



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**β2-ADRENOSEPTÖR AGONİSTİ
FORMOTEROL'ÜN N9 FARE MİKROGLİAL
HÜCRELERİNDE NLRP3 İNFLAMAZOMUNUN
AKTİVASYONU VE PİROPTOZ ÜZERİNE
ETKİSİ**

Mehmet ERDEM

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

TRABZON-2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

06.03.2024

Arş. Gör. Mehmet ERDEM

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi birikimi ve tecrübesi ile bana yeni ufuklar açan ve beni aldığım kararlarda cesaretlendiren; tez çalışmamın her aşamasında göstermiş olduğu hoşgörü ve desteğinden dolayı değerli danışman hocam Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN'a,

Akademik açıdan yetişmemde büyük katkıları olan Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. Birgül VANİZOR KURAL, Prof. Dr. Ahmet ALVER, Prof. Dr. Ahmet MENTEŞE, Dr. Öğr. Üyesi Fulya BALABAN YÜCESAN ve Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin YAMAN'a,

Akademik ve bilimsel anlamdaki deneyimlerini benimle her daim paylaşan, her türlü süreçte yol gösteren ve yanımda olan Doç. Dr. Tuğba Raika KIRAN, Dr. Öğr. Üyesi Önder OTLU, Doç. Dr. Selim DEMİR ve Dr. Serap ÖZER YAMAN'a,

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde büyük katkıları olan ve laboratuvarını bana açan İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi Nörodejenerasyon ve Nöroproteksiyon Laboratuvarı araştırma grup lideri Prof. Dr. Şermin GENÇ ve eski laboratuvar üyeleri Bora ve Nilsu TAŞTAN'a,

Tez çalışmam süresince katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. Ersan KALAY, Doç. Dr. Tuba DİNÇER, Dr. Öğr. Üyesi Gökhan YILDIZ, Doç. Dr. Selcen ÇELİK UZUNER ve yüksek lisans öğrencisi Soner KARABULUT'a,

Laboratuvarında geçirdiğim üç yoğun ve mükemmel ayda, akademik ve insani açıdan harika deneyimler kazanmama vesile olan Prof. Dr. Eva BARTOK'a,

Bu günlere gelmemde her türlü fedakarlığı yapan ve bana inanan başta rahmetli babam Temel ERDEM olmak üzere, annem Yıldız ERDEM, ablam Leyla UZUN ve kardeşim Samet ERDEM'e,

Yüksek lisans tezimde “çok kıymetli arkadaşım” olarak teşekkür ettiğim, sonrasında hayatımı birleştirdiğim ve her yönüyle hayatıma anlam katan çok değerli eşim Arş. Gör. Şeniz ERDEM'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Arş. Gör. Mehmet ERDEM

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin TDK-2022-10126 No'lu projesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

ONAY

BEYAN

İthaf

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

TABLolar DİZİNİ

ix

ŞEKİLLER DİZİNİ

x

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

xi

ÖZET

xv

ABSTRACT

xvi

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

3

2.1. Mikroglia

3

2.1.1. Mikroglia'nın Tarihçesi ve Kökeni

3

2.1.2. Mikroglia'nın Fenotipleri

4

2.1.3. Mikroglia'nın Fonksiyonları

5

2.1.4. Nörodejeneratif Hastalıklarda Mikroglia

5

2.2. İnflamazomlar

6

2.2.1. Bağışıklık Sistemi ve İnflamasyon

6

2.2.2. İnflamazom

7

2.2.3. NLRP3 İnflamazomu

7

2.2.4. NLRP3 İnflamazom Aktivasyonu ve Aktivatörleri

9

2.3. Piroptoz: İnflamasyonun Ana Düzenleyicisi

11

2.3.1. Hücre Ölümü

11

2.3.2. Piroptoz

12

2.4. NLRP3 İnflamazomunun Nörodejeneratif Hastalıklar ve Mikroglia ile İlişkisi

14

2.4.1. Nörodejeneratif Hastalıklarda NLRP3 İnflamazomu

14

2.4.2. Mikroglia'da NLRP3 İnflamazomu

15

2.5. Adrenoseptörler, Çeşitleri, Agonistleri, Nörokoruyucu Etkileri ve Formoterol

16

2.5.1. Adrenoseptörler	16
2.5.2. β 2-Adrenoseptör	17
2.5.3. β 2-Adrenoseptör Agonistleri	18
2.5.4. β 2-Adrenoseptör Agonistlerinin Nörokoruyucu Etkileri	18
2.5.5. Formoterol ($C_{19}H_{24}N_2O_4$)	19
2.6. Western Blot	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM	22
3.1. Gereç	22
3.1.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Sarf Malzemeler	22
3.1.2. Kullanılan Ticari Kitler, Antikorlar ve Kimyasallar	24
3.2. Yöntem	26
3.2.1. Hücrelerin Temin Edilmesi, Çalışmaların Gerçekleştirileceği Yer, Sterilizasyon ve Hücre Kültürü	26
3.2.2. Formoterol'ün Efektif Dozunun Bulunması	28
3.2.2.1. Hücre Canlılığının Belirlenmesi	28
3.2.2.2. Sitotoksitenin Belirlenmesi	29
3.2.2.3. IL-1 β Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi	31
3.2.3. Formoterol'ün NLRP3 İnflamazomu ve Piroptoz Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	34
3.2.3.1. Piroptotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi	36
3.2.3.2. Aktif Kaspaz-1 Aracılı Piroptozun Belirlenmesi	37
3.2.3.3. Propidyum İyodür Boyama ile Piroptozun Belirlenmesi	39
3.2.3.4. IL-1 β ve IL-18 Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi	40
3.2.3.5. NLRP3 İnflamazom Yolu ile İlişkili Protein Seviyelerinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi	44
3.3 İstatistiksel Analiz	51
4. BULGULAR	52
4.1. Formoterol'ün Efektif Dozunun Belirlenmesi Deneyi Sonuçları	52
4.2. Formoterol'ün NLRP3 İnflamazomu ve Piroptoz Üzerine Etkilerinin Analiz Sonuçları	54
4.2.1. Piroptotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi Analiz Sonuçları	54
4.2.2. Aktif Kaspaz-1 Aracılı Piroptotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi Analiz Sonuçları	56

4.2.3. PI Boyama ile Piroptotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi Analiz Sonuçları	58
4.2.4. IL-1 β ve IL-18 Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi Analiz Sonuçları	60
4.2.5. NLRP3 İnflamazom Yolağı ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları	62
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	67
6. KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	89



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. NLRP3 inflamazom aktivatörleri	10
Tablo 2. Piroptozun temel özellikleri	14
Tablo 3. Adrenoseptörlerin doku dağılımı, fizyolojik etkileri ve agonistleri	17
Tablo 4. β_2 -adrenoseptör agonistleri	18
Tablo 5. Çalışmada kullanılan cihaz, alet ve sarf malzemelerinin özellikleri	22
Tablo 6. Çalışmada kullanılan kitler, antikorlar ve kimyasallar ile üretici firmaları	24
Tablo 7. % 5'lik yükleme jelinin hazırlanması	48
Tablo 8. % 10 ve % 12'lik ayırma jelinin hazırlanması	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	NRLP3 inflamozom bileşenleri ve kompleksi	8
Şekil 2.	NF-κB yolağının düzenlenmesi	9
Şekil 3.	NLRP3 inflamazom aktivasyonu	11
Şekil 4.	Gasdermin poru ve piroptoz	13
Şekil 5.	Formoterol (C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₄)'ün molekül yapısı	20
Şekil 6.	IL-1β standart grafiği	34
Şekil 7.	Deneylerde uygulanan işlemler ve gerçekleştirilen analizler	35
Şekil 8.	Deneylerin yapılış amaçları ve kullanılan yöntemler	35
Şekil 9.	IL-1β standart grafiği	42
Şekil 10.	IL-18 standart grafiği	44
Şekil 11.	Total hücre lizatlarında ve hücre kültürü süpernatantlarında protein miktarını hesaplamak için kullanılan standart grafiği	47
Şekil 12.	Hücre canlılığı analizi sonuçları	52
Şekil 13.	Sitotoksosite analizi sonuçları	53
Şekil 14.	IL-1β analizi sonuçları	54
Şekil 15.	Hücre canlılığı analizi sonuçları	55
Şekil 16.	Sitotoksosite analizi sonuçları	56
Şekil 17.	Aktif kaspaz-1 boyamasının floresan görüntüleri	57
Şekil 18.	Aktif kaspaz-1 yoğunluğu (ortalama) analizi sonuçları	58
Şekil 19.	PI boyamasının floresan görüntüleri	59
Şekil 20.	PI boyama ile piroptotik hücre ölümü analizi sonuçları	60
Şekil 21.	IL-1β analizi sonuçları	61
Şekil 22.	IL-18 analizi sonuçları	62
Şekil 23.	IκBα, p-IκBα ve NF-κB p65 protein seviyeleri analizi sonuçları	63
Şekil 24.	NLRP3 protein seviyeleri analiz sonuçları	64
Şekil 25.	pro-kaspaz-1 ve kaspaz-1 (hücre lizatı ve süpernatant) protein seviyeleri analiz sonuçları	65
Şekil 26.	GSDMD ve GSDMD-N protein seviyeleri analiz sonuçları	66

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AH	Alzheimer hastalığı
AIM2	Absent in melanoma 2
ALS	Amyotrofik lateral skleroz
APS	Amonyumpersülfat
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATP	Adenozin trifosfat
ATPaz	Adenozin trifosfataz
Aβ	Amiloid beta
BCA	Bikinkoninik asit
BDNF	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
cAMP	Siklik AMP
CCK-8	Cell Counting Kit-8
CCL2	Kemokin ligandı 2
CCL5	Kemokin ligandı 5
CD36	Cluster of differentiation 36
CLR	C-tipi lektin reseptör
CSF	Koloni uyarıcı faktör
DAMP	Hasarlanma ile ilişkili moleküler yapılar
DMSO	Dimetil sülfoksit
DTT	Dithiothreitol
FBS	Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GDNF	Glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör
GSDMD	Gasdermin D
HH	Huntington hastalığı
HMGB-1	Yüksek mobilite grubu protein 1
HÖAK	Hücre ölümü adlandırma komitesi (Cell Death Nomenclature Committee)
HSP	Isı sok proteini
IFN	İnterferon

IP-10	IFN- γ kaynaklı protein 10
IFN-γ	İnterferon gama
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IL-1β	İnterlökin-1beta
IL-4	İnterlökin-4
IL-6	İnterlökin-6
IL-10	İnterlökin-10
IL-12	İnterlökin-12
IL-13	İnterlökin-13
IL-18	İnterlökin-18
IκBα	κ B inhibitörü alfa
İBG	İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
LDH	Laktat dehidrojenaz
L-DOPA	3,4-dihidroksi-L-fenilalanin
LPS	Lipopolisakkarit
LRR	Lösence zengin tekrar domaini
MHC-II	Majör doku uyumluluk kompleksi-II
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
MS	Multipl skleroz
MSS	Merkezi sinir sistemi
MTT	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür
NACHT	Nükleotid bağlama domaini
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NGF	Sinir büyüme faktörü
NLR	NOD-benzeri reseptör
NLRC4	NLR-family caspase recruitment domain (CARD)-containing 4
NLRP1	NOD-benzeri reseptör ailesi pyrin domain içeren 1 (NOD-like receptor family-pyrin domain-containing 1)
NLRP3	NOD-benzeri reseptör ailesi pyrin domain içeren 3 (NOD-like receptor family-pyrin domain-containing 3)

NLRP6	NOD-benzeri reseptör ailesi pyrin domain içeren 6 (NOD-like receptor family-pyrin domain-containing 6)
NO	Nitrik oksit
PAMP	Patojenle ilişkili moleküler yapılar
PBS	Phosphate buffered saline
PET	Pozitron emisyon tomografisi
PH	Parkinson hastalığı
PI	Propidyum iyodür
PKA	Protein kinaz A
PRR	Patern tanıma reseptör
PTM	Posttranslasyonel modifikasyonlar
PYD	Pirin domaini
RLR	RIG-benzeri reseptör
ROS	Reaktif oksijen türleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SNpc	Substantia nigra pars kompakta
TCA	Trikloro asetik asit
TEMED	N,N,N,N-Tetrametil etilen diamin
TGF-β	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
TLR	Toll-benzeri reseptör
TLR2	Toll benzeri reseptör 2
TNF-α	Tümör nekroz faktörü alfa
UV	Ultraviyole
WST-1	2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu
WST-8 veya CCK-8	2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu
XTT	2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid
α-syn	α -sinüklein

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Mikro

Formüller

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	Amonyum persülfat
$\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$	Bromfenol Mavisi
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Etanol
$\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$	İzopropil alkol
$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$	Dithiothreitol
CH_3COOH	Asetik asit
CO_2	Karbon dioksit
H_3PO_4	Fosforik asit
NaCl	Sodyum klorür

ÖZET

β_2 -Adrenoseptör Agonisti Formoterol'ün N9 Fare Mikroglial Hücrelerinde NLRP3 İnflamazomunun Aktivasyonu ve Piroptoz Üzerine Etkisi

Mikroglialar, merkezi sinir sisteminde doğuştan gelen bağışıklık yanıtının oluşumunda önemli rol oynayan bağışıklık hücreleridir. NOD-benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren 3 (NLRP3) inflamazomu doğuştan gelen bağışıklık için çok önemli olan çoklu proteinli bir yapıdır ve çeşitli tehlike sinyalleriyle aktive olur. NLRP3 inflamazomunun aşırı aktivasyonu, kaspaz-1 aracılığıyla interlökin-1 β (IL-1 β) ve interlökin-18 (IL-18) gibi sitokinlerin salınımını ve pirototik hücre ölümünü teşvik eder. Bu durum nörodejeneratif hastalıklar (NH)'ın patogeneze katkıda bulunur. Dolayısıyla, inflamazom aktivasyonunun regülasyonu ve inhibisyonu NH'nin tedavisinde ve önlenmesinde faydalı bir yol olabilir. β_2 -agonistler, β_2 -adrenoseptörleri aktive eden ilaçlardır ve klinikte kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve astım ve gibi solunum yolu hastalıkları tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. β_2 -adrenoseptör beyinde çok fazla sentezlenmektedir ve β_2 -adrenoseptör agonistlerinin NH'de terapötik bir yaklaşım olarak kullanıldığı çalışmalarda güçlü anti-inflamatuar ve nörokoruyucu etkileri gösterdiği rapor edilmiştir. Ancak, literatürde β_2 -adrenoseptör agonisti Formoterol'ün, mikroglia hücrelerinde NLRP3 inflamazom aktivasyonunu ve pirottozu değerlendiren bir çalışma mevcut değildir. Bu çalışmada, Formoterol'ün N9 mikroglial hücrelerinde inflamazom aktivasyonu ve pirottoza etkisinin incelenmesi amaçlandı. N9 mikroglia hücrelerine LPS ve ATP uygulanarak NLRP3 inflamazom aktivasyonu sağlandı. Sonrasında Formoterol'ün N9 mikroglia hücrelerinde inflamazom aktivasyonu ve pirottoz üzerine etkisi incelendi. Hücre canlılığı CCK-8, sitotoksisite ve pirottoz ise LDH testi ile belirlendi. İnflamazom aktivasyonu ve pirottozu belirlemek için; IL-1 β ve IL-18 düzeyleri ELISA ile, pirototik ölüm aktif kaspaz-1 ve PI boyamayla ve NLRP3 inflamazomu ve pirottoz ile ilişkili proteinlerin seviyeleri Western blot ile belirlendi. Formoterol'ün, NLRP3 inflamazom modelinde kaspaz-1 aktivitesini, IL-1 β ve IL-18 sitokin salınımını baskıladığı; NLRP3 inflamazomu ve pirottoz ile ilişkili proteinlerin seviyelerini azalttığı ve tüm bunları I κ B α /NF- κ B yoluyla inhibe ettiği ve pirototik hücre ölümünü engellediği ortaya koyuldu.

Anahtar Sözcükler: β_2 -Adrenoseptör, Mikroglia, NLRP3 inflamazomu, Nöroinflamasyon, Piroptoz

ABSTRACT

The Effect of β_2 -Adrenoceptor Agonist Formoterol on Activation of NLRP3 Inflammasome and Pyroptosis in N9 Mouse Microglial Cells

Microglia are immune cells that play an important role in the development of innate immune responses in the central nervous system. The NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome is a multi-protein structure crucial for innate immunity, activated by various danger signals. Overactivation of the NLRP3 inflammasome prompts the release of cytokines like interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-18 (IL-18) via caspase-1 and stimulates pyroptotic cell death, contributing to the pathogenesis of neurodegenerative diseases (NDs). Therefore, regulation and inhibition of inflammasome activation may be a beneficial approach in the treatment and prevention of NDs. β_2 -agonists are drugs that activate β_2 -adrenoceptors, and they are widely used in the clinic for the treatment of respiratory diseases such as chronic obstructive pulmonary disease and asthma. β_2 -adrenoceptors are highly expressed in the brain, and studies in which β_2 -adrenoceptor agonists have been used as a therapeutic approach in NDs have reported that they have potent anti-inflammatory and neuroprotective effects. However, there is no study in the literature that evaluates the effects of the β_2 -adrenoceptor agonist Formoterol on NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis in microglial cells. This study aimed to investigate the impact of Formoterol on inflammasome activation and pyroptosis in N9 microglial cells. Activation of the NLRP3 inflammasome in N9 microglia cells was induced by LPS and ATP. Afterwards, the effect of formoterol on inflammasome activation and pyroptosis in N9 microglia cells was investigated. Cell viability was determined by CCK-8, cytotoxicity and pyroptosis by LDH assay. To determine inflammasome activation and pyroptosis; IL-1 β and IL-18 levels were measured with ELISA, pyroptotic death by active caspase-1 and PI staining, and the levels of proteins associated with NLRP3 inflammasome and pyroptosis by Western blot. The study revealed that Formoterol suppressed caspase-1 activity, IL-1 β , and IL-18 cytokine release in the NLRP3 inflammasome model, reduced levels of NLRP3 inflammasome-related proteins, inhibited these processes through the I κ B α /NF- κ B pathway, and prevented pyroptotic cell death.

Keywords: β_2 -Adrenoceptor, Microglia, NLRP3 inflammasome, Neuroinflammation, Pyroptosis

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Nöroinflamasyon, merkezi sinir sistemi (MSS)'nde enfeksiyonlarla mücadele etmeyi ve zararlı maddeleri temizlemeyi amaçlayan doğuştan gelen bağışıklık yanıtıdır. Bu yanıt, astrositler, mikroglia ve oligodendrositler de dahil olmak üzere glia hücreleri tarafından düzenlenir ve MSS'nin patolojik koşullara karşı ilk savunma hattı olarak hareket eder. Bu hücreler arasında mikroglialar, MSS mikroçevresindeki tehditlere hızlı bir şekilde tepki veren başlıca doğuştan gelen bağışıklık hücreleri olarak önemli görevler üstlenirler (1). MSS'de mikroglia hücreleri, inflamazomların ana üreticileri olarak öne çıkarlar (2).

İnflamazomlar, çeşitli patojenik veya fizyolojik uyarılarla aktive edilen, doğuştan gelen bağışıklık yanıtında önemli bir rol oynayan multi-protein komplekslerdir (3, 4). Aşırı inflamazom aktivasyonu, şiddetli ve sürekli inflamasyona yol açabilir; kanser, metabolik bozukluklar ve nörodejeneratif hastalıklar (NH) gibi çeşitli hastalıkların patogeneze katkıda bulunabilir (5). Inflamazomlar arasında, NLRP3 inflamazomu, bilimsel araştırmalarda en kapsamlı şekilde incelenen inflamatuvar sensör molekülüdür (6). NLRP3 inflamazom aktivasyonu mekanizması, priming ve aktivasyon sinyali olmak üzere iki aşamalı bir süreçtir. Priming sinyali, patojen tanıma reseptör (PRR)'lerinin bir türü olan Toll-benzeri reseptör (TLR)'ler tarafından indüklenir. TLR'ler, lipopolisakkarit (LPS) gibi patojen ilişkili moleküler yapı (PAMP)'lar tarafından aktive edilir. Bu sinyal, nükleer faktör- κ B (NF- κ B) aktivasyonunu uyarır (7, 8). NF- κ B genellikle, NF- κ B inhibitörleri (I κ B) ile bağlanma yoluyla sitoplazmada tutulur. Bununla birlikte, PRR veya sitokin aracılı sinyalleme kaskadları, daha sonra NF- κ B aktivitesini inhibe etmekten sorumlu olan kritik bir protein olan I κ B α 'yı fosforile eden I κ B kinaz (IKK) kompleksini aktive eder. Bu fosforilasyon, I κ B α 'nın ubiquitinasyonuna ve proteozom yoluyla degradasyonuna yol açar. Sonuç olarak, NF- κ B çekirdeğe taşınır ve NLRP3, pro-IL-1 β ve pro-IL-18 transkripsiyonunu uyarır (9, 10). Aktivasyon sinyalinde, NLRP3 inflamazom molekülü, PAMP'ler veya amiloid beta (A β), α -sinüklein (α -syn), adenosin 5'-trifosfat (ATP) gibi hasarla ilişkili moleküler yapı (DAMP)'lar yoluyla aktive edilir. Aktive NLRP3 inflamzom kompleksi kaspaz-1'in aktivasyonuna, aktif kaspaz-1 de plazma membranında por oluşumunu teşvik eden bir protein olan Gasdermin D (GSDMD)'nin olgunlaşmasına ve proteolitik bölünmesine neden olur. GSDMD'nin hücre membranında por oluşturmasının ardından "piroptoz" olarak adlandırılan hücre ölümü meydana gelir ve pro-inflamatuvar moleküllerin hücre dışına çıkmasıyla inflamasyon MSS boyunca yayılır (11). Mikroglial NLRP3

inflamazomunun aşırı aktivasyonu, nöroinflamasyona ve dolayısıyla nörodejenerasyon sürecine önemli bir katkı sağladığı ortaya koyulmuştur (12). Alzheimer hastalığı (AH) ve Parkinson hastalığı (PH) patogenezinde görülen A β ve α -syn gibi patolojik protein agregatları, mikrogial NLRP3 aktivasyonunu tetikleyerek nörodejenerasyona sebep olmaktadır (13). Mikrogial NLRP3 inflamazomunun bu aktivasyonu kronik hale dönüştüğünde ise, patoloji şiddetlenerek NH'nin ilerlemesinin hızlanmasına sebebiyet verir (14).

Adrenoseptörler, çoğu hücre türünde eksprese edilen, vücut homeostazını sağlamada çok önemli rolleri olan transmembran proteinlerdir (15). Ayrıca, β_2 -adrenoseptörler, MSS'de nöronlarda, mikrogia ve astrosit hücrelerinde yoğun bir şekilde bulunur. Periferik bölgede β_2 -adrenoseptörlerinin uyarılması, akciğerlerde düz kasların gevşemesini sağlar, bronkodilatasyonu teşvik eder ve kan damarlarında vazodilatasyonu artırır (16-18). β_2 -adrenoseptör agonist ilaçlar, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve astım gibi solunum durumlarının temel tedavisinde kullanılmaktadır (19-20). MSS'de β_2 -adrenoseptörlerin önemli ölçüde sentezlendiği göz önüne alındığında, β_2 -adrenoseptör agonistlerinin klinik kullanımlarının yanında güçlü anti-inflamatuvar etkileri nedeniyle özellikle NH'de terapötik bir yaklaşım olarak kullanımına dair çalışmalara olan ilginin arttığı görülmektedir (21-29). Yüksek seçiciliğe sahip bir β_2 -adrenoseptör agonisti olan Formoterol, insanlarda uzun süreli kullanım için güvenliğini sağlayan minimal yan etki profiline sahiptir (30-31). FDA onaylı, hızlı ve uzun süreli etkili olan bu ilaç, anti-inflamatuvar etkilere sahiptir. Ayrıca, kan-beyin bariyerini geçebilir ve lipofilik bir yapıya sahiptir. Bu nedenle, Formoterol'ün, inflamasyonun bulunduğu hastalıkları değiştirebilecek potansiyele sahip olan glial hücrelerde güçlü bir immünomodülatör etki gösterebileceğinden bahsedilmektedir (29). β_2 -adrenoseptör agonistlerinin MSS'deki etkilerini konu alan çalışmaların sayısı her geçen gün artmasına rağmen, henüz β_2 -adrenoseptör agonisti Formoterol'ün, mikrogia hücrelerinde NLRP3 inflamazomuna ve NLRP3 inflamazomu aktivasyonu ile teşvik edilen programlı hücre ölümü olan piroptoza olan etkisini araştıran herhangi bir çalışma mevcut değildir.

Bu tez çalışmasında, β_2 -adrenoseptör agonisti Formoterol'ün N9 mikrogia hücrelerinde NLRP3 inflamazom aktivasyonuna ve NLRP3 inflamazomu aracılı piroptotik hücre ölümüne etkisinin *in vitro* koşullarda incelenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikroglia

Mikroglia, MSS ana bağışıklık hücresidir; sağlıklı beyin ve omurilikte MSS hücrelerinin yaklaşık % 10'unu oluşturur. Mikroglia, embriyonik olarak türetilmiş ve kendi kendini yenileyen bir doku fagositik makrofajıdır. Mikroglial hücreler, hareket kabiliyeti yüksek ve yapısı oldukça dallanmış hücrelerdir (32, 33). Bu hücreler, MSS'nin gelişimi ve homeostazı süreçlerinin yanında, MSS'de oluşan neredeyse tüm patolojik durumlarda rol alır (34). Mikroglia, kapsamlı hareket yeteneği sayesinde beyin parankimini sürekli olarak araştırır. Mikroglial hücreler, nöronal aktivitedeki değişiklikler, DAMP'lar ve patojen sinyalleri dahil olmak üzere mikro ortamlardaki herhangi bir tehlikenin etkin bir şekilde tespit edilmesini sağlar (35). Mikroglial hücreler, bir tehlike saptadıkları anda tıpkı makrofajlar gibi fagositik ve sitotoksik mekanizmalar vasıtasıyla bu tehlikeyi ortadan kaldırırlar. Ek olarak, sitokin salınımı ve antijen sunumu özelliklerinden dolayı inflamasyon ve homeostatik mekanizmalarına katkı sağlarlar (36).

2.1.1. Mikroglialın Tarihçesi ve Kökeni

1856'da Rudolf Virchow, nöronal unsurlardan farklı bir varlığı ifade etmek için "nöroglia" ifadesini kullanmıştır. Nöroglia terimi, eski Yunanca'dan türetilmiştir ve "yapıştırıcı" veya "sıva" anlamına gelir. 19. yüzyılın sonuna kadar nöroglialın hangi hücre tiplerini temsil ettiği tam olarak açık değildi. Carl Weigert 1895'te glial liflerin bir matriks olduğunu ve çekirdeklerin bu kütleyle gömülü olduğunu iddia etti. Aynı yıl, Michael von Lenhossek "astrosit" terimini ortaya atmıştı, ancak bu yapıyı nöroglialın hücresel bir bileşeni olarak adlandırdı. Nöroglialın nöronal unsurların gömülü olduğu amorf bir yapı olduğu görüşüne karşı çıktı. Yeni terim olan "astrosit" ile Lenhossek, glialın adından da anlaşılacağı gibi sadece bir yapıştırıcıdan ziyade bunun bir hücre olduğunu açıkça belirtmek niyetindeydi. Santiago Ramón y Cajal, beyinde nöronlar ve astrositlerin yanı sıra daha fazla hücre tipi olduğunu fark etti. Cajal, nöroglia çalışmasını daha da sürdürdü ve astrositleri güzel bir şekilde etiketleyen ünlü altın klorür süblimasyon yöntemini geliştirdi. Ek olarak, "üçüncü element" olarak adlandırdığı, ancak özelliklerini tanımlayamadığı ve belirsiz kalan bazı kötü boyanmış, görünüşte apolar olan hücreler gözlemledi. Cajal'ın öğrencisi olan Pio del Rio Hortega, çalışmalarını bu anlayış üzerine inşa etti ve amonyak gümüş karbonat yöntemi gibi yeni boyama tekniklerini tanıttı. Hortega, bu yeni boyama tekniği ile Cajal'ın

“üçüncü element” diye bahsettiği hücrelerin fagositik işlevlerini, plastisitelerini, bölgesel dağılımlarını ve heterojenliklerini tanımlamayı başardı ve bu hücreyi "mikroglia" olarak adlandırdı (34, 37, 38).

Mikroglial hücreler, diğer dokularda makrofajların oluşmasını sağlayan embriyonik yolk kesesinden köken alır ve embriyogenez sırasında MSS’ye göç ederler. MSS boyunca heterojen olmayan bir şekilde yayılır ve dağılırlar (39, 40).

2.1.2. Mikroglialın Fenotipleri

Mikroglia aktivasyonunun travma, koma, felç, nöroinflamasyon ve NH dahil olmak üzere nörolojik bozuklukların patogeneğinde çok önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Aktive edilmiş mikroglia, farklı mikro-çevresel bozukluklara yanıt olarak farklı ve hatta zıt fonksiyonlara sahip iki hücre popülasyonundan oluşur. Bu mikroglia fenotipleri, pro-inflamatuar M1 (klasik olarak aktive edilmiş) ve anti-inflamatuar M2 (alternatif olarak aktive edilmiş) fenotipleri olarak adlandırılır (41). M1 mikroglia, tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), interlökin-6 (IL-6), IL-1 β , interlökin-12 (IL-12) ve kemokin ligandı 2 (CCL2) gibi inflammatuar sitokinler ve kemokinler üretir. Ayrıca nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), majör doku uyumluluk kompleksi-II (MHC-II), integrinler (CD11b, CD11c), kostimülatör moleküller (CD36, CD45, CD47) ve Fc reseptörlerinin ekspresyonunu sağlayarak nöronal hasara katkıda bulunur (42).

