı halka bulunmaktadır. İlk keşfedilen ve aynı zamanda "Folch-Lees" proteini olarak da bilinen PLP 276 amino aside sahiptir ve sitozolik döngüsünde 35 amino asitlik bir segment ile DM20'den farklıdır [231].



Şekil 2.27. Miyelin kılıfının yapısı ve PLP'nin yerleşimi [226]. (A) Miyelinli akson, (B) miyelin kılıfı, (C) iki tabakalı membranlar ve (D) fosfatidiletanolamin. MBP, Miyelin temel protein (myelin basic protein); PLP, proteolipit protein (proteolipid protein).



Şekil 2.28. Fare PLP/DM20 geninin yapısı [230]. aa, Amino asit (amino acid); mRNA, ulak ribonükleik asit (messenger ribonucleic acid); PLP, proteolipit protein (proteolipid protein); sr-DM20, soma kısıtlı DM20 (soma-restricted DM20); sr-PLP, soma kısıtlı proteolipit protein (soma-restricted proteolipid protein).

2.5.2. Ekspresyonunun Düzenlenmesi

SSS'de bulunan ODC'lerde PLP ve periferik sinir sisteminde DM20 baskın olmak üzere, PLP ve DM20 değişen oranlarda eksprese edilirler [232]. PLP, ayrıca, Schwann hücreleri [233-236], bazı nöron türleri [237, 238], immün sistem hücreleri [239, 240], olfaktör sinir hücreleri [241], kardiyak miyositler [242], insan amniyotik epitel hücreleri [243] ile Leidig [244] ve testis [240] hücrelerinde eksprese edilmektedir. Miyelin transkripsiyon faktörü 1, PPAR'lar, Nkx2.2, Ngn3 ile tiroit hormonu reseptörü β tarafından PLP gen ekspresyonunun transkripsiyonel düzeyde artırıldığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır [245-247].

2.5.3. Enflamatuvar Hastalıkların Patojenezindeki Rolü

Miyelin PLP ekspresyonundaki değişikliklerin başta multipl skleroz ve Pelizaeus-Merzbacher hastalığı olmak üzere enflamatuvar demiyelinizan hastalıkların patojenezinde önemli rolü olduğuna ilişkin klinik öncesi ve klinik çalışmalar bulunmaktadır [248-251].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Etik Kurul Onayı

Bu tez çalışmasında kullanılan fareler üzerinde gerçekleştirilen işlemler, Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulundan onay alınarak yapılmıştır (Kurulun 28/06/2021 ile 26/09/2022 tarihli ve sırasıyla 2021/30 ile 2022/16 sayılı kararları).

3.1.2. Deney Hayvanı

Deneylelerde 12 saat aydınlık/12 saat karanlık dönemlerinde yaşatılan 21-31 g ağırlığında 80 adet erkek Balb/c fare kullanılmıştır. Deney hayvanları Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Merkezinden sağlanmıştır.

3.1.3. Sarf Malzemesi

Akrilamit 4K çözeltisi (%30) (161-0157; Bio-Rad)

Amonyum persülfat (A2941; AppliChem)

Aprotinin (A2132; AppliChem)

Benzamidin (B6506; Sigma)

Bradford reajanı (B6916; Sigma)

Bromfenol mavisi (A3640; AppliChem)

Coomassie *brilliant blue R 250* (1.12553; Merck)

Dimetil sülfoksit (DMSO) (60153; A1584; AppliChem)

Ditiyotreytol (DTT) (A2948; AppliChem)

Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (A2937; AppliChem)

Filtre kağıdı (Whatman grade no 3MM chr chromatography paper, cellulose) (3030-917; Whatman)

Fosforile MLKL (Ser³⁵⁸) proteini için primer antikor (*Phospho-MLKL [Ser358] Polyclonal Antibody*) (PA5-105678; Thermo Fisher)

Fosforile RIPK1 (Ser¹⁶⁶) proteini için primer antikor (*Anti-RIPK1/RIP1 Phospho [Ser166] antibody [YJY-1-5]*) (ARG66476; Arigo Biolaboratories)

Fosforile RIPK3 (Ser²³²) proteini için primer antikor (*Phospho-RIP3 [Ser232] Polyclonal Antibody*) (PA5-105701; Thermo Fisher)

Gliserol (A2926; AppliChem)

Glisin (A1067; AppliChem)

Hidroklorik asit (*Hydrochloric acid*; HCl) (100314; Merck)

HEPES (A3724; AppliChem)

HMGB1 proteini için primer antikor (*Anti-HMG-1/HMGB1 Antibody*) (HAP46.5) (sc-56698; Santa Cruz)

IL-1 β proteini için primer antikor (*Anti-IL-1 β Antibody [11E5]*) (sc-52012; Santa Cruz)

İzobütanol (A1150; AppliChem)

Kaspaz-11 p20 proteini için primer antikor (*Caspase-11 p20 antibody [A-2]*) (sc-374615; Santa Cruz)

Löpeptin (L9783; Sigma)

LPS (*Escherichia coli*; *E. coli*) lipopolisakkaridi, O111:B4) (L4130;Sigma)

Metanol (947.046.2500; Isolab)

Miyelin PLP için primer antikor (*Myelin PLP antibody, HRP conjugated*) (bs-11093R-HRP; Bioss Inc.)

MLKL proteini için primer antikor (*MLKL Polyclonal Antibody*) (PA5-102810; Thermo Fisher)

Molekül ağırlığı belirteci (*Rainbow marker, full-range*) (RPN 800E; Amersham)

N,N,N',N'-Tetrametiletilediamin (*N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine*; TEMED) (A1148; AppliChem)

Nitroselüloz membran (162-0112; Bio-Rad)

Nec-1s (17802; Cell Signaling)

p30-GSDMD proteini için primer antikor (*Anti-GSDMDC1 Antibody [A-7]*) (sc-393656; Santa Cruz)

Ponceau S (A1405; AppliChem)

Potasyum dihidrojen fosfat (*Potassium dihydrogen phosphate*; KH₂PO₄) (1.04873; Merck)

Potasyum klorür (*Potassium chloride*; KCl) (1.04936, Merck)

Primer antikorlara özgü sekonder antikor (*Goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase*) (RPN4301; Amersham)

Primer antikorlara özgü sekonder antikor (*Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase*) (RPN4201; Amersham)

Proteinleri görüntüleme çözültisi (*ECL Prime Western Blotting Detection Reagent*) (RPN2232; Amersham)

RIPK1 proteini için primer antikor (*Anti-RIPK1/RIP1 Antibody*) (ARG55746; Arigo Biolaboratories)

RIPK3 proteini için primer antikor (*RIP3 Polyclonal Antibody*) (PA5-19956; Thermo Fisher)
SEMA3A için primer antikor (*Anti-SEMA3A Antibody [A-12]*) (sc-74554; Santa Cruz)
SF (Bioflex; Osel)
Sığır serum albümini (SSA) (A7906; Sigma)
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (A2263; AppliChem)
Sodyum hidroksit (106462; Merck)
Sodyum klorür (*Sodium chloride*; NaCl) (1.06404; Merck)
Sodyum ortovanadat (A2196; AppliChem)
Sodyum pirofosfat (A2197; AppliChem)
Sülfosalisilik asit (A0416; AppliChem)
TLR4 proteini için primer antikor (*Anti-TLR4 Antibody [25]*) (sc-293072; Santa Cruz)
Trikloroasetik asit (A1431; AppliChem)
Tris baz (A2264; AppliChem)
Tween 20 (A4974; AppliChem)
Yağsız kurutulmuş süt tozu (*Non-fat dry milk*; YKST) (sc-2324; Santa Cruz)
 β -Gliserofosfat (G9891; Sigma)
 β -Merkaptoetanol (A1108; AppliChem)
 β -Tübülin proteini için primer antikor (*Anti- β Tubulin Antibody [D-10]*) (sc-5274; Santa Cruz)

3.1.4. Teçhizat

Analgesic Hot Plate (AHP 9601, Commat Ltd.)
Çalkalayıcı (*Red rotor orbital shaker*, PR500-176, Hofer; *orbital rocker-shake*, MR-12, Biosan)
Derin dondurucu (Dik tip, 410 L, -80°C) (Model U410, New Brunswick)
Derin donduruculu buzdolabı (1060 T, Arçelik; 4240 T FH, Arçelik)
Elektroforez sistemi (*Mini-protean tetra 1 mm*) (165-8001, Biorad)
Güç desteği (*Power supply*) (*EV 265 consort power supply, 230 VAC*) (PS265-230V, Hofer)
Güç kaynakları
Hassas terazi (Model APX 200, Denver)
Homojenizatör (Ultra-Turrax, T25, Ika)
Jel dökümantasyon ve analiz sistemi (*EC3-CHEMI HR Imaging System*) (Ultra-Violet Products, UVP)
Manyetik karıştırıcı (*BOE 8056500 magnetic stirrer*) (MMS-3000, ACAdapter 220V, Boeco)

pH metre (Orion 3 Star, Thermo)

Plak okuma aygıtı (405, 450, 490, 550 ve 630 nm olmak üzere beş adet filtreli) (ELX800, Biotek)

Soğutmalı santrifüj (Mikro 22R, Hettich; H1850R, XiangYi/Cence)

Su banyosu (Sıcaklık: 0-100°C, hacmi: 5 L) (Precistern) (JP Selecta)

Ultrasonik banyo (Isıtmalı, frekans ayarlı) (Elmasonic S 40 / [H], Elma)

Üstten kefeli terazi (SPB 52, Scaltec)

Vorteks (RX3, VELP Scientifica)

Yarı-kuru transfer birimi (*TE 77X semi-dry transfer unit*) (TE77X, Hofer)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Enflamatuvar Hiperaleji Modeli

Bu tezde yapılan *in vivo* çalışmalar, insanlarda görülen hiperalejinin rodentlerde incelenilmesi amacıyla sıklıkla yeğlenen ve nosiseptörler aracılığıyla verilen ağrı davranışını ölçen refleksif akut ağrı modellerinden biri olan sıcak zemin testi *Analgesic Hot Plate* kullanılarak gerçekleştirilmiştir [1, 2, 4, 252-254]. Bu testte, rodentlerin hareketli, yalnızca üzeri açık ve içi görülebilen bir bölme içindeki $55.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 'de ısıtılmış bir tabla üzerine bırakılmasının ardından termal uyarıya karşı verdiği pençe yalama biçimindeki yanıtı en çok 60 saniye içinde verinceye dek geçen süre ölçülmektedir [254]. Bu tezde, enflamatuvar hiperaleji modeli, farelere 10 mg/kg (i.p.) dozda LPS uygulanarak daha önce tarafımızdan yapılan çalışmalarda kullanılan yöntemle oluşturulmuştur [99, 101, 103-106].

Daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarına göre [82-89], Nec-1s'nin mortaliteye neden olmaksızın LPS ile oluşan hiperalejiyi önleyen en düşük etkili dozunu belirleme çalışmalarının yapılması amacıyla, fareler aşağıda belirtilen gruplara ayrılmıştır:

Grup 1: SF (10 ml/kg) (kontrol grubu) (n= 10)

Grup 2: LPS (*E. coli* LPS) (10 mg/kg (10 ml/kg) (enflamatuvar hiperaleji grubu) (n= 10)

Grup 3: SF (10 ml/kg.) ve DMSO (10 ml/kg) (çözücü kontrol grubu) (n= 10)

Grup 4: SF (10 ml/kg) ve Nec-1s (0.01 mg/kg; 10 ml/kg) (n= 10)

Grup 5: LPS (10 mg/kg; 10 ml/kg) ve Nec-1s (0.001 mg/kg; 10 ml/kg) (n= 10)

Grup 6: LPS (10 mg/kg; 10 ml/kg) ve Nec-1s (0.01 mg/kg; 10 ml/kg) (n= 10)

Grup 7: LPS (10 mg/kg; 10 ml/kg) ve Nec-1s (0.1 mg/kg; 10 ml/kg) (n= 10)

Grup 8: LPS (10 mg/kg; 10 ml/kg) ve Nec-1s (1 mg/kg; 10 ml/kg) (n= 10)

LPS ve Nec-1s (saf DMSO içindeki çözünürlüğü 25 mg/ml) sırasıyla SF ve seyreltilmiş DMSO (%10 [hacim/hacim]; SF içinde son DMSO derişimi 0.11 mg/ml olacak biçimde) içinde hazırlanmıştır. Farelerin 60 saniye içinde termal uyarıya tepki verme süreleri, SF veya LPS enjeksiyonundan 6 saat sonra ölçülmüştür. Bu modelde etkisi araştırılan Nec-1s farelere SF veya LPS ile birlikte i.p. yoldan aynı zamanda uygulanmıştır. Deneyler süresince ölen fare olup olmadığı da kontrol edilmiştir. Deneyler sonunda boyun dislokasyon yöntemiyle ötanazi yapılmasının ardından farelerin beyinleri ve omurilikleri alınmıştır. İzole edilen dokular -80°C'de saklanmıştır.

3.2.2. Doku Homojenatı Süpernatantlarının Hazırlanması

Dokuların üzerlerine 1.5 ml HEPES tamponu (mM: HEPES 20 [pH 7.5], β-gliserofosfat 20, sodyum pirofosfat 20, benzamidin 10, DTT 1, sodyum ortovanadat 0.2, sodyum florür 20, EDTA 2, löpeptin 20 ve aprotinin 10) eklenerek homojenize edilmiştir. Homojenatlar 23.910 x g'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edilmiş ve ayrılan süpernatantlar toplanmıştır. Süpernatantların üzerlerine 50 µl tris (50 mM, pH 8.0)+KCl (0.5 M) çözeltisi eklenmesinin ardından 15 saniye süreyle 2 kez su banyosu sonikatöründe bekletilmiş ve 23.910 x g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar -80°C'de dondurularak saklanmıştır [255].

3.2.3. Doku Homojenatlarından Hazırlanan Süpernatantlarda Toplam Protein Düzeyinin Ölçülmesi

Hazırlanan doku homojenatı süpernatantlarındaki toplam protein düzeyi standart olarak SSA kullanılarak Coomassie mavisi yöntemi kullanılarak ölçülmüştür [256]. Standart olarak SSA kullanılmıştır. SSA'nın bir dizi derişimlerine karşı elde edilen absorbanslardan yararlanılarak ölçülen absorbans değerlerinden örneklerdeki protein düzeyleri hesaplanmıştır [255].

3.2.4. β-Tübülin, TLR4, RIPK1, Fosforile RIPK1, RIPK3, Fosforile RIPK3, MLKL, Fosforile MLKL, HMGB1, Kaspaz-11 p20, p30-GSDMD, IL-1β, SEMA3A ve Miyelin PLP Protein Ekspresyonunun Ölçülmesi

Hazırlanan örneklerde β-tübülin, TLR4, RIPK1, fosforile RIPK1 (Ser¹⁶⁶), RIPK3, fosforile RIPK3 (Ser²³²), MLKL, fosforile MLKL (Ser³⁵⁸), HMGB1, kaspaz-11 p20, NLRP3, p30-GSDMD, IL-1β, SEMA3A ve miyelin PLP proteinlerinin ekspresyonu daha önce tanımlandığı gibi *immunoblotting* yöntemiyle ölçülmüştür [101, 103, 104, 106, 257]. Çalışmalarda alt jel olarak 6.7 ml %30'luk akrilamit 4K çözeltisi, 5 ml tris çözeltisi (1.5 M, pH 8.8), 0.2 ml %10'luk SDS çözeltisi, 7.9 ml distile su, 0.2 ml %10'luk amonyum persülfat çözeltisi ve 0.008 ml TEMED, üst jel olarak da 1.7 ml %30'luk akrilamit 4K çözeltisi, 1.25 ml tris çözeltisi (1 M, pH 6.8), 0.1 ml %10'luk SDS çözeltisi, 6.8

ml distile su, 0.1 ml %10'luk amonyum persülfat çözeltisi ve 0.01 ml TEMED kullanılmıştır. Üst jelde *Mini-PROTEAN Comb* kullanılarak oluşturulacak çukurlardan birinci çukura 1-3 µl molekül ağırlığı belirteci, son çukura ise 10 µl Laemmli örnek tamponu eklenmiştir. Elektroforez tampon çözeltisi olarak 500 ml distile su içinde 15 g tris, 72 g glisin ve 5 g SDS içeren bir çözelti (pH 8.3) hazırlanmış ve kullanılmadan hemen önce 1/10 oranında seyreltilerek pH değeri 8.3'e ayarlanmıştır. HEPES tamponu ve 5 µl Laemmli örnek tamponu (5 ml tris çözeltisi [0.5 M, pH 6.8], 4 ml gliserol, 40 mg bromfenol mavisi, 0.8 g SDS ve 0.8 ml β-merkaptoetanol 10 ml distile su içinde) ile doku homojenatlarından hesaplanan miktarda karıştırılarak hazırlanan beyin ve omurilik örnekleri için 30 µl'de 45 µg toplam protein içeren -80°C'de dondurulmuş olan örnekler çözündükten sonra 2 dakika kaynar su içinde bekletilmiş, 4°C'de 23.910 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiş, 20 µl'de 30 µg toplam protein olacak biçimde üst jelde oluşturulan çukurlara eklenmiş ve %10 SDS-poliakrilamid jel elektroforez yöntemi ile ayrılmıştır. Jeldeki proteinler ise yarı-kuru aktarma yöntemi ile nitroselüloz membrana aktarılmıştır. Bu işlem için 800 ml distile su içinde 5.8 g tris, 2.9 g glisin ve 0.37 g SDS içeren bir çözelti (pH 8.3) hazırlanmış ve kullanılmadan hemen önce pH değeri 8.3'e ayarlanarak üzerine 200 ml metanol (%20) eklenmiştir.

Jelden proteinlerin nitroselüloz membrana ne derecede aktarıldığının anlaşılabilmesi için, jeller proteinleri özgül olmayan bir biçimde geri dönüşümsüz olarak bağlayan Coomassie mavisi boyama yöntemi ile boyanmıştır [258]. Coomassie mavisi çözeltisi (1000 ml distile su içinde 0.25 g Coomassie *brilliant blue R 250*, 400 ml metanol ve 70 ml asetik asit) içinde 4°C'de 12 saat inkübe edilen jeller, boyasızlaştırma çözeltisi I (*destaining solution I*) (20 ml metanol, 3.5 ml asetik asit ve 26.5 ml distile su) içinde 30 dakika inkübe edildikten sonra, boyasızlaştırma çözeltisi II (*destaining solution II*) (3.5 ml asetik asit, 2.5 ml metanol, 44 ml distile su ve 0.5 ml gliserol) içinde inkübe edilmiştir. Jelin zeminindeki mavi renk açılıncaya dek boyasızlaştırma çözeltisi II 1 veya 2 kez değiştirilmiştir. Ayrıca, jelden proteinlerin nitroselüloz membrana ne derecede aktarıldığının anlaşılabilmesi için, membranlar proteinleri geri dönüşümlü olarak bağlayan Ponceau S boyası (100 ml distile su içinde 2 g Ponceau S, 30 g trikloroasetik asit, 30 g sülfosalisilik asit; kullanılmadan hemen önce 1/10 oranında distile su ile seyreltilmiştir) ile boyanmış ve distile su ile yıkanmıştır [259].

Proteinlerin jelden membrana aktarımının sağlandığı görüldükten sonra, membranlar tris tampon çözeltisi (TTÇ) (3 g tris, 8 g NaCl, 2 g KCl ve 0.5 ml Tween 20 [%0.05] 1000 ml distile içinde, pH 7.4) ile 1 kez 5 dakika yıkanmış, %5 YKST içeren TTÇ ile oda sıcaklığında 1 saat bloke edilmiş ve TTÇ ile 5 kez 10 dakika süre ile yıkanmış, ardından da TLR4, fosforile RIPK1, fosforile RIPK3, fosforile MLKL, HMGB1, kaspaz-11 p20, p30-GSDMD, IL-1β, SEMA3A ve miyelin PLP proteinleri için

primer antikorlar ile 12 saat süreyle 4°C'de inkübe edilmişlerdir. Membranlar, bağlanmamış proteinler TTÇ ile 3 kez 5 dakika yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra, sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiş, ardından da TTÇ ile 3 kez 10 dakika yıkanarak immünoreaktif proteinlerin görüntülenmesi için hazırlanmıştır. İmmünoreaktif proteinlerin belirlenebilmesi için, görüntüleme çözeltisi ile inkübe edilen membranların jel dökümantasyon ve analiz sistemi kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir.