M2 mikroglia aktivasyonu, interlökin-4 (IL-4) ve interlökin-13 (IL-13) gibi anti-inflamatuar sitokinler tarafından indüklenir. M2 mikroglia, anti-inflamatuar sitokinler (interlökin-10 (IL-10), dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β), büyüme faktörleri (insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), fibroblast büyüme faktörü (FGF), koloni uyarıcı faktör (CSF)) ve nörotrofik büyüme faktörleri (sinir büyüme faktörü (NGF), glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve nörotrofinler) üretir. Ayrıca pro-survival faktör progranülini serbest bırakır ve mannoz reseptörünü (CD206) indükler. (43). M2 mikroglia, hücre kalıntılarının ve yanlış katlanmış proteinlerin fagositozunu, hücre dışı matris yeniden yapılandırmasını ve doku onarımını destekler ve nörotrofik faktörlerle nöronun hayatta kalmasını sağlar (44).

Genel olarak, M1 mikroglia inflamasyon ve nörotoksisteyi indüklerken, M2 mikroglia anti-inflamatuar yanıtı ve iyileşmeyi indükler (43).

2.1.3. Mikroglialın Fonksiyonları

Mikroglialın beyindeki ana işlevleri olan bağışıklık gözetimi, bağışıklık savunması ve fagositozun yanında, doku onarımını sağlaması ve MSS'de homeostazı korumak için trofik destek sağlaması gibi görevleri de vardır (45, 46). Mikroglia, MSS'nin gelişimi sırasında beyinde optimal sayıda sinaps oluşumu ve nöronal devrelerin kurulmasında kritik görevleri olan hücredir. Beynin gelişimi sırasında mikroglia işlevindeki kusurlar beyin olgunlaşmasını geciktirir (47, 48). Mikroglia nöronal öncü hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağkalımını modüle ederek nöronal içeriği kontrol eder (49-52). Mikroglia, gelişen ön beyin subventriküler bölgesinde nöron ve oligodendrosit üretimini uyarır (53, 54). Mikroglia sağlıklı beyinde sinaptik yeniden şekillenme ve nörodejeneratif hastalık patogenezi için önemli olan sinaptik budamada görev alır (55, 56). Mikroglia miyelinizasyonda, beyin ve retinanın normal vaskülarizasyonunun sağlanmasında görev alır (57). Mikroglia, BDNF sinyal iletimi yoluyla öğrenme ile ilgili sinapsların oluşumunu teşvik ederek öğrenme ve hafıza gibi daha yüksek bilişsel işlevlerle de ilişkilidir (58).

2.1.4. Nörodejeneratif Hastalıklarda Mikroglia

Nörodejenerasyon, beyin ve omurilikte kronik ve ilerleyici nöron kaybı olarak ifade edilir. Spesifik olarak, AH, hafıza kaybına ve bilişsel gerilemeye neden olan amiloid beta A β plakları ve hücre içi hiperfosforile tau proteini içeren nörofibriler yumaklar ile (59); PH substantia nigra pars kompaktadaki (SNpc) dopaminerjik nöronların seçici ölümü ile (60); amyotrofik lateral skleroz (ALS) motor nöronların dejenerasyonu ile (61, 62); Huntington hastalığı (HH) striatum ve kortekste bulunan belirli bir nöron tipinin ilerleyici kaybı ile karakterize edilir (63, 64).

Bu hastalıklarda mikroglialın aktive olduğu ve IL-1 β , TNF- α , reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrik oksit (NO) gibi bağışıklıkta görev alan mediatörleri ürettiği ortaya konulmuştur (65-67).

Bu bağışıklık mediatörleri bazal düzeyde, nöronların homeostazının sağlanmasında ve nekrotik nöronların enkazının temizlemesinde rol alırlar. Ancak NH'de kronik olarak aktive olan mikroglia, bu mediatörleri çok fazla üretir ve durumu daha da kötüleştirebilir (68). AH'de A β birikiminin, tau hiperfosforilasyonunu ve nörofibriler yumakların oluşumunu teşvik eden, nörodejenerasyon ve bilişsel bozulmaya yol açan bir mikrogliyal yanıtı yol açtığı gösterilmiştir. Burada A β birikimleri, mikroglia tarafından verimli bir

şekilde uzaklaştırılmak yerine bu hücrelerin reseptörlerine bağlanır ve hücrelerden pro-inflamatuar sitokinler salgılamasını tetikler. Bu da nöronlara daha fazla zarar verir. Bu yüzden mikroglia AH'de “iki ucu keskin kılıç” olarak ifade edilmektedir (37).

Parkinson hastalığına sahip kişilerin pozitron emisyon tomografisi (PET) sonuçları incelendiğinde, bu kişilerin SNpc'sinde bol miktarda reaktif mikroglialının bulunduğu tespit edilmiştir. Ancak bu durum klinik şiddet ile doğru orantılı değildir. Bu da bu durumun hastalığın erken döneminde ortaya çıktığını düşündürmektedir (69, 70). Mikroglialının PH'de dahil olduğu mekanizmaların AH'dekine benzer olabileceği ifade edilmektedir. Mikroglia, muhtemelen α -syn'yi ortadan kaldırmaya çalışır ve onun yapısını bozar. Bu süreçteki bir kusur, A β 'ye benzer hücre dışı α -syn birikimine sebebiyet verir (71).

Mikroglia, α -syn birikintilerinin yakınında birikir; cluster of differentiation 36 (CD36) ve toll-benzeri reseptör 2 (TLR2) gibi A β 'yi de bağlayan reseptörlere bağlı olarak pro-inflamatuar hale gelir. AH ve PH'nin benzer patojenik yollara sahip olduğu göz önüne alındığında, mikroglialının PH'de de iki ucu keskin bir kılıç olduğu ifade edilmektedir (72-74).

Pro-inflamatuar belirteçleri eksprese eden mikroglialının, ALS hastalığı olan kişilerin otopsilerinde hasarlı nöronların yakınında yoğun bir şekilde bulunduğu saptanmıştır (75). Ayrıca hayatta olan ALS hastalarının beyinleri PET ile incelendiğinde yine hasarlı nöronların etrafında aktif mikroglialının fazlaca bulunduğu görülmüştür (76). Pro-inflamatuar mikroglia, HH'nin erken safhalarında PET ile tespit edilebilir (77). Ayrıca HH olan kişilerde pro-inflamatuar mikroglia varlığı HH şiddeti ile ilişkilidir (78, 79).

2.2. İnflamazomlar

2.2.1. Bağışıklık Sistemi ve İnflamasyon

Bağışıklık sisteminin doku homeostazındaki değişiklikleri tespit etmek ve bu değişikliklere bağlı olarak yanıt oluşturmak gibi hayati bir görevi vardır. Bağışıklık hücreleri bu görevi yapabilmek için özellikle bariyer bölgelerinde bulunurlar; “patojen tanıma reseptörleri” (PRR'ler) olarak adlandırılan ve Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler), C-tipi lektin reseptörleri (CLR'ler), NOD-benzeri reseptörler (NLR'ler) ve RIG-benzeri reseptörler (RLR'ler) gibi çok çeşitli reseptörü ifade ederler. Bu reseptörler, patojen istilasına, DAMP'lara ve PAMP'lara duyarlıdır ve bu uyarıları tespit eder. Bu uyarıların mevcut olduğu durumlarda PRR'lerden elde edilen sinyaller, doku homeostazını sağlamak için bir

bağışıklık yanıtını başlatan inflamatuvar yanıt üretmek üzere işlenir ve entegre edilir (80). Birçok hastalığın patogeneğinde rol alan inflamasyon süreci, evrimsel olarak korunmuş ve ölü hücreler, toksik maddeler veya patojenler gibi zararlı uyaranlara yanıt olarak aktive olan koruyucu bir reaksiyondur (81). İnflamasyon sürecinin moleküler mekanizması başlıca inflamazom yolunu içermektedir ve inflamazom aktivasyonu ana bileşendir (82-84).

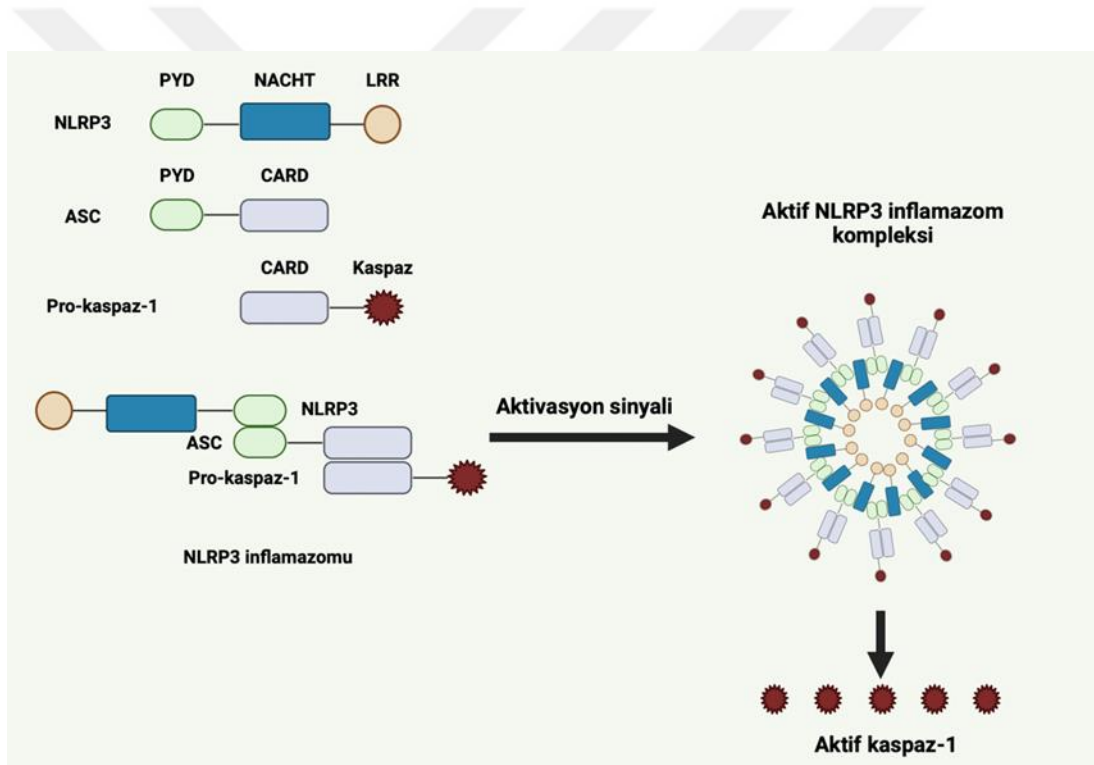
2.2.2. İnflamazom

İnflamazomlar, çeşitli fizyolojik veya patojenik uyaranlarla aktive edilen polimorfik komplekslerdir. İnflamazomlar, patojenleri ve hasarlı hücreleri temizleme yeteneği sayesinde doğuştan gelen immün yanıtın önemli bir bileşenidir (3, 4). İnflamazomlar, DAMP ve PAMP gibi çeşitli uyaranları tanıyan multiprotein kompleksleridir (85, 86). İnflamazomlar aynı zamanda, enfeksiyon durumuna sebebiyet veren mikroorganizmalara ve konak proteinlerinden oluşan moleküllere karşı inflamasyon sürecinin başlatılması ile kaspaz-1 aktivasyonu düzenlenmesi sürecinde görev alan doğuştan gelen bağışıklık sistemi elemanıdır (87). Bugüne kadar, NOD-like receptor (NLR) family pyrin domain-containing 1 (NLRP1), NLRP3, NLR-family caspase recruitment domain (CARD)-containing 4 (NLRC4), NLR family pyrin domain-containing 6 (NLRP6) ve absent in melanoma 2 (AIM2) inflamazomları dahil olmak üzere çeşitli tipte inflamazomlar tanımlanmıştır. Bunlar arasında NLRP3 inflamazomu, en iyi karakterize edilen ve bilimsel çalışmalara en fazla konu olan inflamatuvar sensör molekülüdür (6).

2.2.3. NLRP3 İnflamazomu

Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olan NLRP3 inflamazomu; innate immün reseptör proteini NLRP3, adaptör protein apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC, ayrıca PYCARD olarak da bilinir) ve inflamatuvar proteaz kaspaz-1'den oluşan sitozolik multiprotein kompleksidir (88). NLRP3, üç ana bileşenden (domain) oluşmaktadır. Bu bileşenler, karboksi ucunda lösince zengin tekrar domaini (LRR), merkezde nükleotid bağlama domaini (NACHT) ve amino ucunda pirin domainidir (PYD). LRR, sinyal tanıma kapasitesine ve oto-inhibitör fonksiyonlara sahiptir. Adenozin trifosfataz (ATPaz) aktivitesine sahip olan NACHT domaini kendi kendine oligomerizasyonuna aracılık eder. PYD domaini ise inflamazom oluşturmak için ASC ile bir araya gelir (89). NLRP3 aracılı inflamazom aktivasyonunu sağlayan PAMP ve DAMP dahil olmak üzere çeşitli uyaranlara yanıt olarak NLRP3 bir sensör görevi görür ve homotipik

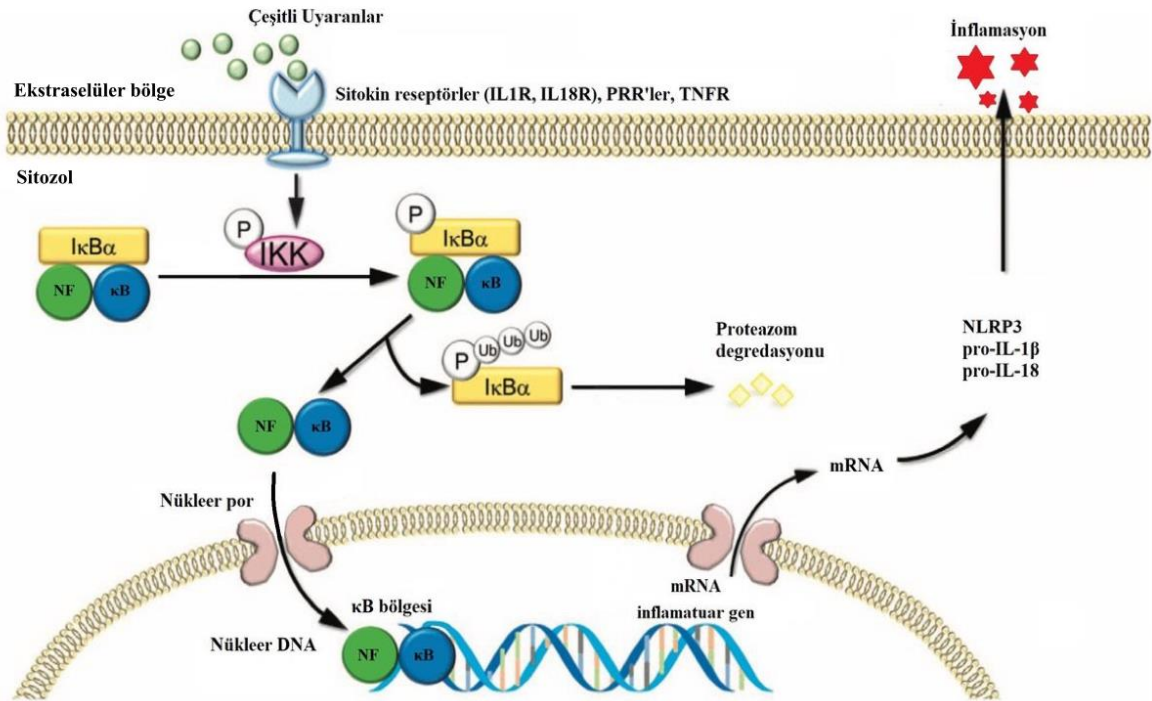
NACHT domaininin etkileşimleri yoluyla kendi kendine oligomerizasyona uğrar. Oligomerize NLRP3, adaptör protein ASC'nin amino ucunda bulunan homotipik PYD-PYD domainlerinin etkileşimleriyle bir araya gelerek ASC speck makromolekülü oluşur (90, 91). Sonrasında bu yapı, homotipik CARD-CARD domainlerinin etkileşimleri yoluyla inflamazom efektör kaspaz-1'in olgunlaşmamış formu (pro-kaspaz-1) ile bir araya gelerek NLRP3 inflamazom kompleksi oluşur (3). ASC filamenti üzerinde pro-kaspaz-1'in oligomerizasyonu kaspaz-1'e olgunlaşmasını sağlar. Ayrılmış kaspaz-1, sırasıyla pro-IL-1 β ve pro-IL-18'i proteolitik olarak keser ve onların aktif formları olan IL-1 β ve IL-18'e dönüşümünü sağlayarak salgılanmasını uyarır (86, 92-94). NLRP3 inflamazom bileşenleri ve kompleksi Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. NLRP3 inflamazom bileşenleri ve kompleksi (Otlu'dan, 95)

2.2.4. NLRP3 İnflamazom Aktivasyonu ve Aktivatörleri

PAMP'lar ve DAMP'lar aracılığıyla NLRP3 inflamazom aktivasyon mekanizması, priming ve aktivasyon sinyalinin oluşmasıyla oluşan iki aşamalı bir süreçtir. İlk sinyal olan priming aşaması iki fonksiyona sahiptir. İlk fonksiyonu, NLRP3, pro-IL-1 β ve pro-IL-18 inflamazom bileşenlerinin ekspresyonunu uyarmaktır. Priming aşaması sırasında, endojen sitokinler (IL-1, TNF- α , interferon (IFN)) veya PRR'ler (nucleotide-binding oligomerization domains-containing protein 2 (NOD2), TLR'ler veya sitokin reseptörleri (IL-1R ve TNFR)) NF- κ B'nin aktivasyonunu uyarır (7, 9, 82). NF- κ B, normalde I κ B'ye bağlanarak sitoplazmada tutulur. Ancak PRR veya sitokin aracılığıyla sinyal kaskadları IKK kompleksini aktive eder. Sonrasında NF- κ B aktivitesinin inhibisyonundan sorumlu temel bir protein olan I κ B α 'yı fosforiler. Bu fosforilasyon, I κ B α ubiquitinasyonu ve proteazom aracılığıyla degradasyonu ile sonuçlanır. Böylece NF- κ B, çekirdeğe transloke olur ve NLRP3, pro-IL-1 β ve pro-IL-18'in transkripsiyonunu uyarır (9, 10). NF- κ B yolğunun düzenlenmesi Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. NF- κ B yolğunun düzenlenmesi (Liu'dan, 10)

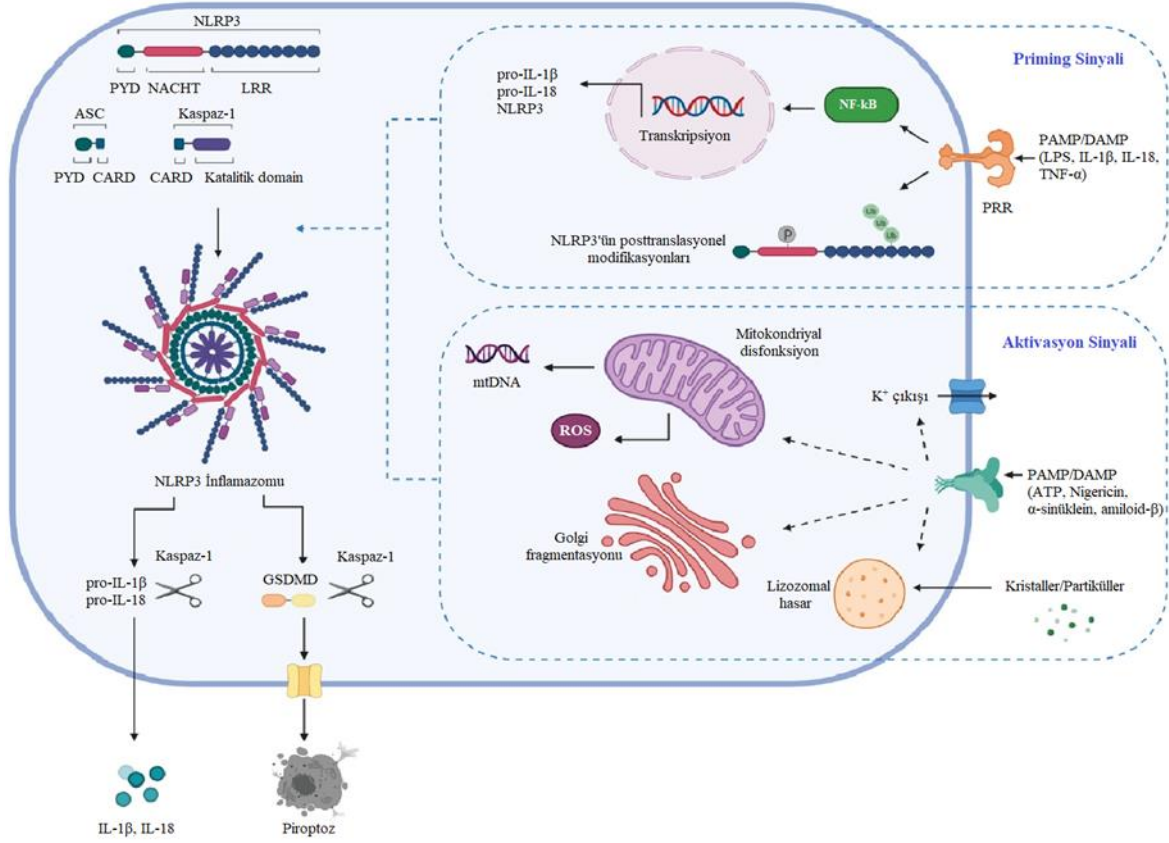
Priming aşamasının ikinci fonksiyonu ise, NLRP3'ün fosforilasyon/defosforilasyon, sumolasyon, ubiquitinasyon/deubikitinasyon, asetilasyon/deasetilasyon ve nitrosilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlarını (PTM'ler) sağlamaktır. Kısaca, priming aşaması hem transkripsiyonel düzenleme ve hem de PTM'ler aracılığıyla NLRP3 inflamazom aktivasyonu için çok önemlidir (88, 90, 96, 97).

İkinci aşama olan “aktivasyon” aşamasında, NLRP3 inflamazom aktivasyonu için eksojen/patojen türevli veya endojen tehlike sinyalinin oluşması bir sinyal gerekmektedir. NLRP3 inflamazomunu aktive eden sinyaller; konakçıdan türetilen moleküller, amiloidojenik proteinler, α -syn, metabolik stres kaynaklı moleküller, çevresel tahriş edici maddeler, bakteriyel por oluşturan toksinler, cildi tahriş edici maddeler ve tüm patojenlerdir (90, 96). NLRP3 inflamazom aktivatörleri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. NLRP3 inflamazom aktivatörleri (Paik’ten, 82; Zangiabadi’dan, 96)

DAMP	Vücut-kaynaklı	ATP, kolesterol kristalleri, palmitat, çözünür ürik asit, α -syn, A β , serum amiloid A, prion proteini, hiyalüronan, okside mitokondriyal DNA, siklik GMP-AMP ve seramidler
	Yabancı-kaynaklı	Silika, alüminyum hidroksit, nanoparçacıklar, karbon nanotüpler, şap ve palmitat
PAMP	Bakteriyel	LPS, peptidoglikan, bakteriyel RNA, RNA–DNA hibridi ve toksinler (nigerisin)
	Viral	Çift ve tek sarmallı RNA

Aktivasyon aşamasında, mitokondriyal disfonksiyon, ROS üretimi, iyon akışı (K^+/Cl^- akışı ve Ca^{2+}/Na^+ girişi), Ca^{2+} homeostazının bozulması, lizozomal hasar, golgi fragmentasyonu ve metabolik değişiklikler gibi birçok sayıda moleküler veya hücrel olaylarda (sinyaller) da NLRP3 inflamazom kompleksinin oluşmasına katkıda bulunabilir (8, 82, 90, 97, 98). NLRP3 inflamazom aktivasyonu Şekil 3’te gösterilmiştir.



Şekil 3. NLRP3 inflamazom aktivasyonu (McKee'den, 99)

2.3. Piroptoz: İnflamasyonun Ana Düzenleyicisi

2.3.1. Hücre Ölümü

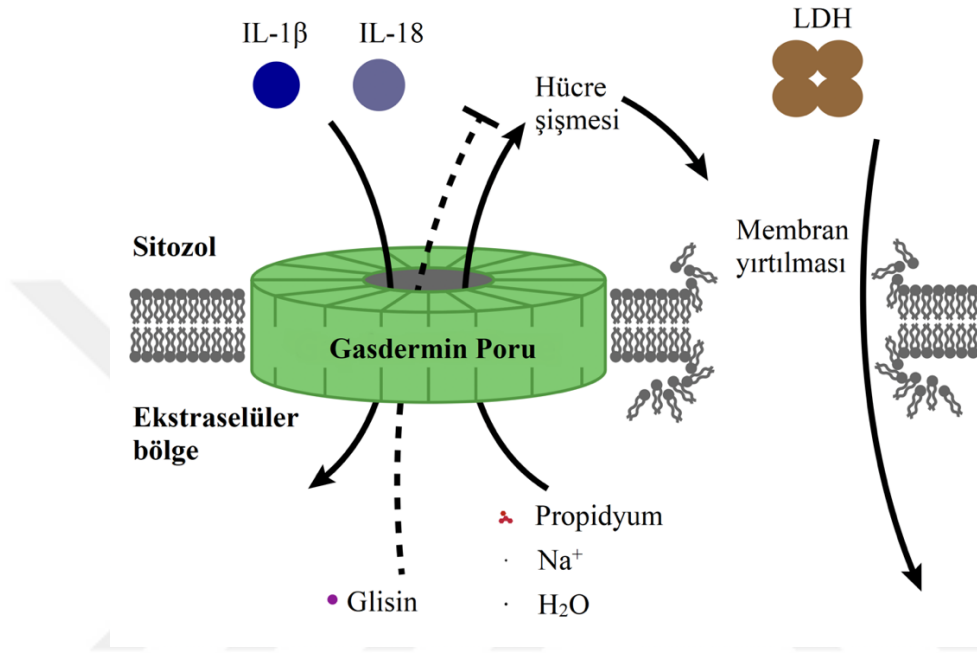
Hücrelerin hayatta kalması ve ölümü, çeşitli sinyaller ve moleküller tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Fizyolojik hücre ölümü normal fonksiyon ve doku gelişimi için çok önemlidir. Ancak patolojik hücre ölümü sağlığımızı tehdit eden yan etkilere ve inflamasyona neden olabilir (100). Hücre ölümü sınıflandırması, Hücre Ölümü Adlandırma Komitesi (Cell Death Nomenclature Committee, HÖAK) tarafından formüle edilmiş ve önerilmiştir. Genel olarak hücre ölümü, hücre ölüm sürecinin düzenlenip düzenlenemeyeceğine bağlı olarak, “kazara hücre ölümü” ve “düzenlenmiş hücre ölümü” olarak ikiye ayrılır. Kazara hücre ölümü, aşırı pH değişimleri, yüksek basınç, yüksek sıcaklık ve anormal ozmotik stres gibi kimyasal, fiziksel veya mekanik stres tarafından tetiklenen kontrolsüz bir hücre ölümü türüdür. Düzenlenmiş hücre ölümü ise karmaşık moleküler mekanizmalar tarafından indüklenen sıkı bir şekilde düzenlenmiş bir hücre ölümü formudur.

Kazara hücre ölümü pasif bir süreçken, düzenlenmiş hücre ölümü, birçok hastalığın patogeneğinde önemli bir rol oynayan aktif bir süreçtir (88, 101). HÖAK son yıllarda ferroptoz, otofaji, nekroptoz, entotik, netotik ve lizozom bağımlı hücre ölümü, alkaloptoz ve piroptoz gibi birçok yeni düzenlenmiş hücre ölümü modeli tanımlamıştır (102).