Görüntülerinin alınmasının ardından fosforile RIPK1, fosforile RIPK3 ve fosforile MLKL proteinleri için kullanılan membranlar, TTÇ ile 1 kez 5 dakika süre ile yıkandıktan sonra, %2 YKST+%2 SSA karışımı ile oda sıcaklığında 1 saat bloke edilmiş, TTÇ ile 5 kez 10 dakika süre ile yıkanmış ve RIPK1, RIPK3, MLKL ve β -tübülün proteinleri için primer ve sekonder antikorlar ile inkübe edilmeye hazır duruma getirilmiştir. Bu membranlar primer antikorlar ile oda sıcaklığında 2 saat veya 4°C'de 12 saat inkübe edilerek bağlanmamış proteinler TTÇ ile 3 kez 5 dakika yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra, sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiş, ardından da TTÇ ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkanmıştır. Görüntüleme çözeltisi ile inkübe edilmelerinin ardından, membranların jel dokümantasyon ve analiz sistemi kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir. Yine jel dökümantasyon ve analiz sistemi kullanılarak, Coomassie mavisi boyama yöntemi ile boyanan jellerin fotoğrafları çekilmiştir.

Görüntülenen immünoreaktif proteinlerin yoğunluk analizi bir yazılım programı (*NIH image software; ImageJ 1.53k, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*) kullanılarak yapılmıştır. Özgül proteinler için immünoreaktif bantların yoğunlukları β -tübülüninkine oranlanarak hesaplanmıştır.

β -Tübülün, TLR4, RIPK1, fosforile RIPK1, RIPK3, fosforile RIPK3, MLKL, fosforile MLKL, HMGB1, kaspaz-11 p20, p30-GSDMD, IL-1 β , SEMA3A ve miyelin PLP protein ekspresyonunun ölçülmesinde kullanılan antikorların özellikleri Tablo 3.1.'de özetlenmiştir.

3.2.5. Verilerin Analizi ve Sonuçların Yorumlanması

Sonuçlar ortalama \pm ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiş, kullanılan fare sayısı ise "n" ile ifade edilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Bartlett testi ile değerlendirilmiştir. İkili grupların karşılaştırılması için normal dağılım varsayımının sağlandığı durumda, eşleştirilmemiş (*unpaired*) iki grup arasındaki farkın önemlilik testi olarak parametrik testlerden Student's *t* testi kullanılmıştır. β -Tübülün protein ekspresyonu açısından gruplar arasındaki farklılığı belirlemek amacıyla tek yönlü varyans analizi yapılmıştır. 0.05'ten küçük *P* değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 3.1. β -Tübülin, TLR4, RIPK1, fosforile RIPK1, RIPK3, fosforile RIPK3, MLKL, fosforile MLKL, HMGB1, kaspaz-11 p20, p30-GSDMD, IL-1 β , SEMA3A ve miyelin PLP protein ekspresyonunun ölçülmesinde kullanılan antikorların özellikleri.

Protein	Molekül ağırlığı (kDa)	Primer antikor	Sekonder antikor
β -Tübülin	55	<i>Anti-β Tubulin Antibody (D-10) (sc-5274; Santa Cruz)</i>	<i>Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (RPN 4201; Amersham)</i>
TLR4	100	<i>Anti-TLR4 Antibody (25) (sc-293072; Santa Cruz)</i>	<i>Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (RPN 4201; Amersham)</i>
RIPK1	76	<i>Anti-RIPK1/RIP1 Antibody (ARG55746; Arigo Biolaboratories)</i>	<i>Goat Anti-Rabbit IgG-Horseradish Peroxidase) (RPN4301; Amersham)</i>
Fosforile RIPK1	76	<i>Anti-RIPK1/RIP1 Phospho (Ser166) Antibody [YJY-1-5] (ARG66476; Arigo Biolaboratories)</i>	<i>Sheep Anti-Mouse IgG-Horseradish Peroxidase (RPN 4201; Amersham)</i>
RIPK3	53	<i>RIP3 Polyclonal Antibody (PA5-19956; Thermo Fisher)</i>	<i>Goat Anti-Rabbit IgG-Horseradish Peroxidase) (RPN4301; Amersham)</i>
Fosforile RIPK3	53	<i>Phospho-RIP3 (Ser232) Polyclonal Antibody (PA5-105701; Thermo Fisher)</i>	<i>Goat Anti-Rabbit IgG-Horseradish Peroxidase) (RPN4301; Amersham)</i>
MLKL	54	<i>MLKL Polyclonal Antibody (PA5-102810; Thermo Fisher)</i>	<i>Goat Anti-Rabbit IgG-Horseradish Peroxidase) (RPN4301; Amersham)</i>
Fosforile MLKL	54	<i>Phospho-MLKL (Ser358) Polyclonal Antibody (PA5-105678; Thermo Fisher)</i>	<i>Goat Anti-Rabbit IgG-Horseradish Peroxidase) (RPN4301; Amersham)</i>
HMGB1	30	<i>Anti-HMG-1/HMGB1 Antibody (HAP46.5) (sc-56698; Santa Cruz)</i>	<i>Sheep Anti-Mouse IgG-Horseradish Peroxidase (RPN 4201; Amersham)</i>
Kaspaz-11 p20	48/20	<i>Anti-Caspase-11 p20 Antibody (A-2) (sc-374615; Santa Cruz)</i>	<i>Sheep Anti-Mouse IgG-Horseradish Peroxidase (RPN 4201; Amersham)</i>
p30-GSDMD	53	<i>Anti-GSDMDC1 Antibody (A-7) (sc-393656; Santa Cruz)</i>	<i>Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (RPN 4201; Amersham)</i>
IL-1 β	31	<i>Anti-IL-1β Antibody (11E5) (sc-52012; Santa Cruz)</i>	<i>Sheep Anti-Mouse IgG-Horseradish Peroxidase (RPN 4201; Amersham)</i>

Tablo 3.1. (devamı) β -Tübülin, TLR4, RIPK1, fosforile RIPK1, RIPK3, fosforile RIPK3, MLKL, fosforile MLKL, HMGB1, kaspaz-11 p20, p30-GSDMD, IL-1 β , SEMA3A ve miyelin PLP protein ekspresyonunun ölçülmesinde kullanılan antikorların özellikleri.

Protein	Molekül ağırlığı (kDa)	Primer antikor	Sekonder antikor
SEMA3A	95	<i>Anti-SEMA3A Antibody (A-12) (sc-74554; Santa Cruz)</i>	<i>Sheep Anti-Mouse IgG-Horseradish Peroxidase (RPN 4201; Amersham)</i>
Miyelin PLP	30	<i>Myelin PLP Antibody, HRP conjugated (bs-11093R-HRP; Bioss Inc.)</i>	<i>Goat Anti-Rabbit IgG-Horseradish Peroxidase (RPN4301; Amersham)</i>

ASC, Apoptozla ilişkili nokta benzeri protein içeren bir kaspaz biriktirici alan (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain); GSDMD, gasdermin D (gasdermin D); HMGB, high-mobility-group-box; IL, interlökin (interleukin); kDa, kilodalton; LPS, lipopolisakkarit; MLKL, karışık kökenli kinaz benzeri psöodokinaz (mixed lineage kinase domain-like pseudokinase); NLRP, nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alan benzeri, lösinden zengin yinelenen ve pirin alanı içeren (nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing); PLP, proteolipit protein; RIPK, reseptör ile etkileşen serin/treonin protein kinaz (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase); SEMA, semaforin; TLR, toll benzeri reseptör (toll-like receptor); TRIF, toll-interlökin-1 reseptör alan içeren adaptör indükleyici interferon- β (toll-interleukin-1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon- β).

4. BULGULAR

4.1. Mortalite

Farelere SF, LPS, DMSO ve/veya Nec-1s uygulanmasından sonra geçen 6 saatlik sürede ölen fare olmamıştır.

4.2. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Termal Uyarıya Yanıt Verme Süreleri Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi

SF veya LPS ile birlikte 0.001, 0.01, 0.1 veya 1 mg/kg dozlarda uygulanan Nec-1s'nin farelerin termal uyarıya tepki verme sürelerindeki değişiklikler üzerindeki etkilerine ilişkin sonuçlar Tablo 4.1. ve Şekil 4.1.'de verilmiştir.

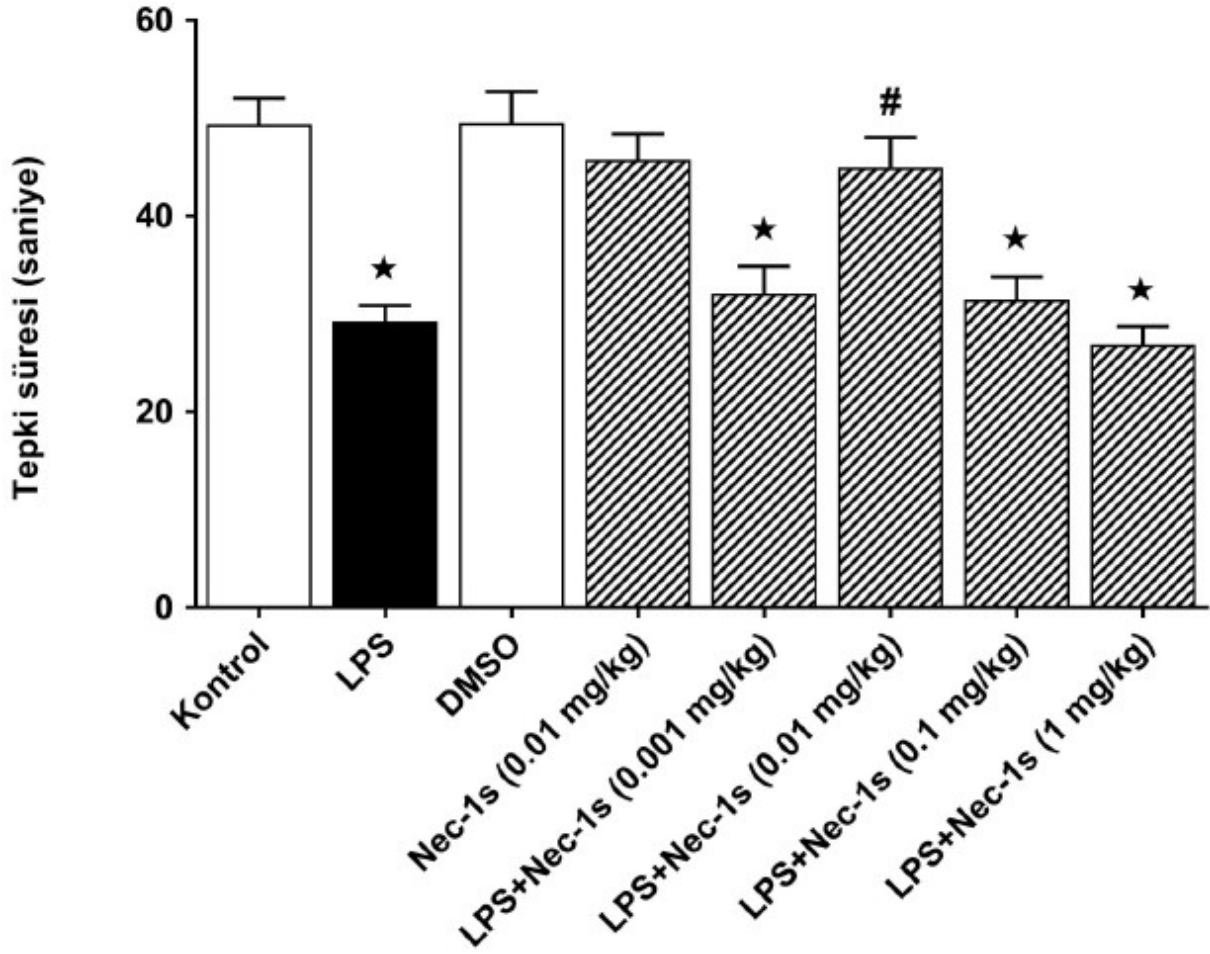
Farelerin termal uyarıya yanıt verme sürelerinin, LPS uygulanmasından 6 saat sonra, kontrol grubundakilere göre daha az olduğu bulunmuştur ($P < 0.05$). LPS'nin neden olduğu hiperaljezi yalnızca 0.01 mg/kg dozda Nec-1s ile önlenmiştir ($P < 0.05$). Dolayısıyla, Nec-1s'nin etkili olan en düşük dozu 0.01 mg/kg ile deneyler sürdürülmüştür. SF ile birlikte DMSO veya Nec-1s 0.01 mg/kg dozda uygulandığında farelerin termal uyarıya yanıt verme sürelerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, farelere LPS uygulanmasından 6 saat sonra hiperaljezi geliştiğini göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS ile oluşan hiperaljezi Nec-1s ile önlenmektedir.

Tablo 4.1. Kontrol ve endotoksemik farelerin termal uyarıya tepki verme süreleri üzerinde Nec-1s'nin etkisi.

	Tepki süresi (Saniye)
Kontrol	49.36±2.69 (n= 10)
LPS	29.24±1.62 (n= 10)*
DMSO	49.50±3.22 (n= 10)
Nec-1s (0.01 mg/kg)	45.74±2.64 (n= 10)
LPS+Nec-1s (0.001 mg/kg)	32.05±2.82 (n= 10)*
LPS+Nec-1s (0.01 mg/kg)	44.97±3.05 (n= 10)#
LPS Nec-1s (0.1 mg/kg)	31.42±2.35 (n= 10)*
LPS+Nec-1s (1 mg/kg)	26.86±1.84 (n= 10)*

DMSO, Dimetil sülfoksit; LPS, lipopolisakkarit; n, fare sayısı; Nec, nekrostatin. *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (Student's t testi; $P < 0.05$).



Şekil 4.1. Kontrol ve endotoksemik farelerin termal uyarıya tepki verme süreleri üzerinde Nec-1s'nin etkisi. DMSO, Dimetil sülfoksit; LPS, lipopolisakkarit; Nec, nekrostatin. *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (Student's t testi; $P < 0.05$).

4.3. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyinleri ve Omuriliklerinde β -Tübülin Protein Ekspresyonu Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi

Farelere SF ve/veya LPS ile birlikte DMSO ya da Nec-1s (0.01 mg/kg) uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilik dokularında β -tübülin protein ekspresyonundaki değişiklikler ile ilgili sonuçlar Tablo 4.2.'de verilmiştir.

SF, LPS, DMSO ve/veya Nec-1s uygulanan farelerin dokularında β -tübülin protein ekspresyonunda oluşan değişiklikler açısından gruplar arasında bir farklılık olmadığı görülmüştür ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS, DMSO ve/veya Nec-1s uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte β -tübülin protein ekspresyonunun kontrol grubuna göre değişmediğini göstermiştir.

Tablo 4.2. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde β -tübülün protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi.

	β-Tübülün protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/mg toplam protein)
Beyin	
Kontrol	24560.00±2094.00 (n= 4)
LPS	25649.00±1603.00 (n= 4)
DMSO	24487.00±1812.00 (n= 4)
Nec-1s	24576.00±1526.00 (n= 4)
LPS+Nec-1s	25309.00±860.70 (n= 4)
Omurilik	
Kontrol	16639.00±484.00 (n= 4)
LPS	16064.00±462.60 (n= 4)
DMSO	16659.00±204.90 (n= 4)
Nec-1s	15690.00±154.50 (n= 4)
LPS+Nec-1s	15907.00±226.80 (n= 4)

DMSO, Dimetil sülfoksit; LPS, lipopolisakkarit; n, fare sayısı; Nec, nekrostatin.

4.4. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyinleri ve Omuriliklerinde TLR4 Protein Ekspresyonu Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi

Farelere SF ve/veya LPS ile birlikte DMSO ya da Nec-1s (0.01 mg/kg) uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilik dokularında TLR4 protein ekspresyonundaki değişiklikler ile ilgili sonuçlar Tablo 4.3. ve Şekil 4.2.'de verilmiştir.

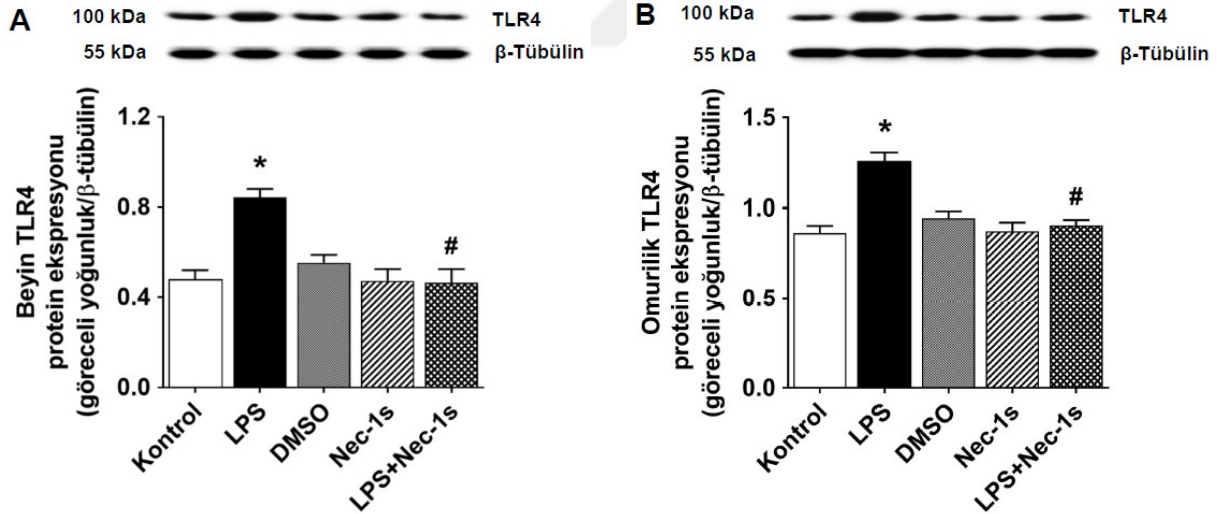
LPS uygulanan farelerin dokularında TLR4 protein ekspresyonunda artma gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin TLR4 protein ekspresyonunda neden olduğu artma Nec-1s ile önlenmiştir ($P < 0.05$). SF ile birlikte DMSO veya Nec-1s uygulanan farelerin dokularında TLR4 protein ekspresyonu kontrol grubu değerlerinden farklı bulunmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte TLR4 ekspresyonunun arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu TLR4 ekspresyonundaki artma Nec-1s ile önlenebilmektedir.

Tablo 4.3. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde TLR4 protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi.

	TLR4 protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/ β -tübülin)
Beyin	
Kontrol	0.48 \pm 0.04 (n= 4)
LPS	0.84 \pm 0.04 (n= 4)*
DMSO	0.55 \pm 0.04 (n= 4)
Nec-1s	0.47 \pm 0.05 (n= 4)
LPS+Nec-1s	0.47 \pm 0.06 (n= 4)#
Omurilik	
Kontrol	0.86 \pm 0.04 (n= 4)
LPS	1.26 \pm 0.05 (n= 4)*
DMSO	0.95 \pm 0.04 (n= 4)
Nec-1s	0.87 \pm 0.05 (n= 4)
LPS+Nec-1s	0.91 \pm 0.03 (n= 4)#

DMSO, Dimetil sülfoksit; LPS, lipopolisakkarit; n, fare sayısı; Nec, nekrostatin; TLR, toll benzeri reseptör (toll-like receptor). *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (Student's t testi; $P < 0.05$).

**Şekil 4.2.** Kontrol ve endotoksemik farelerin (A) beyinleri ve (B) omuriliklerinde TLR4 protein ekspresyonu ile fosforilasyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi. DMSO, Dimetil sülfoksit; kDa, kilodalton; LPS, lipopolisakkarit; Nec, nekrostatin; TLR, toll benzeri reseptör (toll-like receptor). *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (Student's t testi; $P < 0.05$).

4.5. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyinleri ve Omuriliklerinde RIPK1 Protein Ekspresyonu ve Fosforilasyonu Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi

Farelere SF ve/veya LPS ile birlikte DMSO ya da Nec-1s (0.01 mg/kg) uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilik dokularında RIPK1 protein ekspresyonu ile fosforilasyonundaki değişiklikler ile ilgili sonuçlar Tablo 4.4. ve Şekil 4.3.'te verilmiştir.

LPS uygulanan farelerin dokularında RIPK1 protein fosforilasyonu ile fosforile RIPK1/RIPK1 oranında artma gözlenirken ($P < 0.05$), fosforile olmamış RIPK1 protein ekspresyonunda değişiklik olmamıştır ($P > 0.05$). LPS'nin RIPK1 protein fosforilasyonu ile fosforile RIPK1/RIPK1 oranında neden olduğu artma Nec-1s ile önlenmiştir ($P < 0.05$). SF ile birlikte DMSO veya Nec-1s uygulanan farelerin dokularında RIPK1 protein ekspresyonu ve fosforilasyonu ile fosforile RIPK1/RIPK1 oranı kontrol grubu değerlerinden farklı bulunmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte RIPK1 etkinliğinin arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu RIPK1 etkinliğindeki artma Nec-1s ile önlenebilmektedir.

4.6. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyinleri ve Omuriliklerinde RIPK3 Protein Ekspresyonu ve Fosforilasyonu Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi

Farelere SF ve/veya LPS ile birlikte DMSO ya da Nec-1s (0.01 mg/kg) uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilik dokularında RIPK3 protein ekspresyonu ile fosforilasyonundaki değişiklikler ile ilgili sonuçlar Tablo 4.5. ve Şekil 4.4.'te verilmiştir.