2.3.2. Piroptoz

NLRP3 inflamazom aktivasyonu sıklıkla piroptoz olarak bilinen kaspaz-1 bağımlı pro-inflamatuar düzenlenmiş hücre ölümüne de yol açmaktadır. İnflamazom kompleksi kaspaz-1'in otoproteolitik aktivasyonuna yol açar (103). Olgun kaspaz-1'in, inflamazom aracılı inflammatuar hücre ölümünden sorumlu oligomerik membran porlarının oluşumunu sağlayan GSDMD'nin proteolitik bölünmesine aracılık ettiği keşfedilmiştir (94, 104). Bu nedenle, piroptoz 2015 yılında gasdermin aracılı programlı ölüm olarak tanımlanmıştır (105). GSDMD proteini, N-terminal por oluşturucu domain ve C-terminal baskılayıcı domain olmak üzere iki korunmuş domainden oluşur (106). N-terminal domaini muhtemelen por oluşumundan dolayı sitotoksik aktiviteye sahipken, C-terminal domaini oto-inhibitördür ve bu sitotoksik aktiviteye karşı koruma sağlar (107). GSDMD'nin N-terminal domaini aracılığıyla piroptoz uyarılmaktadır. NLRP3 inflamazom aktivasyonunu takiben, inflammatuar kaspazlar (farelerde kaspaz-1 ve -11; insanlarda kaspaz-1, -4 ve -5), özellikle kaspaz-1, sitozolik bir protein olan GSDMD'nin proteolitik olarak bölünmesini indükler. Kaspaz-1, N-terminal domainini C-terminal oto-inhibitör domaininden ayrılmasını sağlayarak GSDMD'nin aktif formunu oluşturur (108). İnflamatuar kaspazlara ek olarak, diğer proteazların da (nötrofil elastaz veya katepsin G) GSDMD'nin proteolitik olarak bölünmesini (N-terminal fragmenti (p30) ve C-terminal fragmenti (p20)) sağladığı bulunmuştur. Bu durum, GSDMD'nin birçok sinyal yoluyla hem piroptotik hücre ölümünün bir substratı ve yürütücüsü olarak kullanılabileceğini hem de IL-1 β ve IL-18'in hücre dışına sekresyonu için gerekli olduğunu düşündürmektedir (108, 109). Bu aktivasyon neticesinde GSDMD'nin N-terminal domaini (p30), fosfatidilinositol fosfatlar, fosfatidilserin ve kardiyolipin dahil olmak üzere membran lipidlerine doğrudan bağlanabilir. Plazma membranı üzerinde lipid bağlanmasını takiben, por oluşumu için GSDMD'nin N terminal domaininin oligomerizasyonu gereklidir. GSDMD'nin N terminal domaini (tahmini 16 PFD monomeri) yay şeklindeki oligomerleri oluşturur ve sonrasında halka şeklindeki oligomerlere dönüşür. Böylece plazma membranı üzerinde 10-15 nm'lik çapta sitoplazmik oligomerik porlar oluşur (108, 110). Bu porlar hücre membran bütünlüğünün bozulmasına, hücre içi ozmotik basıncın artmasına; IL-1 β (4.5 nm), IL-18 (5.0

nm), su (0.275 nm), Na⁺ (0.277 nm), glisin (0.97 nm), laktat dehidrojenaz (9.6 nm), yüksek mobilite grubu protein 1 (HMGB-1) ve ısı sok proteini (HSP) gibi moleküllerin sekresyonunu sağlayarak inflamasyonun yayılmasına katkı sağlar (6, 104, 110-112). GSDMD poru ve piroptoz Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Gasdermin poru ve piroptoz (Kovacs'tan, 110)

GSDMD'nin aktivasyonu plazma membran bütünlüğü kaybına neden olduğu için piroptoz sürecini başlatır. Diğer hücre ölüm türlerinden farklı olarak piroptozda, plazma membran bütünlüğünün bozulması, hücreye su girişi, hücresel şişme, ozmotik lizis ve pro-inflamatuar hücresel içeriğin salınması görülür (88). Piroptozun temel özellikleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Piroptozun temel özellikleri (Huang'dan, 88)

Başlatıcıları	DAMP'lar ve PAMP'lar
Efektörleri	Kaspaz-1, -11 (veya insanda kaspaz-4, -5) ve çoğunlukla gasdermin ailesi üyeleri
Morfolojik özellikleri	Kromatin yoğunlaşır. Çekirdek bozulmadan kalır. Hücrel şişme ve plazma membranı yırtılması görülür.
İnflamatuvar yanıtı	Pro-inflamatuvar
Salınan içerikler	IL-1 β , IL-18, IL-1 α , HMGB1 ve laktat dehidrogenaz (LDH)

Piroptozun düzenlenmesi tam olarak tanımlanmamakla birlikte bu alandaki çalışmalar gün geçtikçe atmaktadır. Piroptozun derecesi, artan inflamazom aktivasyonu ile artmaktadır (6, 113). Yüksek düzeyde piroptoz, inflamatuvar semptomların şiddetlenmesine, hücre ölümüne ve ciddi doku/organ yetmezliğine neden olabilir (114). Ayrıca birçok organelin ve plazma membranının sitozole bakan iç yüzü benzer lipitlerden (fosfatidilinositol fosfat, fosfatidilserin ve kardiyolipin) oluşmaktadır. Örneğin, endoplazmik retikulumda GSDMD poru oluşursa, sitozole kalsiyum depolarından kalsiyum akışı sağlanabilir (110).

2.4. NLRP3 İnflamazomunun Nörodejeneratif Hastalıklar ve Mikroglia ile İlişkisi

2.4.1. Nörodejeneratif Hastalıklarda NLRP3 İnflamazomu

NLRP3 inflamazomunun anormal/aşırı aktivasyonu AH, PH, HH, ALS, multipl skleroz (MS), prion hastalığı gibi NH'nin patogenezi ile ilişkilidir (14, 115, 116). Yanlış katlanmış protein agregatları ve hastalıklara eşlik eden belirli metabolitler, bu hastalıkların başlamasında ve ilerlemesinde kritik bir rol oynayan NLRP3 inflamazomunun doğrudan aktivatörleri olduğu kanıtlanmış olan endojen DAMP'lardır (117).

Alzheimer hastalığının patogenezinde rol alan ve beynin hipokampus ve korteks bölgelerinde biriken amiloid plaklar ve hücre dışı (ekstraselüler) tau proteinleri, beynin en önemli bağışıklık hücreleri olan mikroglialar tarafından çevrelenir ve A β ve tau agregatlarına

bağlı olarak mikrogliyal aktivasyon gerçekleşir. Bu aktivasyon da doğal immün yanıt olan NLRP3 inflamazom aktivasyonunu uyarmaktadır. Aktif mikrogliyalardan oluşturulan inflamatuvar hasarın hastalığın erken aşamalarında ortaya çıktığı düşünülmektedir. Kalıcı mikrogliyal NLRP3 inflamazom sinyali, aşırı A β ve tau birikimine, mikrogliyaların A β ve tau agregatlarını temizleme kapasitesinin azalmasına ve mikrogliyal işlev bozukluğuna yol açar. Gerçekten de son zamanlarda yapılan çalışmalar, şiddetli AH'nin artan mikrogliyal işlev bozukluğu ile ilişkili olduğunu göstermektedir (82, 118). Bu nedenle A β ve tau agregatları, beyinde ciddi seviyede NLRP3 inflamazom sinyal yolunun aktivasyonuna yol açarak AH patofizyolojisine, hastalığın ilerlemesine ve bilişsel azalmaya neden olur (82-84).

Beyinde striatum/SNpc'de bulunan dopaminerjik nöronların dejenerasyonu/ölümü, α -syn proteinini içeren anormal protein kümeleri olan Lewy cisimciklerinin varlığı ve mikroglioz (aktive mikrogliyal hücrelerin birikmesi), PH'nin en önemli nöropatolojik ayırt edici özellikleridir (119, 120). PH'nin patogenezi çok karmaşıktır ve hastalığın gelişimi birçok faktörün kombinasyonunun bir sonucudur. Yoğun araştırmalara rağmen, dopaminerjik nöronların ölüm nedenini açıklayan birleşik bir teori bulunmamaktadır (121). Nöronal dejenerasyona neden olan mekanizmalar tam olarak açıklanamamasına rağmen nöronal dejenerasyonda, α -syn proteostazının bozulması, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, kalsiyum homeostazı, aksonal taşıma, eksitotoksiste, nörotrofik faktörlerin eksikliği, ubiquitin-proteazom sistemin bozulması ve nöroinflamasyon gibi çok sayıda yolun ve mekanizmanın rol aldığı düşünülmektedir (122, 123). Nöronal dejenerasyona neden olan tüm bu mekanizmalar aracılığıyla NLRP3 inflamazom aktivasyonu gerçekleşmektedir (119).

2.4.2. Mikrogliada NLRP3 İnflamazomu

Mikrogliyalardan, PAMP'lar ve DAMP'ların algılanmasını sağlayan PRR'leri (TLR, NLR, CLR, RLR) bünyesinde bulunduran MSS'nin yerleşik bağışıklık hücreleridir. PAMP'lar ve/veya DAMP'lar ile uyarılan PRR'ler, NLRP3 inflamazom aktivasyonunu sağlayarak doğuştan gelen bağışıklık yanıtına kritik bir şekilde katkıda bulunur (124). Ayrıca oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, bozulmuş mitofaji gibi birçok patofizyolojik faktör NLRP3 inflamatuvar kompleksini aktive etmede çok önemli bir rol oynamaktadır (125). Mikrogliyal NLRP3 inflamazom aktivasyonunun, nöroinflamasyon sürecine önemli bir katkı sağladığı ortaya koyulmuştur. A β ve α -syn gibi patolojik protein agregatları mikrogliyal

NLRP3 inflamazom aktivasyonunu tetikleyerek nörodejenerasyona sebep olmaktadır (13). Mikroglial NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu kronik hale dönüştüğünde patoloji şiddetlenir. Bu durum NH'nin ilerlemesinin hızlanmasına sebep olur (14).

2.5. Adrenoseptörler, Çeşitleri, Agonistleri, Nörokoruyucu Etkileri ve Formoterol

2.5.1. Adrenoseptörler

Adrenerjik reseptörler veya adrenoseptörler, birçok hücre tipinde eksprese edilen, hem dinlenme hem de stresli koşullarda sempatik sinir sistemi aracılığıyla tüm vücut homeostazını korumada merkezi bir rol oynayan transmembran proteinlerdir. Adrenoseptörler, α_1 -, α_2 - ve β -adrenoseptörler olmak üzere üç farklı aileye ayrılır. Ek olarak, her aile üç alt tipe ayrılır. Bunlar, α_1A , α_1B ve α_1D (α_1 -adrenoseptörler); α_2A , α_2B ve α_2C (α_2 -adrenoseptörler); β_1 , β_2 ve β_3 'tür (β -adrenoseptörler) (15). Adrenoseptörlerin doku dağılımı, fizyolojik etkileri ve agonistleri Tablo 3'te özetlenmiştir.

Tablo 3. Adrenoseptörlerin doku dağılımı, fizyolojik etkileri ve agonistleri (Sharma'dan, 126)

Reseptör	Doku dağılımı	Fizyolojik etkileri	Agonist
α_1	Vasküler ve viseral düz kaslar	Düz kas kasılması, glukoneogenez, vazokonstrüksiyon	Norepinefrin, Fenilefrin, Methoxamine
α_2	Pre-sinaptik terminaller, pankreas, trombosit, tükürük bezleri	Nörotransmitter salınımının inhibisyonu	Clonidine, Monoxidine
β_1	Kalp, böbrek ve bazı pre-sinaptik terminaller	Kalp atış hızının ve renin sekresyonunun artması	Isoproterenol, Norepinefrin, Dobutamine
β_2	Beyin, bronşiyoller viseral düz kaslar, karaciğer, iskelet kasları	Vazodilatasyon, bronkodilatasyon, insulin salınımının inhibisyonu	Formoterol, Salbutamol, Salmeterol, Terbutaline
β_3	Adipoz doku	Lipolizin artması	Isoproterenol, Amibegron, Solabegron

2.5.2. β_2 -Adrenoseptör

β_2 -adrenoseptör nöron, mikroglia ve astrosit hücrelerinin yüzeylerinde fazlaca eksprese edilen G protein-kenetli bir reseptördür (16-18). Periferde, β_2 -adrenoseptörlerin aktivasyonu akciğerlerdeki düz kasların gevşemesine, kan damarlarında bronkodilatasyona ve vazodilatasyona yol açar (127, 128). β_2 -adrenoseptörün uyarılması sırasıyla, (a) adenilat siklazı aktive ederek hücre içi siklik AMP (cAMP)'yi artırır (b) cAMP-yanıt elemanı bağlayıcı proteini fosforilleyen protein kinaz A (PKA)'nın aktivasyonuna yol açar, (c) NF- κ B'yi inhibe eden protein olan I kappa Ba ($I\kappa B\alpha$)'nın *de novo* sentezini uyarır, böylece (d) NF- κ B'nin çekirdeğe translokasyonu önlenir ve transkripsiyonel olarak sentezlenmesini

inhibe eder ve son olarak (e) pro-inflamatuar sitokinlerin gen ekspresyonunu azaltır. β_2 -adrenoseptörler yoluyla aşağı akış sinyali, mikrogial aktivasyonu inhibe eder ve pro-inflamatuar sitokin üretimini azaltır (29).

2.5.3. β_2 -Adrenoseptör Agonistleri

β_2 -agonistler, epinefrin, norepinefrin ve dopamin gibi endojen katekolaminlerin etkilerini taklit eden bir grup farmasötik bileşik veya semptomimetik ilaçtır. Bu ilaçlar katekolaminlere benzer bir yapıya sahip değildir, ancak yine de doğrudan ya da dolaylı olarak β_2 -adrenerjik reseptörü aktive ederler (129). Klinik uygulamalarda kısa (Salbutamol, Metaproterenol), uzun (Formoterol, Clenbuterol ve Salmeterol) ve ultra uzun (Indacaterol) etkili olmak üzere farklı β_2 -adrenoseptör agonistleri geliştirilmiştir ve bu ilaçlar astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) gibi solunum yolu hastalıklarının tedavisi için yaygın olarak kullanılmaktadır. (19, 20). Bu ilaçlar, Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. β_2 -adrenoseptör agonistleri (Magistrelli'den, 19)

Kısa etkili	Uzun etkili	Ultra uzun etkili
Salbutamol	Formoterol	Indacaterol
Levosalbutamol	Salmeterol	
Terbutaline	Bambuterol	
Pirbuterol	Clenbuterol	
Precaterol		
Metaprotenerol		
Fenoterol		
Bitolterol mesylate		
Ritodrine		
Isoproterenol		

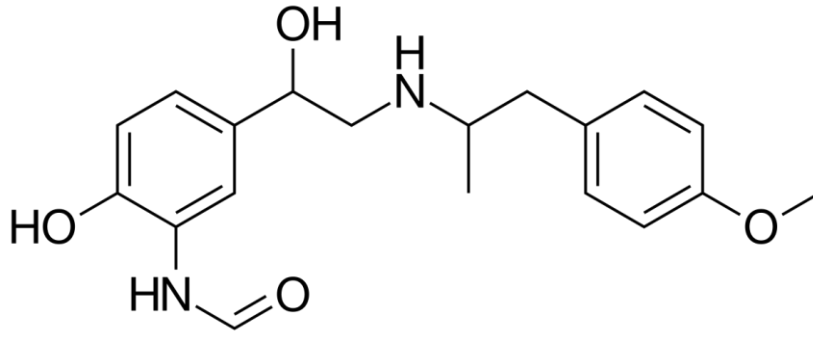
2.5.4. β_2 -Adrenoseptör Agonistlerinin Nörokoruyucu Etkileri

β_2 -adrenoseptör, beyinde çok fazla sentezlendiğinden, β_2 -adrenoseptör agonistlerinin klinik kullanımlarının yanında güçlü anti-inflamatuar etkileri nedeniyle NH'de terapötik bir yaklaşım olarak kullanımına dair çalışmalara olan ilgi artmaktadır (21, 22). Mittal ve

arkadaşları, Norveç Reçete Veritabanı'na kayıtlı 4.5 milyondan fazla Norveçli'yi 11 yıllık bir zaman periyodunda incelemiş ve β_2 -adrenoseptör agonisti Salbutamol'ün α -syn seviyelerini düşürerek PH gelişme riskini % 40'a kadar azalttığını bulmuşlardır (23). Gronich ve arkadaşları, İsrail popülasyonundan elde edilen verileri kullanmışlar ve β_2 -adrenoseptör agonistleri ile tedavi edilen kişilerde daha düşük PH riski olduğunu göstermişlerdir (24). Alzheimer fare modeli oluşturulan bir çalışmada, β_2 -adrenoseptör aktivasyonunun, hipokampal nörogenezi artırdığı, bilişsel azalmayı iyileştirdiği ve sinaptik protein seviyelerinin up-regülasyonu ile birlikte dendritik dalları ve omurga yoğunluğunu artırdığı bulunmuştur (25). β_2 -adrenoseptör agonisti Salbutamol'ün, MS hastalarında glatiramer asetat tedavisine ek tedavi olarak uygulanmasından sonra, MS hastalığında seviyeleri artan IL-12'yi azalttığı ve MS'in klinik sonuçlarını iyileştirdiği tespit edilmiştir (26). β_2 -adrenoseptör agonistlerinin uygulanmasıyla hem 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) hem de LPS fare modellerinde toksik mikroglianin inhibe edildiği ve farelerde 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin (L-DOPA)'nın beyin ekstraksiyonunu artırdığı bulunmuştur (27). Clenbuterol'ün, kainik asit eksitotoksisite modelinde pro-inflamatuar moleküller IL-1 β , interferon-gama (IFN- γ) ve iNOS ekspresyonunu azalttığı; glial hücrelerde nörotrofik faktörlerin ekspresyonunu artırdığı ve anti-inflamatuar fenotipi teşvik ettiği bulunmuştur (28). Yine Clenbuterol'ün glial hücrelerindeki β_2 -adrenoseptörleri uyararak, nörotrofik faktörlerin üretimini, anti-inflamatuar ve nörokoruyucu etkileri artırdığı saptanmıştır (130).

2.5.5. Formoterol (C₁₉H₂₄N₂O₄)

Formoterol, klinikte KOAH ve astım tedavisi için kullanılmaktadır. FDA tarafından onaylı, hızlı ve uzun etkili, anti-inflamatuar etkileri olan ve oldukça seçici bir β_2 -adrenoseptör agonistidir (31). Formoterol, minimal yan etki profiline sahiptir ve insanlarda uzun süreli kullanım için güvenlidir (30). Lipofiliktir ve kan-beyin bariyerini geçebilir. Formoterol'ün molekül yapısı Şekil 5'te gösterilmiştir (131).



Şekil 5. Formoterol ($C_{19}H_{24}N_2O_4$)'ün molekül yapısı (Hostrup'tan, 131)

Sistemik ve intranigral LPS ile oluşturulan nöroinflamasyonda Formoterol'ün mikrogial aktivasyonu azalttığı, substantia nigra ve striatumdaki dopaminerjik hücre kaybını önlediği, orta beyin/striatum dopamin konsantrasyonlarını arttırdığı ve merkezi/sistemik inflamasyonun neden olduğu motor bozukluklarını azalttığı bulunmuştur. Glial hücrelerin dahil olduğu inflamasyon sürecinde, MSS parankimine girerek glial hücreler üzerinde güçlü immünomodülatör etkiler oluşturabilir (29).

2.6. Western Blot

Tek bir hücrede binlerce farklı protein bulunmaktadır. Bu proteinlerin her biri hücrede belli bir biyokimyasal sürece dahil olmaktadır. Bilim insanları proteinlerin görevlerini, yapılarını ve özelliklerini belirlemek adına bilimsel çalışmalar yapmaktadır. Bu bağlamda belirli bir proteinin tespitinin yanında miktarının belirlenmesine de ihtiyaç duyulmaktadır. İlk olarak 1979'da proteinlerin membranlara elektroforetik ve elektroforetik olmayan şekilde transferi (protein blotlama) ile temelleri atılan western blot yöntemi, günümüze kadar büyük ölçüde gelişim göstermiştir. Western blot, hücrelerden elde edilen protein karışımından spesifik bir proteinin tayin edilmesini sağlayan yüksek hassasiyetli ve yarı kantitatif bir yöntemdir ve bilimsel çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde ilk olarak hücreler, içindeki proteinlerin ortaya çıkabilmesi için parçalanır ve bir hücre lizatı elde edilir. Ardından bu protein karışımı, “jel elektroforezi” adı verilen bir yöntem kullanılarak bir jel üzerinde proteinin boyutuna göre birbirinden ayrılır. Sonrasında jelde birbirinden ayrılan proteinler, jel ortamının kırılabilir olması ve antikorların proteinlere kolayca erişebilmesi sebebiyle bir membrana aktarılır. Bu işlemin ardından membran bloklanır ve uygun primer ve sekonder antikorlar kullanılarak hedef protein görünür hale getirilir. Son aşamada ise

hedef protein, kemilüminesans, floresans veya kolorimetrik yöntemler ile belirlenir (132, 133).

Farklı örneklerde protein seviyelerinin güvenilir bir şekilde belirlemek için dikkat edilmesi gereken iki faktör vardır. Bunlar, elektroforetik ayırmada her bir kuyucuğa yüklenen toplam protein miktarı ve blotlama aşamasında verimli bir aktarımın sağlanmasıdır (134).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Sarf Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihaz, alet ve sarf malzemeler Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 5. Çalışmada kullanılan cihaz, alet ve sarf malzemelerinin özellikleri

Kullanılan Cihaz, Alet ve Sarf Malzemeler	Üretici Firma / Model
Hücre kültürü kabini	Metisafe BSC-IIA-120
Ters faz mikroskop	Nikon Eclipse TS100
CO ₂ inkübatörü	Heraeus Heracell 240+KS-12
Etüv (37 °C)	Heraeus B12
Buzdolabı (4 °C ve -20 °C)	Beko
Derin dondurucu (-80 °C)	New Brunswick Scientific U410-86
Hassas analitik terazi	Mettler Toledo AB204-S
Soğutmalı santrifüj	Beckman-Coulter Allegra 64R
Santrifüj	Eppendorf Centrifuge 5804
Mikrosantrifüj	Thermo IEC Micromax
Vorteks	Ika Genius 3
Vorteks	Ika Vortex 4 basic
Mikropleyt okuyucu	Molecular Devices Versa Max
pH-metre	Hanna Instruments HI 9321
Çalkalayıcılı ısı bloğu	Eppendorf Thermo Mixer Comfort
Çalkalayıcılı inkübatör	ShellLab/Sheldon S14-2
Orbital karıştırıcı	Nüve SL 350
Shaker cihazı	Bio-Rad UltraRocker
Otoklav	Tuttnauer 3150 ELV
Kuru hava sterilizatörü	Memmert INE 500
Manyetik karıştırıcı	Ikamag RH
Sonikatör	Sonics-Vibracell VCX500
Floresan mikroskop	Zeiss Axio Vert.A1

Tablo 5. Çalışmada kullanılan cihaz, alet ve sarf malzemelerinin özellikleri (Devamı)

Kullanılan Cihaz, Alet ve Sarf Malzemeler	Üretici Firma / Model
Flow sitometre	Becton Dickinson Accuri C6
Buz makinası	Hoshizaki FM-80KE
Sıvı azot tankı	Thermo Biocane 47
Western blot jel görüntüleme cihazı	Bio-Rad Chemidoc MP Imaging Syst.
Distile su cihazı	Gfl 2004
Ultra saf su cihazı	Elga Purelab DV25
Doğru akım güç kaynağı (300 volt)	Thermo EC250-90
Pipet pompası	Vitlab Pipeo
Farklı hacimlerde otomatik pipetler	Eppendorf
Dikey elektroforez ve immünoblot sistemi	Bio-Rad
T-25 ve T-75 hücre kültürü flaskları	Nest
6 kuyucuklu steril hücre kültürü plaka	Nest
96 kuyucuklu steril hücre kültürü plaka	Nest
5, 10 ve 25 mL'lik steril serolojik pipetler	Nest
3 mL'lik steril pastör pipet	Isolab
15 ve 50 mL'lik steril falkon tüpler	Isolab
Çeşitli hacimlerde steril pipet uçları	Nest
1.5 mL'lik Eppendorf tüp	Kirgen
Mikrosantrifüj tüpü	Kirgen
Membran filtresi (0.2 µm)	Gvs Abluo
Çeşitli cam malzemeler	Isolab
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Cryo tüp	Nest
Steril hücre kaldırıcı	Greiner Bio-One
Nitroselüloz membran (0.45 µm)	Bio-Rad, 1620115
Whatman kağıdı 3 mm	Ge-Healthcares, 3030-861

3.1.2. Kullanılan Ticari Kitler, Antikorlar ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kitler, antikorlar ve kimyasallar üretici firmaları ile birlikte Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. Çalışmada kullanılan kitler, antikorlar ve kimyasallar ile üretici firmaları

Kullanılan kitler, antikorlar ve kimyasallar	Üretici Firma / Kod
Cell Counting Kit-8 (CCK-8)	Sigma Aldrich, 96992
LDH Cytotoxicity Detection Kit	Roche, 4744926001
Mouse IL-1 β ELISA kiti	Thermo Scientific, 88-7013-22
Mouse IL-18 ELISA kiti	Thermo Scientific, 88-50618-22
Propidyum iyodür (PI)	Abcam, ab219935
FAM-FLICA® Caspase-1 (YVAD) Assay	Abcam, ab219935
BCA protein miktar tayini kiti	Thermo Scientific, 23225
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad, 170-5060
Anti-I κ B α , Policlonal	Santa Cruz, sc-371
Anti-p-I κ B α , Policlonal	Santa Cruz, sc-101713
Anti-NF- κ B p65, Policlonal	Santa Cruz, sc-8008
Anti-NLRP3, Monoclonal	Abcam, ab263899
Anti-pro-Kaspaz-1, Monoclonal	AdipoGen, AG-20B-0042
Anti-Kaspaz-1 (p20), Monoclonal	AdipoGen, AG-20B-0042
Anti-GSDMD-N, Monoclonal	Abcam, ab219800
Anti-GSDMD, Monoclonal	Abcam, ab219800
Anti- β -Actin, Monoclonal	Cell Signaling Technology, 3700S
Goat Anti-Rabbit HRP	Bio-Rad, 170-5046
Goat Anti-Mouse HRP	Bio-Rad, 170-5047
Formoterol	Cayman Chemical, 15584
LPS	InvivoGen, tlrl-3pelps
ATP	Sigma-Aldrich, A26209
Dimetil sülfoksit (DMSO), cell culture grade	Genaxxon Bioscience, M6323.0100
RPMI 1640 besiyeri	Capricorn Scientific, RPMI-XA

Tablo 6. Çalışmada kullanılan kitler, antikorlar ve kimyasallar ile üretici firmaları (Devamı)

Kullanılan kitler, antikorlar ve kimyasallar	Üretici Firma / Kod
L-glutamin	Capricorn Scientific, GLN-B
Penisilin (100 U/mL)/Streptomisin (100 µg/mL)	Capricorn Scientific, PS-B
Trypsin/EDTA % 0.25 çözeltisi	Wisent Bio Products, 325-043-EL
Fetal bovine serum (FBS)	Capricorn Scientific, FBS-11A
Proteaz inhibitör kokteyli	Serva, SE3910201
Phosphate buffered saline (PBS) tablet	Thermo Scientific Oxoid™, BR0014G
Etanol (C ₂ H ₅ OH)	Sigma, 34870
Amonyumpersülfat (APS) (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Serva, 13375.05
Precision Plus Protein™ WesternC™ Blotting Standards	Bio-Rad, 1610374
Glisin	Serva, 23390.04
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Serva, 20765.01
% 40 Akrilamid/Bis Solüsyonu (29:1)	Serva, SE1068001
Dithiothreitol (DTT- C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	Sigma, D0632
RIPA Lysis and Extraction Buffer	Serva, 39244.01
Tris-baz	Sigma, T1503
Gliserol	Sigma, 49770
Bromfenol blue	Merck, 1.08122.005
İzopropanol	Labkim, P.0428.01.21
Trikloro asetik asit (TCA)	Merck, 1.00810.1000
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma, 27816
Metanol	Merck, 1.06009.2511
Asetik asit (CH ₃ COOH)	Sigma, 2722
N,N,N,N-Tetrametil etilen diamin (TEMED)	Serva, 35925.01
Sodyum klorür (NaCl)	Merck, 1.06400.5000
Tween-20	Merck, 8.22184.0500
Fosforik asit (H ₃ PO ₄)	Sigma, 04102
Yağsız süt tozu	Bağdat Baharat, 2495

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücrelerin Temin Edilmesi, Çalışmaların Gerçekleştirileceği Yer, Sterilizasyon ve Hücre Kültürü

N9 fare mikrogial hücre serisi, Dr. Paola Ricciardi-Castagnoli'nin (Cellular Pharmacology Center, Milano, İtalya) İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi (İBG) Genç Nörodejenerasyon ve Nöroproteksiyon Labortauvarı'na sağladığı hücrelerden temin edildi. Bu bağlamda, N9 fare mikrogia hücreleri İBG'den uygun koşullarda (kuru buz içerisinde) iki cryo tüp olarak tarafımıza ulaştırıldı. Ulaşmasının akabinde, cryo tüpler hemen azot buharına konuldu ve çalışma başlayana kadar azot tankında muhafaza edildi (135). N9 fare mikrogial hücre serisi, fare beyninden türetilmiştir ve primer fare mikrogia hücreleri ile birçok yönden benzerlik göstermektedir (136).

Tüm hücre kültürü uygulamaları, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı hücre kültürü laboratuvarındaki hücre kültürü kabininde (air flow kabin) steril çalışma ortamı sağlanarak yapıldı. Hücre kültürü çalışmalarına başlamadan önce hücre kültürü kabini ve deneyde kullanılacak gereçler % 70'lik etil alkol ile temizlendi. Ayrıca, ultraviyole (UV) ışıktan etkilenmeyen ve kabin içinde kullanılacak olan malzemeler kabin içine koyularak 15 dakika (dk) UV ışığa maruz bırakıldı. Çalışma tamamlandıktan sonra kabin % 70'lik etil alkol ile tekrar temizlendi. Kabinin kapağı kapatıldıktan sonra, hücre kültürü kabini ve hücre kültürü odası yeniden kullanıma hazır olması için 1 saat UV ışığa maruz bırakılarak sterilizasyon sağlandı.

Hücre kültürü çalışmalarında % 10 FBS, 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin, 2 mM L-glutamin içeren RPMI 1640 besiyeri (tam besiyeri) kullanıldı.

Tam besiyerinin hazırlanışı: Tam besiyeri, 50 mL'lik steril falkon tüpler içerisinde hazırlandı. Falkon tüpe ilk olarak belirli miktarda RPMI 1640 besiyeri ilave edildi. Ardından, tüpe yine belirli miktarlarda FBS, penisilin, streptomisin ve L-Glutamin eklendi. Hazırlanan tam besiyeri, vorteks cihazı kullanılarak homojen bir şekilde karıştırıldı. Homojen tam besiyeri hazırlandığı falkon tüp parafilm ile sarıldı ve 4 °C'ye kaldırıldı.

0.01 M PBS (pH 7.4) hazırlanışı: Bir behere yaklaşık 800 mL saf su koyuldu. Beherin içerisine 10 adet PBS tableti eklendi ve tabletler çözüldükten sonra çözeltinin pH'si, pH metre ile 7.4'e ayarlandı. Çözeltinin pH'si ayarlandıktan sonra hacmi balon joje ile 1 L'ye

tamamlandı. Son olarak çözelti otoklavlandı ve hücre kültürü çalışmalarına hazır hale getirildi.

Formoterol, LPS+ATP ile yapılan deneylerde içerisinde FBS olmayan, 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin ve 2 mM L-Glutamin olan RPMI 1640 hücre kültürü ortamı kullanıldı. Hücreler, deneye göre 75 cm²'lik flasklara (pasajlama), 6 veya 96 kuyucuklu plakalara (*in vitro* deneyler) ekildi; 37 °C ve % 5 CO₂ koşullarındaki inkübatörde inkübe edildi.