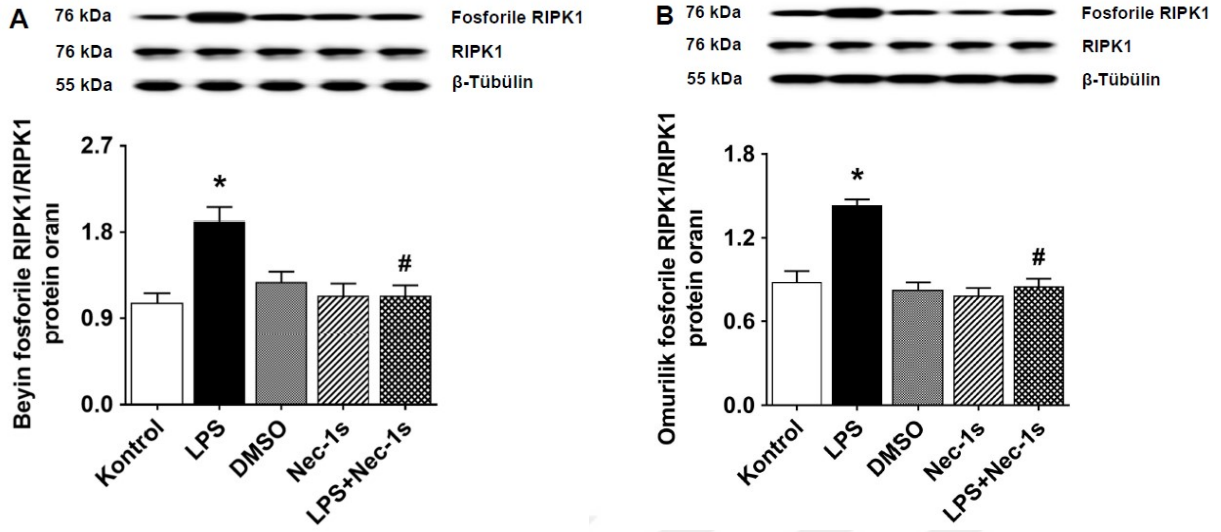
LPS uygulanan farelerin dokularında RIPK3 protein fosforilasyonu ile fosforile RIPK3/RIPK3 oranında artma gözlenirken ($P < 0.05$), fosforile olmamış RIPK3 protein ekspresyonunda değişiklik olmamıştır ($P > 0.05$). LPS'nin RIPK3 protein fosforilasyonu ile fosforile RIPK3/RIPK3 oranında neden olduğu artma Nec-1s ile önlenmiştir ($P < 0.05$). SF ile birlikte DMSO veya Nec-1s uygulanan farelerin dokularında RIPK3 protein ekspresyonu ve fosforilasyonu ile fosforile RIPK3/RIPK3 oranı kontrol grubu değerlerinden farklı bulunmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte RIPK3 etkinliğinin arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu RIPK3 etkinliğindeki artma Nec-1s ile önlenebilmektedir.

Tablo 4.4. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde RIPK1 protein ekspresyonu ve fosforilasyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi.

	RIPK1 protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/ β -tübulin)	Fosforile RIPK1 protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/ β -tübulin)	Fosforile RIPK1/RIPK1 protein oranı
Beyin			
Kontrol	0.97 \pm 0.02 (n= 4)	1.02 \pm 0.07 (n= 4)	1.06 \pm 0.10 (n= 4)
LPS	0.89 \pm 0.07 (n= 4)	1.54 \pm 0.05 (n= 4)*	1.91 \pm 0.15 (n= 4)*
DMSO	0.89 \pm 0.09 (n= 4)	1.14 \pm 0.07 (n= 4)	1.28 \pm 0.11 (n= 4)
Nec-1s	0.97 \pm 0.06 (n= 4)	1.08 \pm 0.08 (n= 4)	1.14 \pm 0.13 (n= 4)
LPS+Nec-1s	0.92 \pm 0.07 (n= 4)	1.02 \pm 0.07 (n= 4)#	1.14 \pm 0.11 (n= 4)#
Omurilik			
Kontrol	1.37 \pm 0.06 (n= 4)	1.32 \pm 0.07 (n= 4)	0.88 \pm 0.08 (n= 4)
LPS	1.43 \pm 0.07 (n= 4)	1.93 \pm 0.05 (n= 4)*	1.43 \pm 0.04 (n= 4)*
DMSO	1.45 \pm 0.08 (n= 4)	1.34 \pm 0.05 (n= 4)	0.83 \pm 0.05 (n= 4)
Nec-1s	1.42 \pm 0.09 (n= 4)	1.32 \pm 0.06 (n= 4)	0.79 \pm 0.06 (n= 4)
LPS+Nec-1s	1.40 \pm 0.10 (n= 4)	1.31 \pm 0.08 (n= 4)#	0.85 \pm 0.05 (n= 4)#

DMSO, Dimetil sülfoksit; LPS, lipopolisakkarit; n, fare sayısı; Nec, nekrostatin; RIPK, reseptör ile etkileşen serin/treonin protein kinaz (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase). *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (Student's t testi; $P < 0.05$).



Şekil 4.3. Kontrol ve endotoksemik farelerin (A) beyinleri ve (B) omuriliklerinde RIPK1 protein ekspresyonu ile fosforilasyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi. *DMSO*, Dimetil sülfoksit; *kDa*, kilodalton; *LPS*, lipopolisakkarit; *Nec*, nekrostatin; *RIPK*, reseptör ile etkileşen serin/treonin protein kinaz (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase). *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (Student's t testi; $P < 0.05$).

4.7. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyinleri ve Omuriliklerinde MLKL Protein Ekspresyonu ve Fosforilasyonu Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi

Farelere SF ve/veya LPS ile birlikte DMSO ya da Nec-1s (0.01 mg/kg) uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilik dokularında MLKL protein ekspresyonu ile fosforilasyonundaki değişiklikler ile ilgili sonuçlar Tablo 4.6. ve Şekil 4.5.'te verilmiştir.

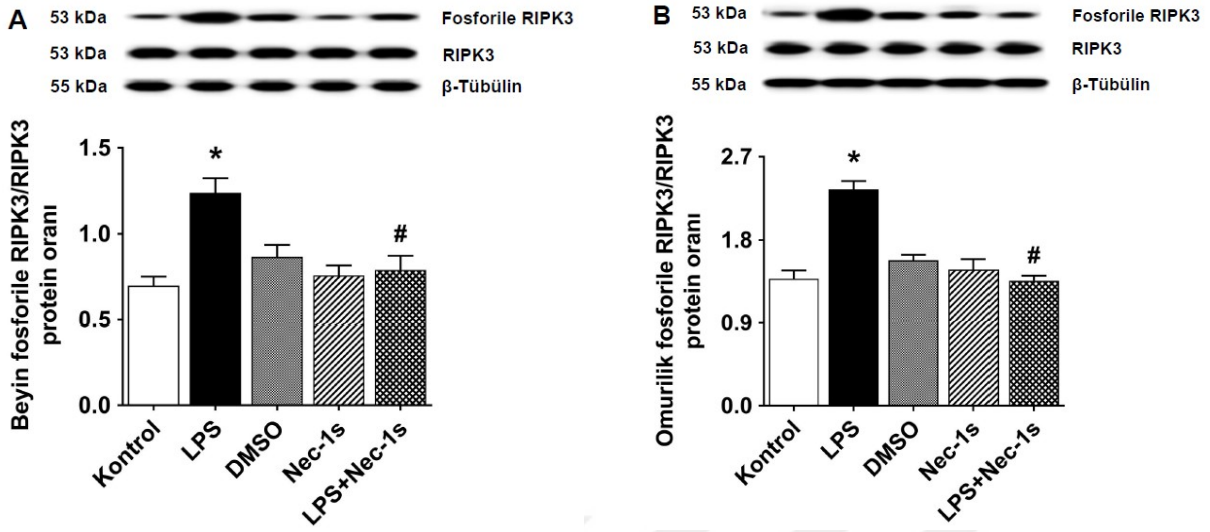
LPS uygulanan farelerin dokularında MLKL protein fosforilasyonu ile fosforile MLKL/MLKL oranında artma gözlenirken ($P < 0.05$), fosforile olmamış MLKL protein ekspresyonunda değişiklik olmamıştır ($P > 0.05$). LPS'nin MLKL protein fosforilasyonu ile fosforile MLKL/MLKL oranında neden olduğu artma Nec-1s ile önlenmiştir ($P < 0.05$). SF ile birlikte DMSO veya Nec-1s uygulanan farelerin dokularında MLKL protein ekspresyonu ve fosforilasyonu ile fosforile MLKL/MLKL oranı kontrol grubu değerlerinden farklı bulunmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte MLKL etkinliğinin arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu MLKL etkinliğindeki artma Nec-1s ile önlenmektedir.

Tablo 4.5. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde RIPK3 protein ekspresyonu ve fosforilasyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi.

	RIPK3 protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/β-tübulin)	Fosforile RIPK3 protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/β-tübulin)	Fosforile RIPK3/RIPK3 protein oranı
Beyin			
Kontrol	0.65 \pm 0.02 (n= 4)	0.45 \pm 0.04 (n= 4)	0.70 \pm 0.05 (n= 4)
LPS	0.61 \pm 0.02 (n= 4)	0.76 \pm 0.03 (n= 4)*	1.24 \pm 0.09 (n= 4)*
DMSO	0.62 \pm 0.02 (n= 4)	0.53 \pm 0.03 (n= 4)	0.87 \pm 0.07 (n= 4)
Nec-1s	0.61 \pm 0.04 (n= 4)	0.46 \pm 0.03 (n= 4)	0.76 \pm 0.06 (n= 4)
LPS+Nec-1s	0.60 \pm 0.04 (n= 4)	0.47 \pm 0.04 (n= 4)#	0.79 \pm 0.08 (n= 4)#
Omurilik			
Kontrol	1.02 \pm 0.10 (n= 4)	1.38 \pm 0.03 (n= 4)	1.382 \pm 0.09 (n= 4)
LPS	0.98 \pm 0.07 (n= 4)	1.38 \pm 0.03 (n= 4)*	2.35 \pm 0.09 (n= 4)*
DMSO	0.94 \pm 0.08 (n= 4)	1.97 \pm 0.09 (n= 4)	1.58 \pm 0.06 (n= 4)
Nec-1s	0.97 \pm 0.08 (n= 4)	1.48 \pm 0.10 (n= 4)	1.48 \pm 0.11 (n= 4)
LPS+Nec-1s	1.09 \pm 0.05 (n= 4)	1.42 \pm 0.05 (n= 4)#	1.36 \pm 0.05 (n= 4)#

DMSO, Dimetil sülfoksit; LPS, lipopolisakkarit; n, fare sayısı; Nec, nekrostatin; RIPK, reseptör ile etkileşen serin/treonin protein kinaz (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase). *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (Student's t testi; P < 0.05).



Şekil 4.4. Kontrol ve endotoksemik farelerin (A) beyinleri ve (B) omuriliklerinde RIPK3 protein ekspresyonu ile fosforilasyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi. *DMSO*, Dimetil sülfoksit; *kDa*, kilodalton; *LPS*, lipopolisakarit; *Nec*, nekrostatin; *RIPK*, reseptör ile etkileşen serin/treonin protein kinaz (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase). *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (Student's t testi; $P < 0.05$).

4.8. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyinleri ve Omuriliklerinde HMGB1 Protein Ekspresyonu ile Serum HMGB1 Düzeyleri Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi

Farelere SF ve/veya LPS ile birlikte DMSO ya da Nec-1s (0.01 mg/kg) uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilik dokularında HMGB1 protein ekspresyonundaki değişiklikler ile ilgili sonuçlar Tablo 4.7. ve Şekil 4.6.'da verilmiştir.

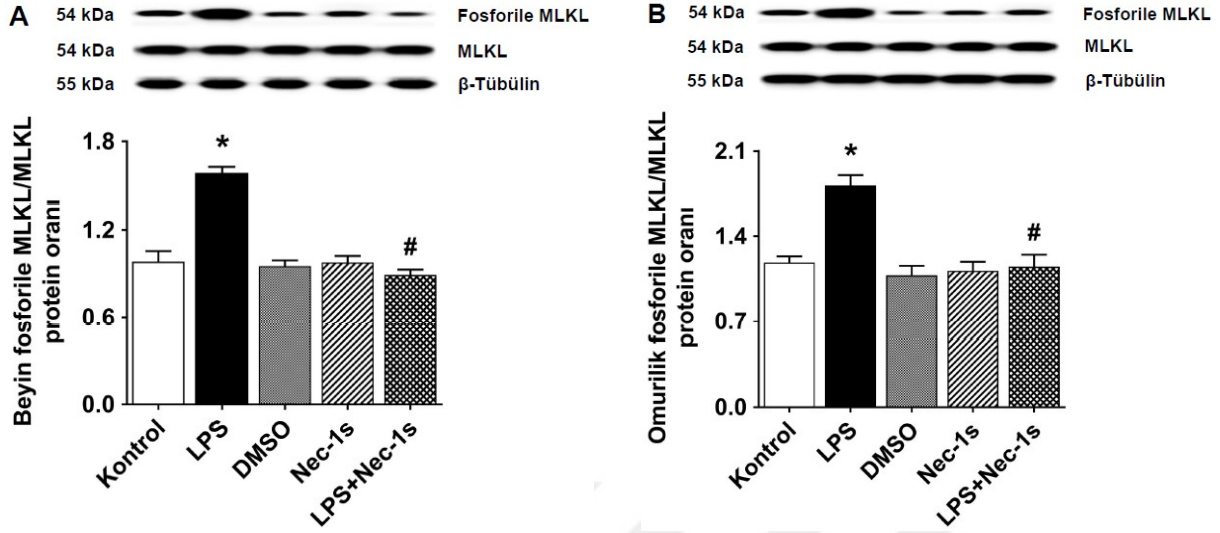
LPS uygulanan farelerin dokularında HMGB1 protein ekspresyonunda artma gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin HMGB1 protein ekspresyonunda neden olduğu artma Nec-1s ile önlenmiştir ($P < 0.05$). SF ile birlikte DMSO veya Nec-1s uygulanan farelerin dokularında HMGB1 protein ekspresyonu kontrol grubu değerlerinden farklı bulunmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte HMGB1 ekspresyonunun arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu dokulardaki HMGB1 ekspresyonundaki artma Nec-1s ile önlenmektedir.

Tablo 4.6. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde MLKL protein ekspresyonu ve fosforilasyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi.

	MLKL protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/β-tübülün)	Fosforile MLKL protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/β-tübülün)	Fosforile MLKL/MLKL protein oranı
Beyin			
Kontrol	0.85 \pm 0.02 (n= 4)	0.69 \pm 0.02 (n= 4)	0.98 \pm 0.07 (n= 4)
LPS	0.80 \pm 0.03 (n= 4)	1.05 \pm 0.04 (n= 4)*	1.59 \pm 0.04 (n= 4)*
DMSO	0.78 \pm 0.03 (n= 4)	0.77 \pm 0.03 (n= 4)	0.95 \pm 0.04 (n= 4)
Nec-1s	0.76 \pm 0.06 (n= 4)	0.76 \pm 0.03 (n= 4)	0.98 \pm 0.05 (n= 4)
LPS+Nec-1s	0.77 \pm 0.05 (n= 4)	0.71 \pm 0.04 (n= 4)#	0.89 \pm 0.04 (n= 4)#
Omurilik			
Kontrol	1.32 \pm 0.05 (n= 4)	1.45 \pm 0.04 (n= 4)	1.19 \pm 0.05 (n= 4)
LPS	1.27 \pm 0.08 (n= 4)	2.10 \pm 0.06 (n= 4)*	1.82 \pm 0.09 (n= 4)*
DMSO	1.26 \pm 0.06 (n= 4)	1.35 \pm 0.05 (n= 4)	1.08 \pm 0.08 (n= 4)
Nec-1s	1.26 \pm 0.07 (n= 4)	1.40 \pm 0.10 (n= 4)	1.12 \pm 0.07 (n= 4)
LPS+Nec-1s	1.25 \pm 0.10 (n= 4)	1.42 \pm 0.09 (n= 4)#	1.15 \pm 0.10 (n= 4)#

DMSO, Dimetil sülfoksit; LPS, lipopolisakkarit; MLKL, karışık kökenli kinaz benzeri psöodokinaz (mixed lineage kinase domain-like pseudokinase); n, fare sayısı; Nec, nekrostatin. *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (Student's t testi; $P < 0.05$).

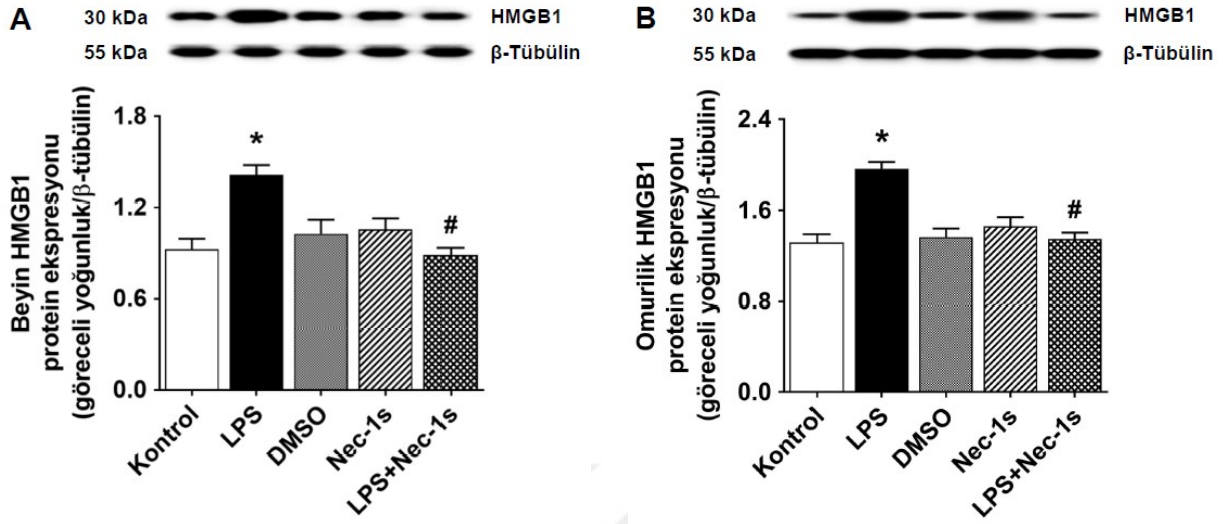


Şekil 4.5. Kontrol ve endotoksemik farelerin (A) beyinleri ve (B) omuriliklerinde MLKL protein ekspresyonu ile fosforilasyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi. *DMSO*, Dimetil sülfoksit; *kDa*, kilodalton; *LPS*, lipopolisakarit; *MLKL*, karışık kökenli kinaz benzeri psödokinaz (*mixed lineage kinase domain-like pseudokinase*); *Nec*, nekrostatin. *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (*Student's t testi*; $P < 0.05$).

Tablo 4.7. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde HMGB1 protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi.

	HMGB1 protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/ β -tübülin)
Beyin	
Kontrol	0.93 \pm 0.07 (n= 4)
LPS	1.42 \pm 0.06 (n= 4)*
DMSO	1.03 \pm 0.09 (n= 4)
Nec-1s	1.06 \pm 0.07 (n= 4)
LPS+Nec-1s	0.89 \pm 0.05 (n= 4)#
Omurilik	
Kontrol	1.32 \pm 0.07 (n= 4)
LPS	1.97 \pm 0.06 (n= 4)*
DMSO	1.36 \pm 0.08 (n= 4)
Nec-1s	1.46 \pm 0.08 (n= 4)
LPS+Nec-1s	1.35 \pm 0.06 (n= 4)#

DMSO, Dimetil sülfoksit; *HMGB*, *high-mobility-group-box*; *LPS*, lipopolisakarit; *n*, fare sayısı; *Nec*, nekrostatin. *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (*Student's t testi*; $P < 0.05$).



Şekil 4.6. Kontrol ve endotoksemik farelerin (A) beyinleri ve (B) omuriliklerinde HMGB1 protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi. *DMSO*, Dimetil sülfoksit; *HMGB*, high-mobility-group-box; *kDa*, kilodalton; *LPS*, lipopolisakkarit; *Nec*, nekrostatin. *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (Student's t testi; $P < 0.05$).

4.9. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyinleri ve Omuriliklerinde IL-1 β Protein Ekspresyonu Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi

Farelere SF ve/veya LPS ile birlikte DMSO ya da Nec-1s (0.01 mg/kg) uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilik dokularında IL-1 β protein ekspresyonundaki değişiklikler ile ilgili sonuçlar Tablo 4.8. ve Şekil 4.7.'de verilmiştir.

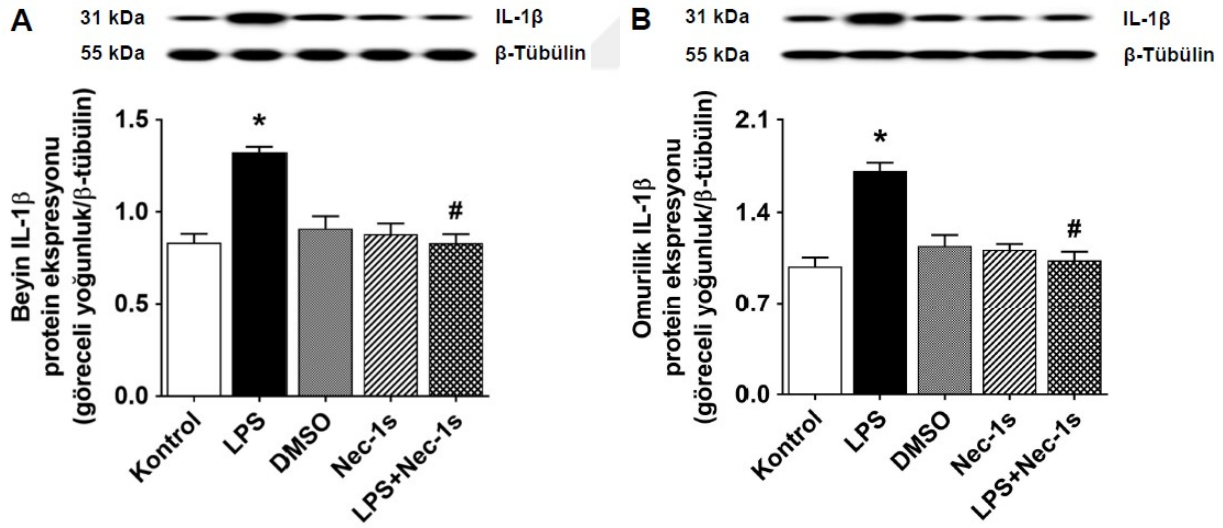
LPS uygulanan farelerin dokularında dokularda IL-1 β protein ekspresyonunda artma gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin IL-1 β protein ekspresyonunda neden olduğu artma Nec-1s ile önlenmiştir ($P < 0.05$). SF ile birlikte DMSO veya Nec-1s uygulanan farelerin dokularında IL-1 β protein ekspresyonu kontrol grubu değerlerinden farklı bulunmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte IL-1 β ekspresyonunun arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu IL-1 β ekspresyonundaki artma Nec-1s ile önenebilmektedir.

Tablo 4.8. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde IL-1 β protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi.

	IL-1 β protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/ β -tübülin)
Beyin	
Kontrol	0.83 \pm 0.05 (n= 4)
LPS	1.32 \pm 0.03 (n= 4)*
DMSO	0.91 \pm 0.07 (n= 4)
Nec-1s	0.88 \pm 0.06 (n= 4)
LPS+Nec-1s	0.83 \pm 0.05 (n= 4)#
Omurilik	
Kontrol	0.99 \pm 0.07 (n= 4)
LPS	1.71 \pm 0.06 (n= 4)*
DMSO	1.14 \pm 0.08 (n= 4)
Nec-1s	1.11 \pm 0.05 (n= 4)
LPS+Nec-1s	1.03 \pm 0.07 (n= 4)#

DMSO, Dimetil sülfoksit; IL, interlökin (interleukin); LPS, lipopolisakkarit; n, fare sayısı; Nec, nekrostatin. *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (Student's t testi; $P < 0.05$).

**Şekil 4.7.** Kontrol ve endotoksemik farelerin (A) beyinleri ve (B) omuriliklerinde IL-1 β protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi. DMSO, Dimetil sülfoksit; IL, interlökin (interleukin); kDa, kilodalton; LPS, lipopolisakkarit; Nec, nekrostatin. *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (Student's t testi; $P < 0.05$).

4.10. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyinleri ve Omuriliklerinde Kaspaz-11 p20 Protein Ekspresyonu Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi

Farelere SF ve/veya LPS ile birlikte DMSO ya da Nec-1s (0.01 mg/kg) uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilik dokularında kaspaz-11 p20 protein ekspresyonundaki değişiklikler ile ilgili sonuçlar Tablo 4.9. ve Şekil 4.8.'de verilmiştir.

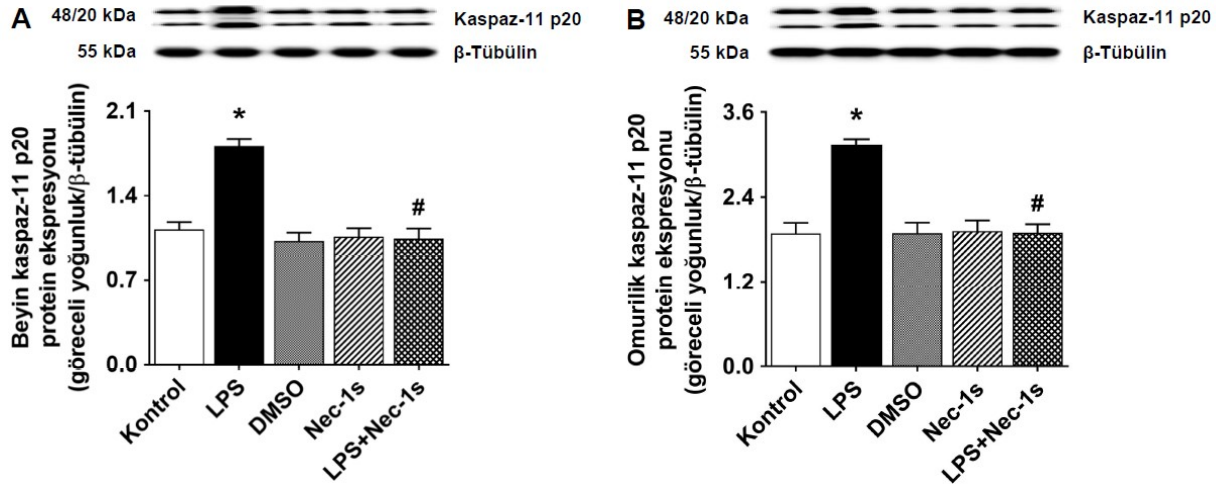
LPS uygulanan farelerin dokularında kaspaz-11 p20 protein ekspresyonunda artma gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin kaspaz-11 p20 protein ekspresyonunda neden olduğu artma Nec-1s ile önlenmiştir ($P < 0.05$). SF ile birlikte DMSO veya Nec-1s uygulanan farelerin dokularında kaspaz-11 p20 protein ekspresyonu kontrol grubu değerlerinden farklı bulunmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte kaspaz-11 p20 ekspresyonunun arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu kaspaz-11 p20 ekspresyonundaki artma Nec-1s ile önenebilmektedir.

Tablo 4.9. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde kaspaz-11 p20 protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi.

	Kaspaz-11 p20 protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/ β -tübülün)
Beyin	
Kontrol	1.12 \pm 0.06 (n= 4)
LPS	1.81 \pm 0.06 (n= 4)*
DMSO	1.02 \pm 0.07 (n= 4)
Nec-1s	1.06 \pm 0.07 (n= 4)
LPS+Nec-1s	1.04 \pm 0.09 (n= 4)#
Omurilik	
Kontrol	1.89 \pm 0.15 (n= 4)
LPS	3.14 \pm 0.08 (n= 4)*
DMSO	1.89 \pm 0.15 (n= 4)
Nec-1s	1.92 \pm 0.15 (n= 4)
LPS+Nec-1s	1.90 \pm 0.12 (n= 4)#

DMSO, Dimetil sülfoksit; LPS, lipopolisakkarit; n, fare sayısı; Nec, nekrostatin. *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (Student's t testi; $P < 0.05$).



Şekil 4.8. Kontrol ve endotoksemik farelerin (A) beyinleri ve (B) omuriliklerinde kaspaz-11 p20 protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi. DMSO, Dimetil sülfoksit; kDa, kilodalton; LPS, lipopolisakarrit; Nec, nekrostatin. *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (Student's t testi; $P < 0.05$).

4.11. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyinleri ve Omuriliklerinde p30-GSDMD Protein Ekspresyonu Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi

Farelere SF ve/veya LPS ile birlikte DMSO ya da Nec-1s (0.01 mg/kg) uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilik dokularında p30-GSDMD protein ekspresyonundaki değişiklikler ile ilgili sonuçlar Tablo 4.10. ve Şekil 4.9.'da verilmiştir.

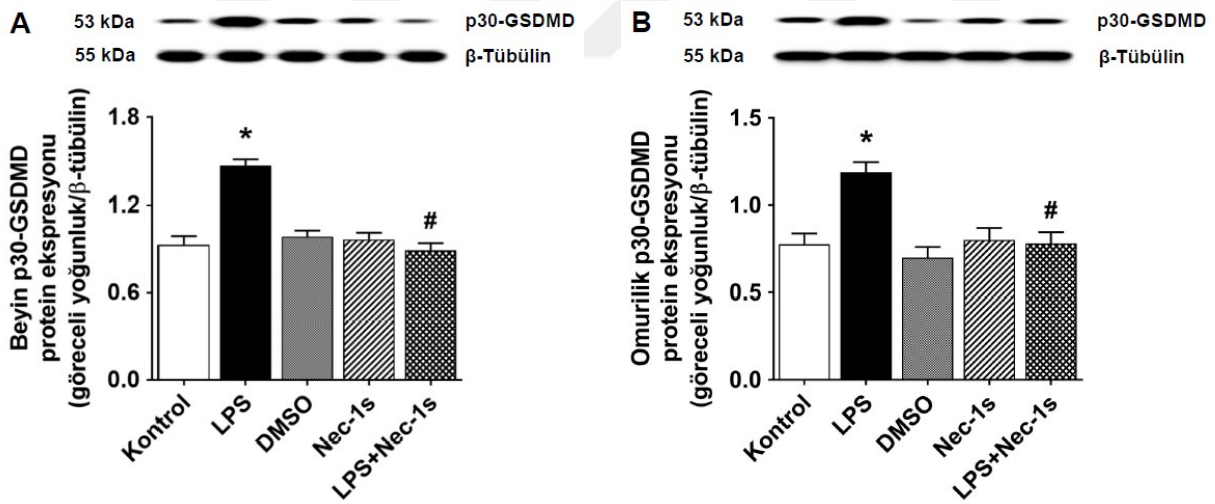
LPS uygulanan farelerin dokularında dokularda p30-GSDMD protein ekspresyonunda artma gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin p30-GSDMD protein ekspresyonunda neden olduğu artma Nec-1s ile önlenmiştir ($P < 0.05$). SF ile birlikte DMSO veya Nec-1s uygulanan farelerin dokularında p30-GSDMD protein ekspresyonu kontrol grubu değerlerinden farklı bulunmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte p30-GSDMD ekspresyonunun arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu p30-GSDMD ekspresyonundaki artma Nec-1s ile önlenebilmektedir.

Tablo 4.10. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde p30-GSDMD protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi.

	p30-GSDMD protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/ β -tübülin)
Beyin	
Kontrol	0.93 \pm 0.06 (n= 4)
LPS	1.47 \pm 0.04 (n= 4)*
DMSO	0.99 \pm 0.04 (n= 4)
Nec-1s	0.97 \pm 0.05 (n= 4)
LPS+Nec-1s	0.89 \pm 0.05 (n= 4)#
Omurilik	
Kontrol	0.78 \pm 0.06 (n= 4)
LPS	1.19 \pm 0.06 (n= 4)*
DMSO	0.70 \pm 0.06 (n= 4)
Nec-1s	0.80 \pm 0.07 (n= 4)
LPS+Nec-1s	0.78 \pm 0.06 (n= 4)#

DMSO, Dimetil sülfoksit; LPS, lipopolisakkarit; n, fare sayısı; Nec, nekrostatin; p30-GSDMD, kaspaz-11 tarafından bölünen piroptotik delik oluşturuucu protein GSDMD'nin N ucu p30 fragmanı. *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (Student's t testi; $P < 0.05$).

**Şekil 4.9.** Kontrol ve endotoksemik farelerin (A) beyinleri ve (B) omuriliklerinde p30-GSDMD protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi. DMSO, Dimetil sülfoksit; kDa, kilodalton; LPS, lipopolisakkarit; Nec, nekrostatin. *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (Student's t testi; $P < 0.05$).

4.12. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyinleri ve Omuriliklerinde SEMA3A Protein Ekspresyonu Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi

Farelere SF ve/veya LPS ile birlikte DMSO ya da Nec-1s (0.01 mg/kg) uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilik dokularında SEMA3A protein ekspresyonundaki değişiklikler ile ilgili sonuçlar Tablo 4.11. ve Şekil 4.10.'da verilmiştir.

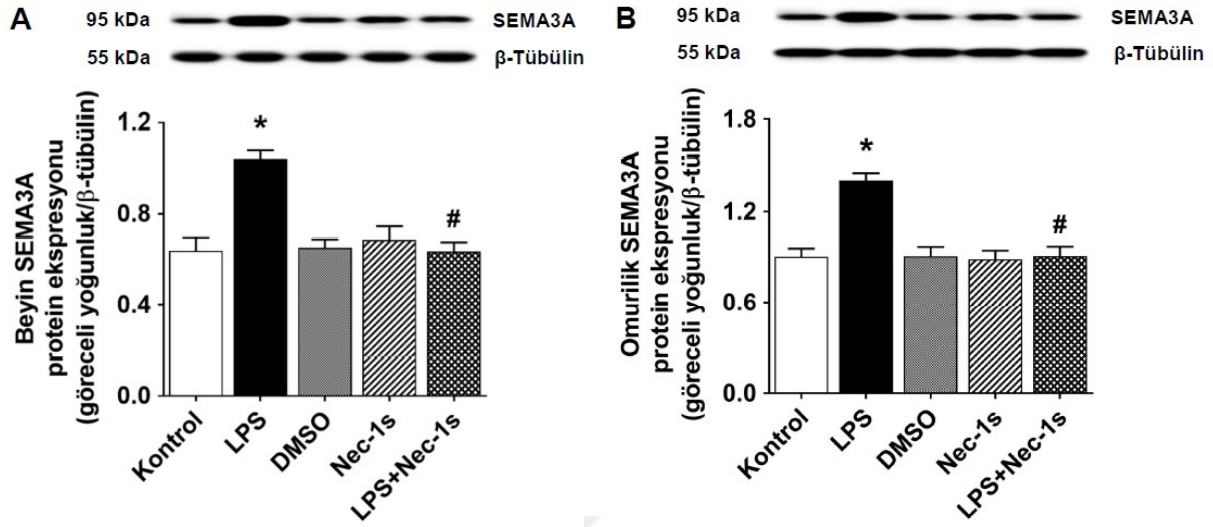
LPS uygulanan farelerin dokularında SEMA3A protein ekspresyonunda artma gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin SEMA3A protein ekspresyonunda neden olduğu artma Nec-1s ile önlenmiştir ($P < 0.05$). SF ile birlikte DMSO veya Nec-1s uygulanan farelerin dokularında SEMA3A protein ekspresyonu kontrol grubu değerlerinden farklı bulunmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte SEMA3A ekspresyonunun arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu SEMA3A ekspresyonundaki artma Nec-1s ile önlenebilmektedir.

Tablo 4.11. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde SEMA3A protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi.

	SEMA3A protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/ β -tübülin)
Beyin	
Kontrol	0.64 \pm 0.06 (n= 4)
LPS	1.04 \pm 0.04 (n= 4)*
DMSO	0.65 \pm 0.04 (n= 4)
Nec-1s	0.69 \pm 0.06 (n= 4)
LPS+Nec-1s	0.64 \pm 0.04 (n= 4)#
Omurilik	
Kontrol	0.90 \pm 0.05 (n= 4)
LPS	1.40 \pm 0.05 (n= 4)*
DMSO	0.91 \pm 0.06 (n= 4)
Nec-1s	0.89 \pm 0.06 (n= 4)
LPS+Nec-1s	0.91 \pm 0.06 (n= 4)#

DMSO, Dimetil sülfoksit; LPS, lipopolisakkarit; n, fare sayısı; Nec, nekrostatin; SEMA, semaforin. *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (Student's t testi; $P < 0.05$).



Şekil 4.10. Kontrol ve endotoksemik farelerin (A) beyinleri ve (B) omuriliklerinde SEMA3A protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi. DMSO, Dimetil sülfoksit; kDa, kilodalton; LPS, lipopolisakkarit; Nec, nekrostatin; SEMA, semaforin. *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (Student's t testi; $P < 0.05$).

4.13. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyinleri ve Omuriliklerinde Miyelin PLP Protein Ekspresyonu Üzerinde Nec-1s'nin Etkisi

Farelere SF ve/veya LPS ile birlikte DMSO ya da Nec-1s (0.01 mg/kg) uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilik dokularında miyelin PLP protein ekspresyonundaki değişiklikler ile ilgili sonuçlar Tablo 4.12. ve Şekil 4.11.'de verilmiştir.

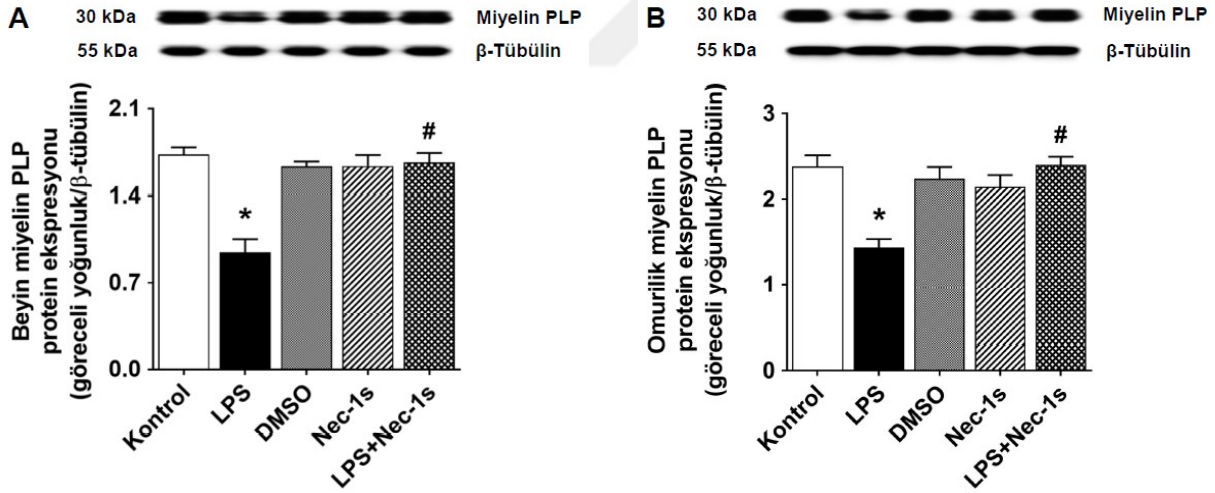
LPS uygulanan farelerin dokularında miyelin PLP protein ekspresyonunda azalma gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin miyelin PLP protein ekspresyonunda neden olduğu azalma Nec-1s ile önlenmiştir ($P < 0.05$). SF ile birlikte DMSO veya Nec-1s uygulanan farelerin dokularında miyelin PLP protein ekspresyonu kontrol grubu değerlerinden farklı bulunmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte miyelin PLP ekspresyonunun azaldığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu miyelin PLP ekspresyonundaki azalma Nec-1s ile önenebilmektedir.

Tablo 4.12. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyinleri ve omuriliklerinde miyelin PLP protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi.

	Miyelin PLP protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/ β -tübülin)
Beyin	
Kontrol	1.73 \pm 0.06 (n= 4)
LPS	0.95 \pm 0.11 (n= 4)*
DMSO	1.63 \pm 0.04 (n= 4)
Nec-1s	1.64 \pm 0.09 (n= 4)
LPS+Nec-1s	1.67 \pm 0.08 (n= 4)#
Omurilik	
Kontrol	2.38 \pm 0.13 (n= 4)
LPS	1.44 \pm 0.10 (n= 4)*
DMSO	1.24 \pm 0.14 (n= 4)
Nec-1s	2.15 \pm 0.14 (n= 4)
LPS+Nec-1s	2.40 \pm 0.09 (n= 4)#

DMSO, Dimetil sülfoksit; LPS, lipopolisakkarit; n, fare sayısı; Nec, nekrostatin; PLP, proteolipit protein. *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (Student's t testi; $P < 0.05$).



Şekil 4.11. Kontrol ve endotoksemik farelerin (A) beyinleri ve (B) omuriliklerinde miyelin PLP protein ekspresyonu üzerinde Nec-1s'nin etkisi. DMSO, Dimetil sülfoksit; kDa, kilodalton; LPS, lipopolisakkarit; Nec, nekrostatin; PLP, proteolipit protein. *Kontrol ve #LPS değerlerinden farklı (Student's t testi; $P < 0.05$).