Deneylerin başlangıcında, cryo tüp içinde bulunan N9 fare mikroglia hücreleri azot buharından çıkarılmasının ardından 37 °C su banyosunda 5 dk bekletildi ve hücrelerin tamamının çözülmesi sağlandı. Sonrasında cryo tüp, 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve içerisindeki DMSO uzaklaştırıldı. Hücreler 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı ve hücrelerin üzerine 5 mL tam besiyeri ilave edildi. Hücre süspansiyonları 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüjün ardından süpernatant atıldı; tüpe 1 mL taze besiyeri eklendi ve hafif bir pipetaj işlemi ile hücre çökelekleri çözüldü. Çözülen hücrelerin üzerine 10 mL tam besiyeri eklendi ve hücreler T-75 kültür flasklarında 37 °C sıcaklıkta, % 5 CO₂ içeren steril inkübatörde çoğaltıldı.

Hücrelerin Pasajlanması, Sayılması ve Saklanması

Ekimi yapılan N9 fare mikroglia hücreleri, pasajlama işlemi öncesinde ters faz mikroskopla kontrol edildi. Çoğalan sağlıklı hücreler flask yüzeyinin % 70-80'lik bölümünü kaplamasının ardından hücre pasajlaması yapıldı. Pasajlama işleminde, flask yüzeyine tutunan hücrelerin üzerindeki besiyeri serolojik pipetle hücrelerin tutunduğu yüzey göz önüne alınarak dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Ardından, kalıntıları temizlemek için flask 5 mL PBS ile yıkandı ve PBS flasktan serolojik pipet ile uzaklaştırıldı. Daha sonra ise hücreleri flask yüzeyinden ayırmak için 2 mL % 0.25 Trypsin-EDTA çözeltisi, hücreler üzerine eklenerek flask 37 °C'de 5 dk inkübe edildi. Hücreler ters faz mikroskopta kontrol edildi; hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra tripsinizasyonu durdurmak için 5 mL tam besiyeri ilave edildi. Flasktan toplanan hücreler 15 mL'lik falkon tüpe alınarak 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Hücreler 10 mL tam besiyerinde süspansiyon edildi. Ardından hücre sayımı için hücre süspansiyonundan 100 µL mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve hücreler flow sitometre cihazı kullanılarak sayıldı. Hücreler sayıldıktan sonra gerekli hesaplamalar yapıldı ve gerekli yoğunluktaki (sayıdaki)

hücre, yapılacak deneydeki hücre miktarını içerecek şekilde ekildi. Eğer deney planlanmadıysa belirli miktarda hücre tekrar pasajlandı. Tüm pasajlamalarda hücre serisi, pasaj numarası ve tarih bilgileri flaskın üzerine yazıldı ve flask inkübatöre koyuldu.

3.2.2. Formoterol'ün Efektif Dozunun Bulunması

Deneyin başlangıcında Formoterol, DMSO ile çözülerek stok çözelti hazırlandı ve belirli miktarlarda alıktlandı. Alikotlanan Formoterol, literatürdeki dozlar göz önüne alınarak, içerisinde FBS olmayan besiyeri ile seyreltildi ve 10^{-3} - 10^{-10} M dozları arasında Formoterol çözeltileri hazırlandı (137-140).

Formoterol'ün farklı dozlarının hücre canlılığı üzerine olan bazal etkisi CCK-8 testi ile değerlendirildi. Akabinde, farklı dozlardaki Formoterol'ün hücreler üzerinde sitotoksosite göstermediği dozu bulabilmek için LDH testi uygulandı. Son olarak, Formoterol'ün toksik olmayan uygun dozları belirlendikten sonra, NLRP3 inflamazomunun aktif hale geldiğini belirten en önemli biyobelirteçlerden biri olan IL-1 β 'nın seviyeleri ELISA ile tespit edildi. Bu doğrultuda, sitotoksosite göstermeyen dozlar hücrelere uygulandı ve IL-1 β düzeylerini kontrol grubuna (bazal) en yakın hale getiren doz “efektif doz” olarak belirlendi. Sonraki tüm deneyler Formoterol'ün bu dozu kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.2.1. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Hücre canlılığı, bir örnekteki sağlıklı hücrelerin sayısı olarak tanımlanır. Hücre canlılığının belirlenmesi, tüm hücre kültürü çalışmaları için oldukça önemli bir aşamadır. Hücre canlılığı deneyleri esas olarak, hücrelerin bir ilaca veya bir kimyasal maddeye karşı tepkisini belirlemek için kullanılır. Araştırmacılar, hücreleri hedef alan bir terapötüğün hücre canlılığı sonucunu belirlemek için çeşitli testler kullanmaktadır. Bu bağlamda, Formoterol'ün farklı dozlarının hücre canlılığına etkisinin ölçülmesinde Cell Counting Kit-8 (CCK-8) testi kullanıldı. CCK-8 testi, suda yüksek oranda çözünür bir tuz olan 2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzunun indirgenmesiyle turuncu renkte ve suda çözünür bir formazan boyası üretmesi esasına dayanır. Bu reaksiyon, hücrel dehidrojenazlar vasıtasıyla gerçekleştirilir. Hücrelerde dehidrojenazların aktivitesi ile oluşan formazan boya miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır (141).

Deney başlangıç gününde (0. gün), pasajlama yapmak için uygun hale gelen hücrelere, “3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması, Sayılması ve Saklanması” başlığındaki

işlemler uygulandı. Sayımı yapılan hücreler 96 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde 200 µL tam besiyeri içinde ekildi. Her grup için 5 kuyucuğa hücre ekimi yapıldı.

Deney başlangıcından bir gün sonra (1. gün) ilk olarak tam besiyeri hazırlandı; 37 °C'ye ayarlanan su banyosu içinde ısıtıldı ve deneye hazır duruma getirildi. Sonrasında 96 kuyucuklu plaka inkübatörden alındı ve bütün besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Hemen ardından, aşağıda verilen işlemler gruplara uygulandı.

Kontrol grubu: Hücrelere 200 µL FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 6 saat inkübasyona bırakıldı.

Formoterol grubu: Hücrelere FBS içermeyen besiyeri içinde farklı dozlarda (10^{-3} - 10^{-10} M) Formoterol eklendi ve hücreler 6 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyonun ardından 96 kuyucuklu plaka inkübatörden alındı; kuyucuklardan 100 µL süpernatant LDH testi (3.2.3.1. Sitotoksitenin Değerlendirilmesi) için alındı ve farklı bir 96 kuyucuklu plakaya aktararak deney yapılana kadar 4 °C'de saklandı. Deneye ilk 96 kuyucuklu plakayla devam edildi ve hücre canlılığı kitin aşağıdaki protokölüne göre belirlendi:

- Her kuyucuğa 10 µL CCK-8 solüsyonu eklendi ve 2 saat inkübatörde inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından absorbans okuma işlemine geçildi ve absorbanslar mikropleyt okuyucuda 450 nm'de ve 620 nm referans dalga boyları kullanılarak okundu. Yüzde hücre canlılıkları aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$\% \text{ Hücre canlılığı} = (\text{Saptanan absorbans} / \text{Maksimum absorbans}) \times 100$$

Bu formülde “Saptanan absorbans” her bir örnek için ölçülen absorbansı temsil ederken, “maksimum absorbans” kontrol grubunda ölçülen absorbansların (5 adet) ortalamasını ifade etmektedir.

3.2.2.2. Sitotoksitenin Belirlenmesi

LDH, piroptoz ve diğer bazı hücre ölüm türlerinin tipik bir özelliği olan membran bütünlüğünün kaybı nedeniyle hücre kültürü ortamına salınan kararlı bir sitoplazmik enzimdir. Dolayısıyla LDH testi, hücrelerde sitotoksiteyi ve piroptozu saptamak için yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.

LDH testinin çalışma prensibi iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada, hücre süpernatantına salınan laktatı LDH piruvata yükseltger ve NAD^+ ı NADH^+/H^+ a indirger. İkinci aşamada ise, 2 hidrojen bir katalizör (diaforaz) tarafından NADH^+/H^+ dan sarı tetrazolyum tuzu INT'ye (2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-feniltetrazolyum klorür) aktarılır. Bu aktarımın sonucunda kırmızı renkli formazan tuzu oluşur. Süpernatandaki formazan miktarı, 490 nm'de ölçülen absorbans değerleri ile belirlenir ve bu değerler LDH miktarını temsil eder. LDH miktarı hücre hasarı ile doğru orantılıdır (142, 143). Formoterol'ün farklı dozlarının hücreler üzerinde gösterdiği sitotoksiteyi belirlemek için LDH testi kullanıldı.

Deney başlangıç gününde (0. gün), pasajlama yapmak için uygun hale gelen hücrelere, “3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması, Sayılması ve Saklanması” başlığındaki işlemler uygulandı. Sayımı yapılan hücreler 96 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde 200 μL tam besiyeri içinde ekildi. Her grup için 5 kuyucuğa hücre ekimi yapıldı. Üç farklı kuyucuğa ise kontrolü temsil etmesi için tam besiyeri eklendi. Ekimi yapılan 96 kuyucuklu plak inkübatöre kaldırıldı.

Deney başlangıcından bir gün sonra (1. gün) ilk olarak tam besiyeri hazırlandı; 37 °C'ye ayarlanan su banyosu içinde ısıtıldı ve deneye hazır duruma getirildi. Sonrasında 96 kuyucuklu plaka inkübatörden alındı ve bütün besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Hemen ardından, aşağıda verilen işlemler gruplara uygulandı.

Kontrol grubu: Hücrelere 200 μL FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 6 saat inkübasyona bırakıldı.

Formoterol grubu: Hücrelere FBS içermeyen besiyeri içinde farklı dozlarda (10^{-3} - 10^{-10} M) Formoterol eklendi ve hücreler 6 saat inkübasyona bırakıldı.

Maksimal salınım grubu: Kontrol grubundaki tüm işlemler bu gruba da uygulandı. Kontrol grubundan farklı olarak, hücreler deneyin sonuna doğru (son bir saat) lizis tamponu ile lizis edildi ve LDH testi için “maksimal ölüm” grubu oluşturuldu.

LDH salınımı için, kontrol grubu ve maksimal salınım grupları kullanıldı. Kontrol grubu yalnızca tam besiyerinden oluşturulurken, maksimal salınım grubunda hücreler deney sonunda (son bir saat) lizis tamponu ile lizis edildi ve LDH testi için maksimal ölüm grubu oluşturuldu. Kontrol grubu ve maksimal salınım grupları, Formoterol'ün hücreler üzerinde ne kadar sitotoksite gösterdiğinin hesaplanmasında kullanıldı.

İnkübasyon bitiminden sonra hücrelerden elde edilen süpernatantlardaki LDH miktarları, kitin aşağıdaki protokölüne göre belirlendi:

- Her bir örnekten 100 µL süpernatant 96 kuyucuklu steril hücre kültürü plağına yüklendi (“3.2.2.1. Hücre Canlılığının Belirlenmesi” kısmında yapıldı).
- Kitin içinde bulunan LDH deteksiyon solüsyonundan her kuyucuğa 100 µL eklendi; oda sıcaklığı ve karanlık ortamda 15 dk inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası örneklerin absorbansları 490 nm’de ve referans olarak da 620 nm dalga boylarında okundu. Tüm gruplar için yüzde sitotoksosite aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$\% \text{ Sitotoksosite} = (\text{Bulunan absorbans} - \text{Kontrol absorbans}) / (\text{Maksimal Salınım Absorbansı} - \text{Kontrol absorbansı}) \times 100$$

3.2.2.3. IL-1β Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi

Formoterol’ün farklı dozlarının IL-1β sitokin seviyelerine etkisi ticari sandwich ELISA kiti kullanılarak belirlendi.

Deney başlangıç gününde (0. gün), pasajlama yapmak için uygun hale gelen hücrelere, “3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması, Sayılması ve Saklanması” başlığındaki işlemler uygulandı. Sayımı yapılan hücreler 96 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 5×10^4 hücre olacak şekilde 200 µL tam besiyeri içinde ekildi. Her grup için 5 kuyucuğa hücre ekimi yapıldı.

Deney başlangıcından bir gün sonra (1. gün) ilk olarak tam besiyeri hazırlandı; 37 °C’ye ayarlanan su banyosu içinde ısıtıldı ve deneye hazır duruma getirildi. Sonrasında 96 kuyucuklu plaka inkübatörden alındı ve bütün besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Hemen ardından, aşağıda verilen işlemler gruplara uygulandı.

Kontrol grubu: İlk olarak hücrelere 100 µL FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 µL FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyon ardından, hücrelere 50 µL FBS içermeyen besiyeri konuldu ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

LPS + ATP grubu: İlk olarak hücrelere 100 µL FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 µL hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 3 µg/mL LPS (son konsantrasyon: 1 µg/mL) verildi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 µL hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 20 mM ATP (son konsantrasyon: 5 mM) ve 1 µg/mL LPS verildi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

Formoterol + LPS + ATP grubu: İlk olarak hücrelere 100 µL FBS içermeyen besiyeri içinde farklı dozlarda (10^{-3} - 10^{-10} M) Formoterol eklendi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 µL hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 3 µg/mL LPS (son konsantrasyon: 1 µg/mL) ve farklı dozlarda (10^{-3} - 10^{-10} M) Formoterol verildi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 µL hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 20 mM ATP (son konsantrasyon: 5 mM), 1 µg/mL LPS ve farklı dozlarda (10^{-3} - 10^{-10} M) Formoterol verildi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

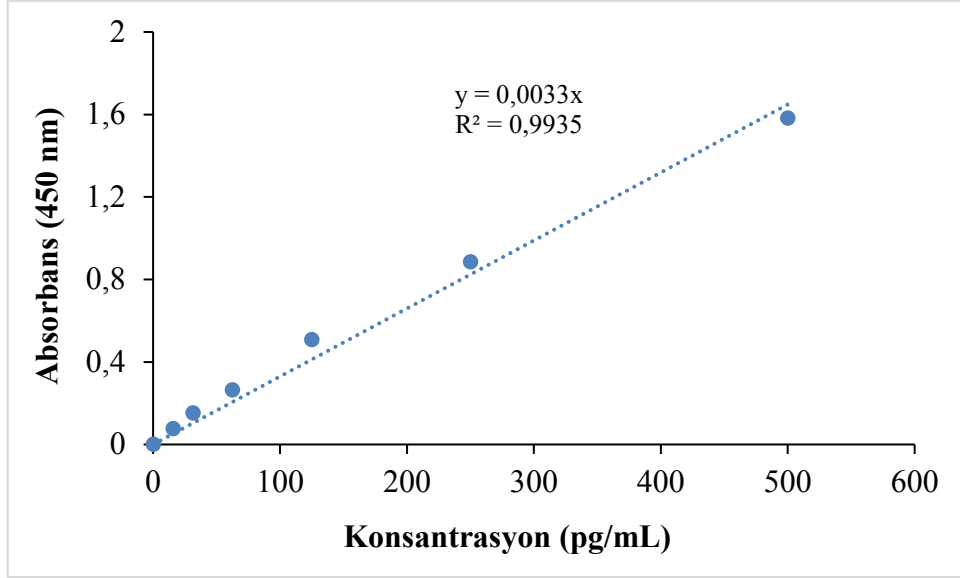
İnkübasyon işleminin hemen ardından, hücre kültürü süpernatantları alındı ve çözünmeyen materyali uzaklaştırmak için 10.000 g'de, 4 °C'de 5 dk santrifüj edildi. Oluşan süpernatantlarındaki IL-1β seviyeleri aşağıda belirtilen şekilde saptandı:

IL-1β Denevi

1. Corning™ Costar™ 9018 ELISA plakası 100 µL Capture Antibody ile kaplandı. Plaka membran ile kapatılarak gece boyunca 4 °C'de inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonrasında plakadaki her bir kuyucuk aspire edildi ve yıkama tamponu ile 3 kez yıkama işlemi yapıldı.
3. Yıkama işleminin ardından her bir kuyucuğa bloklama için 200 µL ELISA/ELISPOT Diluent (1X) eklendi ve plaka bir membranla kaplanarak oda sıcaklığında çalkalayıcı cihazda 1 saat inkübe edildi.
4. İnkübasyonun ardından plakadaki her bir kuyucuk aspire edildi ve yıkama tamponu ile en az 1 kez yıkama işlemi yapıldı.
5. IL-1β standartları kit prosedürüne uygun olarak hazırlandı. Standart kuyucuklarına 100 µL standart, kör kuyucuğuna 100 µL ELISA/ELISPOT Diluent (1X) ve numune kuyucuklarına 100 µL numune eklendi. Plaka bir membran ile kapatılarak gece boyunca 4 °C'de inkübe edildi.

6. İnkübasyon sonrasında plakadaki her bir kuyucuk aspire edildi ve yıkama tamponu ile 5 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi.
7. Yıkama işleminin sonrasında tüm kuyucuklara 100 µL Detection Antibody çözeltisi ilave edildi ve plaka bir membranla kaplanarak oda sıcaklığında çalkalayıcı cihazda 1 saat inkübe edildi.
8. İnkübasyonun ardından plakadaki her bir kuyucuk aspire edildi ve yıkama tamponu ile 5 kez yıkama işlemi yapıldı.
9. Yıkama işleminin ardından her bir kuyucuğa 100 µL Streptavidin-HRP çözeltisi eklendi. Plaka, tekrar membranla kaplandı ve oda sıcaklığında çalkalayıcıda 30 dk inkübasyona bırakıldı.
10. İnkübasyon sonrasında plakadaki her bir kuyucuk aspire edildi ve yıkama tamponu ile 7 kez yıkama işlemi yapıldı.
11. Her bir kuyucuğa 100 µL 1X TMB Solution çözeltisi eklendi ve plaka bir membran ile kapatılarak oda sıcaklığında çalkalayıcıda ışıktan korunarak 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
12. İnkübasyonun ardından her bir kuyucuğa 100 µL renklenmeyi durdurma çözeltisi (stop solution) eklendi ve numunelerin renginin sarıya döndüğü gözlemlendi.
13. Örneklerin absorbansları 450 nm dalga boyuna ayarlanan mikropate okuyucu ile belirlendi. Sonuçlar pg/mL olarak verildi.

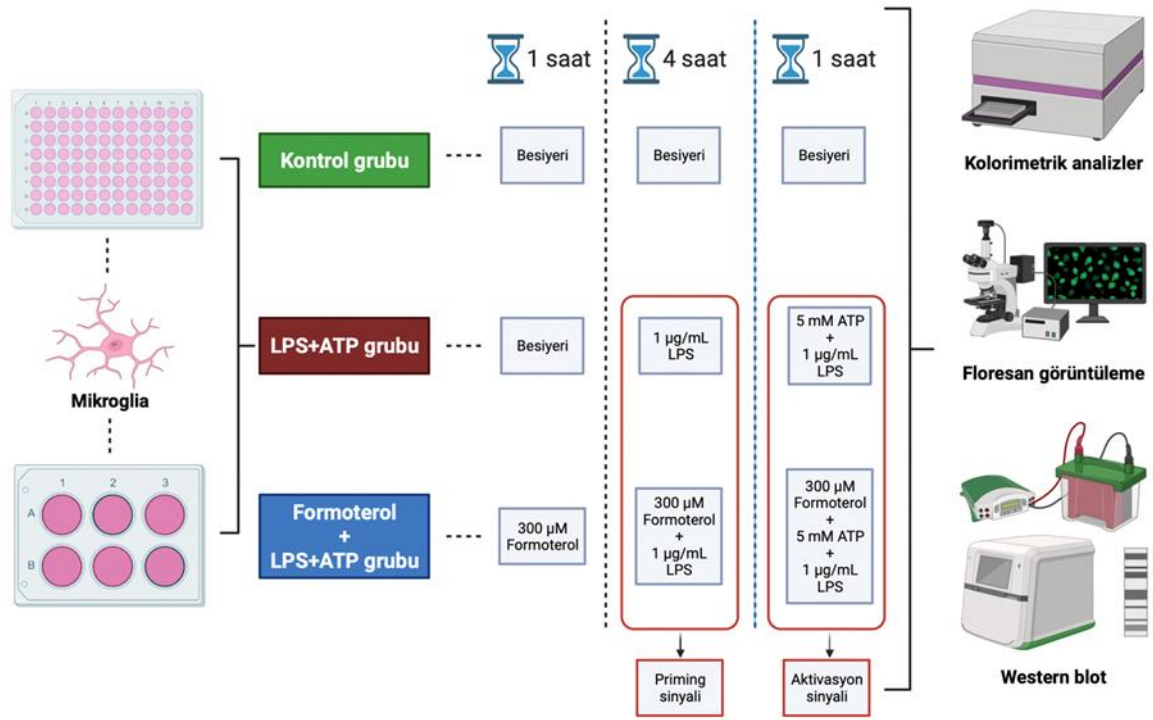
ELISA kitinin içindeki 1000 pg/mL konsantrasyonundaki IL-1 β stok standardından kitin tavsiyeleri doğrultusunda seri dilüsyon ile eppendorf tüplerde 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ve 15.625 pg/mL'lik standart çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltiler (stok standart dahil) çalışmada kullanıldı. Standart çözeltilerinden elde edilen verilerle standart grafiği oluşturuldu. Bu grafik kullanılarak IL-1 β miktarları pg/mL olarak belirlendi. IL-1 β standart grafiği Şekil 6'da verilmiştir.



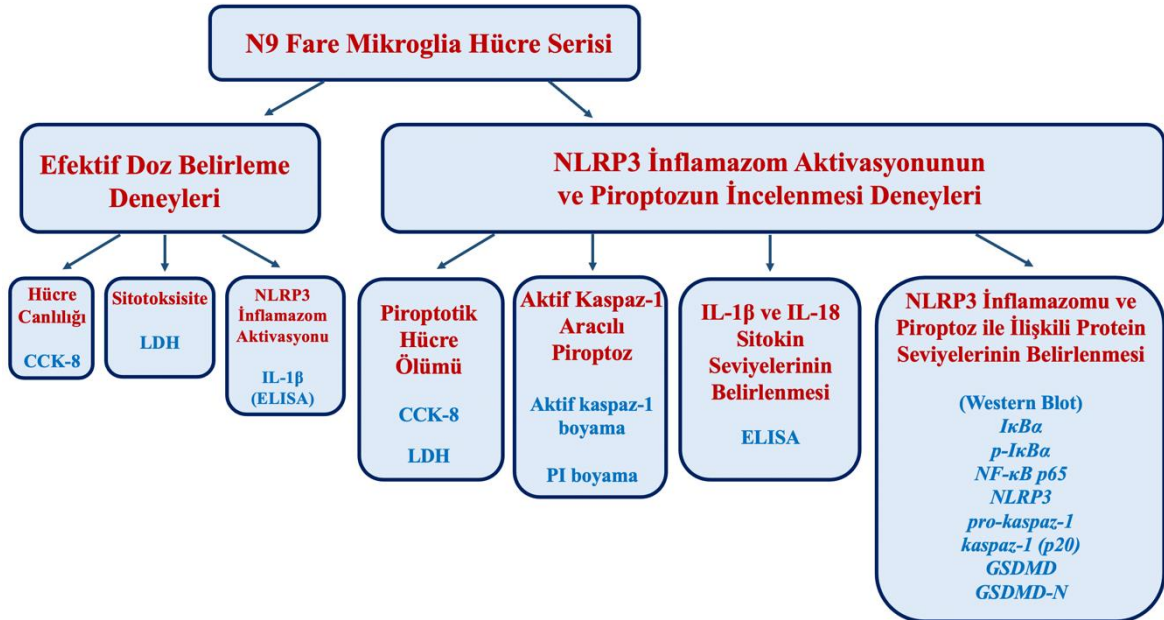
Şekil 6. IL-1 β standart grafiği

3.2.3. Formoterol'ün NLRP3 İnflamazomu ve Piroptoz Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Formoterol'ün efektif dozunun NLRP3 inflamazomu ve piroptoz üzerine etkisinin belirlenmesi için farklı yöntemler kullanılarak deneyler yapıldı. Bu bağlamda ilk olarak piroptotik hücre ölümünü belirlemek için CCK-8 ve LDH testlerinden faydalandı. Ardından yine piroptotik hücre ölümünün belirlenmesi için aktif kaspaz-1 ve propidyum iyodür (PI) boyama yöntemleri kullanıldı. Sonrasında NLRP3 inflamazom aktivasyonu sonucunda seviyeleri artan IL-1 β ve IL-18 düzeyleri ELISA ile belirlendi. Son olarak NLRP3 inflamazomu ve piroptoz yolağında görev alan proteinlerin seviyeleri western blot yöntemiyle saptandı. İlgili deneylerde uygulanan işlemler ve gerçekleştirilen analizler Şekil 7'de verilmiştir. Ayrıca deneylerin yapılış amaçları ve kullanılan yöntemler Şekil 8'de özetlenmiştir.



Şekil 7. Deneylerde uygulanan işlemler ve gerçekleştirilen analizler



Şekil 8. Deneylerin yapılış amaçları ve kullanılan yöntemler

3.2.3.1. Piroptotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi

Formoterol'ün piroptotik hücre ölümüne etkisinin belirlenmesi için, hücrelerde LPS+ATP ile oluşturulan NLRP3 inflamazomu aktivasyonundan sonra, CCK-8 ve LDH testleri kullanıldı.

CCK-8 Testi

“3.2.2.1. Hücre Canlılığının Belirlenmesi” başlığında belirtilen tüm işlemler ve hesaplamalar aynı şekilde aşağıda belirtilen gruplara uygulandı:

Kontrol grubu: İlk olarak hücrelere 100 µL FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 µL FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyon ardından, hücrelere 50 µL FBS içermeyen besiyeri konuldu ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

LPS + ATP grubu: İlk olarak hücrelere 100 µL FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 µL hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 3 µg/mL LPS (son konsantrasyon: 1 µg/mL) verildi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 µL hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 20 mM ATP (son konsantrasyon: 5 mM) ve 1 µg/mL LPS verildi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

Formoterol + LPS + ATP grubu: İlk olarak hücrelere 100 µL FBS içermeyen besiyeri içinde 300 µM Formoterol eklendi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 µL hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 3 µg/mL LPS (son konsantrasyon: 1 µg/mL) ve 300 µM Formoterol verildi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 µL hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 20 mM ATP (son konsantrasyon: 5 mM), 1 µg/mL LPS ve 300 µM Formoterol verildi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

100 µL süpernatant LDH testi (Piroptotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi) için alındı ve farklı bir 96 kuyucuklu plakaya aktarılarak deney yapılana kadar 4 °C’de saklandı.

LDH Testi

“3.2.2.2. Sitotoksitenin Belirlenmesi” başlığında belirtilen tüm işlemler ve hesaplamalar aynı şekilde aşağıda belirtilen gruplara uygulandı:

Kontrol grubu: İlk olarak hücrelere 100 μ L FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 μ L FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyon ardından, hücrelere 50 μ L FBS içermeyen besiyeri konuldu ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

LPS + ATP grubu: İlk olarak hücrelere 100 μ L FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 μ L hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 3 μ g/mL LPS (son konsantrasyon: 1 μ g/mL) verildi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 μ L hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 20 mM ATP (son konsantrasyon: 5 mM) ve 1 μ g/mL LPS verildi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

Formoterol + LPS + ATP grubu: İlk olarak hücrelere 100 μ L FBS içermeyen besiyeri içinde 300 μ M Formoterol eklendi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 μ L hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 3 μ g/mL LPS (son konsantrasyon: 1 μ g/mL) ve 300 μ M Formoterol verildi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 μ L hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 20 mM ATP (son konsantrasyon: 5 mM), 1 μ g/mL LPS ve 300 μ M Formoterol verildi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

Maksimal salınım grubu: Kontrol grubundaki tüm işlemler bu gruba da uygulandı. Kontrol grubundan farklı olarak, hücreler deneyin sonuna doğru (son bir saat) lizis tamponu ile lizis edildi ve LDH testi için “maksimal ölüm” grubu oluşturuldu.

3.2.3.2. Aktif Kaspaz-1 Aracılı Piroptozun Belirlenmesi

NLRP3 inflamazom aktivasyonu sonucunda kaspaz-1 aktive olur ve piroptotik hücre ölümü teşvik edilir. Aktif kaspaz-1 boyama kiti, canlı hücrelerde kaspaz-1 aktivasyonunu ölçmek için kullanılan hassas florometrik bir testtir. Kitin içindeki FAM-YVAD-FMK, hücre membranını geçebilen bir maddedir ve canlı hücrelerin içine girerek verimli bir şekilde yayılabilir. FAM-YVAD-FMK, hücre içinde aktif kaspaz-1 enzimi ile karşılaştığında ona geri dönüşümsüz olarak bağlanır ve yeşil floresan ışımaya yapar. FAM-YVAD-FMK

sinyalinin floresan yoğunluğu, aktif kaspaz-1 miktarı ile doğru orantılıdır (144-146). Formoterol'ün aktif kaspaz-1 miktarına etkisinin değerlendirilmesinde aktif kaspaz-1 boyama kiti kullanıldı.

Deney başlangıç gününde (0. gün), pasajlama yapmak için uygun hale gelen hücrelere, “3.2.1.4. Hücrelerin Pasajlanması, Sayılması ve Saklanması” başlığındaki işlemler uygulandı. Sayımı yapılan hücreler 96 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 3×10^5 hücre olacak şekilde 200 μ L tam besiyeri içinde ekildi. Her grup için 5 kuyucuğa hücre ekimi yapıldı.

Deney başlangıcından bir gün sonra (1. gün) ilk olarak tam besiyeri hazırlandı; 37 °C'ye ayarlanan su banyosu içinde ısıtıldı ve deneye hazır duruma getirildi. Sonrasında 96 kuyucuklu plaka inkübatörden alındı ve bütün besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Hemen ardından, aşağıda verilen işlemler gruplara uygulandı.