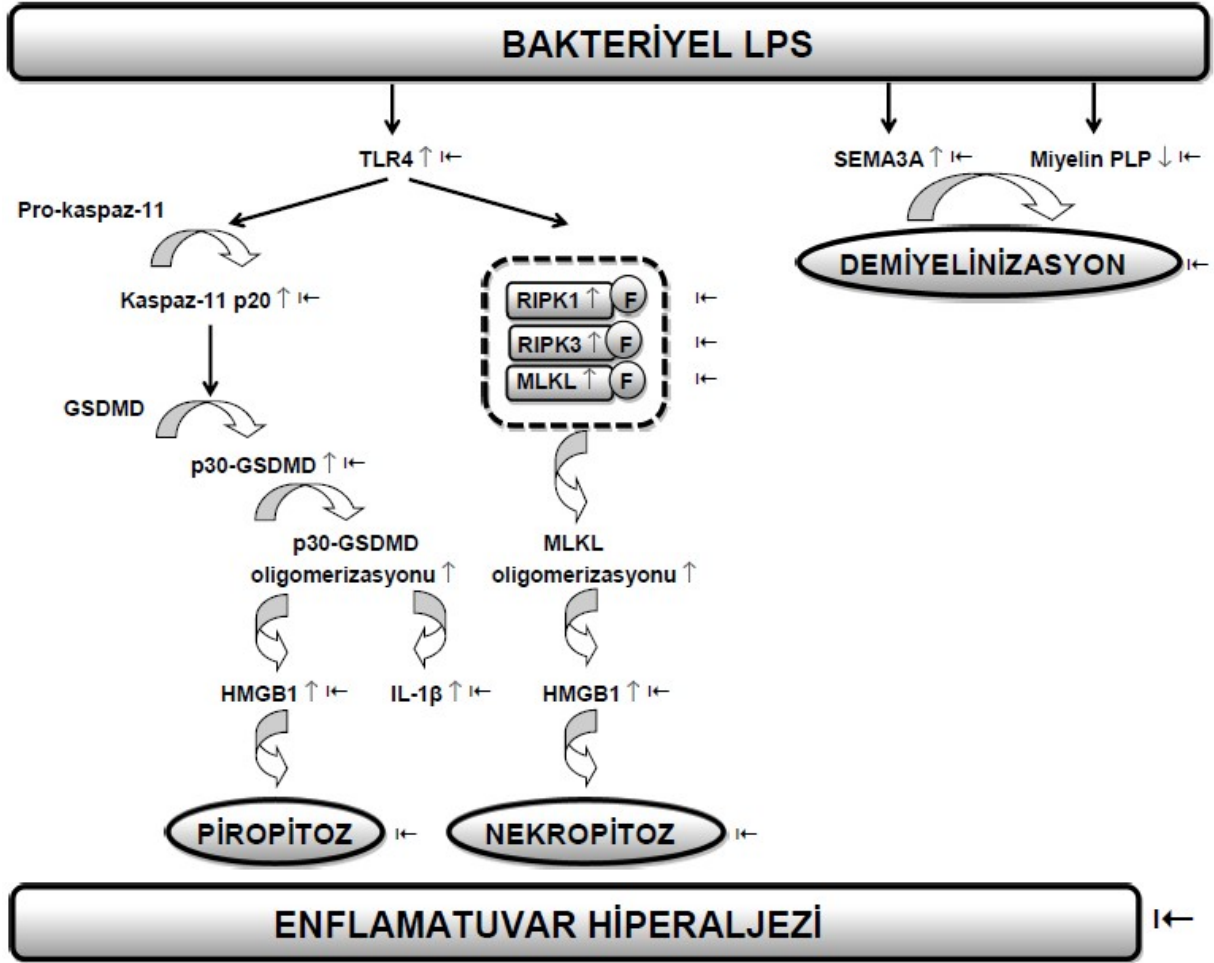
5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tezde, LPS ile farelerde oluşturulan enflamatuvar hiperaljeziye RIPK1/RIPK3/MLKL nekrozomunun katkısı seçici RIPK1 inhibitörü Nec-1s kullanılarak araştırılmıştır. Bulgularımız, Nec-1s'nin LPS/TLR4 yolu aracılığıyla gelişen enflamatuvar hiperaljeziyi önleyici etkisine SSS'de (1) RIPK1/RIPK3/MLKL nekrozomu aracılıklı nekropitozda azalma, (2) kaspaz-11/GSDMD aracılıklı piropitozda azalma, (3) remiyelinizasyon inhibitörü SEMA3A ekspresyonundaki azalma ve (4) miyelin membranının başlıca bileşeni olan PLP ekspresyonundaki artmanın katkıda bulunabileceğini düşündürmüştür (Şekil 5.1.).

Bu çalışma kapsamında yapılan çalışmaların sonuçları aşağıda özetlenmiştir:

(1) SF, LPS (10 mg/kg), DMSO ve/veya Nec-1s (0.001, 0.01, 0.1 veya 1 mg/kg) uygulanmasının ardından geçen 6 saatlik sürede ölen fare olmamıştır. Bu enflamatuvar hiperaljezi modelinde 10 mg/kg dozda uygulanan LPS'nin mortaliteye neden olmaması, daha önceki çalışmalarımızın sonuçları ile uyumludur [99-101, 103-106]. Öte yandan, bu modelde kontrol ve endotoksemik farelerde Nec-1s'nin kullanılan dozlarında mortaliteye neden olmadığı ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

(2) Farelere LPS uygulanmasından 6 saat sonra hiperaljezi gelişmektedir. Bulgularımıza göre, LPS ile oluşan hiperaljezi Nec-1s ile önlenebilmektedir. 10 mg/kg dozda uygulanan LPS'nin hiperaljeziye neden olması, daha önceki çalışmalarımızın sonuçları ile uyumludur [99-101, 103-106]. Öte yandan, bu modelde Nec-1s'nin 0.01 mg/kg dozda kontrol ve endotoksemik farelere uygulandığında mortaliteye de yol açmaksızın LPS'nin neden olduğu hiperaljeziyi önlediği ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Nec-1s'nin gibi seçici RIPK1 inhibitörlerinin sistemik yoldan uygulandığında SSS'ye geçerek nekropitoz aracılıklı nöroenflamasyonu önleyebildiklerini bildiklerini bildiren çalışmalar bulunmaktadır [260]. Dolayısıyla bulgularımız, daha önce yapılan LPS ile oluşan ve supraspinal düzeyde algılanan enflamatuvar hiperaljeziyi Nec-1s'nin önleyebileceğine ilişkin *in vivo* çalışmaların sonuçları ile de uyumludur [260].



Şekil 5.1. Farelerde LPS ile oluşturulan enflamatuvar hiperaljezi modelinde, Nec-1s'nin TLR4 aracılığıyla gelişen RIPK1/RIPK3/MLKL nekrozomu aracılıklı nekropitoz ve kaspaz-11/GSDMD aracılıklı piropitozun yanı sıra, demiyelinizasyon ve remiyelinizasyona ilişkin olaylar üzerindeki etkisi ile ilgili olarak önerilen mekanizma. LPS'nin neden olduğu hiperaljeziye santral sinir sisteminde TLR4, fosforile RIPK1, fosforile RIPK3, fosforile MLKL, HMGB1, kaspaz-11 p20, p30-GSDMD, IL-1 β ve SEMA3A ekspresyonunda artmanın yanı sıra, miyelin PLP ekspresyonundaki azalma eşlik etmektedir. LPS'nin neden olduğu bu değişiklikleri Nec-1s önleyebilmektedir. F, fosforilasyon; GSDMD, gasdermin D; HMGB, high-mobility-group-box; IL, interlökin (interleukin); LPS, lipopolisakkarit; MLKL, karışık kökenli kinaz benzeri psöodokinaz (mixed lineage kinase domain-like pseudokinase); Nec, nekrostatin (necrostatin); p30-GSDMD, kaspaz-11 tarafından bölünen piroptotik delik oluşturucu protein GSDMD'nin N ucu p30 fragmanı; PLP, proteolipit protein; RIPK, reseptör ile etkileşen serin/treonin protein kinaz (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase); SEMA, semaforin. \uparrow , LPS ile artıyor; \downarrow , LPS ile azalıyor; \leftarrow , RIPK inhibitörü Nec-1s önlüyor.

(3) Farelere LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte LPS/farklılaşma kümesi (*cluster of differentiation*; CD)14/miyeloid farklılaşma (*myeloid differentiation*; MD)-2/TLR4 aracılıklı enflamatuvar yol etkinliğinin göstergesi olarak ölçülen TLR4 protein ekspresyonu artmaktadır. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu TLR4 protein ekspresyonundaki artmayı Nec-1s önlemektedir. Enflamatuvar hiperaleji modelinde, LPS'nin beyin ve omurilikte TLR4 protein ekspresyonunda artmaya neden olması, daha önceki çalışmalarımızın sonuçları ile uyumludur [103]. Öte yandan, bu modelde Nec-1s'nin beyin ve omurilikte LPS'nin neden olduğu TLR4 protein ekspresyonundaki artma üzerindeki etkisi ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

(4) Farelere LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte RIPK1/RIPK3/MLKL nekrozomu aracılıklı nekropitozun göstergesi olarak ölçülen fosforile RIPK1, RIPK3 ve MLKL proteinlerinin ekspresyonu artmaktadır. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu RIPK1, RIPK3 ve MLKL protein fosforilasyonundaki artmayı Nec-1s önlemektedir. Enflamatuvar hiperaleji modelinde, LPS'nin beyin ve omurilikte RIPK1, RIPK3 ve MLKL protein fosforilasyonunda artmaya neden olması, daha önceki çalışmalarımızın sonuçları ile uyumludur [106]. Öte yandan, bu modelde Nec-1s'nin beyin ve omurilikte LPS'nin neden olduğu RIPK1, RIPK3 ve MLKL protein fosforilasyondaki artma üzerindeki etkisi ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

(5) Farelere LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte RIPK1/RIPK3/MLKL nekrozomu aracılıklı nekropitoz, kaspaz-11/GSDMD aracılıklı piropitoz ve enflamasyonun göstergesi olarak ölçülen HMGB1 protein ekspresyonu artmaktadır. Enflamatuvar hiperaleji modelinde, LPS'nin beyin ve omurilikte HMGB1 protein ekspresyonunda artmaya neden olması, daha önce yapılan çalışmaların sonuçları ile uyumludur [106, 261]. Öte yandan, bu modelde Nec-1s'nin beyin ve omurilikte LPS'nin neden olduğu HMGB1 protein ekspresyonundaki artma üzerindeki etkisi ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

(6) Farelere LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte kaspaz-11/GSDMD aracılıklı piropitozun göstergesi olarak ölçülen kaspaz-11 p20 ve GSDMD proteinlerinin ekspresyonu artmaktadır. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu kaspaz-11 p20 protein ekspresyonundaki artmayı Nec-1s önlemektedir. Enflamatuvar hiperaleji modelinde, LPS'nin beyin ve omurilikte kaspaz-11 p20 protein ekspresyonunda artmaya neden olması, daha önceki çalışmalarımızın sonuçları ile uyumludur [101, 104, 106]. Öte yandan, bu modelde Nec-1s'nin beyin ve omurilikte LPS'nin neden olduğu kaspaz-11 p20 protein ekspresyonundaki artma üzerindeki etkisi ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

(7) Farelere LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte RIPK1/RIPK3/MLKL nekrozomu aracılıklı nekropitoz ve kaspaz-11/GSDMD aracılıklı piropitoz ile enflamasyonun göstergesi olarak ölçülen IL-1 β protein ekspresyonu artmaktadır. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu IL-1 β protein ekspresyonundaki artmayı Nec-1s önlemektedir. Enflamatuvar hiperaljezi modelinde, LPS'nin beyin ve omurilikte IL-1 β protein ekspresyonunda artmaya neden olması, daha önceki çalışmalarımızın sonuçları ile uyumludur [101, 103, 104, 106]. Öte yandan, bu modelde Nec-1s'nin beyin ve omurilikte LPS'nin neden olduğu IL-1 β protein ekspresyonundaki artma üzerindeki etkisi ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

(8) Farelere LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte demiyelinizasyonun göstergesi olarak ölçülen SEMA3A protein ekspresyonu artmaktadır. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu SEMA3A protein ekspresyonundaki artmayı Nec-1s önlemektedir. Enflamatuvar hiperaljezi modelinde, LPS'nin beyin ve omurilikte SEMA3A protein ekspresyonunda artmaya neden olması, daha önceki çalışmalarımızın sonuçları ile uyumludur [106]. Öte yandan, bu modelde Nec-1s'nin beyin ve omurilikte LPS'nin neden olduğu SEMA3A protein ekspresyonundaki artma üzerindeki etkisi ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

(9) Farelere LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte remiyelinizasyonun göstergesi olarak ölçülen miyelin PLP protein ekspresyonu azalmaktadır. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu miyelin PLP protein ekspresyonundaki azalmayı Nec-1s önlemektedir. Enflamatuvar hiperaljezi modelinde, LPS'nin beyin ve omurilikte miyelin PLP protein ekspresyonunda azalmaya neden olması, daha önceki çalışmalarımızın sonuçları ile uyumludur [106]. Öte yandan, bu modelde Nec-1s'nin beyin ve omurilikte LPS'nin neden olduğu miyelin PLP protein ekspresyonundaki azalma üzerindeki etkisi ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

Bu çalışma kapsamında her ne kadar enflamatuvar hiperaljezi üzerindeki yararlı etkilerinin moleküler mekanizmaları ayrıntılı olarak araştırılmamış olsa da, literatürde bulunan bilgiler doğrultusunda, Nec-1s'nin, doğrudan olduğu kadar dolaylı olarak da, RIPK1/RIPK3/MLKL nekrozomu aracılıklı nekropitoz ve kaspaz-11/GSDMD aracılıklı piropitozun yanı sıra, SEMA3A ve miyelin PLP proteinlerinin ekspresyonunu değiştirebileceği düşünülebilir. Bunlara ek olarak, Nec-1s'nin LPS'nin neden olduğu enflamatuvar hiperaljezi patojenezinde rol oynayan sinyal ileti yolları üzerinde sinerjik etkisi nedeniyle de yararlı etkisini gösterebilmesi olasıdır. Ancak, bu hipotezlerin geçerliliklerinin kanıtlanabilmesi için ek çalışmalar yapılmalıdır.

Sonuç olarak, farelere sistemik yoldan uygulanan seçici RIPK1 inhibitörü Nec-1s'nin SSS'de RIPK1/RIPK3/MLKL nekrozomu aracılıklı nekropitoz, kaspaz-11/GSDMD aracılıklı piropitoz ve demiyelinizasyonu önlemesinin yanı sıra, remiyelinizasyona da yol açması sonucunda, LPS'nin neden olduğu enflamatuvar hiperaljeziyi önleyebildiği ilk kez bu tez çalışmasında gösterilmiştir. Bulgularımız, sistemik yoldan uygulandığında SSS'ye de geçebilen Nec-1s gibi seçici RIPK1 inhibitörlerinin bakteriyel enfeksiyonlara bağlı olarak gelişebilecek ağrının da eşlik ettiği akut enflamatuvar hastalıkların yanı sıra, patojenezinde enflamasyonun rol oynadığı kronik ağrılı durumların önlenmesi ve tedavisinde de analjezik/antiinflamatuvar ilaç olarak yararlı olabileceklerini düşündürmüştür. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların, Nec-1s'nin analjezik/antiinflamatuvar ilaç olarak geliştirilmesi amacıyla yapılacak olan klinik öncesi ve klinik araştırmalara katkıda bulunabileceği beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- [1]. Benson, S.; Engler, H.; Schedlowski, M.; Elsenbruch, S., Experimental endotoxemia as a model to study neuroimmune mechanisms in human visceral pain. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2012**, 1262, 108-117.
- [2]. Cobos, E. J.; Portillo-Salido, E., Bedside-to-bench behavioral outcomes in animal models of pain: beyond the evaluation of reflexes. *Current Neuropharmacology* **2013**, 11, (6), 560-591.
- [3]. Holzer, P.; Farzi, A.; Hassan, A. M.; Zenz, G.; Jacan, A.; Reichmann, F., Visceral inflammation and immune activation stress the brain. *Frontiers in Immunology* **2017**, 8, 1613.
- [4]. Deuis, J. R.; Dvorakova, L. S.; Vetter, I., Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **2017**, 10, 284.
- [5]. Hori, T.; Oka, T.; Hosoi, M.; Abe, M.; Oka, K., Hypothalamic mechanisms of pain modulatory actions of cytokines and prostaglandin E2. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2000**, 917, 106-120.
- [6]. Abbas, M.; Rahman, S., Effects of alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor positive allosteric modulator on lipopolysaccharide-induced neuroinflammatory pain in mice. *European Journal of Pharmacology* **2016**, 783, 85-91.
- [7]. Abe, M.; Oka, T.; Horia, T.; Takahashi, S., Prostanoids in the preoptic hypothalamus mediate systemic lipopolysaccharide-induced hyperalgesia in rats. *Brain Research* **2001**, 916, (1-2), 41-49.
- [8]. Chen, S.; Xiong, J.; Zhan, Y.; Liu, W.; Wang, X., Wogonin inhibits LPS-induced inflammatory response in rat dorsal root ganglion neurons via inhibiting TLR4-MyD88-TAK1-mediated NF- κ B and MAPK signaling pathway. *Cellular and Molecular Neurobiology* **2015**, 35, (4), 523-531.
- [9]. Wang, L. L.; Shi, D. L.; Gu, H. Y.; Zheng, M. Z.; Hu, J.; Song, X. H.; Shen, Y. L.; Chen, Y. Y., Resveratrol attenuates inflammatory hyperalgesia by inhibiting glial activation in mice spinal cords. *Molecular Medicine Reports* **2016**, 13, (5), 4051-4057.
- [10]. Yoon, S. Y.; Patel, D.; Dougherty, P. M., Minocycline blocks lipopolysaccharide induced hyperalgesia by suppression of microglia but not astrocytes. *Neuroscience* **2012**, 221, 214-224.
- [11]. Zhao, H.; Luo, F.; Li, H.; Zhang, L.; Yi, Y.; Wan, J., Antinociceptive effect of tetrandrine on LPS-induced hyperalgesia via the inhibition of IKK β phosphorylation and the COX-2/PGE2 pathway in mice. *PLoS One* **2014**, 9, (4), e94586.
- [12]. Bernard, N. J.; O'Neill, L. A., Mal, more than a bridge to MyD88. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* **2013**, 65, (9), 777-786.

- [13]. Ciesielska, A.; Matyjek, M.; Kwiatkowska, K., TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2021**, 78 (4), 1233-1261.
- [14]. Landström, M., The TAK1-TRAF6 signalling pathway. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **2010**, 42 (5), 585-589.
- [15]. Singh, S.; Sahu, K.; Singh, C.; Singh, A., Lipopolysaccharide induced altered signaling pathways in various neurological disorders. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **2022**, 395, (3), 285-294.
- [16]. Zhou, D.; Huang, C.; Lin, Z.; Zhan, S.; Kong, L.; Fang, C.; Li, J., Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell Signaling* **2014** 26, (2), 192-197.
- [17]. Zucoloto, A. Z.; Manchope, M. F.; Staurengo-Ferrari, L.; Pinho-Ribeiro, F. A.; Zarpelon, A. C.; Saraiva, A. L. L.; Cecílio, N. T.; Alves-Filho, J. C.; Cunha, T. M.; Menezes, G. B.; Cunha, F. Q.; Casagrande, R.; Verri, W. A., Probucol attenuates lipopolysaccharide-induced leukocyte recruitment and inflammatory hyperalgesia: effect on NF- κ B activation and cytokine production. *European Journal of Pharmacology* **2017**, 809, 52-63.
- [18]. Al Mamun, A.; Suchi, S. A.; Aziz, M. A.; Zaeem, M.; Munir, F.; Wu, Y.; Xiao, J., Pyroptosis in acute pancreatitis and its therapeutic regulation. *Apoptosis* **2022**, 27, (7-8), 465-481.
- [19]. Bertheloot, D.; Latz, E.; Franklin, B. S., Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular and Molecular Immunology* **2021**, 18, (5), 1106-1121.
- [20]. Dai, W., Cheng, J., Leng, X., Hu, X., Ao, Y., The potential role of necroptosis in clinical diseases. *International Journal of Molecular Medicine* **2021**, 47, (5), 89.
- [21]. Frank, D.; Vince, J. E., Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk. *Cell Death and Differentiation* **2019**, 26, (1), 99-114.
- [22]. Kaczmarek, A.; Vandenabeele, P.; Krysko, D. V., Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* **2013**, 38, (2), 209-223.
- [23]. Kearney, C. J., Martin, S. J., An inflammatory perspective on necroptosis. *Molecular Cell* **2017**, 65, (6), 965-973.
- [24]. Mázló, A.; Jenei, V.; Burai, S.; Molnár, T.; Bácsi, A.; Koncz, G., Types of necroinflammation, the effect of cell death modalities on sterile inflammation. *Cell Death and Disease* **2022**, 13, (5), 423.
- [25]. Yu, Z.; Jiang, N.; Su, W.; Zhuo, Y., Necroptosis: a novel pathway in neuroinflammation. *Frontiers in Pharmacology* **2021**, 12, 701564.

- [26]. Humphries, F.; Yang, S.; Wang, B.; Moynagh, P. N., RIP kinases: key decision makers in cell death and innate immunity. *Cell Death and Differentiation* **2015**, *22*, (2), 225-236.
- [27]. Rao, Z.; Zhang, N.; Xu, N.; Pan, Y.; Xiao, M.; Wu, J.; Zhou, H.; Yang, S.; Chen, Y., 1,25-Dihydroxyvitamin D inhibits LPS-induced high-mobility group box 1 (HMGB1) secretion via targeting the NF-E2-related factor 2-hemeoxygenase-1-HMGB1 pathway in macrophages. *Frontiers in Immunology* **2017**, *8*, 1308.
- [28]. Murao, A.; Aziz, M.; Wang, H.; Brenner, M.; Wang, P. Release mechanisms of major DAMPs. *Apoptosis* **2021**, *26*, (3-4), 152-162.
- [29]. Yang, H.; Wang, H.; Andersson, U., Targeting inflammation driven by HMGB1. *Frontiers in Immunology* **2020**, *11*, 484.
- [30]. McQuade, T.; Cho, Y.; Chan, F. K., Positive and negative phosphorylation regulates RIP1- and RIP3-induced programmed necrosis. *Biochemical Journal* **2013**, *456*, (3), 409-415.
- [31]. Miller, D. R.; Cramer, S. D.; Thorburn, A., The interplay of autophagy and non-apoptotic cell death pathways. *International Review of Cell and Molecular Biology* **2020**, *352*, 159-187.
- [32]. Orozco, S.; Yatim, N.; Werner, M. R.; Tran, H.; Gunja, S. Y.; Tait, S. W.; Albert, M. L.; Green, D. R.; Oberst, A., RIPK1 both positively and negatively regulates RIPK3 oligomerization and necroptosis. *Cell Death and Differentiation* **2014**, *21*, (10), 1511-1521.
- [33]. Zhao, H.; Liu, H.; Yang, Y.; Wang, H., The role of autophagy and pyroptosis in liver disorders. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23*, (11), 6208.
- [34]. Yu, P.; Zhang, X.; Liu, N.; Tang, L.; Peng, C.; Chen, X., Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2021**, *6*, (1), 128.
- [35]. Choi, M. E.; Price, D. R.; Ryter, S. W.; Choi, A. M. K., Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease. *JCI Insight* **2019**, *4*, (15), e128834.
- [36]. Christgen, S.; Tweedell, R. E.; Kanneganti, T. D., Programming inflammatory cell death for therapy. *Pharmacology and Therapeutics* **2022**, *232*, 108010.
- [37]. Chu, Q.; Gu, X.; Zheng, Q.; Wang, J.; Zhu, H., Mitochondrial mechanisms of apoptosis and necroptosis in liver diseases. *Analytical Cellular Pathology* **2021**, *2021*, 8900122.
- [38]. Du, K.; He, M.; Zhao, D.; Wang, Y.; Ma, C.; Liang, H.; Wang, W.; Min, D.; Xue, L.; Guo, F., Mechanism of cell death pathways in status epilepticus and related therapeutic agents. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2022**, *149*, 112875.
- [39]. Faust, H.; Mangalmurti, N. S., Collateral damage: necroptosis in the development of lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **2020**, *318*, (2), L215-L225.

- [40]. Fiani, B.; Kondilis, A.; Soula, M.; Tao, A.; Alvi, M. A., Novel methods of necroptosis inhibition for spinal cord injury using translational research to limit secondary injury and enhance endogenous repair and regeneration. *Neurospine* **2021**, 18, (2), 261-270.
- [41]. Gullett, J. M.; Tweedell, R. E.; Kanneganti, T. D., It's all in the PAN: crosstalk, plasticity, redundancies, switches, and interconnectedness encompassed by PANoptosis underlying the totality of cell death-associated biological effects. *Cells* **2022**, 11, (9), 1495.
- [42]. Karlowitz, R.; van Wijk, S. J. L., Surviving death: emerging concepts of RIPK3 and MLKL ubiquitination in the regulation of necroptosis. *FEBS Journal* **2021**, Oct 28.
- [43]. Lima, I. S.; Pêgo, A. C.; Barros, J. T.; Prada, A. R.; Gozzelino, R., Cell death-osis of dopaminergic neurons and the role of iron in Parkinson's disease. *Antioxidants and Redox Signaling* **2021**, 35, (6), 453-473.
- [44]. Liu, L.; Lalaoui, N., 25 years of research put RIPK1 in the clinic. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **2021**, 109, 86-95.
- [45]. Liu, X.; Xie, X.; Ren, Y.; Shao, Z.; Zhang, N.; Li, L.; Ding, X.; Zhang, L., The role of necroptosis in disease and treatment. *MedComm* **2021**, 2, (4), 730-755.
- [46]. Liu, Y.; Liu, T.; Lei, T.; Zhang, D.; Du, S.; Girani, L.; Qi, D.; Lin, C.; Tong, R.; Wang, Y., RIP1/RIP3-regulated necroptosis as a target for multifaceted disease therapy. *International Journal of Molecular Medicine* **2019**, 44, (3), 771-786.
- [47]. Moujalled, D.; Strasser, A.; Liddell, J. R., Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases. *Cell Death and Differentiation* **2021**, 28, (7), 2029-2044.
- [48]. Neel, D. V.; Basu, H.; Gunner, G.; Chiu, I. M., Catching a killer: mechanisms of programmed cell death and immune activation in amyotrophic lateral sclerosis. *Immunological Reviews* **2022**, 311, (1), 130-150.
- [49]. Perez, F.; Ruera, C. N.; Miculan, E.; Carasi, P.; Chirido, F. G., Programmed cell death in the small intestine: implications for the pathogenesis of celiac disease. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22, (14), 7426.
- [50]. Richard, R.; Mousa, S., Necroptosis in Alzheimer's disease: potential therapeutic target. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **2022**, 152, 113203.
- [51]. Rucker, A. J.; Chan, F. K., Tumor-intrinsic and immune modulatory roles of receptor-interacting protein kinases. *Trends in Biochemical Sciences* **2022**, 47, (4), 342-351.
- [52]. Scarpitta, A.; Hacker, U. T.; Büning, H.; Boyer, O.; Adriouch, S., Pyroptotic and necroptotic cell death in the tumor microenvironment and their potential to stimulate anti-tumor immune responses. *Frontiers in Oncology* **2021**, 11, 731598.

- [53]. Wang, L.; Zhou, L.; Zhou, Y.; Liu, L.; Jiang, W.; Zhang, H.; Liu, H., Necroptosis in pulmonary diseases: a new therapeutic target. *Frontiers in Pharmacology* **2021**, *12*, 737129.
- [54]. Wei, J.; Zhao, Y.; Liang, H.; Du, W.; Wang, L., Preliminary evidence for the presence of multiple forms of cell death in diabetes cardiomyopathy. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2022**, *12*, (1), 1-17.
- [55]. Yuan, J.; Amin, P.; Ofengeim, D., Necroptosis and RIPK1-mediated neuroinflammation in CNS diseases. *Nature Reviews Neuroscience* **2019**, *20*, (1), 19-33.
- [56]. Zhao, J.; Jiang, P.; Guo, S.; Schrodi, S. J.; He, D., Apoptosis, autophagy, NETosis, necroptosis, and pyroptosis mediated programmed cell death as targets for innovative therapy in rheumatoid arthritis. *Frontiers in Immunology* **2021**, *12*, 809806.
- [57]. Zhao, J.; Wei, K.; Jiang, P.; Chang, C.; Xu, L.; Xu, L.; Shi, Y.; Guo, S.; Xue, Y.; He, D., Inflammatory response to regulated cell death in gout and its functional implications. *Frontiers in Immunology* **2022**, *13*, 888306.
- [58]. Zheng, Z.; Li, G., Mechanisms and therapeutic regulation of pyroptosis in inflammatory diseases and cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, (4), 1456.
- [59]. Zhou, Y.; Wu, R.; Wang, X.; Bao, X.; Lu, C., Roles of necroptosis in alcoholic liver disease and hepatic pathogenesis. *Cell Proliferation* **2022**, *55*, (3), e13193.
- [60]. <https://clinicaltrials.gov> (30.10.2022).
- [61]. Dong, W.; Li, Z.; Chen, Y.; Zhang, L.; Ye, Z.; Liang, H.; Li, R.; Xu, L.; Zhang, B.; Liu, S.; Wang, W.; Li, C.; Shi, W.; Liang, X., Necrostatin-1 attenuates sepsis-associated acute kidney injury by promoting autophagosome elimination in renal tubular epithelial cells. *Molecular Medicine Reports* **2018**, *17*, (2), 3194-3199.
- [62]. Guan, E.; Wang, Y.; Wang, C.; Zhang, R.; Zhao, Y.; Hong, J., Necrostatin-1 attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Experimental Lung Research* **2017**, *43*, (9-10), 378-387.
- [63]. Kim, S. J.; Lee, S. M., Necrostatin-1 protects against D-dalactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatic injury by preventing TLR4 and RAGE signaling. *Inflammation* **2017**, *40*, (6), 1912-1923.
- [64]. Lin, B.; Jin, Z.; Chen, X.; Zhao, L.; Weng, C.; Chen, B.; Tang, Y.; Lin, L., Necrostatin-1 protects mice from acute lung injury by suppressing necroptosis and reactive oxygen species. *Molecular Medicine Reports* **2020**, *21*, (5), 2171-2181.

- [65]. Najjar, M.; Saleh, D.; Zelic, M.; Nogusa, S.; Shah, S.; Tai, A.; Finger, J. N.; Polykratis, A.; Gough, P. J.; Bertin, J.; Whalen, M.; Pasparakis, M.; Balachandran, S.; Kelliher, M.; Poltorak, A.; Degterev, A., RIPK1 and RIPK3 kinases promote cell-death-independent inflammation by toll-like receptor 4. *Immunity* **2016**, 45, (1), 46-59.
- [66]. Newton, K.; Dugger, D. L.; Maltzman, A.; Greve, J. M.; Hedehus, M.; Martin-McNulty, B.; Carano, R. A.; Cao, T. C.; van Bruggen, N.; Bernstein, L.; Lee, W. P.; Wu, X.; DeVoss, J.; Zhang, J.; Jeet, S.; Peng, I.; McKenzie, B. S.; Roose-Girma, M.; Caplazi, P.; Diehl, L.; Webster, J. D.; Vucic, D., RIPK3 deficiency or catalytically inactive RIPK1 provides greater benefit than MLKL deficiency in mouse models of inflammation and tissue injury. *Cell Death and Differentiation* **2016**, 23, (9), 1565-1576.
- [67]. Ni, H. M.; McGill, M. R.; Chao, X.; Woolbright, B. L.; Jaeschke, H.; Ding, W. X., Caspase inhibition prevents tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and promotes necrotic cell death in mouse hepatocytes in vivo and in vitro. *American Journal of Pathology* **2016**, 186, (10), 2623-2636.
- [68]. Saleh, D.; Najjar, M.; Zelic, M.; Shah, S.; Nogusa, S.; Polykratis, A.; Paczosa, M. K.; Gough, P. J.; Bertin, J.; Whalen, M.; Fitzgerald, K. A.; Slavov, N.; Pasparakis, M.; Balachandran, S.; Kelliher, M.; Meccas, J.; Degterev, A., Kinase activities of RIPK1 and RIPK3 can direct IFN-beta synthesis induced by lipopolysaccharide. *Journal of Immunology* **2017**, 198, (11), 4435-4447.
- [69]. Yu, X.; Mao, M.; Liu, X.; Shen, T.; Li, T.; Yu, H.; Zhang, J.; Chen, X.; Zhao, X.; Zhu, D., A cytosolic heat shock protein 90 and co-chaperone p23 complex activates RIPK3/MLKL during necroptosis of endothelial cells in acute respiratory distress syndrome. *Journal of Molecular Medicine* **2020**, 98, (4), 569-583.
- [70]. Huang, W. Y.; Lai, Y. L.; Liu, K. H.; Lin, S.; Chen, H. Y.; Liang, C. H.; Wu, H. M.; Hsu, K. S., TNF α -mediated necroptosis in brain endothelial cells as a potential mechanism of increased seizure susceptibility in mice following systemic inflammation. *Journal of Neuroinflammation* **2022**, 19, (1), 29.
- [71]. Kondo, T.; Macdonald, S.; Engelmann, C.; Habtesion, A.; Macnaughtan, J.; Mehta, G.; Mookerjee, R. P.; Davies, N.; Pavesi, M.; Moreau, R.; Angeli, P.; Arroyo, V.; Andreola, F.; Jalan, R., The role of RIPK1 mediated cell death in acute on chronic liver failure. *Cell Death and Disease* **2021**, 13, (1), 5.
- [72]. Li, L.; Shu, M. Q.; Chen, J., CYLD deficiency exacerbates lipopolysaccharide (LPS)-induced pyroptosis in astrocytes of mice with sepsis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2019**, 514, (4), 1066-1073.

- [73]. Shao, L.; Liu, X.; Zhu, S.; Liu, C.; Gao, Y.; Xu, X., The role of Smurf1 in neuronal necroptosis after lipopolysaccharide-induced neuroinflammation. *Cellular and Molecular Neurobiology* **2018**, 38, (4), 809-816.
- [74]. Chen, H.; Li, Y.; Wu, J.; Li, G.; Tao, X.; Lai, K.; Yuan, Y.; Zhang, X.; Zou, Z.; Xu, Y., RIPK3 collaborates with GSDMD to drive tissue injury in lethal polymicrobial sepsis. *Cell Death and Differentiation* **2020**, 27 (9), 2568-2585.
- [75]. Zhang, Q.; Wei, S.; Lu, J.; Fu, W.; Chen, H.; Huang, Q.; Chen, Z.; Zeng, Z., Necrostatin-1 accelerates time to death in a rat model of cecal ligation and puncture and massively increases hepatocyte caspase-3 cleavage. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **2019**, 316, (4), G551-G561.
- [76]. Liu, Y.; Xu, Q.; Wang, Y.; Liang, T.; Li, X.; Wang, D.; Wang, X.; Zhu, H.; Xiao, K., Necroptosis is active and contributes to intestinal injury in a piglet model with lipopolysaccharide challenge. *Cell Death and Disease* **2021**, 12, (1), 62.
- [77]. Nikseresht, S.; Khodagholi, F.; Nategh, M.; Dargahi, L., RIP1 Inhibition rescues from LPS-induced RIP3-mediated programmed cell death, distributed energy metabolism and spatial memory impairment. *Journal of Molecular Neuroscience* **2015**, 57, (2), 219-230.
- [78]. Seo, M. J.; Hong, J. M.; Kim, S. J.; Lee, S. M., Genipin protects d-galactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatic injury through suppression of the necroptosis-mediated inflammasome signaling. *European Journal of Pharmacology* **2017**, 812, 128-137.
- [79]. Xu, Q.; Guo, J.; Li, X.; Wang, Y.; Wang, D.; Xiao, K.; Zhu, H.; Wang, X.; Hu, C. A. A.; Zhang, G.; Liu, Y., Necroptosis underlies hepatic damage in a piglet model of lipopolysaccharide-induced sepsis. *Frontiers in Immunology* **2021**, 12, 633830.
- [80]. Yuan, Z.; Zhang, H.; Hasnat, M.; Ding, J.; Chen, X.; Liang, P.; Sun, L.; Zhang, L.; Jiang, Z., A new perspective of triptolide-associated hepatotoxicity: liver hypersensitivity upon LPS stimulation. *Toxicology* **2019**, 414, 45-56.
- [81]. Mikus, P.; Pecher, D.; Rauova, D.; Horvath, C.; Szobi, A.; Adameova, A., Determination of novel highly effective necrostatin Nec-1s in rat plasma by high performance liquid chromatography hyphenated with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Molecules* **2018**, 23, (8), 1946.
- [82]. Takahashi, T.; Duprez, L.; Grootjans, S.; Cauwels, A.; Nerinckx, W.; DuHadaway, J. B.; Goossens, V.; Roelandt, R.; Van Hauwermeiren, F.; Libert, C.; Declercq, W.; Callewaert, N.; Prendergast, G. C.; Degterev, A.; Yuan, J.; Vandenabeele, P., Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models. *Cell Death and Disease* **2012**, 3, (11), e437.

- [83]. Jhun, J.; Lee, S. H.; Kim, S. Y.; Ryu, J.; Kwon, J. Y.; Na, H. S.; Jung, K.; Moon, S. J.; Cho, M. L.; Min, J. K., RIPK1 inhibition attenuates experimental autoimmune arthritis via suppression of osteoclastogenesis. *Journal of Translational Medicine* **2019**, *17*, (1), 84.
- [84]. Koschel, J.; Nishanth, G.; Just, S.; Harit, K.; Kröger, A.; Deckert, M.; Naumann, M.; Schlüter, D., OTUB1 prevents lethal hepatocyte necroptosis through stabilization of c-IAP1 during murine liver inflammation. *Cell Death and Differentiation* **2022**, *29*, (4), 891.
- [85]. Mohammed, S.; Nicklas, E. H.; Thadathil, N.; Selvarani, R.; Royce, G. H.; Kinter, M.; Richardson, A.; Deepa, S. S., Role of necroptosis in chronic hepatic inflammation and fibrosis in a mouse model of increased oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* **2021**, *164*, 315-328.
- [86]. Qin, D.; Wang, X.; Li, Y.; Yang, L.; Wang, R.; Peng, J.; Essandoh, K.; Mu, X.; Peng, T.; Han, Q.; Yu, K. J.; Fan, G. C., MicroRNA-223-5p and -3p cooperatively suppress necroptosis in ischemic/reperfused hearts. *Journal of Biological Chemistry* **2016**, *291*, (38), 20247-20259.
- [87]. Wang, Q.; Zhou, T.; Liu, Z.; Ren, J.; Phan, N.; Gupta, K.; Stewart, D. M.; Morgan, S.; Assa, C.; Kent, K. C.; Liu, B., Inhibition of receptor-interacting protein kinase 1 with necrostatin-1s ameliorates disease progression in elastase-induced mouse abdominal aortic aneurysm model. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 42159.
- [88]. Yue, S.; Zhou, H.; Wang, X.; Busuttill, R. W.; Kupiec-Weglinski, J. W.; Zhai, Y., Prolonged ischemia triggers necrotic depletion of tissue-resident macrophages to facilitate inflammatory immune activation in liver ischemia reperfusion injury. *Journal of Immunology* **2017**, *198*, (9), 3588-3595.
- [89]. Zhuang, Y.; Xu, H. C.; Shinde, P. V.; Warfsmann, J.; Vasilevska, J.; Sundaram, B.; Behnke, K.; Huang, J.; Hoell, J. I.; Borkhardt, A.; Pfeffer, K.; Taha, M. S.; Herebian, D.; Mayatepek, E.; Brenner, D.; Ahmadian, M. R.; Keitel, V.; Wieczorek, D.; Haussinger, D.; Pandyra, A. A.; Lang, K. S.; Lang, P. A., Fragile X mental retardation protein protects against tumour necrosis factor-mediated cell death and liver injury. *Gut* **2020**, *69*, (1), 133-145.
- [90]. Kearney, C. J.; Cullen, S. P.; Clancy, D.; Martin, S. J., RIPK1 can function as an inhibitor rather than an initiator of RIPK3-dependent necroptosis. *FEBS Journal* **2014**, *281*, (21), 4921-4934.
- [91]. Keller, N.; Ozmadenci, D.; Ichim, G.; Stupack, D., Caspase-8 function, and phosphorylation, in cell migration. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **2018**, *82*, 105-117.
- [92]. Eng, V. V.; Wemyss, M. A.; Pearson, J. S., The diverse roles of RIP kinases in host-pathogen interactions. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **2021**, *109*, 125-143.