Kontrol grubu: İlk olarak hücrelere 100 μ L FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 μ L FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 μ L FBS içermeyen besiyeri konuldu ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

LPS + ATP grubu: İlk olarak hücrelere 100 μ L FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 μ L hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 3 μ g/mL LPS (son konsantrasyon: 1 μ g/mL) verildi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 μ L hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 20 mM ATP (son konsantrasyon: 5 mM) ve 1 μ g/mL LPS verildi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

Formoterol + LPS + ATP grubu: İlk olarak hücrelere 100 μ L FBS içermeyen besiyeri içinde 300 μ M Formoterol eklendi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 μ L hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 3 μ g/mL LPS (son konsantrasyon: 1 μ g/mL) ve 300 μ M Formoterol verildi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 μ L hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 20 mM ATP (son konsantrasyon: 5 mM), 1 μ g/mL LPS ve 300 μ M Formoterol verildi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

Bu işlemlerden sonra hücrelerde kaspaz-1 aktivitesi, kitin aşağıdaki protokolüne göre belirlendi:

- Hücreler 200 µL yıkama tamponuyla 2 kez yıkandı.
- Hücrelere 150 µL yıkama tamponu, 1 µL kaspaz-1 saptama probu (FAM-YVAD-FMK) ve 0.3 µL 500X Hoechst eklendi. Hücreler 60 dk inkübatörde inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından, hücrelerin medyumunu uzaklaştırıldı ve yıkama tamponu ile 2 kez yıkandı.
- Yıkama işleminin ardından hücreler, 100 µL yıkama tamponuyla süspanse edildi.
- Hücreler uygun filtreler (FAM-YVAD-FMK: yeşil/FITC; Hoechst: mavi/DAPI kanalı) kullanılarak floresan mikroskobu ile analiz edildi.

3.2.3.3. PI Boyama ile Piroptozun Belirlenmesi

Piroptozda kaspaz-1 aktivitesine bağlı olarak, membranda oluşan 1-2 nm'lik gözenekler, küçük molekül ağırlıklı moleküllerin piroptotik hücrelere kolayca girip hücreleri boyamasına neden olur. PI bu amaçla kullanılan, DNA'nın her dört ila beş baz çiftine bağlanabilen floresan bir boyadır ve piroptotik hücrelerin kırmızıya boyanmasını sağlar. PI, canlı hücrelerde membranı geçememesi sebebiyle DNA'ya bağlanamaz. Bundan dolayı PI, ölü hücrelerin tanımlanmasına olanak sağlar (106, 147). Formoterol'ün hücre ölümüne etkisinin belirlenmesinde PI boyası kullanıldı.

Deney başlangıç gününde (0. gün), pasajlama yapmak için uygun hale gelen hücrelere, “3.2.1.4. Hücrelerin Pasajlanması, Sayılması ve Saklanması” başlığındaki işlemler uygulandı. Sayımı yapılan hücreler 96 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 3×10^5 hücre olacak şekilde 200 µL tam besiyeri içinde ekildi. Her grup için 5 kuyucuğa hücre ekimi yapıldı.

Deney başlangıcından bir gün sonra (1. gün) ilk olarak tam besiyeri hazırlandı; 37 °C'ye ayarlanan su banyosu içinde ısıtıldı ve deneye hazır duruma getirildi. Sonrasında 96 kuyucuklu plaka inkübatörden alındı ve bütün besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Hemen ardından, aşağıda verilen işlemler gruplara uygulandı.

Kontrol grubu: İlk olarak hücrelere 100 µL FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 µL FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyon

ardından, hücrelere 50 µL FBS içermeyen besiyeri konuldu ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

LPS + ATP grubu: İlk olarak hücrelere 100 µL FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 µL hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 3 µg/mL LPS (son konsantrasyon: 1 µg/mL) verildi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 µL hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 20 mM ATP (son konsantrasyon: 5 mM) ve 1 µg/mL LPS verildi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

Formoterol + LPS + ATP grubu: İlk olarak hücrelere 100 µL FBS içermeyen besiyeri içinde 300 µM Formoterol eklendi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 µL hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 3 µg/mL LPS (son konsantrasyon: 1 µg/mL) ve 300 µM Formoterol verildi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 50 µL hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 20 mM ATP (son konsantrasyon: 5 mM), 1 µg/mL LPS ve 300 µM Formoterol verildi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

Bu işlemlerden sonra deneye, kitin aşağıdaki protokolü ile devam edildi:

- Hücreler 200 µL yıkama tamponuyla 2 kez yıkandı.
- Hücrelere 150 µL yıkama tamponu ve 1.8 µL 500X PI eklendi. Hücreler 60 dk inkübatörde inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından, hücrelerin medyumunu uzaklaştırıldı ve yıkama tamponu ile 2 kez yıkandı.
- Yıkama işleminin ardından hücreler, 100 µL yıkama tamponuyla süspanse edildi.
- Hücreler Texas Red (kırmızı) filtre kullanılarak floresan mikroskobu ile analiz edildi.
- Her kuyucuktan 20X'te 5 bölgenin fotoğrafı alındı. Bu fotoğraflarda PI pozitif hücreler ImageJ programı ile sayıldı. Veriler toplam hücrelerin yüzdesi olarak ifade edildi.

3.2.3.4. IL-1β ve IL-18 Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi

NLRP3 inflamazom aktivasyonu sonucu oluşan IL-1β ve IL-18 sitokin düzeyleri ticari sandwich ELISA kitleri kullanılarak belirlendi.

Deney başlangıç gününde (0. gün), pasajlama yapmak için uygun hale gelen hücrelere, “3.2.1.4. Hücrelerin Pasajlanması, Sayılması ve Saklanması” başlığındaki

işlemler uygulandı. Sayımı yapılan hücreler 96 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 5×10^4 hücre olacak şekilde 200 µL tam besiyeri içinde ekildi. Her grup için 5 kuyucuğa hücre ekimi yapıldı.

Deney başlangıcından bir gün sonra (1. gün) ilk olarak tam besiyeri hazırlandı; 37 °C'ye ayarlanan su banyosu içinde ısıtıldı ve deneye hazır duruma getirildi. Sonrasında 96 kuyucuklu plaka inkübatörden alındı ve bütün besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Hemen ardından, aşağıda verilen işlemler gruplara uygulandı.

Kontrol grubu: İlk olarak hücelere 100 µL FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından, hücelere 50 µL FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyon ardından, hücelere 50 µL FBS içermeyen besiyeri konuldu ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

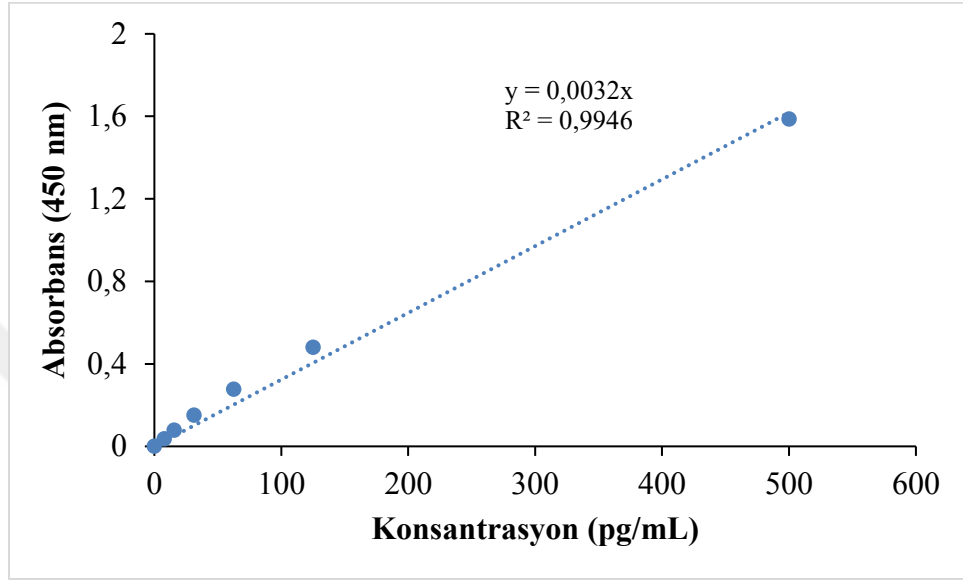
LPS + ATP grubu: İlk olarak hücelere 100 µL FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından, hücelere 50 µL hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 3 µg/mL LPS (son konsantrasyon: 1 µg/mL) verildi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyonun ardından, hücelere 50 µL hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 20 mM ATP (son konsantrasyon: 5 mM) ve 1 µg/mL LPS verildi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

Formoterol + LPS + ATP grubu: İlk olarak hücelere 100 µL FBS içermeyen besiyeri içinde 300 µM Formoterol eklendi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından, hücelere 50 µL hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 3 µg/mL LPS (son konsantrasyon: 1 µg/mL) ve 300 µM Formoterol verildi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyonun ardından, hücelere 50 µL hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 20 mM ATP (son konsantrasyon: 5 mM), 1 µg/mL LPS ve 300 µM Formoterol verildi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon işleminin hemen ardından, hücre kültürü süpernatantları alındı ve çözünmeyen materyali uzaklaştırmak için 10.000 g'de, 4 °C'de 5 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlardaki IL-1β ve IL-18 seviyeleri aşağıda belirtilen şekilde saptandı:

IL-1 β Deneyi

İnterlökin-1 β seviyeleri, “3.2.2.3. IL-1 β Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi” başlığında, “IL-1 β Deneyi” kısmında belirtilen şekilde tespit edildi. IL-1 β standart grafiği Şekil 9’da verilmiştir.



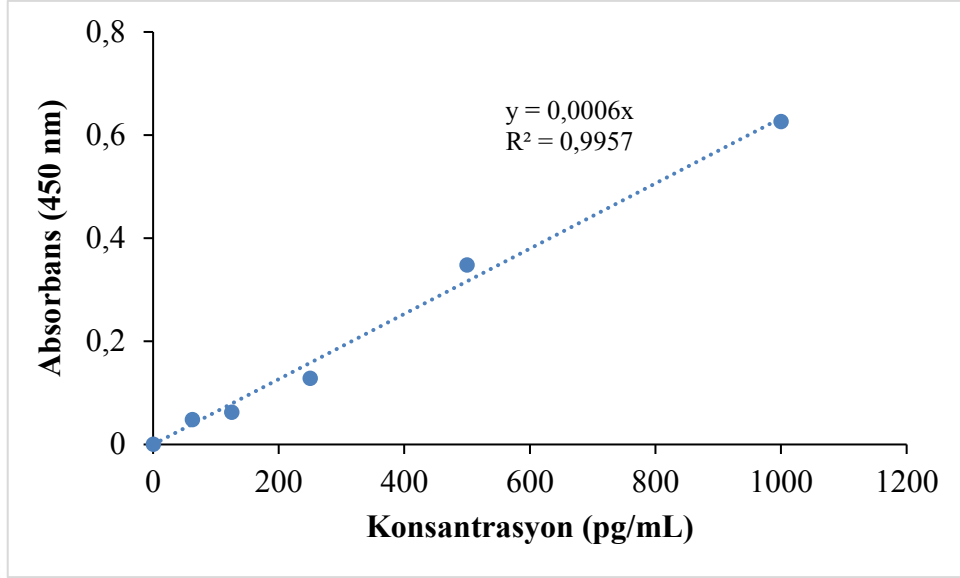
Şekil 9. IL-1 β standart grafiği

IL-18 Deneyi

1. Corning™ Costar™ 9018 ELISA plakası 100 μ L Capture Antibody ile kaplandı. Plaka membran ile kapatılarak gece boyunca 4 °C'de inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonrasında plakadaki her bir kuyucuk aspire edildi ve yıkama tamponu ile 2 kez yıkama işlemi yapıldı.
3. Yıkama işleminin ardından her bir kuyucuğa bloklama için 250 μ L Blocking Buffer eklendi ve plaka bir membranla kaplanarak oda sıcaklığında çalkalayıcı cihazda 2 saat inkübe edildi.
4. İnkübasyonun ardından plakadaki her bir kuyucuk aspire edildi ve yıkama tamponu ile 2 kez yıkama işlemi yapıldı.
5. IL-18 standartları kit prosedürüne uygun olarak hazırlandı. Standart kuyucuklarına 100 μ L standart, kör kuyucuğuna 100 μ L Sample Diluent C eklendi. Numune kuyucuklarına ise 50 μ L Sample Diluent C ve 50 μ L numune eklendi.

6. Hemen ardından tüm kuyucuklara 50 µL Detection Antibody çözeltisi eklendi ve plaka bir membranla kaplanarak oda sıcaklığında çalkalayıcı cihazda 2 saat inkübe edildi.
7. İnkübasyonun ardından plakadaki her bir kuyucuk aspire edildi ve yıkama tamponu ile 3 kez yıkama işlemi yapıldı.
8. Yıkama işleminin ardından her bir kuyucuğa 100 µL Streptavidin-HRP çözeltisi eklendi. Plaka, tekrar membranla kapatıldı ve oda sıcaklığında çalkalayıcı cihazda 1 saat inkübe edildi.
9. İnkübasyonun ardından plakadaki her bir kuyucuk aspire edildi ve yıkama tamponu ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi.
10. Her bir kuyucuğa 100 µL Substrate Solution çözeltisi ilave edildi ve plaka bir membran ile kapatılarak oda sıcaklığında çalkalayıcıda ışıktan korunarak 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
11. İnkübasyonun ardından her bir kuyucuğa 100 µL renklenmeyi durdurma çözeltisi (stop solution) eklendi ve örneklerin renginin sarıya dönüştüğü gözlemlendi.
12. Örneklerin absorbansları 450 nm dalga boyuna ayarlanan mikropate okuyucu ile belirlendi. Sonuçlar pg/mL olarak verildi.

ELISA kitinin içindeki 4000 pg/mL konsantrasyonundaki IL-18 stok standardından kitin tavsiyeleri doğrultusunda seri dilüsyon ile eppendorf tüplerde 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5 ve 31.25 pg/mL'lik standart çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltiler (stok standart dahil) çalışmada kullanıldı. Standart çözeltilerinden elde edilen verilerle standart grafiği oluşturuldu. Bu grafik kullanılarak IL-18 miktarları pg/mL olarak belirlendi. IL-18 standart grafiği Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 10. IL-18 standart grafiği

3.2.3.5. NLRP3 İnflamazomu ve Piroptoz ile İlişkili Protein Seviyelerinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi

NLRP3 inflamazom ve piroptoz yolağındaki I κ B α , p-I κ B α ve NF- κ B p65, NLRP3, pro-kaspaz-1, kaspaz-1 (p20), GSDMD ve GSDMD-N protein seviyelerini belirlemek amacıyla western blot yöntemi kullanıldı. Western blot, bir numunedeki proteinlerin miktarını ve türünü belirlemek için kullanılan hassas bir tekniktir ve yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır. İlgilenilen bir proteinin örnekteki varlığı veya yokluğunu ve aynı örnekten alınan farklı gruplar arasındaki protein miktarını karşılaştırarak göreceli (yarı kantitatif) bir değerlendirme yapmayı sağlar (148, 149).

Total Hücresel Proteinlerin ve Hücre Kültürü Süpernatant Proteinlerinin Elde Edilmesi

Deney başlangıç gününde (0. gün), pasajlama yapmak için uygun hale gelen hücrelere, “3.2.1.4. Hücrelerin Pasajlanması, Sayılması ve Saklanması” başlığındaki işlemler uygulandı. Sayımı yapılan hücreler 6 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 1×10^6 hücre olacak şekilde 2 mL tam besiyeri içinde ekildi. Her grup için 5 kuyucuğa hücre ekimi yapıldı.

Deney başlangıcından bir gün sonra (1. gün) ilk olarak tam besiyeri hazırlandı; 37 °C’ye ayarlanan su banyosu içinde ısıtıldı ve deneye hazır duruma getirildi. Sonrasında 6

kuyucuklu plaka inkübatörden alındı ve bütün besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Hemen ardından, aşağıda verilen işlemler gruplara uygulandı.

Kontrol grubu: İlk olarak hücrelere 1 mL FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 500 µL FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyon ardından, hücrelere 500 µL FBS içermeyen besiyeri konuldu ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

LPS + ATP grubu: İlk olarak hücrelere 1 mL FBS içermeyen besiyeri eklendi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 500 µL hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 3 µg/mL LPS (son konsantrasyon: 1 µg/mL) verildi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 500 µL hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 20 mM ATP (son konsantrasyon: 5 mM) ve 1 µg/mL LPS verildi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

Formoterol + LPS + ATP grubu: İlk olarak hücrelere 1 mL FBS içermeyen besiyeri içinde 300 µM Formoterol eklendi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 500 µL hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 3 µg/mL LPS (son konsantrasyon: 1 µg/mL) ve 300 µM Formoterol verildi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatlik inkübasyonun ardından, hücrelere 500 µL hacminde FBS içermeyen besiyeri içinde 20 mM ATP (son konsantrasyon: 5 mM), 1 µg/mL LPS ve 300 µM Formoterol verildi ve hücreler 1 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon bitiminden sonra total hücresel proteinlerin elde edilmesi için, hücrelere proteaz inhibitörü içeren 300 µL RIPA lizis tamponu (50 mM Tris-HCL, pH 7.4, 150 mM NaCl, % 0.25 deoksikolik asit, % 1 Nonidet P-40, 1 mM EDTA) eklendi ve hücreler plakadan hücre kaldırıncılar kullanılarak kaldırıldı. Hücreler eppendorf tüplere aktararak 15 dk buz üzerinde bekletildi. Sonrasında 20.000 g'de, 4 °C'de 25 dk santrifüj edilerek protein elde edildi.

Hücre kültürü süpernatant proteinlerinin elde edilmesi için, metanol/kloroform çöktürme yöntemi uygulanarak izole etme işlemi gerçekleştirildi. Bunun için Eppendorf'a 500 µL süpernatant için 500 µL metanol ve 100 µL kloroform ilavesi yapıldı. Süpernatant karışımı 13.000 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve karışımdan süpernatantlar çıkarıldı. Kalan kısma tekrar 500 µL metanol ilavesi yapıldı ve 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi tekrar

yapıldı. Sonrasında kalan pellet proteaz inhibitörü içeren 300 µL RIPA lizis tamponu (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, % 0.25 deoksikolik asit, % 1 Nonidet P-40, 1 mM EDTA) ile yeniden süspanse edildi ve eppendorf tüplere aktararak 15 dk buz üzerinde bekletildi. Sonrasında 20.000 g'de, 4 °C'de 25 dk santrifüj edilerek protein elde edildi. Deneyler gerçekleştirilene kadar -80 °C derin dondurucuda muhafaza edildi.

Protein Miktar Tayini

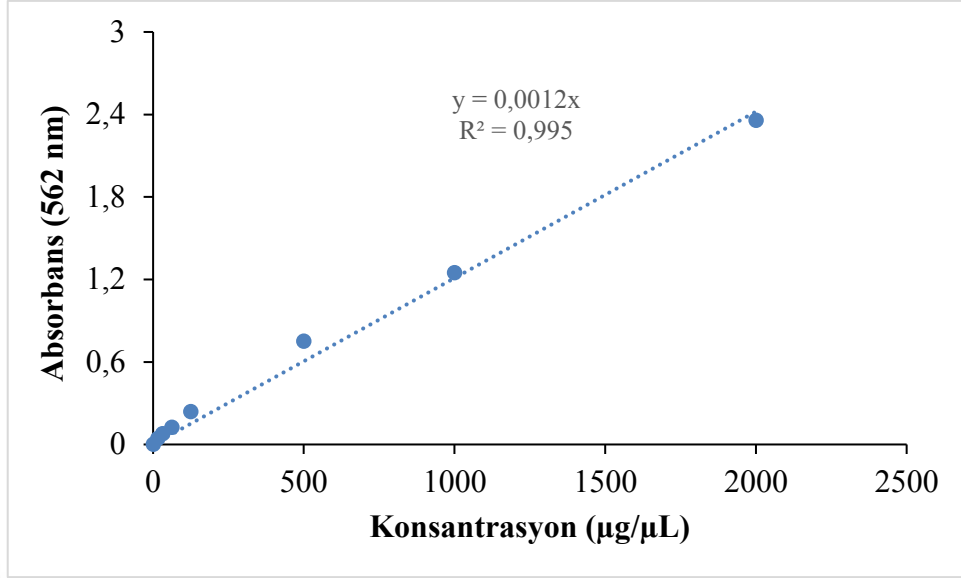
Total hücre lizati ve hücre kültürü süpernatant proteinleri elde edildikten sonra konsantrasyonları bikinkoninik asit (BCA) yöntemi kullanılarak analiz edildi. Bu yöntem, alkali ortamda mevcut proteinler tarafından Cu^{2+} 'nin Cu^{1+} 'e indirgenmesi esasına dayanır. Oluşan bakır katyonunun (Cu^{1+}) BCA ile reaksiyona girmesiyle kolorimetrik tayin gerçekleştirilir (150).

Çözeltilerin Hazırlanması

BCA working reagent: Her bir örnek için 50:1 oranında BCA Reagent A ve B karıştırılarak BCA working reagent hazırlandı.

Standartların hazırlanması: Çalışmada 2 mg/mL konsantrasyonda albümin standardı kullanıldı. 2 mg/mL konsantrasyonundaki albümin stok standardından seri dilüsyon ile 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.90 ve 1.95 mg/mL'lik standart çözeltileri hazırlandı. Standart çözeltilerinden elde edilen verilerle standart grafiği çizildi. Bu grafik kullanılarak protein miktarları µg/µL olarak belirlendi.

Standart, kör ve numune kuyucuklarına 25'er µL eklendi. Hemen ardından tüm kuyucuklara 200 µL BCA working reagent eklendi ve plaka bir membran ile kapatılarak 37°C'ye ayarlı çalkalayıcı inkübatörde 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından standartların ve örneklerin absorbansları 562 nm'de okundu. Şekil 11'de standart grafiği verilmiştir.



Şekil 11. Total hücre lizatlarında ve hücre kültürü süpernatantlarında protein miktarını hesaplamak için kullanılan standart grafiği

SDS- PAGE ve Western Blot

SDS-PAGE

Kullanılan Çözeltiler

Ayırma Jel Tamponu (1.5 M Tris-HCl pH 8.8): 181.71 g Tris 800 mL deiyonize su içerisinde çözöldü, pH 8.8'e ayarlandı, toplam hacim 1 L'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Yükleme Jel Tamponu (0.5 M Tris-HCl pH 6.8): 60.57 g Tris 800 mL deiyonize su içerisinde çözöldü, pH 6.8'e ayarlandı toplam hacim 1 L'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

% 10 (w/v) Sodyum Dodesil Sulfat (SDS): 5 g SDS 50 mL deiyonize su içerisinde çözöldü oda sıcaklığında saklandı.

% 10 (w/v) Amonyum Persölfat (APS): 100 mg APS 1 mL deiyonize su içerisinde çözöldü. Bu çözelti ihtiyaca göre taze hazırlanmalıdır.

5X SDS PAGE Numune Yükleme Tamponu: 0.67 mL yükleme tamponu, 5 mL gliserol, 0.5 g SDS, 1 mg bromfenol mavisi, 2 mL deiyonize su içerisinde çözöldü ve -20 °C'de saklandı. Kullanmadan önce 77 mg DTT eklendi.

SDS-PAGE Yürütme Tamponu (10 X): 30.3 g Tris-HCl, 144 g glisin ve 10 g SDS (% 0,1 w/v) 1 L deiyonize su içerisinde çözülerek oda sıcaklığında saklandı. Deneyde kullanılacak olan SDS-PAGE yürütme tamponu 1X olacak şekilde seyreltilti.

3.2.3.5. bölümünde elde edilen total protein, SDS-PAGE aşaması Laemmli tarafından belirtilen yöntemle gerçekleştirilecektir (151).

Ayırma ve Yükleme Jellerinin Hazırlanması

Çalışmalarda % 10-12'lik ayırma jeli ve % 5'lik yükleme jeli kullanıldı.

Tablo 7. % 5'lik yükleme jelinin hazırlanması

Kimyasallar	2 x (1 mm)
ddH₂O	3.08 mL
Akrilamid (% 40 akrilamid mix)	0.56 mL
0.5 M Tris-HCl pH: 6.8	1.25 mL
% 10 SDS	0.05 mL
% 10 APS	0.05 mL
TEMED	3 µL

Tablo 8. % 10 ve % 12'lik ayırma jelinin hazırlanması

Kimyasallar	% 10 (2 x 1 mm)	% 12 (2 x 1 mm)
ddH₂O	4.85 mL	4.34 mL
Akrilamid (% 40 akrilamid mix)	2.50 mL	3.00 mL
1.5 M Tris-HCl pH: 8.8	2.50 mL	2.50 mL
% 10 SDS	0.10 mL	0.10 mL
% 10 APS	0.10 mL	0.10 mL
TEMED	10 µL	10 µL

Kontaminasyon riskini veya jel artıklarını önlemek için camlar ilk olarak saf su ile sonrasında % 70'lik etil alkol ile temizlendi. Camlar kurulandıktan sonra kısa ve uzun camlar birleştirildi ve jel hazırlama standına yerleştirildi. İlk olarak Tablo 8'de verilen miktarlara göre SDS-PAGE ayırma jeli hazırlandı. Hazırlanan çözelti camlar arasında hava kabarcığı olmayacak şekilde kısa camın yaklaşık 1 cm altına gelene kadar ilave edildi. Ayırma jelinin hava ile temasını önlemek ve uygun bir şekilde polimerleşmesini sağlamak amacıyla üzerine soğuk izopropanol ilave edildi ve yaklaşık 30-60 dk beklendi.

Polimerizasyonun ardından ilk olarak jelin üzerindeki izopropanol uzaklaştırıldı ve jelin üzeri saf suyla yıkandı. Tablo 7'ye göre hazırlanan yükleme jeli hızlı bir şekilde ayırma jelinin üzerine ilave edildi. 10 kuyucuklu taraklar % 70'lik etil alkolle dezenfekte edildikten sonra camlar arasına dikkatli bir şekilde yerleştirildi ve polimerizasyon için yaklaşık 30-60 dk beklendi.

Polimerizasyonun ardından jelden taraklar kuyulara zarar vermeden çıkarıldı ve kuyular saf su ile yıkandı. Sonrasında jel dikkatli bir şekilde yükleme standına yerleştirildikten sonra tankın içine konuldu. Tank 1X SDS-PAGE yürütme tamponu ile dolduruldu.

Total hücre lizati ve hücre kültürü süpernatantları -80°C buzdolabından çıkarılarak buz içerisine alındı ve çözülmesi sağlandı. Yürütme işlemi yapılacak olan numuneler 1:4 (yükleme boyası (5X): numune) oranında yükleme boyası ile hazırlandı. Denatürasyonun sağlanması için numuneler 99 °C'de 5 dk kaynatıldı. Kaynatılan numuneler oda sıcaklığında hızlı bir şekilde santrifüj edildi. Ardından tanka yerleştirilen jelin ilk kuyucuğuna 2 µL protein markırı diğer kuyucuklara ise 20-30 µL numune yüklendi. Jel 75 Volt'ta 15 dk, ardından 100 Volt'ta 90-100 dk yürütüldü.

Yürütme işlemi biten jel yürütme tankından alındı ve 1X SDS-PAGE yürütme tamponunun uzaklaştırılması için distile suyla yıkandı. Spatula yardımıyla camlar yavaş ve dikkatli bir şekilde birbirinden ayrıldı. Kısa cam jelin üzerinden kaldırıldıktan sonra jelin numune içermeyen bölümleri spatula yardımıyla kesilip uzaklaştırıldı. Ardından western blot deneyine geçildi.

Western Blot

Kullanılan Çözeltiler

10X Tris-Glisin Tamponu: 30.3 g Tris ve 144 g glisin 800 mL deiyonize su içerisinde çözüldükten sonra hacmi 1 L'ye tamamlandı.

Transfer Tamponu: 100 mL 10X Tris-Glisin tamponu, 100 mL metanol ve 800 mL deiyonize su ile hazırlandı.

10X-TBS: 24.05 g Tris ve 88 g NaCl 900 mL deiyonize su içerisinde çözüldü. Çözeltinin pH'si 12 N HCl ile 7.6'ya ayarlanarak son hacim 1L'ye tamamlandı.

% 20'lik Tween-20: 2 mL Tween-20 ve 8 mL 1X-TBS ile hazırlandı.

1X-TBST: 20 mL 10X TBS, 500 µL % 20'lik Tween-20 ve 180 mL deiyonize su ile hazırlandı.

Bloklama Tamponu (% 5 Yağsız Süt Tozu-TBST): 5 g yağsız süt tozu 100 mL 1X-TBST içerisinde çözüldü.

Primer Antikor: Primer antikor bloklama tamponu ile antikoru üreten firmanın önerdiği koşullara göre seyreltilerek hazırlandı.

Sekonder Antikor: Sekonder antikor bloklama tamponu ile antikoru üreten firmanın önerdiği koşullara göre seyreltilerek hazırlandı.

Blotlama işlemi için ilk olarak dört tane ince Whatmann kağıdı ve iki tane sünger yatak transfer tamponu içerisinde ıslatıldı. Blotlama kasetinin siyah yüzüne ıslak bir tane sünger yatak yerleştirildi. Sonrasında ıslak iki tane ince Whatman kağıdı sünger yatağın üzerine yerleştirildi. Jele uygun büyüklükte kesilen nitroselüloz membran transfer tamponu ile ıslatıldıktan sonra hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek Whatman kağıtlarının üzerine yerleştirildi. Ardından jel dikkatlice membranın üstüne konuldu. Sonrasında jelin üstüne, iki tane ıslak ve ince Whatman kağıdı hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek yerleştirildi. Son olarak ıslak sünger yatak Whatman kağıdının en üstüne konularak blotlama kaseti kapatıldı. Hazırlanan kaset, kutup başlarında dikkat edilerek tanka yerleştirildi. Tank transfer tamponu ile doldurulduktan sonra tank içerisine ısınma durumunu önlemek amacıyla bir buz aküsü konuldu. Transfer işlemi 100 Volt'ta 1 saat 15 dk akım verilerek gerçekleştirildi.

Membranın Bloklanması ve Proteinin İmmünokimya ile Görüntülenmesi

Blotlama işleminden sonra membran, 10 mL bloklama çözeltisi ile oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi. Bloklama sonrası membran, primer antikör (anti-I κ B α (1:1000), anti-p-I κ B α (1:1000), anti-NF- κ B p65 (1:1000), anti-NLRP3 (1:1000), anti-pro-kaspaz-1 (1:1000), anti-kaspaz-1 (p20) (1:1000), anti-gasdermin D (1:1000) ve anti- β -aktin (1:5000) antikör çözeltisi) içerisinde oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından membran 10'ar dakika arayla üç kez 1X-TBST ile yıkandı. Ardından, primer antikora uygun sekonder antikör 1:10000 oranında seyreltilerek hazırlanan çözelti içerisinde oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından membran tekrar 10'ar dakika arayla üç kez 1X-TBST ile yıkandı. Yıkama işlemlerinden sonra membran üzerine Clarity™ Western ECL Substrate çözeltisi ilave edildi ve membranlarda kemilünesans görüntüleme yapıldı.

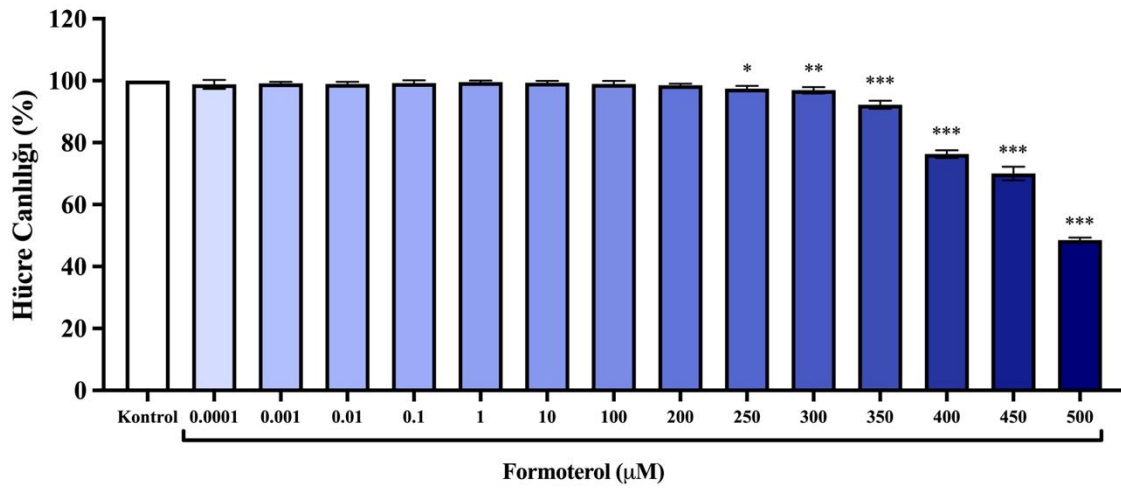
3.3. İstatistiksel Analiz

Deney verilerinin analizi SPSS (IBM Statistics 25, New York, NY, USA) programı ile yapıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Her bir gruba ait değerler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma ($X \pm SD$) olarak ifade edildi. Normal dağılım sergileyen iki grup arasındaki karşılaştırmalarda One-way ANOVA kullanıldı. Grup içi post-hoc değerlendirmeler için ise Tukey testi uygulandı. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

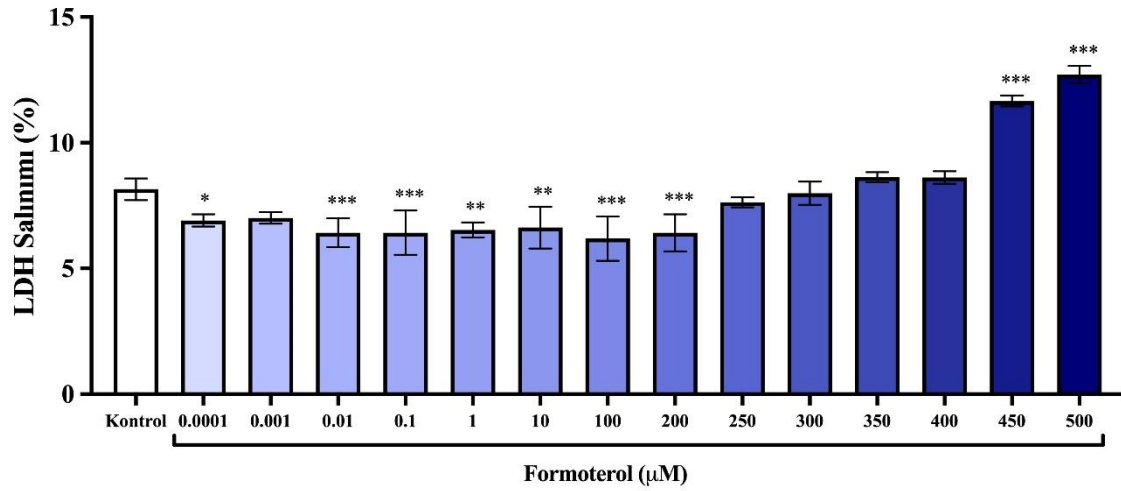
4.1. Formoterol'ün Efektif Dozunun Belirlenmesi Deneyi Sonuçları

Efektif dozun bulunabilmesi için ilk aşamada Formoterol'ün farklı dozlarının (0.0001 μ M, 0.001 μ M, 0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 250 μ M, 300 μ M, 350 μ M, 400 μ M, 450 μ M ve 500 μ M) bazal hücre ölümü üzerindeki etkisine (CCK-8 testi) bakıldı. Analiz sonuçlarına göre hücre canlılığı değerleri, 0.0001-300 μ M dozları arasında kontrol grubu değerine yakinken, 350 μ M ve üzerindeki dozlarda kontrole göre kayda değer bir şekilde azalmıştır ($p<0.001$). Şekil 12'de herhangi bir işlem görmeyen kontrol grubuna göre Formoterol'ün farklı dozlarının hücre canlılığı üzerine etkisi gösterilmiştir.



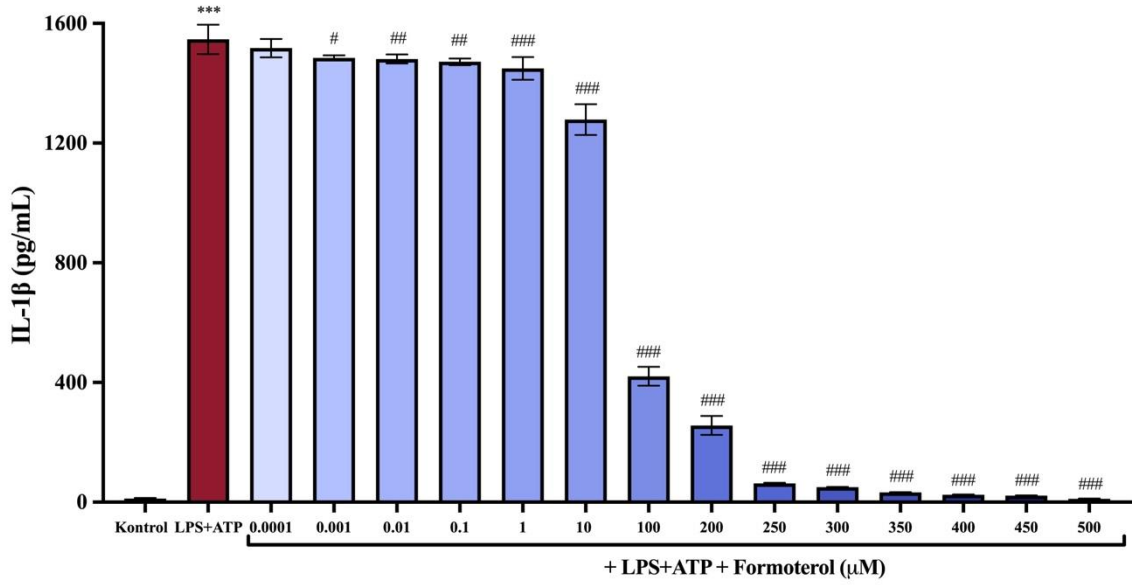
Şekil 12. Hücre canlılığı analizi sonuçları (n=5) [* , ** , *** Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$)]

Efektif dozun bulunabilmesi için ikinci aşamada, Formoterol'ün farklı dozlarının sitotoksosite gösterip göstermediğine (LDH testi) bakıldı. Analiz sonuçlarına göre Formoterol'ün 450 ve 500 μ M dozlarının kontrol grubu değeri ile kıyaslandığında hücreler üzerinde sitotoksisiteyi artırdığı bulunmuştur ($p<0.001$). Şekil 13'te herhangi bir işlem görmeyen kontrol grubuna göre Formoterol'ün farklı dozlarının sitotoksosite üzerine etkisi gösterilmiştir.



Şekil 13. Sitotoksosite analizi sonuçları (n=5) [*,**,*** Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma veya artma görüldü (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$)]

Efektif dozun bulunabilmesi için son aşamada ise, hücreler üzerinde LPS+ATP ile inflamazom aktivasyonu oluşturulduktan sonra Formoterol'ün farklı dozlarının IL-1 β seviyeleri üzerine etkisi bakıldı. Analiz sonuçlarına göre artan Formoterol dozlarında IL-1 β seviyelerinin azaldığı bulunmuştur. Şekil 14'te herhangi bir işlem görmeyen kontrol grubuna göre LPS+ATP (-) grubunun ve Formoterol'ün farklı dozlarının LPS+ATP (-) grubuna göre IL-1 β seviyeleri bakımından karşılaştırılması gösterilmiştir.



Şekil 14. IL-1 β analizi sonuçları (n=5) [***Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir artma görüldü (**p<0.01)]. [#,,###LPS+ATP (-) grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü (#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001)]

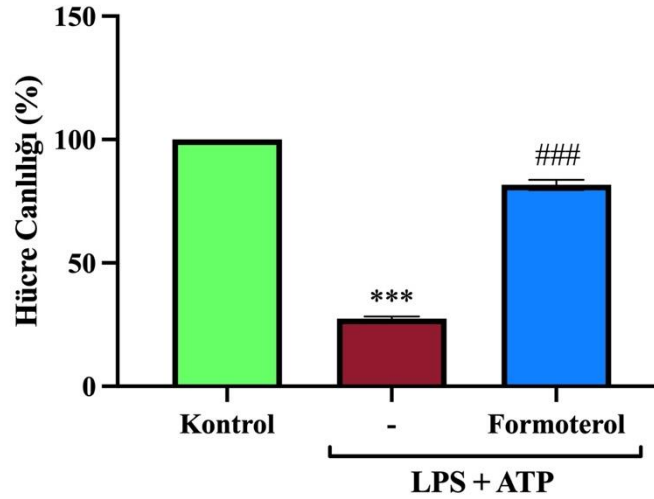
Yapılan üç deney sonucunda hücre canlılığını % 96.34 değerinde tuttuğu, sitotoksisiteyi % 7.98 değerine indirdiği (kontrol değeri % 8.15) ve inflamazom aktivasyonu yapıldıktan sonra IL-1 β seviyesini (50.34) LPS+ATP (-) grubuna kıyasla neredeyse kontrol seviyesine (12.26) indirdiği için Formoterol'ün efektif dozu 300 μ M olarak belirlendi. Sonraki yapılan tüm deneylerde Formoterol'ün 300 μ M dozu kullanıldı.

4.2. Formoterol'ün NLRP3 İnflamazomu ve Piroptoz Üzerine Etkilerinin Analiz Sonuçları

4.2.1. Piroptotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi Analiz Sonuçları

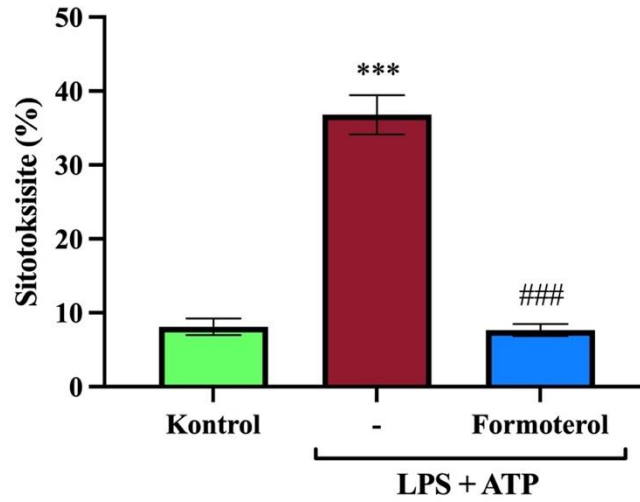
Formoterol'ün pirototik hücre ölümüne etkisi, hücrelerde LPS+ATP ile oluşturulan NLRP3 inflamazomu aktivasyonundan sonra CCK-8 ve LDH deneyleri yapılarak belirlendi. CCK-8 testi analiz sonuçlarına göre, hücre canlılığı LPS+ATP grubunda % 27.44 $\pm$ 0.86 iken, Formoterol grubunda % 81.65 $\pm$ 2.07 olarak bulundu. Formoterol, LPS+ATP ile azalan hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırmıştır (p<0.001). Şekil 15'te

herhangi bir işlem görmeyen kontrol grubuna göre LPS+ATP (-) grubunun ve Formoterol'ün LPS+ATP (-) grubuna göre hücre canlılığı bakımından karşılaştırılması gösterilmiştir.



Şekil 15. Hücre canlılığı analizi sonuçları (n=5) [*** Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü (**p<0.001)]. [### LPS+ATP (-) grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı artma görüldü (###p<0.001)]

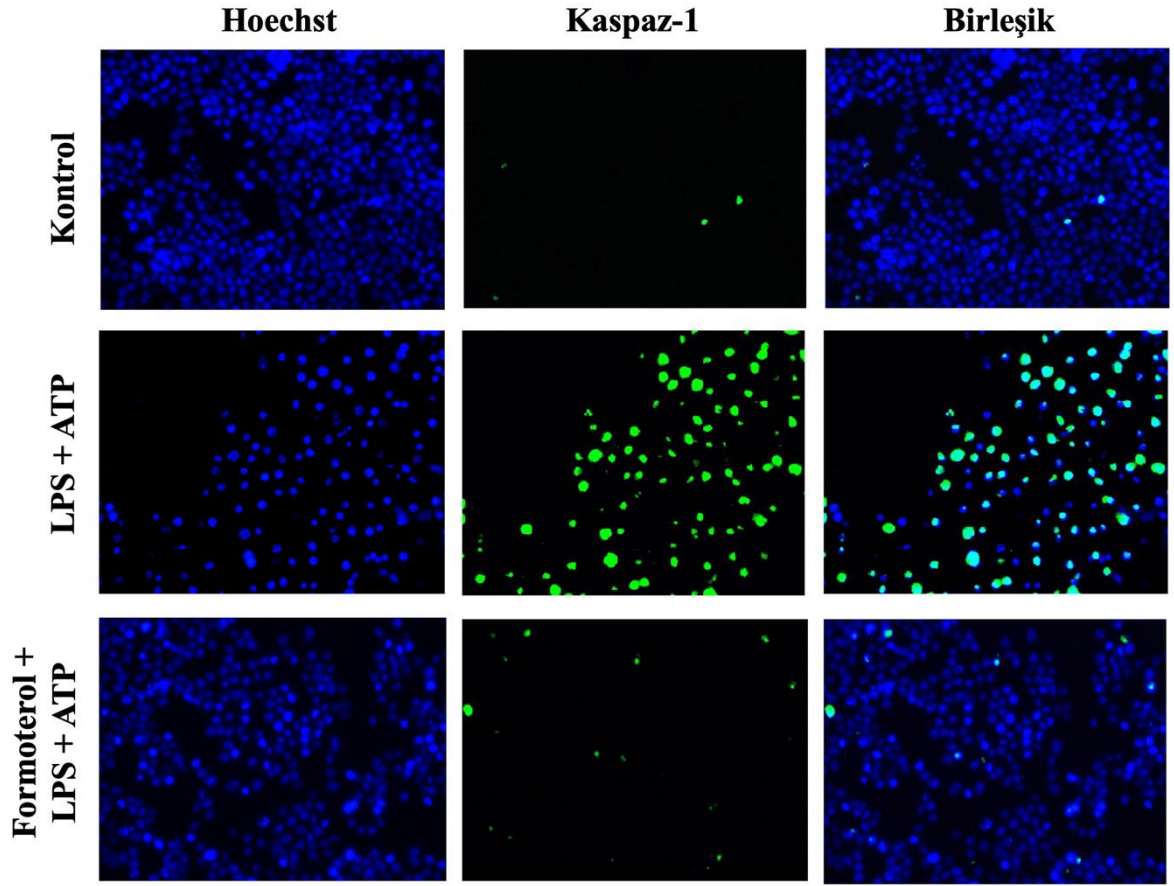
LDH testi analiz sonuçlarına göre, sitotoksiste LPS+ATP grubunda 36.80 ± 2.63 iken, Formoterol grubunda 7.66 ± 0.79 olarak bulundu. Formoterol, LPS+ATP ile artan sitotoksisteyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır (p<0.001). Şekil 16'da herhangi bir işlem görmeyen kontrol grubuna göre LPS+ATP (-) grubunun ve Formoterol'ün LPS+ATP (-) grubuna göre sitotoksiste bakımından karşılaştırılması gösterilmiştir.



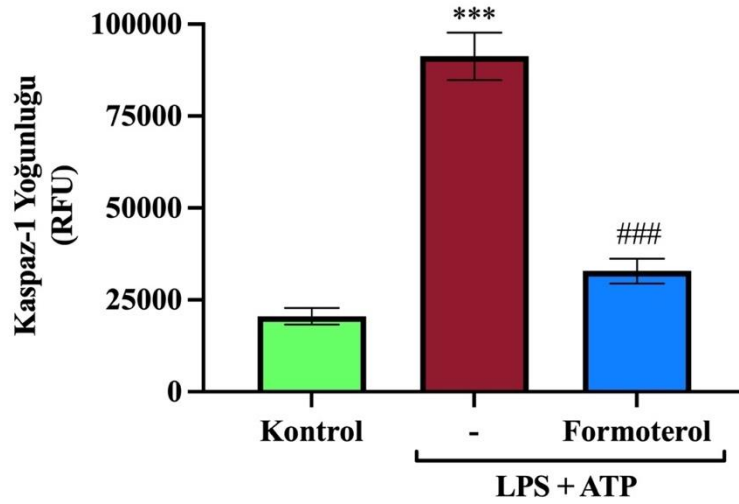
Şekil 16. Sitotoksosite analizi sonuçları (n=5) [***Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir artma görüldü (**p<0.001)]. [###LPS+ATP (-) grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü (###p<0.001)]

4.2.2. Aktif Kaspaz-1 Aracılı Piroptotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi Analiz Sonuçları

Formoterol'ün aktif kaspaz-1 aracılı pirototik hücre ölümüne etkisinin belirlenmesi için aktif kaspaz-1 boyama (FAM-YVAD-FMK) kiti kullanıldı. Şekil 17'de herhangi bir işlem görmeyen kontrol grubuna göre LPS+ATP (-) grubunun ve Formoterol'ün LPS+ATP (-) grubuna göre aktif kaspaz-1 yoğunluğu bakımından karşılaştırılmasının floresan görüntüleri verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre, kaspaz-1 ortalama yoğunluğu LPS+ATP grubunda 91253 ± 6480 iken, Formoterol grubunda 32853 ± 3363 olarak bulundu. Formoterol, LPS+ATP ile artan aktif kaspaz-1 yoğunluğunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır (p<0.001) (Şekil 18).



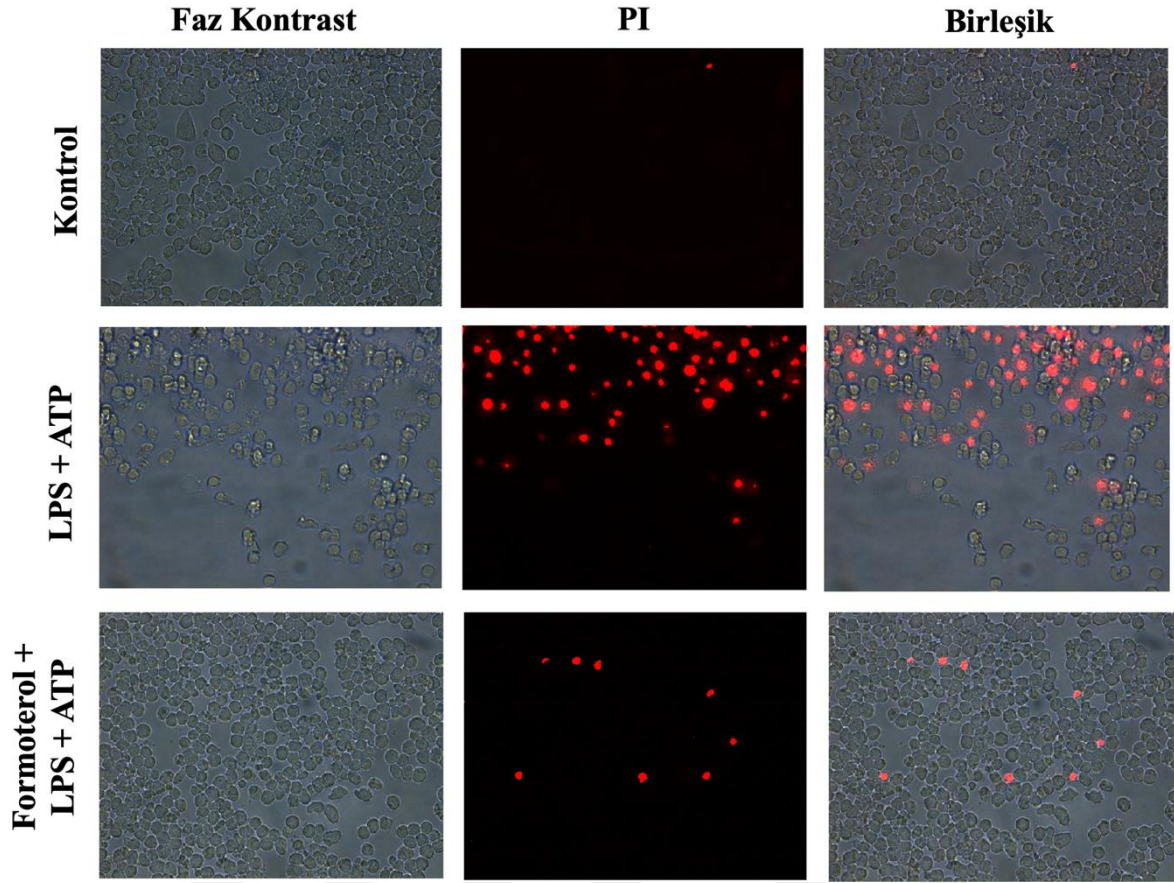
Şekil 17. Aktif kaspaz-1 boyamasının floresan görüntüleri



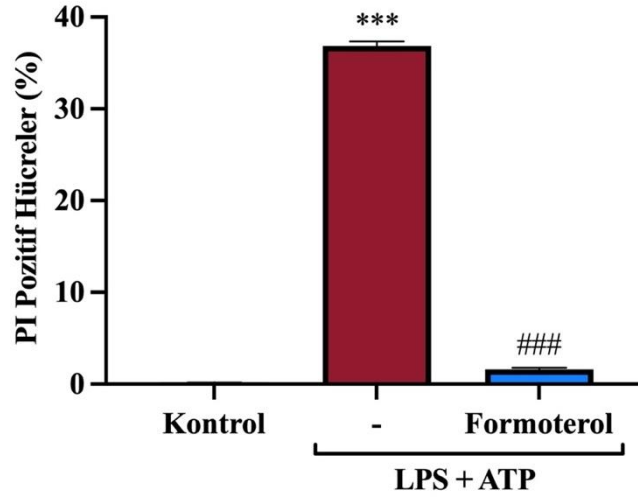
Şekil 18. Aktif kaspaz-1 yoğunluğu (ortalama) analizi sonuçları (n=5) [***Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı artma görüldü (**p<0.001)]. [###LPS+ATP (-) grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü (###p<0.001)]

4.2.3. PI Boyama ile Piroptotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi Analiz Sonuçları

Formoterol'ün piroptotik hücre ölümüne etkisinin belirlenmesi için PI boyası kullanıldı. Şekil 19'da herhangi bir işlem görmeyen kontrol grubuna göre LPS+ATP (-) grubunun ve Formoterol'ün LPS+ATP (-) grubuna göre PI pozitif hücre bakımından karşılaştırılmasının floresan görüntüleri verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre, PI pozitif hücre LPS+ATP grubunda % 36.30 ± 2.51 iken, Formoterol grubunda % 1.66 ± 0.24 olarak bulundu. Formoterol, LPS+ATP ile artan PI pozitif hücre sayısını (% cinsinden) istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır (p<0.001) (Şekil 20).



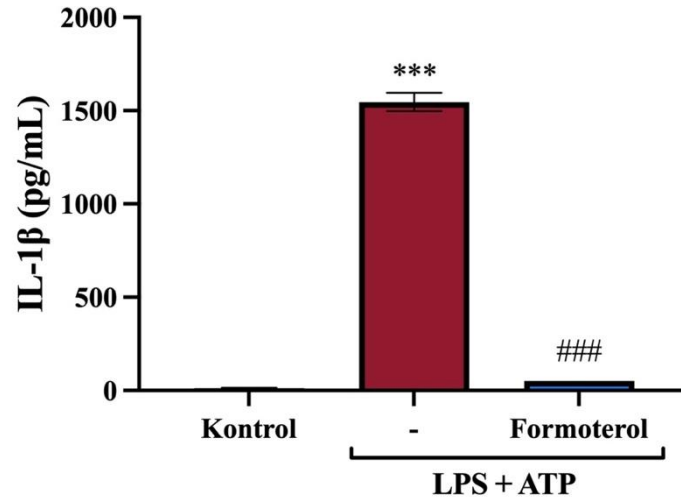
Şekil 19. PI boyamasının floresan görüntüleri



Şekil 20. PI boyama ile pirototik hücre ölümü analizi sonuçları (n=5) [***Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı artma görüldü (**p<0.001)]. [###LPS+ATP (-) grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü (###p<0.001)]

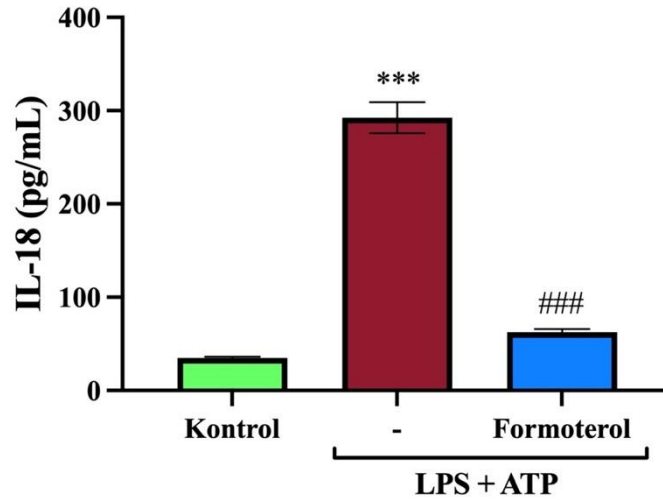
4.2.4. IL-1 β ve IL-18 Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi Analiz Sonuçları

Formoterol'ün IL-1 β ve IL-18 sitokin seviyelerine etkisi, hücrelerde LPS+ATP ile oluşturulan NLRP3 inflamazomu aktivasyonundan sonra IL-1 β ve IL-18 ELISA deneyleri yapılarak belirlendi. IL-1 β seviyeleri LPS+ATP grubunda 1546.55 ± 48.86 pg/mL iken, Formoterol grubunda 50.34 ± 0.25 pg/mL olarak bulundu. Formoterol, LPS+ATP ile artan IL-1 β seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır (p<0.001). Şekil 21'de herhangi bir işlem görmeyen kontrol grubuna göre LPS+ATP (-) grubunun ve Formoterol'ün LPS+ATP (-) grubuna göre IL-1 β seviyeleri bakımından karşılaştırılması gösterilmiştir.



Şekil 21. IL-1 β analizi sonuçları (n=5) [***Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı artma görüldü (**p<0.001)]. [###LPS+ATP (-) grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü (###p<0.001)]

IL-18 seviyeleri LPS+ATP grubunda 292.56 ± 16.70 pg/mL iken, Formoterol grubunda 62.54 ± 3.15 pg/mL olarak bulundu. Formoterol, LPS+ATP ile artan IL-18 seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır (p<0.001). Şekil 22’de herhangi bir işlem görmeyen kontrol grubuna göre LPS+ATP (-) grubunun ve Formoterol’ün LPS+ATP (-) grubuna göre IL-18 seviyeleri bakımından karşılaştırılması gösterilmiştir.