- [93]. Paget, C.; Doz-Deblauwe, E.; Winter, N.; Briard, B., Specific NLRP3 inflammasome assembling and regulation in neutrophils: relevance in inflammatory and infectious diseases. *Cells* **2022**, *11*, (7), 1188.
- [94]. Speir, M.; Lawlor, K. E., RIP-roaring inflammation: RIPK1 and RIPK3 driven NLRP3 inflammasome activation and autoinflammatory disease. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **2021**, *109*, 114-124.
- [95]. Vince, J. E.; Silke, J., The intersection of cell death and inflammasome activation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2016**, *73*, (11-12), 2349-2367.
- [96]. Tunctan, B.; Uludag, O.; Altug, S.; Abacioglu, N., Effects of nitric oxide synthase inhibition in lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Pharmacological Research* **1998**, *38*, (5), 405-411.
- [97]. Tunctan, B.; Altug, S.; Uludag, O.; Abacioglu, N., Time-dependent variations in serum nitrite, 6-keto-prostaglandin F_{1α} and thromboxane B₂ levels induced by lipopolysaccharide in mice. *Biological Rhythm Research* **2000**, *31*, (4), 499-513.
- [98]. Tunctan, B.; Altug, S.; Uludag, O.; Demirkay, B.; Abacioglu, N., Effects of cyclooxygenase inhibitors on nitric oxide production and survival in a mice model of sepsis. *Pharmacological Research* **2003**, *48*, (1), 37-48.
- [99]. Tunctan, B.; Ozveren, E.; Korkmaz, B.; Buharalioglu, C. K., Tamer, L.; Degirmenci, U.; Atik, U., Nitric oxide reverses endotoxin-induced inflammatory hyperalgesia via inhibition of prostacyclin production in mice. *Pharmacological Research* **2006**, *53*, (2), 177-192.
- [100]. Buharalioglu, K.; Ozbasoglu, O.; Korkmaz, B.; Cuez, T.; Sahan-Firat, S.; Yalcin, A., Tunctan, B., Thalidomide potentiates analgesic effect of COX inhibitors on endotoxin-induced hyperalgesia by modulating TNF- α , PGE and NO synthesis in mice. *Federation of American Societies for Experimental Biology* **2009**, *23*, (1), 742.4.
- [101]. Dolunay, A.; Senol, S. P.; Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; Sari, A. N.; Sahan-Firat, S.; Tunctan, B., Inhibition of NLRP3 inflammasome prevents LPS-induced inflammatory hyperalgesia in mice: contribution of NF- κ B, caspase-1/11, ASC, NOX, and NOS isoforms. *Inflammation* **2017**, *40*, (2), 366-386.
- [102]. Bahceli, O.; Senol, S. P.; Temiz-Resitoglu, M.; Horat, M. F.; Sahan-Firat, S.; Tunctan, B., Bexarotene ameliorates LPS-induced hyperalgesia: contribution of TLR4/MyD88-dependent pro-inflammatory, anti-apoptotic, and anti-inflammatory signaling pathways. *International Journal of Pharmacology* **2022**, *18*, (6), 1171-1188.

- [103]. Senol, S. P.; Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; Sari, A. N.; Sahan-Firat, S.; Tunctan, B., Suppression of TLR4/MyD88/TAK1/NF- κ B/COX-2 signaling pathway in the central nervous system by bexarotene, a selective RXR agonist, prevents hyperalgesia in the lipopolysaccharide-induced pain mouse model. *Neurochemical Research* **2021**, 46, (3), 624-637.
- [104]. Cagli, A.; Senol, S. P.; Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; Sari, A. N.; Sahan-Firat, S.; Tunctan, B., Soluble epoxide hydrolase inhibitor trifluoromethoxyphenyl-3-(1-propionylpiperidin-4-yl)urea prevents hyperalgesia through regulating NLR4 inflammasome-related pro-inflammatory and anti-inflammatory signaling pathways in the lipopolysaccharide-induced pain mouse model. *Drug Development Research* **2021**, 82, (6), 815-825.
- [105]. Yılmaz, D. E. 2021. "Farelerde oluşturulan enflamatuvar hiperaljezi modelinde dokozahekzaenoik asidin TRAF6/IKK/NF- κ B yolu üzerindeki etkisinin antienflamatuvar NLRX1 ile ilişkilendirilerek araştırılması", Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Mersin.
- [106]. Özgen, B. 2022. "Farelerde Liposakkarit ile Oluşturulan Enflamatuvar Hiperaljezi Modelinde Piroptoz ve Nekroptoz İnhibitörü Nekrosülfonamidin Etkisinin Araştırılması", Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Mersin.
- [107]. <https://www.iasp-pain.org/resources/terminology> (13.01.2023).
- [108]. Raja, S. N.; Carr, D. B.; Cohen, M.; Finnerup, N. B.; Flor, H.; Gibson, S.; Keefe, F. J.; Mogil, J. S.; Ringkamp, M.; Sluka, K. A.; Song, X. J.; Stevens, B.; Sullivan, M. D.; Tutelman, P. R.; Ushida, T.; Vader, K., The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain* **2020**, 161, (9), 1976-1982.
- [109]. Xiao, X.; Ding, M.; Zhang, Y. Q., Role of the anterior cingulate cortex in translational pain research. *Neuroscience Bulletin* **2021**, 37, (3), 405-422.
- [110]. Ellison, D. L., Physiology of pain. *Critical Care Nursing Clinics of North America* **2017**, 29, (4), 397-406.
- [111]. Ignatavicius, D.; Workman, M. L., Assessment and Care of Patients with Pain. *Medical-Surgical Nursing: Patient-Centered Collaborative Care*. Elsevier: St. Louis, 2016.
- [112]. Patel, N. B., Physiology of pain from guide to pain management in low resources settings. *International Association for the Study of Pain* **2010**, 14-17.
- [113]. Dinakar, P.; Stillman, A. M., Pathogenesis of pain. *Seminars in Pediatric Neurology* **2016**, 23, (3), 201-208.
- [114]. Huether, S.; McCance, K., *Understanding Pathophysiology*. Mosby, 2016.

- [115]. Matsuda, M.; Huh, Y.; Ji, R. R., Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain. *Journal of Anesthesia* **2019**, *33*, (1), 131-139.
- [116]. McCleskey, E. W.; Gold, M. S., Ion channels of nociception. *Annual Review of Physiology* **1999**, *61*, 835.
- [117]. Amaya, F.; Izumi, Y.; Matsuda, M.; Sasaki, M., Tissue injury and related mediators of pain exacerbation. *Current Neuropharmacology* **2013**, *11*, 592-597.
- [118]. Gold, M. S.; Gebhart, G. F., Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nature Medicine* **2010**, *16*, 1248-1257.
- [119]. Ji, R. R.; Xu, Z. Z.; Gao, Y. J., Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nature Reviews Drug Discovery* **2014**, *13*, 533-548.
- [120]. Julius, D.; Basbaum, A. I., Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **2001**, *413*, 203-210.
- [121]. White, F. A.; Bhangoo, S. K.; Miller, R. J., Chemokines: integrators of pain and inflammation. *Nature Reviews Drug Discovery* **2005**, *4*, 834-844.
- [122]. Bautista, D. M.; Jordt, S. E.; Nikai, T.; Tsuruda, P. R.; Read, A. J.; Poblete, J.; Yamoah, E. N.; Basbaum, A. I.; Julius, D., TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* **2006**, *124*, 1269-1282.
- [123]. Moore, C.; Gupta, R.; Jordt, S. E.; Chen, Y.; Liedtke, W. B., Regulation of pain and itch by TRP channels. *Neuroscience Bulletin* **2018**, *34*, 120-142.
- [124]. Amaya, F.; Decosterd, I.; Samad, T. A.; Plumpton, C.; Tate, S.; Mannion, R. J.; Costigan, M.; Woolf, C. J., Diversity of expression of the sensory neuron-specific TTX-resistant voltage-gated sodium ion channels SNS and SNS2. *Molecular and Cellular Neuroscience* **2000**, *15*, 331-342.
- [125]. Waxman, S. G.; Dib-Hajj, S.; Cummins, T. R.; Black, J. A., Sodium channels and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 7635-7639.
- [126]. Eijkelkamp, N.; Linley, J. E.; Torres, J. M.; Bee, L.; Dickenson, A. H.; Gringhuis, M.; Minett, M. S.; Hong, G. S.; Lee, E.; Oh, U.; Ishikawa, Y.; Zwartkuis, F. J.; Cox, J. J.; Wood, J. N., A role for Piezo2 in EPAC1-dependent mechanical allodynia. *Nature Communications* **2013**, *4*, 1682.
- [127]. Aley, K. O.; Levine, J. D., Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. *Journal of Neuroscience* **1999**, *19*, 2181-2186.
- [128]. Gold, M. S.; Levine, J. D.; Correa, A. M., Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. *Journal of Neuroscience* **1998**, *18*, 10345-10355.

- [129]. Ji, R. R.; Gereau, R. W.; Malcangio, M.; Strichartz, G. R., MAP kinase and pain. *Brain Research Reviews* **2009**, 60, 135-148.
- [130]. Obata, K.; Noguchi, K., MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. *Life Sciences* **2004**, 74, 2643-2653.
- [131]. Coutaux, A.; Adam, F.; Willer, J. C.; Le Bars, D., Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine* **2005**, 72, (5), 359-371.
- [132]. Vasko, M. R. *Inflammatory Pain*. Springer: Berlin, Heidelberg, 2009.
- [133]. Wang, H.; Xu, C., A novel progress: glial cells and inflammatory pain. *ACS Chemical Neuroscience* **2022**, 13, (3), 288-295.
- [134]. Ji, R. R.; Berta, T.; Nedergaard, M., Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain* **2013**, 154, Suppl 1, (0 1), S10-S28.
- [135]. Stein, C.; Clark, J. D.; Oh, U.; Vasko, M. R.; Wilcox, G. L.; Overland, A. C.; Vanderah, T. W.; Spencer, R. H., Peripheral mechanisms of pain and analgesia. *Brain Research Reviews* **2009**, 60, (1), 90-113.
- [136]. Zhang, H.; Li, N.; Li, Z.; Li, Y.; Yu, Y.; Zhang, L., The involvement of caspases in neuroinflammation and neuronal apoptosis in chronic pain and potential therapeutic targets. *Frontiers in Pharmacology* **2022**, 13, 898574.
- [137]. Clark, A. K.; D'Aquisto, F.; Gentry, C.; Marchand, F.; McMahon, S. B.; Malcangio, M., Rapid co-release of interleukin 1beta and caspase 1 in spinal cord inflammation. *Journal of Neurochemistry* **2006**, 99, 868-880.
- [138]. Cunha, T. M.; Talbot, J.; Pinto, L. G.; Vieira, S. M.; Souza, G. R.; Guerrero, A. T.; Sonogo, F.; Verri, W. A.; Zamboni, D. S.; Ferreira, S. H.; Cunha, F. Q., Caspase-1 is involved in the genesis of inflammatory hypernociception by contributing to peripheral IL-1 β maturation. *Molecular Pain* **2010**, 6, 63.
- [139]. Gao, F.; Xiang, H. C.; Li, H. P.; Jia, M.; Pan, X. L.; Pan, H. L.; Li, M., Electroacupuncture inhibits NLRP3 inflammasome activation through CB2 receptors in inflammatory pain. *Brain, Behavior, and Immunity* **2018**, 67, 91-100.
- [140]. Hsieh, C. T.; Lee, Y. J.; Dai, X.; Ojeda, N. B.; Lee, H. J.; Tien, L. T.; Fan, L. W., Systemic Lipopolysaccharide-Induced Pain Sensitivity and Spinal Inflammation Were Reduced by Minocycline in Neonatal Rats. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, 19, (10), 2947.
- [141]. Lan, L.; Xu, M.; Li, J.; Liu, L.; Xu, M.; Zhou, C.; Shen, L.; Tang, Z.; Wan, F., Mas-related G protein-coupled receptor D participates in inflammatory pain by promoting NF- κ B activation through interaction with TAK1 and IKK complex. *Cellular Signaling* **2020**, 76, 109813.

- [142]. Ma, Z.; Huang, Z.; Zhang, L.; Li, X.; Xu, B.; Xiao, Y.; Shi, X.; Zhang, H.; Liao, T.; Wang, P., Vanillic acid reduces pain-related behavior in knee osteoarthritis rats through the inhibition of NLRP3 inflammasome-related synovitis. *Frontiers in Pharmacology* **2020**, *11*, 599022.
- [143]. Matsuoka, Y.; Yamashita, A.; Matsuda, M.; Kawai, K.; Sawa, T.; Amaya, F., NLRP2 inflammasome in dorsal root ganglion as a novel molecular platform that produces inflammatory pain hypersensitivity. *Pain* **2019**, *160*, 2149-2160.
- [144]. Yin, N.; Gao, Q.; Tao, W.; Chen, J.; Bi, J.; Ding, F.; Wang, Z., Paeoniflorin relieves LPS-induced inflammatory pain in mice by inhibiting NLRP3 inflammasome activation via transient receptor potential vanilloid 1. *Journal of Leukocyte Biology* **2020**, *108*, (1), 229-241.
- [145]. Benke, D., GABAB receptors and pain. *Current Topics in Behavioral Neurosciences* **2022**, *52*, 213-239.
- [146]. Chopade, A. R.; Mulla, W. A., Novel strategies for the treatment of inflammatory hyperalgesia. *European Journal of Clinical Pharmacology* **2010**, *66*, (5), 429-444.
- [147]. Cioffi, C. L., Inhibition of glycine re-uptake: a potential approach for treating pain by augmenting glycine-mediated spinal neurotransmission and blunting central nociceptive signaling. *Biomolecules* **2021**, *11*, (6), 864.
- [148]. Gerum, M.; Simonin, F., Behavioral characterization, potential clinical relevance and mechanisms of latent pain sensitization. *Pharmacology and Therapeutics* **2022**, *233*, 108032.
- [149]. Jogpal, V.; Sanduja, M.; Dutt, R.; Garg, V.; Tinku, Advancement of nanomedicines in chronic inflammatory disorders. *Inflammopharmacology* **2022**, *30*, (2), 355-368.
- [150]. Varrassi, G.; Alon, E.; Bagnasco, M.; Lanata, L.; Mayoral-Rojals, V.; Paladini, A.; Pergolizzi, J. V.; Perrot, S.; Scarpignato, C.; Tölle, T., Towards an effective and safe treatment of inflammatory pain: a Delphi-guided expert consensus. *Advances in Therapy* **2019**, *36*, (10), 2618-2637.
- [151]. He, S.; Wang, X., RIP kinases as modulators of inflammation and immunity. *Nature Immunology* **2018**, *19*, 912-922.
- [152]. Tigno-Aranjuez, J. T.; Asara, J. M.; Abbott, D. W., Inhibition of RIP2's tyrosine kinase activity limits NOD2-driven cytokine responses. *Genes and Development* **2010**, *24*, 2666-2677.
- [153]. Vanden Berghe, T.; Grootjans, S.; Goossens, V.; Dondelinger, Y.; Krysko, D. V.; Takahashi, N.; Vandenabeele, P., Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods* **2013**, *61*, (2), 117-129.
- [154]. Zhou, W.; Yuan, J., Necroptosis in health and diseases. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **2014**, *35*, 14-23.

- [155]. Amin, P.; Florez, M.; Najafov, A.; Pan, H.; Geng, J.; Ofengeim, D.; Dziedzic, S. A.; Wang, H.; Barrett, V. J.; Ito, Y.; LaVoie, M. J.; Yuan, J., Regulation of a distinct activated RIPK1 intermediate bridging complex I and complex II in TNF α -mediated apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2018**, 115, (26), E5944-E5953.
- [156]. Micheau, O.; Tschopp J., Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **2003**, 114, (2), 181-190.
- [157]. Akira, S.; Hoshino, K., Myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent pathways in toll-like receptor signaling. *Journal of Infectious Diseases* **2003**, 187, (Suppl. 2), S356-S363.
- [158]. Kagan, J. C.; Su, T.; Horng, T.; Chow, A.; Akira, S.; Medzhitov, R., TRAM couples endocytosis of toll-like receptor 4 to the induction of interferon- β . *Nature Immunology* **2008**, 9, (4), 361-368.
- [159]. Agnew, A.; Nulty, C.; Creagh, E. M., Regulation, activation and function of caspase-11 during health and disease. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22, (4), 1506.
- [160]. Bibo-Verdugo, B.; Salvesen, G. S., Caspase mechanisms in the regulation of inflammation. *Molecular Aspects of Medicine* **2022**, 88, 101085.
- [161]. Bolívar, B. E.; Vogel, T. P.; Bouchier-Hayes, L., Inflammatory caspase regulation: maintaining balance between inflammation and cell death in health and disease. *FEBS Journal* **2019**, 286, (14), 2628-2644.
- [162]. Huang, X.; Feng, Y.; Xiong, G.; Whyte, S.; Duan, J.; Yang, Y.; Wang, K.; Yang, S.; Geng, Y.; Ou, Y.; Chen, D., Caspase-11, a specific sensor for intracellular lipopolysaccharide recognition, mediates the non-canonical inflammatory pathway of pyroptosis. *Cell Bioscience* **2019**, 9, 31.
- [163]. Ross, C.; Chan, A. H.; von Pein, J. B.; Maddugoda, M. P.; Boucher, D.; Schroder, K., Inflammatory caspases: toward a unified model for caspase activation by inflammasomes. *Annual Review of Immunology* **2022**, 40, 249-269.
- [164]. Shalini, S.; Dorstyn, L.; Dawar, S.; Kumar, S., Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death and Differentiation* **2015**, 22, (4), 526-539.
- [165]. Uchiyama, R.; Tsutsui, H., Caspases as the key effectors of inflammatory responses against bacterial infection. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* **2015**, 63, (1), 1-13.
- [166]. Viganò, E.; Mortellaro, A., Caspase-11: the driving factor for noncanonical inflammasomes. *European Journal of Immunology* **2013**, 43, (9), 2240-2245.
- [167]. Yi, Y. S., Dual roles of the caspase-11 non-canonical inflammasome in inflammatory bowel disease. *International Immunopharmacology* **2022**, 108, 108739.

- [168]. Wang, S.; Miura, M.; Jung, Y.; Zhu, H.; Gagliardini, V., Shi, L.; Greenberg, A. H.; Yuan, J., Identification and characterization of Ich-3, a member of the interleukin-1beta converting enzyme (ICE)/Ced-3 family and an upstream regulator of ICE. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271, 20580-20587.
- [169]. Yi, Y. S., Regulatory roles of caspase-11 non-canonical inflammasome in inflammatory liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, 23, (9), 4986.
- [170]. Lin, X. Y.; Choi, M. S., Porter, A. G., Expression analysis of the human caspase-1 subfamily reveals specific regulation of the CASP5 gene by lipopolysaccharide and interferon-gamma. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275, 39920-39926.
- [171]. Bourdonnay, E.; Henry, T., Transcriptional and epigenetic regulation of gasdermins. *Journal of Molecular Biology* **2022**, 434, (4), 167253.
- [172]. Burdette, B. E.; Esparza, A. N.; Zhu, H.; Wang, S., Gasdermin D in pyroptosis. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2021**, 11, (9), 2768-2782.
- [173]. Cao, A.; Kagan, J. C., Gasdermin pore forming activities that promote inflammation from living and dead cells. *Journal of Molecular Biology* **2022**, 434, (4), 167427.
- [174]. Hu, Y.; Wang, B.; Li, S.; Yang, S., Pyroptosis, and its role in central nervous system disease. *Journal of Molecular Biology* **2022**, 434, (4), 167379.
- [175]. Jain, K.; Barve, K.; Bhatt, L. K., Gasdermins: pore forming proteins as a potential therapeutic target. *Current Protein and Peptide Science* **2022**, 23, (3), 133-151.
- [176]. Liang, F.; Qin, W.; Zeng, Y.; Wang, D., Modulation of autoimmune and autoinflammatory diseases by gasdermins. *Frontiers in Immunology* **2022**, 13, 841729.
- [177]. Liu, Z.; Busscher, B. M.; Storl-Desmond, M.; Xiao, T. S., Mechanisms of gasdermin recognition by proteases. *Journal of Molecular Biology* **2022**, 434, (4), 167274.
- [178]. Ryder, C. B.; Kondolf, H. C.; O'Keefe, M. E.; Zhou, B.; Abbott, D. W., Chemical modulation of gasdermin-mediated pyroptosis and therapeutic potential. *Journal of Molecular Biology* **2022**, 434, (4), 167183.
- [179]. You, R.; He, X.; Zeng, Z.; Zhan, Y.; Xiao, Y.; Xiao, R., Pyroptosis and its role in autoimmune disease: a potential therapeutic target. *Frontiers in Immunology* **2022**, 13, 841732.
- [180]. Aglietti, R. A.; Estevez, A.; Gupta, A.; Ramirez, M. G.; Liu, P. S.; Kayagaki, N.; Ciferri, C.; Dixit, V. M.; Dueber, E. C., GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2016**, 113, 7858e63.