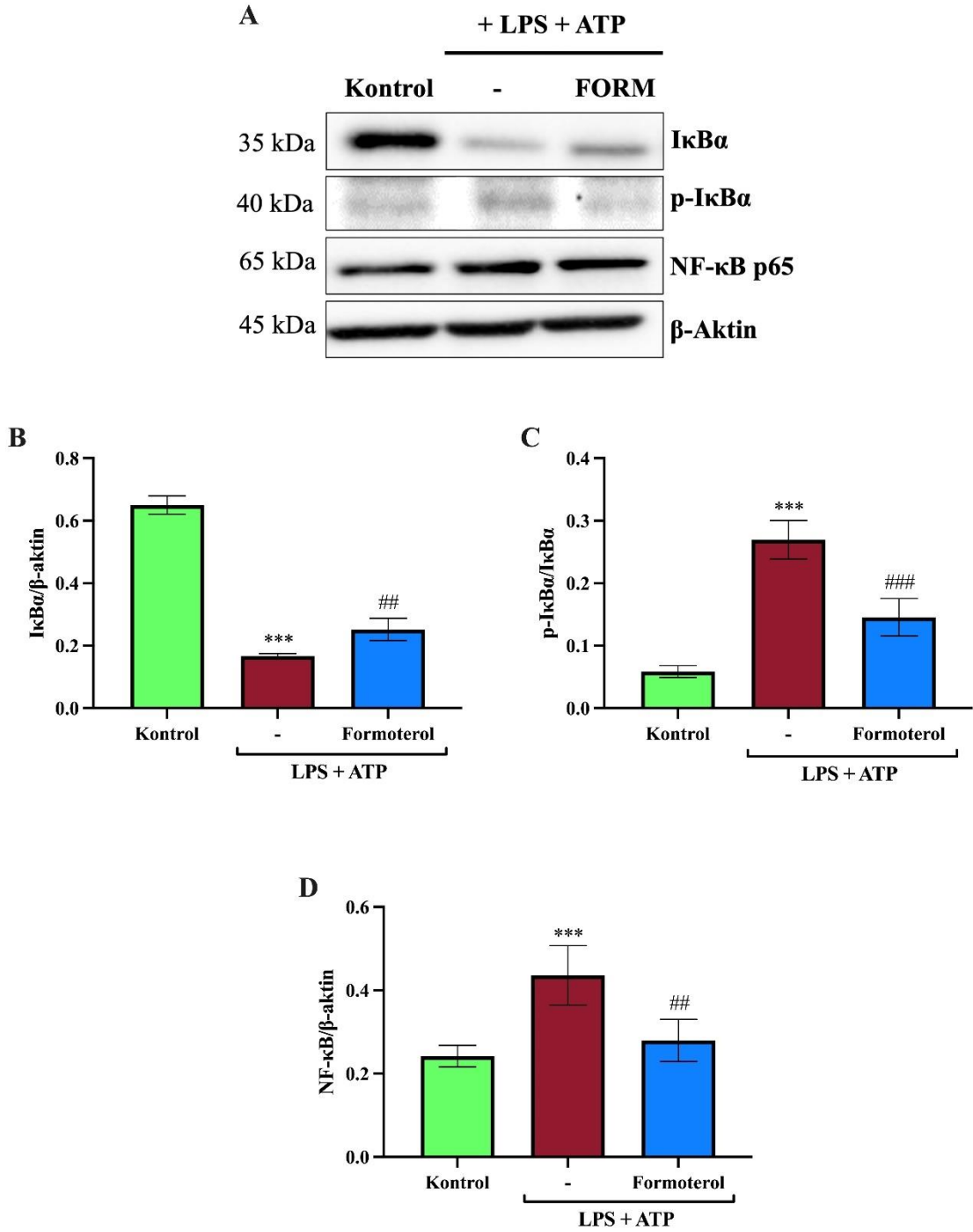


Şekil 22. IL-18 analizi sonuçları (n=5) [***Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı artma görüldü (**p<0.001)]. [###LPS+ATP (-) grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü (###p<0.001)]

4.2.5. NLRP3 İnflamazom Yolağı ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları

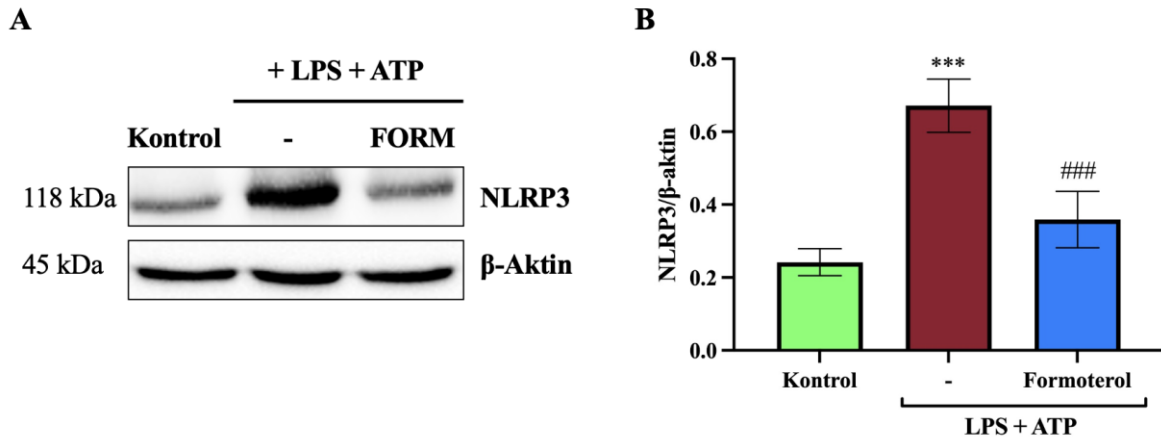
Formoterol'ün, NLRP3 inflamazom yolağı ile ilişkili I κ B α , p-I κ B α , NF- κ B p65, NLRP3, pro-kaspaz-1, kaspaz-1 (p20), GSDMD ve GSDMD-N protein seviyelerine etkisi western blot yöntemiyle belirlendi.

I κ B α protein seviyeleri LPS+ATP grubunda 0.166 ± 0.008 iken, Formoterol grubunda 0.251 ± 0.035 olarak bulundu. Formoterol, LPS+ATP ile azalan I κ B α protein seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırmıştır (p<0.01). p-I κ B α protein seviyeleri LPS+ATP grubunda 0.219 ± 0.060 iken, Formoterol grubunda 0.145 ± 0.030 olarak bulundu. Formoterol, LPS+ATP ile artan p-I κ B α protein seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır (p<0.001). NF- κ B p65 protein seviyeleri LPS+ATP grubunda 0.436 ± 0.071 iken, Formoterol grubunda 0.280 ± 0.050 olarak bulundu. Formoterol, LPS+ATP ile artan NF- κ B p65 protein seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır (p<0.01). Şekil 23'te herhangi bir işlem görmeyen kontrol grubuna göre LPS+ATP (-) grubunun ve Formoterol'ün LPS+ATP (-) grubuna göre I κ B α , p-I κ B α ve NF- κ B p65 protein seviyeleri bakımından karşılaştırılması gösterilmiştir.



Şekil 23. IκBα, p-IκBα ve NF-κB p65 protein seviyeleri analizi sonuçları (n=5) [***Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı artma görüldü (**p<0.001)]. [##,###LPS+ATP (-) grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü (##p<0.01, ###p<0.001)]

NLRP3 protein seviyeleri LPS+ATP grubunda 0.671 ± 0.072 iken, Formoterol grubunda 0.359 ± 0.077 olarak bulundu. Formoterol, LPS+ATP ile artan NLRP3 protein seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır ($p<0.001$). Şekil 24'te herhangi bir işlem görmeyen kontrol grubuna göre LPS+ATP (-) grubunun ve Formoterol'ün LPS+ATP (-) grubuna göre NLRP3 protein seviyeleri bakımından karşılaştırılması gösterilmiştir.



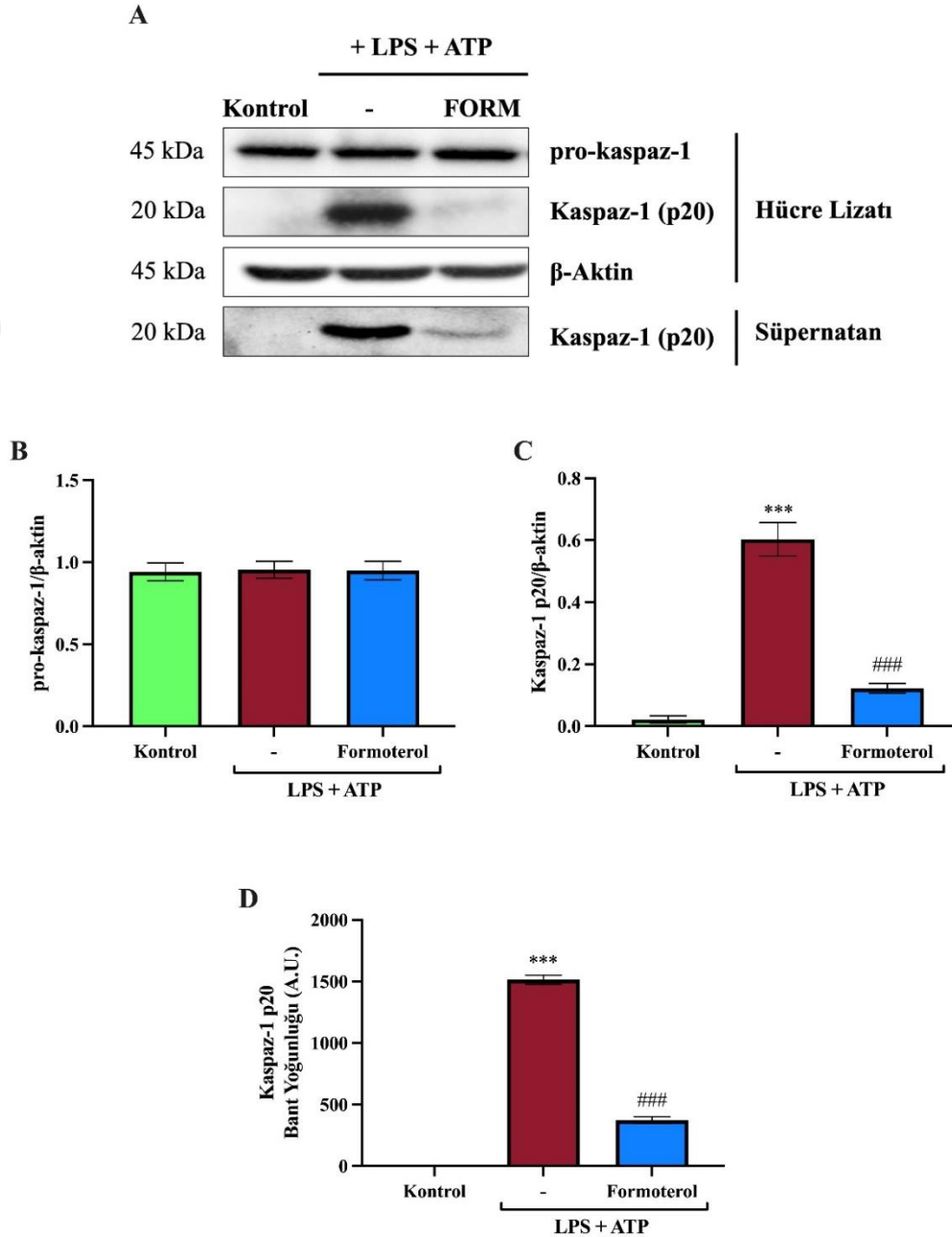
Şekil 24. NLRP3 protein seviyeleri analiz sonuçları (n=5) [***Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı artma görüldü (**p<0.001)]. [###LPS+ATP (-) grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü (###p<0.001)]

Pro-kaspaz-1 protein seviyeleri LPS+ATP grubunda 0.954 ± 0.051 iken, Formoterol grubunda 0.948 ± 0.056 olarak bulundu. Formoterol ve LPS+ATP grupları arasında pro-kaspaz-1 protein seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.984$).

Hücre lizatında, kaspaz-1 protein seviyeleri LPS+ATP grubunda 0.603 ± 0.054 iken, Formoterol grubunda 0.122 ± 0.016 olarak bulundu. Formoterol, LPS+ATP ile artan kaspaz-1 protein seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır ($p<0.001$).

Süpernatanda, kaspaz-1 protein seviyeleri LPS+ATP grubunda 1513.4 ± 37.8 iken, Formoterol grubunda 373.2 ± 27.2 olarak bulundu. Formoterol, LPS+ATP ile artan kaspaz-1 protein seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır ($p<0.001$). Şekil 25'te

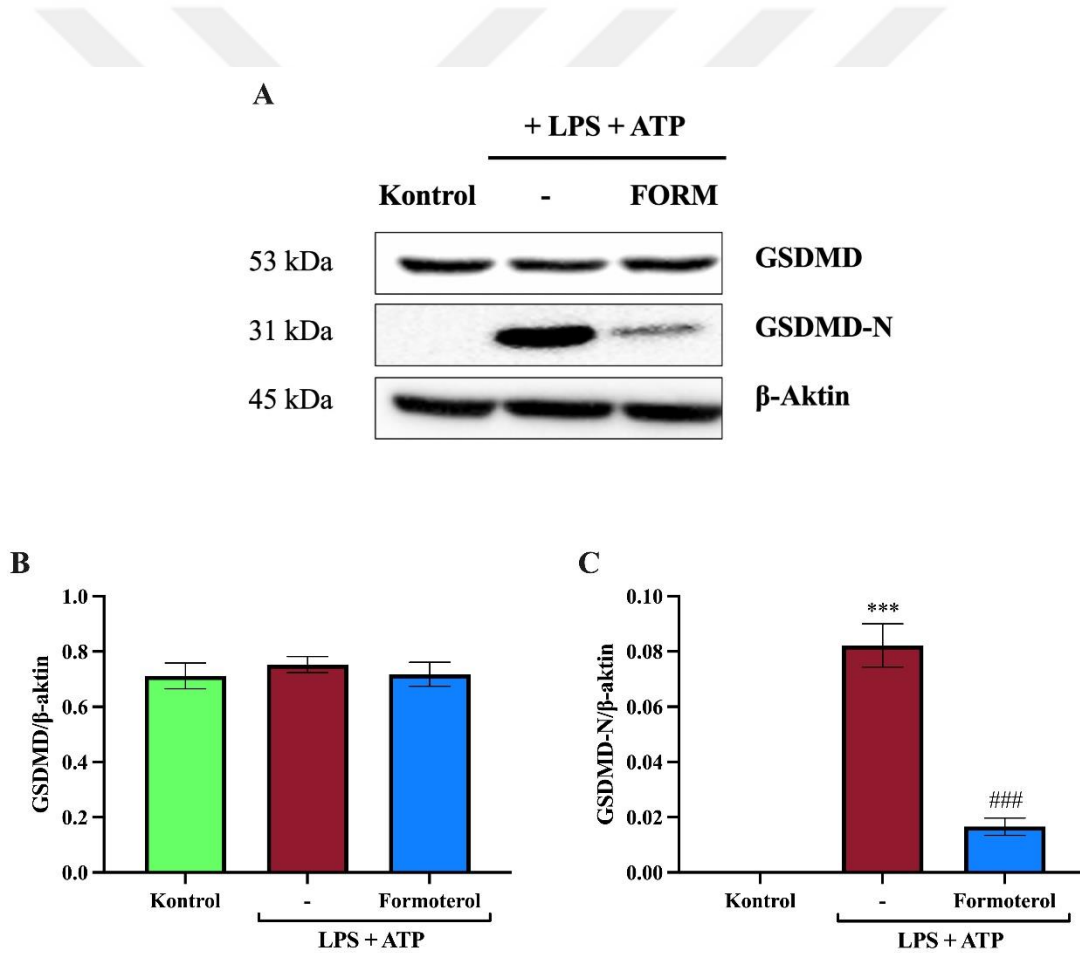
herhangi bir işlem görmeyen kontrol grubuna göre LPS+ATP (-) grubunun ve Formoterol'ün LPS+ATP (-) grubuna göre pro-kaspaz-1 ve kaspaz-1 (hücre lizatu ve süpernatant) protein seviyeleri bakımından karşılaştırılması gösterilmiştir.



Şekil 25. pro-kaspaz-1 ve kaspaz-1 (hücre lizatu ve süpernatant) protein seviyeleri analiz sonuçları (n=5) [***Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı artma görüldü (**p<0.001)]. [###LPS+ATP (-) grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü (###p<0.001)]

GSDMD protein seviyeleri LPS+ATP grubunda 0.753 ± 0.029 iken, Formoterol grubunda 0.718 ± 0.043 olarak bulundu. Formoterol ve LPS+ATP grupları arasında GSDMD protein seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.385$).

GSDMD-N protein seviyeleri LPS+ATP grubunda 0.082 ± 0.007 iken, Formoterol grubunda 0.016 ± 0.003 olarak bulundu. Formoterol, LPS+ATP ile artan GSDMD-N protein seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır ($p<0.001$). Şekil 26'da herhangi bir işlem görmeyen kontrol grubuna göre LPS+ATP (-) grubunun ve Formoterol'ün LPS+ATP (-) grubuna göre GSDMD ve GSDMD-N protein seviyeleri bakımından karşılaştırılması gösterilmiştir.



Şekil 26. GSDMD ve GSDMD-N protein seviyeleri analiz sonuçları (n=5) [***Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı artma görüldü (** $p<0.001$)]. [###LPS+ATP (-) grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü (### $p<0.001$)]

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Nörodejenerasyon, merkezi sinir sisteminde nöron hücresi kaybı olarak tanımlanan, “NH” olarak ifade edilen AH ve PH gibi hastalıkların ortaya çıkmasını sağlayan bir süreçtir (59, 60). NH’de, merkezi sinir sisteminin ana bağışıklık hücresi olan mikroglialar kronik olarak aktive olmakta ve bağışıklıkta görev alan mediatörleri üreterek nöroinflamasyona neden olmaktadır (32, 65-67). Mikroglial NLRP3 inflamazom aktivasyonunun, nöroinflamasyon sürecinde önemli rol oynadığı (13); aktivasyon kronik hale dönüştüğünde patolojinin şiddetlendiği ve bu durumun da NH’nin ilerlemesinin hızlanmasına sebep olduğu ortaya koyulmuştur (14).

NLRP3 inflamazom aktivasyonu “piroptoz” olarak tanımlanan ve kaspaz-1 bağımlı pro-inflamatuar düzenlenmiş hücre ölümüne yol açmaktadır (103). İnflamazom kompleksi kaspaz-1’in aktivasyonuna, aktif kaspaz-1 ise IL-1 β ve IL-18 inflamatuvar sitokinlerinin üretilmesine ve hücre ölümünden sorumlu oligomerik membran porlarının oluşumunu sağlayan GSDMD’nin aktive olmasına neden olmaktadır (93, 104). GSDMD’nin aktivasyonu plazma membran bütünlüğü kaybına (por oluşturarak) neden olduğu için piroptoz sürecini başlatır ve inflamasyonun yayılmasına katkı sağlar (6, 104, 110-112). Bu nedenle, istenmeyen aşırı inflamasyonu önlemek için NLRP3 inflamazom aktivasyonunun düzenlenmesi oldukça önem arz etmektedir. NLRP3 inflamazom aktivasyonunun inhibe edilmesi/azaltılması, hücrelerin piroptoz yoluyla ölümünü ve inflamatuvar sitokinlerin hücreler arasında yayılmasını önleyebilir. Bu alandaki hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmakta ve bu konu literatürde ön plana çıkmaktadır (152-155).

β_2 -adrenoseptör, MSS’de yoğun miktarda bulunan bir reseptördür (16-18). Dolayısıyla bu reseptörün hedef alınarak terapötik etkilerinin belirlenmesi NH için önemli olabilir. MSS’de çeşitli hastalık veya hastalık modellerinde β_2 -adrenoseptör agonistlerinin terapötik kullanımında umut verici nörokoruyucu ve anti-inflamatuar etkiler tespit edilmiştir. β_2 -adrenoseptör agonistlerinin kullanımının, α -syn seviyelerini azaltarak PH riskini % 40’a kadar düşürdüğü (23), PH riskini azalttığı (24), hipokampal nörojenezi artırdığı ve bilişsel gerilemeyi iyileştirdiği (25), MS’e özgü klinik sonuçları iyileştirdiği (26), toksik mikroglialıyı inhibe ettiği (27), glia hücrelerinde anti-inflamatuar fenotip durumunu teşvik ettiği (28), mikroglial aktivasyonu ve pro-inflamatuar sitokin üretimini azalttığı (29)

bulunmuştur. Formoterol, β_2 -adrenoseptörün güçlü ve seçici bir agonistidir. FDA tarafından onaylanmıştır ve nörokoruyucu ve anti-inflamatuar etkileri belirlenmiştir (29). Literatürdeki bu önemli çalışmalar göz önüne alındığında, merkezi sinir sisteminde β_2 -adrenoseptör aktivasyonu ile ilgili son yıllarda birçok çalışma yapılmasına rağmen (23, 27, 29), Formoterol'ün mikroglia hücrelerinde NLRP3 inflamazomu ve NLRP3 inflamazomu aktivasyonu ile teşvik edilen programlı hücre ölümü olan piroptoz üzerindeki etkilerini araştıran herhangi bir çalışma mevcut değildir. Bu durum göz önüne alınarak planlanan bu çalışmada, β_2 -adrenoseptör agonisti Formoterol'ün NLRP3 inflamazomu aktivasyonuna ve NLRP3 inflamazomu aracılı piroptotik hücre ölümüne etkisi *in vitro* koşullarda incelendi.

NLRP3 inflamazomu, PAMP'lar (LPS, vb.) ve DAMP'lar (ATP, vb.) dahil olmak üzere çeşitli uyarılara yanıt olarak aktif hale gelir ve piroptotik hücre ölüm sürecini başlatır (3, 90, 91). Tüm bu süreçler düşünüldüğünde, ilk olarak *in vitro* koşullarda mikroglia hücrelerinde NLRP3 inflamazomu aktivasyonunun gerçekleştirilmesi gereği ortaya çıkmaktadır. Bu bağlamda literatür incelendiğinde benzer çalışmaların olduğu ve standardizasyonun sağlandığı görülmektedir. Bu çalışmalarda NLRP3 inflamazom aktivasyonunda birinci sinyal olan “priming” sinyalini aktive etmek için 1 μ g/mL LPS, ikinci sinyal olan “aktivasyon” sinyalini aktive etmek için ise 5 mM ATP kullanılmıştır. İnflamazom aktivasyonundan sonra,

- IL-1 β ve IL-18 sitokin seviyelerinin (ELISA ve RT-PCR yöntemi ile ölçülmüş) arttığı,
- piroptotik hücre ölümü belirteçleri olan LDH seviyelerinin (sitotoksiste tespit kiti ile ölçülmüş), kaspaz-1 seviyelerinin (aktivite tayini ve western blot yöntemi ile ölçülmüş) ve PI pozitif hücre sayısının (PI boyama yöntemi ile ölçülmüş) arttığı,
- NLRP3 inflamazom yolağı ile ilişkili proteinler olan NLRP3, kaspaz-1 (p20) ve GSDMD-N protein seviyelerinin (Western blot yöntemi ile ölçülmüş) arttığı saptanmıştır (11, 12, 156).

Bu çalışmada da tıpkı ilgili çalışmalardaki gibi, N9 fare mikroglia hücrelerine 4 saat 1 μ g/mL LPS ve 1 saat 5 mM ATP uygulaması yapıldı ve NLRP3 inflamazom aktivasyonu gerçekleştirildi.

Hücre kültürü çalışmalarında hücre canlılığını tespit etmek için günümüzde 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür (MTT), 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid (XTT), 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-

disülfopenil)-2H tetrazolyum, monosodyum tuzu (WST-1), 2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfopenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu (CCK-8) ve LDH gibi testler kullanılmaktadır (157). Uygun hücre canlılığı testi seçilirken, güvenilir sonuçlar elde edebilme, maliyet, hız, hassasiyet ve gerekli ekipman gibi faktörler göz önünde bulundurulmaktadır (158). Bu faktörler göz önüne alındığında ideal bir hücre canlılığı testi, çalışması güvenli, hızlı, sonuçları güvenilir, verimli, zaman ve maliyet açısından uygun olmalı ve aynı zamanda test maddesini etkilememelidir (159). CCK-8 testi, radyoaktif olmayan, bileşenlerin önceden hazırlanması gerekmeyen, hassas kolorimetrik bir analiz yöntemidir. Ayrıca CCK-8'in tespit hassasiyeti, MTT, XTT, MTS veya WST-1 gibi diğer tetrazolyum tuzlarından daha yüksektir (141). Bu sebeplerden dolayı bu çalışmada, N9 fare mikroglia hücrelerinde hem efektif dozun bulunması hem de NLRP3 inflamazom aktivasyonundan sonra Formoterol'ün etkisinin değerlendirilmesi deneylerinde hücre canlılığı testi olarak CCK-8 testi kullanıldı. Formoterol'ün, LPS+ATP ile azalan hücre canlılığını anlamlı olarak artırdığı belirlendi.

NLRP3 inflamazom aktivasyonu ile hücre kültürü ortamındaki membranı hasarlı ve/veya ölü hücrelerden ortama LDH salınmaktadır. LDH testi, hücre kültürü çalışmalarında sitotoksisiteyi ve piroptozu test etmek için geliştirilen hassas, hızlı ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (160, 161). Bu yüzden, N9 fare mikroglia hücrelerinde hem efektif dozun bulunmasında sitotoksisitenin saptanmasında hem de NLRP3 inflamazom aktivasyonundan sonra Formoterol'ün piroptozu etkisinin değerlendirilmesi deneylerinde LDH testi kullanıldı. Formoterol'ün, LPS+ATP ile artan sitotoksisiteyi anlamlı olarak azalttığı tespit edildi.

NLRP3 inflamazom aktivasyonu neticesinde kaspaz-1 aktive olarak piroptozu teşvik etmektedir. Aktif kaspaz-1 boyama kiti, hücre kültürü çalışmalarında canlı hücrelerde kaspaz-1 aktivasyonunu ölçmek için kullanılan hassas ve sonucu kısa süre içinde alınan florometrik bir testtir (144-146). NLRP3 inflamazomu ve piroptoz çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (162, 163). Bu sebeple, N9 fare mikroglia hücrelerinde NLRP3 inflamazom aktivasyonundan sonra Formoterol'ün aktif kaspaz-1 miktarına etkisinin değerlendirilmesinde aktif kaspaz-1 boyama kiti tercih edildi. Formoterol'ün, LPS+ATP ile artan aktif kaspaz-1 yoğunluğunu anlamlı olarak azalttığı saptandı.

NLRP3 inflamazom aktivasyonu ile hücre ölümü meydana gelmektedir. PI, hücre kültürü çalışmalarında ölü hücreleri belirleme amacıyla kullanılan bir boyadır ve piroptotik

hücrelerin belirlenmesinde yaygın olarak tercih edilmektedir (12, 106, 147). Bundan dolayı, N9 fare mikroglia hücrelerinde NLRP3 inflamazom aktivasyonundan sonra Formoterol'ün hücre ölümüne etkisinin belirlenmesinde PI boyası tercih edildi. Formoterol'ün, LPS+ATP ile artan PI pozitif hücre sayısını anlamlı olarak azalttığı bulundu.

Birçok hastalığın patogenezinde inflamasyonun yaygın rolü düşünüldüğünde, mevcut ilaçlar için yeni anti-inflamatuar mekanizmaları ortaya çıkarmayı veya inflamasyonu hafifletmek için yeni terapötikler geliştirmeyi amaçlayan araştırmalara olan ilgi giderek artmaktadır (164). Bu bağlamda, hem periferik dokulardaki hem de MSS'deki immün hücreler üzerine yapılan çalışmalar, Formoterol'ün anti-inflamatuar etkilerini doğrulamıştır. Victoni ve arkadaşları, insan monositik makrofaj hücrelerinde LPS ile oluşturdukları inflamasyon modelinde Formoterol'ün TNF- α ve IL-1 β pro-inflamatuar sitokin salınımını azalttığını tespit etmişlerdir (140). Damo ve arkadaşları ve mikroglia hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada Formoterol'ün mikroglial aktivasyonu ve IFN- γ ve TNF- α pro-inflamatuar sinyal iletimini inhibe ettiği bildirmişlerdir (165). Bu çalışmada, N9 fare mikroglia hücrelerinde LPS+ATP ile oluşturulan nöroinflamasyon modelinde, β_2 -adrenoseptör agonisti Formoterol'ün NLRP3 inflamazomu aracılı piroptotik hücre ölümüyle hücre dışına salınan IL-1 β ve IL-18 sitokin seviyelerine etkisi ELISA yöntemi ile değerlendirildi. Literatürde benzer çalışmalardaki verileri destekleyecek şekilde, Formoterol'ün LPS+ATP hasarı ile artan IL-1 β ve IL-18 seviyelerini anlamlı olarak azalttığı saptandı.

Nöroinflamasyonun NH'nin patogenezinde kritik rol oynaması, bu konu hakkındaki çalışmalara yönelik ilginin artmasında neden olmuştur (166). Bu bağlamda, literatürde Formoterol'ün nöroinflamasyon üzerindeki terapötik etkilerini inceleyen çalışmalar da bulunmaktadır. Ryan ve arkadaşları, ratlarda LPS ile oluşturdukları nöroinflamasyon modelinde, korteks ve hipokampüste Clenbuterol ve Formoterol'ün I κ B α ekspresyonunu artırdığını ve NF- κ B seviyelerini azalttığını göstermişlerdir. Ryan ve arkadaşları, Clenbuterol ve Formoterol'ün MSS'de NF- κ B seviyelerini azalttığı sonucuna dayanarak, β_2 -adrenoseptörlerin nöroinflamasyonu tedavi etmek ve inflamasyonla ilişkili nörodejenerasyonla mücadele etmek için çekici bir hedef olabileceğini açıklamışlardır (167). O'Neill ve arkadaşları, ratlarda sistemik ve intranigral LPS ile oluşturdukları nöroinflamasyon modelinde Formoterol'ün mikroglial aktivasyonu azalttığı, substantia nigra ve striatumdaki dopaminerjik hücre kaybını önlediği, orta beyin/striatum dopamin

konsantrasyonlarını arttırdığı ve merkezi/sistemik inflamasyonun neden olduğu motor bozukluklarını azalttığı bulunmuşlardır. O'Neill ve arkadaşları, glial hücrelerin dahil olduğu nöroinflamasyon sürecinde, Formoterol'ün MSS parankimine girerek glial hücreler üzerinde güçlü immünomodülatör etkiler oluşturabileceğini belirtmişlerdir (29). MSS'de yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, NLRP3 inflamazomunun nöroinflamasyonu düzenlemede merkezi bir rol oynadığını göstermektedir (1). NF- κ B, NLRP3 protein sentezini ve NLRP3 inflamazom aktivasyonunu artıran kritik transkripsiyon faktörüdür (4). Bu bilgiler ve Formoterol'ün olumlu etkileri (130, 167) göz önünde bulundurularak, bu çalışmada, N9 fare mikroglia hücrelerinde LPS+ATP ile oluşturulan nöroinflamasyon modelinde, β_2 -adrenoseptör agonisti Formoterol'ün NLRP3 inflamazomu aktivasyonu öncesinde görev alan proteinler olan I κ B α , p-I κ B α ve NF- κ B p65 protein seviyeleri western blot yöntemi ile belirlendi. Buna göre, literatürde ilgili yolağı inceleyen çalışmalardaki sonuçlar ile benzer şekilde, Formoterol'ün LPS+ATP hasarı ile azalan I κ B α protein seviyelerini anlamlı olarak artırdığı; artan p-I κ B α ve NF- κ B p65 protein seviyelerini ise anlamlı olarak azalttığı bulundu.