- [181]. de Vasconcelos, N. M.; van Opdenbosch, N.; van Gorp, H.; Parthoens, E.; Lamkanfi, M., Single-cell analysis of pyroptosis dynamics reveals conserved GSDMD-mediated subcellular events that precede plasma membrane rupture. *Cell Death and Differentiation* **2019**, *26*, 146e61.
- [182]. Wu, C.; Lu, W.; Zhang, Y.; Zhang, G.; Shi, X.; Hisada, Y.; Grover, S. P.; Zhang, X.; Li, L.; Xiang, B.; Shi, J.; Li, X. A.; Daugherty, A.; Smyth, S. S.; Kirchhofer, D.; Shiroishi, T.; Shao, F.; Mackman, N.; Wei, Y.; Li, Z., Inflammasome activation triggers blood clotting and host death through pyroptosis. *Immunity* **2019**, *50*, 1401e11.
- [183]. Evavold, C. L.; Ruan, J.; Tan, Y.; Xia, S.; Wu, H.; Kagan, J. C., The poreforming protein gasdermin D regulates interleukin-1 secretion from living macrophages. *Immunity* **2018**, *48*, 35e44.
- [184]. Heilig, R.; Dick, M. S.; Sborgi, L.; Meunier, E.; Hiller, S.; Broz, P., The gasdermin-D pore acts as a conduit for IL-1 β secretion in mice. *European Journal of Immunology* **2018**, *48*, 584-592.
- [185]. Liu, J.; Fan, G.; Tao, N.; Sun, T., Role of pyroptosis in respiratory diseases and its therapeutic potential. *Journal of Inflammation Research* **2022**, *15*, 2033-2050.
- [186]. Xiao, J.; Wang, C.; Yao, J. C.; Alippe, Y.; Xu, C.; Kress, D.; Civitelli, R.; Abu-Amer, Y.; Kanneganti, T. D.; Link, D. C.; Mbalaviele, G., Gasdermin D mediates the pathogenesis of neonatal-onset multisystem inflammatory disease in mice. *PLOS Biology* **2018**, *16*, e3000047.
- [187]. Weir, A.; Vince, J. E., No longer married to inflammasome signaling: the diverse interacting pathways leading to pyroptotic cell death. *Biochemical Journal* **2022**, *479*, (10), 1083-1102.
- [188]. Abu Khweek, A.; Amer, A. O., Pyroptotic and non-pyroptotic effector functions of caspase-11. *Immunological Reviews* **2020**, *297*, (1), 39-52.
- [189]. Bezbradica, J. S.; Coll, R. C.; Boucher, D., Activation of the non-canonical inflammasome in mouse and human cells. *Methods in Molecular Biology* **2022**, *2459*, 51-63.
- [190]. Lacey, C. A.; Miao, E. A., Programmed cell death in the evolutionary race against bacterial virulence factors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2020**, *12*, (2), a036459.
- [191]. Rathkey, J. K.; Zhao, J.; Liu, Z.; Chen, Y.; Yang, J.; Kondolf, H. C.; Benson, B. L.; Chirieleison, S. M.; Huang, A. Y.; Dubyak, G. R.; Xiao, T. S.; Li, X.; Abbott, D. W., Chemical disruption of the pyroptotic pore-forming protein gasdermin D inhibits inflammatory cell death and sepsis. *Science Immunology* **2018**, *3*, (26), eaat2738.
- [192]. Shi, J.; Zhao, Y.; Wang, K.; Shi, X.; Wang, Y.; Huang, H.; Zhuang, Y.; Cai, T.; Wang, F.; Shao, F., Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* **2015**, *526*, (7575), 660-665.

- [193]. Wright, S. S.; Vasudevan, S. O.; Rathinam, V. A., Mechanisms and consequences of noncanonical inflammasome-mediated pyroptosis. *Journal of Molecular Biology* **2022**, 434, (4), 167245.
- [194]. Wu, J.; Sun, J.; Meng, X., Pyroptosis by caspase-11 inflammasome-gasdermin D pathway in autoimmune diseases. *Pharmacological Research* **2021**, 165, 105408.
- [195]. Ross, C.; Chan, A. H.; Von Pein, J.; Boucher, D.; Schroder, K., Dimerization and auto-processing induce caspase-11 protease activation within the non-canonical inflammasome. *Life Science Alliance* **2018**, 1, e201800237.
- [196]. Deng, M.; Tang, Y.; Li, W.; Wang, X.; Zhang, R.; Zhang, X.; Zhao, X.; Liu, J.; Tang C., Liu Z.; Huang, Y.; Peng, H.; Xiao, L.; Tang, D.; Scott, M. J.; Wang, Q.; Liu, J.; Xiao, X.; Watkins, S.; Li, J.; Yang, H.; Wang, H.; Chen, F.; Tracey, K. J.; Billiar, T. R.; Lu, B., The endotoxin delivery protein HMGB1 mediates caspase-11-dependent lethality in sepsis. *Immunity* **2018**, 49, 740-753.e7.
- [197]. Chen, R.; Zeng, L.; Zhu, S.; Liu, J.; Zeh, H. J.; Kroemer, G.; Wang, H.; Billiar, T. R.; Jiang, J.; Tang, D.; Kang, R., cAMP metabolism controls caspase-11 inflammasome activation and pyroptosis in sepsis. *Science Advances* **2019**, 5, eaav5562.
- [198]. Chu, L. H.; Indramohan, M.; Ratsimandresy, R. A.; Gangopadhyay, A.; Morris, E. P.; Monack, D. M.; Dorfleutner, A.; Stehlik, C., The oxidized phospholipid oxPAPC protects from septic shock by targeting the non-canonical inflammasome in macrophages. *Nature Communications* **2018**, 9, 996.
- [199]. Li, W.; Zhang, W.; Deng, M.; Loughran, P.; Tang, Y.; Liao, H.; Zhang, X.; Liu, J.; Billiar, T. R.; Lu, B., Stearoyl lysophosphatidylcholine inhibits endotoxin-induced caspase-11 activation. *Shock* **2018**, 50, 339-345.
- [200]. Zanoni, I.; Tan, Y.; Di Gioia, M.; Broggi, A.; Ruan, J.; Shi, J.; Donado, C. A.; Shao, F.; Wu, H.; Springstead, J. R.; Kagan, J. C., An endogenous caspase-11 ligand elicits interleukin-1 release from living dendritic cells. *Science* **2016**, 352, 1232-1236.
- [201]. Rühl, S.; Broz, P., Regulation of lytic and non-lytic functions of gasdermin pores. *Journal of Molecular Biology* **2022**, 434, (4), 167246.
- [202]. Al Mamun, A.; Wu, Y.; Monalisa, I.; Jia, C.; Zhou, K.; Munir, F.; Xiao, J., Role of pyroptosis in spinal cord injury and its therapeutic implications. *Journal of Advanced Research* **2021**, 28, 97-109.
- [203]. Cheng, K. T.; Xiong, S.; Ye, Z.; Hong, Z.; Di, A.; Tsang, K. M.; Gao, X.; An, S.; Mittal, M.; Vogel, S. M.; Miao, E. A.; Rehman, J.; Malik, A. B., Caspase-11-mediated endothelial pyroptosis underlies endotoxemia-induced lung injury. *Journal of Clinical Investigation* **2017**, 127, (11), 4124-4135.

- [204]. Wu, Y.; Pan, B.; Zhang, Z.; Li, X.; Leng, Y.; Ji, Y.; Sun, K.; Chen, A. F., Caspase-4/11-mediated pulmonary artery endothelial cell pyroptosis contributes to pulmonary arterial hypertension. *Hypertension* **2022**, 79, (3), 536-548.
- [205]. Zeng, C.; Wang, R.; Tan, H., Role of pyroptosis in cardiovascular diseases and its therapeutic implications. *International Journal of Biological Sciences* **2019**, 15, (7), 1345-1357.
- [206]. Fard, D.; Tamagnone, L., Semaphorins in health and disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews* **2020**, 57, 55-63.
- [207]. Goodman, C.; Kolodkin, A.; Luo, Y.; Püschel, A.; Raper, J., Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. *Cell* **1999**, 97, 551-552.
- [208]. Kolodkin, A. L.; Matthes, D. J.; Goodman, C. S., The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* **1993**, 75, 1389-1399.
- [209]. Nishide, M.; Kumanogoh, A., The role of semaphorins in immune responses and autoimmune rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology* **2017**, 14, 19-31.
- [210]. Lotfi, R.; Nasiri Kalmarzi, R.; Rajabinejad, M.; Hasani, S.; Zamani, F., The role of immune semaphorins in the pathogenesis of multiple sclerosis: potential therapeutic targets. *International Immunopharmacology* **2021**, 95, 107556.
- [211]. Lotfi, R.; Zamanimehr, N., Semaphorin-3A: a promising therapeutic tool in allergic rhinitis. *Immunological Research* **2022**, 70, (2), 135-142.
- [212]. Eixarch, H.; Gutiérrez-Franco, A.; Montalban, X.; Espejo, C., Semaphorins 3A and 7A: potential immune and neuroregenerative targets in multiple sclerosis. *Trends in Molecular Medicine* **2013**, 19, 157-164.
- [213]. Piaton, G.; Aigrot, M. S.; Williams, A.; Moyon, S.; Tepavcevic, V.; Moutkine, I.; Gras, J.; Matho, K. S.; Schmitt, A.; Soellner, H.; Huber, A. B.; Ravassard, P.; Lubetzki, C., Class 3 semaphorins influence oligodendrocyte precursor recruitment and remyelination in adult central nervous system. *Brain* **2011**, 134, 1156-1167.
- [214]. Syed, Y. A.; Hand, E.; Mobius, W.; Zhao, C.; Hofer, M.; Nave, K. A.; Kotter, M. R., Inhibition of CNS remyelination by the presence of semaphorin 3A. *Journal of Neuroscience* **2011**, 31, 3719-3728.
- [215]. Yamamoto, M.; Suzuki, K.; Okuno, T.; Ogata, T.; Takegahara, N.; Takamatsu, H.; Mizui, M.; Taniguchi, M.; Chédotal, A.; Suto, F., Plexin-A4 negatively regulates T lymphocyte responses. *International Immunology* **2008**, 20, 413-420.
- [216]. Okuno, T.; Nakatsuji, Y.; Kumanogoh, A., The role of immune semaphorins in multiple sclerosis. *FEBS Letters* **2011**, 585, (23), 3829-3835.

- [217]. Williams, A.; Piaton, G.; Aigrot, M. S.; Belhadi, A.; Th'éaudin, M.; Petermann, F.; Thomas, J. L.; Zalc, B.; Lubetzki, C., Semaphorin 3A and 3F: key players in myelin repair in multiple sclerosis? *Brain* **2007**, 130, 2554-2565.
- [218]. Gutierrez-Franco, A.; Costa, C.; Eixarch, H.; Castillo, M.; Medina-Rodriguez, E. M.; Bribian, A.; de Castro, F.; Montalban, X.; Espejo, C., Differential expression of sema3A and sema7A in a murine model of multiple sclerosis: implications for a therapeutic design. *Clinical Immunology* **2016**, 163, 22-33.
- [219]. Mecollari, V.; Nieuwenhuis, B.; Verhaagen, J., A perspective on the role of class III semaphorin signaling in central nervous system trauma. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **2014**, 8, 328.
- [220]. Adi, S. D.; Eiza, N.; Bejar, J.; Shefer, H.; Toledano, S.; Kessler, O.; Neufeld, G.; Toubi, E.; Vadasz, Z., Semaphorin 3A is effective in reducing both inflammation and angiogenesis in a mouse model of bronchial asthma. *Frontiers in Immunology* **2019**, 10, 550.
- [221]. Ji, J. D.; Park-Min, K. H.; Ivashkiv, L. B., Expression and function of semaphorin 3A and its receptors in human monocyte-derived macrophages. *Human Immunology* **2009**, 70, 211-217.
- [222]. Liu, L. N.; Li, X. M.; Ye, D. Q.; Pan, H. F., Emerging role of semaphorin-3A in autoimmune diseases. *Inflammopharmacology* **2018**, 26, 655-665.
- [223]. Nasiri Kalmarzi, R.; Rajabinejad, M.; Lotfi, R., Immune semaphorins: crucial regulatory signals and novel therapeutic targets in asthma and allergic diseases. *European Journal of Pharmacology* **2020**, 881, 173209.
- [224]. Carulli, D.; de Winter, F.; Verhaagen, J., Semaphorins in adult nervous system plasticity and disease. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* **2021**, 13, 672891.
- [225]. Zheng, Y.; Jiang, F.; Wang, C.; Dong, M.; Wang, C.; Yan, E.; Wang, Y.; Zhu, Z.; Xiong, X.; Ding, X.; Ye, J.; He, Y.; Zhang, H.; Zhou, J.; Zhang, W.; Wu, Y.; Song, X., Regulation of semaphorin3A in the process of cutaneous wound healing. *Cell Death and Differentiation* **2022**, 29, (10), 1941-1954.
- [226]. Min, Y.; Kristiansen, K.; Boggs, J. M.; Husted, C.; Zasadzinski, J. A.; Israelachvili, J., Interaction forces and adhesion of supported myelin lipid bilayers modulated by myelin basic protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, 106, (9), 3154-3159.
- [227]. Mattei, M. G.; Alliel, P. M.; Dautigny, A. E. P.; Pham-Dinh, D.; Mattei, J. F.; Jolles, P., The gene encoding for the major brain proteolipid (PLP) maps on the q-22 band of the human X chromosome. *Human Genetics* **1986**, 72, 352-353.

- [228]. Willard, H. F.; Riordan, J. R., Assignment of the gene for myelin proteolipid protein to the X chromosome: implications for X-linked myelin disorders. *Science* **1985**, 230, 940-942.
- [229]. Nave, K. A.; Lai, C.; Bloom, F. E.; Milner, R. J., Splice site selection in the proteolipid protein (PLP) gene transcript and primary structure of the DM-20 protein of central nervous system myelin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, 84, 5665-5669.
- [230]. Jacobs, E. C.; Bongarzone, E. R.; Campagnoni, C. W.; Kampf, K.; Campagnoni, A. T., Soma-restricted products of the myelin proteolipid gene are expressed primarily in neurons in the developing mouse nervous system. *Developmental Neuroscience* **2003**, 25, (2-4), 96-104.
- [231]. Folch, J.; Lees M. Proteolipids, a new type of tissue lipoproteins; their isolation from brain. *Journal of Biological Chemistry* **1951**, 191, 807-817.
- [232]. Pham-Dinh, D.; Birling, M. C.; Roussel, G.; Dautigny, A., Nussbaum, J. L., Proteolipid DM-20 predominates over PLP in peripheral nervous system. *Neuroreport* **1991**, 2, 89-92.
- [233]. Kamholz, J.; Sessa, M.; Scherer, S.; Vogelbacker, H.; Mokuno, K.; Baron P., Wrabetz, L.; Shy, M.; Pleasure, D., Structure and expression of proteolipid protein in the peripheral nervous system. *Journal of Neuroscience Research* **1992**, 31, 231-244.
- [234]. Griffiths, I. R.; Dickinson, P.; Montague, P., Expression of the proteolipid protein gene in glial cells of the postnatal peripheral nervous system of rodents. *Neuropathology and Applied Neurobiology* **1995**, 21, 97-110.
- [235]. Griffiths, I. R.; Mitchell, L. S.; McPhilemy, K.; Morrison, S.; Kyriakides, E.; Barrie, J. A., Expression of myelin protein genes in Schwann cells. *Journal of Neurocytology* **1989**, 18, 345-352.
- [236]. Puckett, C.; Hudson, L.; Ono, K.; Friedrich, V.; Benecke, J.; Dubois-Dalcq, M.; Lazzarini, R. A., Myelin-specific proteolipid protein is expressed in myelinating Schwann cells but is not incorporated into myelin sheaths. *Journal of Neuroscience Research* **1987**, 18, 511-518.
- [237]. Bongarzone, E. R.; Campagnoni, C. W.; Kampf, K.; Jacobs, E. C.; Handley, V. W.; Schonmann, V. Campagnoni, A. T., Identification of a new exon in the myelin proteolipid protein gene encoding novel protein isoforms that are restricted to the somata of oligodendrocytes and neurons. *Journal of Neuroscience* **1999**, 19, 8349-8357.
- [238]. Miller, M. J.; Haxhiu, M. A.; Georgiadis, P.; Gudz, T. I.; Kangas, C. D.; Macklin, W. B., Proteolipid protein gene mutation induces altered ventilatory response to hypoxia in the myelin-deficient rat. *Journal of Neuroscience* **2003**, 23, 2265-2273.

- [239]. Pribyl, T. M.; Campagnoni, C. W.; Kampf, K.; Kashima, T.; Handley, V. W.; McMahon, J.; Campagnoni, A. T., Expression of the myelin proteolipid protein gene in the human fetal thymus. *Journal of Neuroimmunology* **1996**, 67, 125-130.
- [240]. Pribyl, T. M.; Campagnoni, C.; Kampf, K.; Handley, V. W.; Campagnoni, A. T., The major myelin protein genes are expressed in the human thymus. *Journal of Neuroscience Research* **1996**, 45, 812-819.
- [241]. Dickinson, P. J.; Griffiths, I. R.; Barrie, J. M.; Kyriakides, E.; Pollock, G. F.; Barnett, S. C., Expression of the dm-20 isoform of the plp gene in olfactory nerve ensheathing cells: evidence from developmental studies. *Journal of Neurocytology* **1997**, 26, 181-189.
- [242]. Campagnoni, C. W.; Garbay, B.; Micevych, P.; Pribyl, T.; Kampf, K.; Handley, V. W.; Campagnoni, A. T., DM-20 mRNA splice product of the myelin proteolipid protein gene is expressed in the murine heart. *Journal of Neuroscience Research* **1992**, 33, 148-155.
- [243]. Ishii, T.; Ohsugi, K.; Nakamura, S.; Sato, K.; Hashimoto, M.; Mikoshiba, K.; Sakuragawa, N., Gene expression of oligodendrocyte markers in human amniotic epithelial cells using neural cell-type-specific expression system. *Neuroscience Letters* **1999**, 268, 131-134.
- [244]. Li, S.; Moore, C. L.; Dobretsova, A.; Wight, P. A., Myelin proteolipid protein (Plp) intron 1 DNA is required to temporally regulate Plp gene expression in the brain. *Journal of Neurochemistry* **2002**, 83, 193-201.
- [245]. Bogazzi, F.; Hudson, L. D.; Nikodem, V. M., A novel heterodimerization partner for thyroid hormone receptor. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269, 11683-11686.
- [246]. Lee, J.; Wu, Y.; Qi, Y.; Xue, H.; Liu, Y.; Scheel, D.; German, M.; Qiu, M.; Guillemot, F.; Rao, M.; Gradwohl, G., Neurogenin3 participates in gliogenesis in the developing vertebrate spinal cord. *Developmental Biology* **2003**, 253, 84-98.
- [247]. Qi, Y.; Cai, J.; Wu, Y.; Wu, R.; Lee, J.; Fu, H.; Rao, M.; Sussel, L.; Rubenstein, J.; Qiu, M., Control of oligodendrocyte differentiation by the Nkx2.2 homeodomain transcription factor. *Development* **2001**, 128, 2723-2733.
- [248]. Greer, J. M.; Pender, M. P., Myelin proteolipid protein: an effective autoantigen and target of autoimmunity in multiple sclerosis. *Journal of Autoimmunity* **2008**, 31, (3), 281-287.
- [249]. Koukoulitsa, C.; Chontzopoulou, E.; Kiriakidi, S.; Tzakos, A. G.; Mavromoustakos, T., A journey to the conformational analysis of T-cell epitope peptides involved in multiple sclerosis. *Brain Sciences* **2020**, 10, (6), 356.
- [250]. Singh, R.; Samanta, D., Pelizaeus-Merzbacher disease. **2022**, Feb 4. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-.

- [251]. Wight, P. A.; Dobretsova, A., Where, when and how much: regulation of myelin proteolipid protein gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2004**, 61, (7-8), 810-821.
- [252]. Barrot, M., Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience* **2012**, 211, 39-50.
- [253]. Gregory, N. S.; Harris, A. L.; Robinson, C. R.; Dougherty, P. M.; Fuchs, P. N.; Sluka, K. A., An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *Journal of Pain* **2013**, 14, (11), 1255-1269.
- [254]. Turner, R. A., Analgesics. *Screening Methods in Pharmacology*. Academic Press: New York, 1965.
- [255]. Tunctan, B.; Korkmaz, B.; Yildirim, H.; Tamer, L.; Atik, U.; Buharalioglu, C.K., Increased production of nitric oxide contributes to renal oxidative stress in endotoxemic rat. *American Journal of Infectious Diseases* **2005**, 1, (2), 111-115.
- [256]. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, 72, 248-254.
- [257]. Horat, M. F. 2022. "Farelerde oluşturulan kronik deneysel otoimmün ensefalomyelit modelinde çözünebilir epoksit hidrolaz inhibisyonunun GPR75/FLC/PI3K/Akt1'e bağımlı antiapoptotik sinyal ileti yolu üzerindeki etkisinin araştırılması", Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Mersin.
- [258]. Wilson, C. M., Staining of proteins on gels: comparison of dyes and procedures. *Methods in Enzymology* **1983**, 91, 236-247.
- [259]. Salinovich, O.; Montelano, R. C., Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **1986**, 156, (2), 341-347.
- [260]. Thadathil, N.; Nicklas, E. H.; Mohammed, S.; Lewis, T. L.; Richardson, A.; Deepa, S. S., Necroptosis increases with age in the brain and contributes to age-related neuroinflammation. *Geroscience* **2021**, 43, (5), 2345-2361.
- [261]. Tanaka, J.; Seki, Y.; Ishikura, H.; Tsubota, M.; Sekiguchi, F.; Yamaguchi, K.; Murai, A.; Umemura, T.; Kawabata, A., Recombinant human soluble thrombomodulin prevents peripheral HMGB1-dependent hyperalgesia in rats. *British Journal of Pharmacology* **2013**, 170, (6), 1233-1241.

EKLER

Etik Kurul Onay Belgesi









ÖZ GEÇMİŞ