NLRP3 inflamazomu aktive edildiğinde, kaspaz-1'in aktivasyonunu sağlar. Aktif kaspaz-1 daha sonra pro-IL-1 β ve pro-IL-18'i enzimatik olarak parçalayarak, onları aktif formları olan IL-1 β ve IL-18'e dönüştürür ve hücre dışına salınmalarını kolaylaştırır. Ek olarak aktif kaspaz-1, pirototik hücre ölümünde rol oynayan bir protein olan GSDMD'nin aktivasyonunu başlatır. Bu durum, plazma membranında porların oluşmasına, piroptoz sürecinin başlamasına ve inflamasyonun yayılmasına sebep olur (168). Bu çalışmada, N9 fare mikroglia hücrelerinde LPS+ATP ile oluşturulan NLRP3 inflamazom aktivasyonu modelinde, β_2 -adrenoseptör agonisti Formoterol'ün NLRP3 inflamazomu aktivasyonuna ve NLRP3 inflamazomu aracılı pirototik hücre ölümüne etkisi *in vitro* koşullarda incelendi. Bu bağlamda, NLRP3 inflamazomu aktivasyonunun ve piroptozun en önemli belirteçleri olan kaspaz-1 (p20) (aktif kaspaz-1 boyama kiti ve western blot yöntemi ile), pro-kaspaz-1, NLRP3, GSDMD ve GSDMD-N (Western blot yöntemi ile) seviyeleri incelenmiştir. Literatürde benzer çalışmalardaki verileri destekleyecek şekilde, Formoterol'ün LPS+ATP hasarı ile artan kaspaz-1 (p20), NLRP3 ve GSDMD-N seviyelerini anlamlı olarak azalttığı tespit edildi.

N9 fare mikroglia hücrelerinde LPS+ATP ile uyarılan NLRP3 inflamazom aktivasyonu modelinin oluşturulduğu bu çalışmada, bir β_2 -adrenoseptör agonisti olan Formoterol'ün NLRP3 inflamazomu aktivasyonunu I κ B/NF- κ B yoluyla inhibe ettiği ve piroptotik hücre ölümünü engellediği ortaya koyuldu. Etkilerini tam olarak anlamak için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulsa da sonuçlarımız, Formoterol'ün nöroinflamasyon süreci ile ilişkili olan NLRP3 inflamazom aktivasyonunda ve düzenlenmesinde anti-inflamatuar ve immünomodülatör etkiler sergilediğini göstermiştir. Bu durum, Formoterol'ün nöroinflamasyonu azaltabilecek potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini işaret etmektedir. Bu çalışma, ilgili yolaktaki mekanizmalar hakkında yapılacak çalışmalara yeni ışıklar tutmaktadır.



6. KAYNAKLAR

1. Yang SJ, Shao GF, Chen JL, Gong J (2018). The NLRP3 Inflammasome: An Important Driver of Neuroinflammation in Hemorrhagic Stroke. *Cell Mol Neurobiol* 38(3): 595-603.
2. Olcum M, Tufekci KU, Durur DY, Tastan B, Gokbayrak IN, Genc K, Genc S (2021). Ethyl Pyruvate Attenuates Microglial NLRP3 Inflammasome Activation via Inhibition of HMGB1/NF- κ B/miR-223 Signaling. *Antioxidants (Basel)* 10(5): 745.
3. Martinon F, Burns K, Tschopp J (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 10(2): 417-426.
4. Sharma D, Kanneganti TD (2016). The cell biology of inflammasomes: mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J Cell Biol* 213(6): 617-629.
5. Zheng D, Liwinski T, Elinav E (2020). Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell Discov* 6: 36.
6. Liu X, Zhang Z, Ruan J, Pan Y, Magupalli VG, Wu H, Lieberman J (2016). Inflammasome-activated gasdermin d causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* 535: 153-158.
7. Qiu Y, Huang Y, Chen M, Yang Y, Li X, Zhang W (2022). Mitochondrial DNA in NLRP3 inflammasome activation. *Int Immunopharmacol* 108: 108719.
8. Cheng YC, Chu LW, Chen JY, Hsieh SL, Chang YC, Dai ZK, Wu BN (2020). Loganin attenuates high glucose-induced schwann cells pyroptosis by inhibiting ROS generation and NLRP3 inflammasome activation. *Cells* 9(9): 1948.
9. Afonina IS, Zhong Z, Karin M, Beyaert R (2017). Limiting inflammation-the negative regulation of NF- κ B and the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol* 18(8): 861-869.
10. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2: 17023.
11. Tastan B, Arioz BI, Tufekci KU, Tarakcioglu E, Gonul CP, Genc K, Genc S (2021). Dimethyl fumarate alleviates NLRP3 inflammasome activation in microglia and sickness behavior in LPS-challenged mice. *Front Immunol* 12: 737065.
12. Tufekci KU, Ercan I, Isci KB, Olcum M, Tastan B, Gonul CP, Genc K, Genc S (2021). Sulforaphane inhibits NLRP3 inflammasome activation in microglia through Nrf2-mediated miRNA alteration. *Immunol Lett* 233: 20-30.

13. Deora V, Lee JD, Albornoz EA, McAlary L, Jagaraj CJ, Robertson AAB, Atkin JD, Cooper MA, Schroder K, Yerbury JJ, Gordon R, Woodruff TM (2020). The microglial NLRP3 inflammasome is activated by amyotrophic lateral sclerosis proteins. *Glia* 68(2): 407-421.
14. Wu AG, Zhou XG, Qiao G, Yu L, Tang Y, Yan L, Qiu WQ, Pan R, Yu CL, Law BY, Qin DL, Wu JM (2021). Targeting microglial autophagic degradation in NLRP3 inflammasome-mediated neurodegenerative diseases. *Ageing Res Rev* 65: 101202.
15. Velmurugan BK, Baskaran R, Huang CY (2019). Detailed insight on β -adrenoceptors as therapeutic targets. *Biomed Pharmacother* 117: 109039.
16. Tanaka KF, Kashima H, Suzuki H, Ono K, Sawada M (2002). Existence of functional beta1- and beta2-adrenergic receptors on microglia. *J Neurosci Res* 70(2): 232-237.
17. Cash R, Raisman R, Lanfume Y, Ploska A, Agid Y (1986). Cellular localization of adrenergic receptors in rat and human brain. *Brain Res* 370(1): 127-135.
18. Qian L, Hu X, Zhang D, Snyder A, Wu HM, Li Y, Wilson B, Lu RB, Hong JS, Flood PM (2009). beta2 Adrenergic receptor activation induces microglial NADPH oxidase activation and dopaminergic neurotoxicity through an ERK-dependent/protein kinase A-independent pathway. *Glia* 57(15): 1600-1609.
19. Magistrelli L, Comi C (2020). Beta2-adrenoceptor agonists in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *J Neuroimmune Pharmacol* 15(1): 74-81.
20. Billington CK, Penn RB, Hall IP (2017). β_2 agonists. *Handb Exp Pharmacol* 237: 23-40.
21. Hopfner F, Höglinger GU, Kuhlenbäumer G, Pottegård A, Wod M, Christensen K, Tanner CM, Deuschl G (2020). β -adrenoreceptors and the risk of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 19(3): 247-254.
22. Abdelmotilib H, West AB (2017). Breathing new life into an old target: pulmonary disease drugs for Parkinson's disease therapy. *Genome Med* 9(1): 88.
23. Mittal S, Bjørnevik K, Im DS, Flierl A, Dong X, Locascio JJ, Abo KM, Long E, Jin M, Xu B, Xiang YK, Rochet JC, Engeland A, Rizzu P, Heutink P, Bartels T, Selkoe DJ, Caldarone BJ, Glicksman MA, Khurana V, Schüle B, Park DS, Riise T, Scherzer CR (2017). β_2 -adrenoreceptor is a regulator of the α -synuclein gene driving risk of Parkinson's disease. *Science* 357(6354): 891-898.

24. Gronich N, Abernethy DR, Auriel E, Lavi I, Rennert G, Saliba W (2018). β_2 -adrenoceptor agonists and antagonists and risk of Parkinson's disease. *Mov Disord* 33(9): 1465-1471.
25. Chai GS, Wang YY, Yasheng A, Zhao P (2016). Beta 2-adrenergic receptor activation enhances neurogenesis in Alzheimer's disease mice. *Neural Regen Res* 11(10): 1617-1624.
26. Khoury SJ, Healy BC, Kivisäkk P, Viglietta V, Egorova S, Guttmann CR, Wedgwood JF, Hafler DA, Weiner HL, Buckle G, Cook S, Reddy S (2010). A randomized controlled double-masked trial of albuterol add-on therapy in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 67(9): 1055-1061.
27. Qian L, Wu HM, Chen SH, Zhang D, Ali SF, Peterson L, Wilson B, Lu RB, Hong JS, Flood PM (2011). β_2 -adrenergic receptor activation prevents rodent dopaminergic neurotoxicity by inhibiting microglia via a novel signaling pathway. *J Immunol* 186(7): 4443-4454.
28. Gleeson LC, Ryan KJ, Griffin EW, Connor TJ, Harkin A (2010). The β_2 -adrenoceptor agonist clenbuterol elicits neuroprotective, anti-inflammatory and neurotrophic actions in the kainic acid model of excitotoxicity. *Brain Behav Immun* 24(8): 1354-1361.
29. O'Neill E, Yssel JD, McNamara C, Harkin A (2020). Pharmacological targeting of β_2 -adrenoceptors is neuroprotective in the LPS inflammatory rat model of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol* 177(2): 282-297.
30. Rosenhall L, Heinig JH, Lindqvist A, Leegaard J, Ståhl E, Bergqvist PB (2002). Budesonide/formoterol (symbicort) is well tolerated and effective in patients with moderate persistent asthma. *Int J Clin Pract* 56(6): 427-433.
31. Rosenhall L, Elvstrand A, Tilling B, Vinge I, Jemsby P, Ståhl E, Jerre F, Bergqvist PB (2003). One-year safety and efficacy of budesonide/formoterol in a single inhaler (symbicort turbuhaler) for the treatment of asthma. *Respir Med* 97(6): 702-708.
32. Salter MW, Stevens B (2017). Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med* 23(9): 1018-1027.
33. Song WM, Colonna M (2018). The identity and function of microglia in neurodegeneration. *Nat Immunol* 19(10): 1048-1058.

34. Nayak D, Roth TL, McGavern DB (2014). Microglia development and function. *Annu Rev Immunol* 32: 367-402.
35. Brown GC, Neher JJ (2014). Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat Rev Neurosci* 15(4): 209-216.
36. Cai Y, Kong H, Pan YB, Jiang L, Pan XX, Hu L, Qian YN, Jiang CY, Liu WT (2016). Procyanidins alleviates morphine tolerance by inhibiting activation of NLRP3 inflammasome in microglia. *J Neuroinflammation* 13(1): 53.
37. Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, El Khoury J (2018). Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci* 21(10): 1359-1369.
38. Sierra A, de Castro F, Del Río-Hortega J, Rafael Iglesias-Rozas J, Garrosa M, Kettenmann H (2016). The "Big-Bang" for modern glial biology: translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia* 64(11): 1801-1840.
39. Bachiller S, Jiménez-Ferrer I, Paulus A, Yang Y, Swanberg M, Deierborg T, Boza-Serrano A (2018). Microglia in neurological diseases: a road map to brain-disease dependent-inflammatory response. *Front Cell Neurosci* 12: 488.
40. Li Q, Barres BA (2018). Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 18(4): 225-242.
41. Zhang B, Wei YZ, Wang GQ, Li DD, Shi JS, Zhang F (2019). Targeting MAPK pathways by naringenin modulates microglia M1/M2 polarization in lipopolysaccharide-stimulated cultures. *Front Cell Neurosci* 12: 531.
42. Guo S, Wang H, Yin Y (2022). Microglia polarization from M1 to M2 in neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci* 14: 815347.
43. Colonna M, Butovsky O (2017). Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *Annu Rev Immunol* 35: 441-468.
44. Tang Y, Le W (2016). Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol* 53(2): 1181-1194.
45. Sarlus H, Heneka MT (2017). Microglia in Alzheimer's disease. *J Clin Invest* 127(9): 3240-3249.
46. Hansen DV, Hanson JE, Sheng M (2018). Microglia in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 217(2): 459-472.

47. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333(6048): 1456-1458.
48. Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SW, Barres BA (2007). The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131(6): 1164-1178.
49. Marín-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M (2004). Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41(4): 535-547.
50. Bessis A, Béchade C, Bernard D, Roumier A (2007). Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55(3): 233-238.
51. Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7(4): 483-495.
52. Cunningham CL, Martínez-Cerdeño V, Noctor SC (2013). Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 33(10): 4216-4233.
53. Arnò B, Grassivaro F, Rossi C, Bergamaschi A, Castiglioni V, Furlan R, Greter M, Favaro R, Comi G, Becher B, Martino G, Muzio L (2014). Neural progenitor cells orchestrate microglia migration and positioning into the developing cortex. *Nat Commun* 5: 5611.
54. Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y, Sato K (2014). Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *J Neurosci* 34(6): 2231-2243.
55. Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, Merry KM, Shi Q, Rosenthal A, Barres BA, Lemere CA, Selkoe DJ, Stevens B (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* 352(6286): 712-716.

56. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74(4): 691-705.
57. Pierre WC, Smith PLP, Londono I, Chemtob S, Mallard C, Lodygensky GA (2017). Neonatal microglia: the cornerstone of brain fate. *Brain Behav Immun* 59: 333-345.
58. Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR 3rd, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR, Gan WB (2013). Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 155(7): 1596-1609.
59. Nelson PT, Braak H, Markesbery WR (2009). Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship. *J Neuropathol Exp Neurol* 68(1): 1-14.
60. Rodriguez-Oroz MC, Jahanshahi M, Krack P, Litvan I, Macias R, Bezard E, Obeso JA (2009). Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *Lancet Neurol* 8(12): 1128-1139.
61. Khaniani MS, Derakhshan SM, Abasalizadeh S (2013). Prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy: clinical experience and molecular genetics of SMN gene analysis in 36 cases. *J Prenat Med* 7(3): 32-34.
62. Robberecht W, Philips T (2013). The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 14(4): 248-264.
63. The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72(6): 971-983.
64. Raymond LA, André VM, Cepeda C, Gladding CM, Milnerwood AJ, Levine MS (2011). Pathophysiology of Huntington's disease: time-dependent alterations in synaptic and receptor function. *Neuroscience* 198: 252-273.
65. Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW (1993). Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7(1): 111-118.
66. Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW (1995). Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 20(3): 269-287.
67. Hopkins SJ, Rothwell NJ (1995). Cytokines and the nervous system. I: expression and recognition. *Trends Neurosci* 18(2): 83-88.

68. Fuhrmann M, Bittner T, Jung CK, Burgold S, Page RM, Mitteregger G, Haass C, LaFerla FM, Kretschmar H, Herms J (2010). Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 13(4): 411-413.
69. McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG (1988). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38(8): 1285-1291.
70. Gerhard A, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, Es M, Hammers A, Eggert K, Oertel W, Banati RB, Brooks DJ (2006). In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 21(2): 404-412.
71. Halliday GM, Stevens CH (2011). Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. *Mov Disord* 26(1): 6-17.
72. Croisier E, Moran LB, Dexter DT, Pearce RK, Graeber MB (2005). Microglial inflammation in the parkinsonian substantia nigra: relationship to alpha-synuclein deposition. *J Neuroinflammation* 2: 14.
73. Su X, Maguire-Zeiss KA, Giuliano R, Prifti L, Venkatesh K, Federoff HJ (2008). Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 29(11): 1690-1701.
74. Kim C, Ho DH, Suk JE, You S, Michael S, Kang J, Joong Lee S, Masliah E, Hwang D, Lee HJ, Lee SJ (2013). Neuron-released oligomeric α -synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nat Commun* 4: 1562.
75. Henkel JS, Engelhardt JI, Siklós L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, Goodman JC, Siddique T, Beers DR, Appel SH (2004). Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol* 55(2): 221-235.
76. Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN, Banati RB (2004). Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis* 15(3): 601-609.
77. Tai YF, Pavese N, Gerhard A, Tabrizi SJ, Barker RA, Brooks DJ, Piccini P (2007). Microglial activation in presymptomatic Huntington's disease gene carriers. *Brain* 130(Pt 7): 1759-1766.

78. Pavese N, Gerhard A, Tai YF, Ho AK, Turkheimer F, Barker RA, Brooks DJ, Piccini P (2006). Microglial activation correlates with severity in Huntington disease: a clinical and PET study. *Neurology* 66(11): 1638-1643.
79. Sapp E, Kegel KB, Aronin N, Hashikawa T, Uchiyama Y, Tohyama K, Bhide PG, Vonsattel JP, DiFiglia M (2001). Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 60(2): 161-172.
80. Akbal A, Dernst A, Lovotti M, Mangan MSJ, McManus RM, Latz E (2022). How location and cellular signaling combine to activate the NLRP3 inflammasome. *Cell Mol Immunol* (11): 1201-1214.
81. Fusco R, Siracusa R, Genovese T, Cuzzocrea S, Di Paola R (2020). Focus on the role of NLRP3 inflammasome in diseases. *Int J Mol Sci* 21(12): 4223.
82. Milner MT, Maddugoda M, Götz J, Burgener SS, Schroder K (2021). The NLRP3 inflammasome triggers sterile neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Curr Opin Immunol* 68: 116-124.
83. Ising C, Venegas C, Zhang S, Scheiblich H, Schmidt SV, Vieira-Saecker A, Schwartz S, Albasset S, McManus RM, Tejera D, Griep A, Santarelli F, Brosseron F, Opitz S, Stunden J, Merten M, Kaye R, Golenbock DT, Blum D, Latz E, Buée L, Heneka MT (2019). NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology. *Nature* 575(7784): 669-673.
84. Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, Griep A, Axt D, Remus A, Tzeng TC, Gelpi E, Halle A, Korte M, Latz E, Golenbock DT (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 493(7434): 674-678.
85. Rathinam VA, Fitzgerald KA (2016). Inflammasome complexes: emerging mechanisms and effector functions. *Cell* 165(4): 792-800.
86. Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J (2011). The inflammasome: an integrated view. *Immunol Rev* 243(1): 136-151.
87. Hoseini Z, Sepahvand F, Rashidi B, Sahebkar A, Masoudifar A, Mirzaei H (2018). NLRP3 inflammasome: its regulation and involvement in atherosclerosis. *J Cell Physiol* 233(3): 2116-2132.
88. Huang Y, Xu W, Zhou R (2021). NLRP3 inflammasome activation and cell death. *Cell Mol Immunol* 18(9): 2114-2127.

89. He Y, Hara H, Núñez G (2016). Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends Biochem Sci* 41(12): 1012-1021.
90. Paik S, Kim JK, Silwal P, Sasakawa C, Jo EK (2021). An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol* 18(5): 1141-1160.
91. Lu A, Magupalli VG, Ruan J, Yin Q, Atianand MK, Vos MR, Schröder GF, Fitzgerald KA, Wu H, Egelman EH (2014). Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell* 156(6): 1193-1206.
92. Sharma BR, Kanneganti TD (2021). NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases. *Nat Immunol* 22(5): 550-559.
93. Boucher D, Monteleone M, Coll RC, Chen KW, Ross CM, Teo JL, Gomez GA, Holley CL, Bierschenk D, Stacey KJ, Yap AS, Bezbradica JS, Schroder K (2018). Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *J Exp Med* 215(3): 827-840.
94. Broz P, Dixit VM (2016). Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol* 16(7): 407-420.
95. Otlü Ö, Erdem M, Kıran TR (2022). Microglial NLRP3 Inflammasome in Parkinson's Disease. Atik D, Kilic N (Ed.), *Advances in Health Sciences*. Duvar Publishing, Izmir, Sayfa: 241-261.
96. Zangiabadi S, Abdul-Sater AA (2022). Regulation of the NLRP3 inflammasome by posttranslational modifications. *J Immunol* 208(2): 286-292.
97. Swanson KV, Deng M, Ting JP (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* 19(8): 477-489.
98. Bai B, Yang Y, Wang Q, Li M, Tian C, Liu Y, Aung LHH, Li PF, Yu T, Chu XM (2020). NLRP3 inflammasome in endothelial dysfunction. *Cell Death Dis* 11(9): 776.
99. McKee CM, Coll RC (2020). NLRP3 inflammasome priming: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma. *J Leukoc Biol* 108(3): 937-952.
100. Kuang F, Liu J, Tang D, Kang R (2020). Oxidative damage and antioxidant defense in ferroptosis. *Front Cell Dev Biol* 8: 586578.
101. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 25(3): 486-541.

102. Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G (2019). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res* 29(5): 347-364.
103. Rashidi M, Wicks IP, Vince JE (2020). Inflammasomes and cell death: common pathways in microparticle diseases. *Trends Mol Med* 26(11): 1003-1020.
104. Broz P, Pelegrín P, Shao F (2020). The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. *Nat Rev Immunol* 20(3): 143-157.
105. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, Zhuang Y, Cai T, Wang F, Shao F (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 526(7575): 660-665.
106. Yu P, Zhang X, Liu N, Tang L, Peng C, Chen X (2021). Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Signal Transduct Target Ther* 6(1): 128.
107. Aglietti RA, Dueber EC (2017). Recent Insights into the molecular mechanisms underlying pyroptosis and gasdermin family functions. *Trends Immunol* 38(4): 261-271.
108. Pandey A, Shen C, Feng S, Man SM (2021). Cell biology of inflammasome activation. *Trends Cell Biol* 31(11): 924-939.
109. He WT, Wan H, Hu L, Chen P, Wang X, Huang Z, Yang ZH, Zhong CQ, Han J (2015). Gasdermin d is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Res* 25(12): 1285-1298.
110. Kovacs SB, Miao EA (2017). Gasdermins: effectors of pyroptosis. *Trends Cell Biol* 27(9): 673-684.
111. Ding J, Wang K, Liu W, She Y, Sun Q, Shi J, Sun H, Wang DC, Shao F (2016). Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature* 535(7610): 111-116.
112. Sborgi L, Rühl S, Mulvihill E, Pipercevic J, Heilig R, Stahlberg H, Farady CJ, Müller DJ, Broz P, Hiller S (2016). GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *EMBO J* 35(16): 1766-1778.
113. Schroder K, Tschopp J (2010). The inflammasomes. *Cell* 140(6): 821-832.
114. Wu Y, Zhang J, Yu S, Li Y, Zhu J, Zhang K, Zhang R (2022). Cell pyroptosis in health and inflammatory diseases. *Cell Death Discov* 8(1): 191.

115. Holbrook JA, Jarosz-Griffiths HH, Caseley E, Lara-Reyna S, Poulter JA, Williams-Gray CH, Peckham D, McDermott MF (2021). Neurodegenerative disease and the NLRP3 inflammasome. *Front Pharmacol* 12: 643254.
116. Heneka MT, McManus RM, Latz E (2018). Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* 19(10): 610-621.
117. Guo H, Callaway JB, Ting JP (2015). Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med* 21(7): 677-687.
118. Tsatsanis A, McCorkindale AN, Wong BX, Patrick E, Ryan TM, Evans RW, Bush AI, Sutherland GT, Sivaprasadarao A, Guennewig B, Duce JA (2021). The acute phase protein lactoferrin is a key feature of Alzheimer's disease and predictor of A β burden through induction of APP amyloidogenic processing. *Mol Psychiatry* 26(10): 5516-5531.
119. Haque ME, Akther M, Jakaria M, Kim IS, Azam S, Choi DK (2020). Targeting the microglial NLRP3 inflammasome and its role in Parkinson's disease. *Mov Disord* 35(1): 20-33.
120. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJ (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener* 12(1): 10.
121. Wang S, Yuan YH, Chen NH, Wang HB (2019). The mechanisms of NLRP3 inflammasome/pyroptosis activation and their role in Parkinson's disease. *Int Immunopharmacol* 67: 458-464.
122. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, Schrag AE, Lang AE (2017). Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers* 3: 17013.
123. Sarkar S, Malovic E, Harishchandra DS, Ghaisas S, Panicker N, Charli A, Palanisamy BN, Rokad D, Jin H, Anantharam V, Kanthasamy A, Kanthasamy AG (2017). Mitochondrial impairment in microglia amplifies NLRP3 inflammasome proinflammatory signaling in cell culture and animal models of Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis* 3: 30.
124. Voet S, Srinivasan S, Lamkanfi M, van Loo G (2019). Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *EMBO Mol Med* 11(6): e10248.

125. Ahmed S, Kwatra M, Ranjan Panda S, Murty USN, Naidu VGM (2021). Andrographolide suppresses NLRP3 inflammasome activation in microglia through induction of parkin-mediated mitophagy in in-vitro and in-vivo models of Parkinson disease. *Brain Behav Immun* 91: 142-158.
126. Sharma M (2019). Mechanism of beta 2 adrenergic receptor (β_2 AR) agonist in regulation of inflammation in Parkinson's disease. Doctor of Philosophy Thesis, University of Alberta Department of Medical Microbiology and Immunology, Edmonton.
127. Barisione G, Baroffio M, Crimi E, Brusasco V (2010). Beta-adrenergic agonists. *Pharmaceuticals (Basel)* 3(4): 1016-1044.
128. Guimarães S, Moura D (2001). Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev* 53(2): 319-356.
129. Chu EK, Drazen JM (2005). Asthma: one hundred years of treatment and onward. *Am J Respir Crit Care Med* 171(11): 1202-1208.
130. Ryan KM, Griffin ÉW, Ryan KJ, Tanveer R, Vanattou-Saifoudine N, McNamee EN, Fallon E, Heffernan S, Harkin A, Connor TJ (2016). Clenbuterol activates the central IL-1 system via the β_2 -adrenoceptor without provoking inflammatory response related behaviours in rats. *Brain Behav Immun* 56: 114-129.
131. Hostrup M, Narkowicz CK, Habib S, Nichols DS, Jacobson GA (2019). Beta2 - adrenergic ligand racemic formoterol exhibits enantioselective disposition in blood and skeletal muscle of humans and elicits myocellular PKA signaling at therapeutic inhaled doses. *Drug Test Anal* 11(7): 1048-1056.
132. Kurien BT (2021). Western Blotting for the Non-Expert. *Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert*. Springer Nature Switzerland, Cham, Sayfa: 7-8.
133. Kurien BT, Scofield RH (2015). Western blotting: Methods and protocols. *Methods in Molecular Biology*. Springer Science+Business Media, New York, Sayfa: 17-19.
134. Mısır S (2017). Türk propolisinin meme kanseri (MCF-7) hücre serisi üzerinde mikroRNA ekspresyonu ve apoptoza etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Trabzon.

135. Righi M, Mori L, De Libero G, Sironi M, Biondi A, Mantovani A, Donini SD, Ricciardi-Castagnoli P (1989). Monokine production by microglial cell clones. *Eur J Immunol* 19(8): 1443-1448.
136. Stansley B, Post J, Hensley K (2012). A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 9: 115.
137. Koziol-White C, Johnstone TB, Corpuz ML, Cao G, Orfanos S, Parikh V, Deeney B, Tliba O, Ostrom RS, Dainty I, Panettieri RA Jr (2020). Budesonide enhances agonist-induced bronchodilation in human small airways by increasing cAMP production in airway smooth muscle. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 318(2): 345-355.
138. Hung CH, Chu YT, Hua YM, Hsu SH, Lin CS, Chang HC, Lee MS, Jong YJ (2008). Effects of formoterol and salmeterol on the production of Th1- and Th2-related chemokines by monocytes and bronchial epithelial cells. *Eur. Respir. J* 31(6): 1313-1321.
139. Lewis RJ, Chachi L, Newby C, Amrani Y, Bradding P (2016). Bidirectional Counterregulation of Human Lung Mast Cell and Airway Smooth Muscle β_2 Adrenoceptors. *J. Immunol* 196(1): 55-63.
140. Victoni T, Salvator H, Abrial C, Brollo M, Porto LCS, Lagente V, Naline E, Grassin-Delyle S, Devillier P (2017). Human lung and monocyte-derived macrophages differ with regard to the effects of β_2 -adrenoceptor agonists on cytokine release. *Respir. Res* 18(1): 126.
141. Taştan B (2017). Dimetil fumaratın mikrogial hücrelerde NLRP3 inflamazom aktivasyonu üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilimler Ana Bilim Dalı, İzmir.
142. Chan FK, Moriwaki K, De Rosa MJ (2013). Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol Biol* 979: 65-70.
143. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD (2018). Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harb Protoc* (6).
144. Chang Y, Zhu J, Wang D, Li H, He Y, Liu K, Wang X, Peng Y, Pan S, Huang K (2020). NLRP3 inflammasome-mediated microglial pyroptosis is critically involved in the development of post-cardiac arrest brain injury. *J Neuroinflammation* 17(1): 219.

145. Huang Y, Wang H, Hao Y, Lin H, Dong M, Ye J, Song L, Wang Y, Li Q, Shan B, Jiang Y, Li H, Shao Z, Kroemer G, Zhang H, Bai L, Jin T, Wang C, Ma Y, Cai Y, Ding C, Liu S, Pan Y, Jiang W, Zhou R (2020). Myeloid PTEN promotes chemotherapy-induced NLRP3-inflammasome activation and antitumour immunity. *Nat Cell Biol* 22(6): 716-727.
146. Hu JJ, Liu X, Xia S, Zhang Z, Zhang Y, Zhao J, Ruan J, Luo X, Lou X, Bai Y, Wang J, Hollingsworth LR, Magupalli VG, Zhao L, Luo HR, Kim J, Lieberman J, Wu H (2020). FDA-approved disulfiram inhibits pyroptosis by blocking gasdermin d pore formation. *Nat Immunol* 21(7): 736-745.
147. Walle L, Lamkanfi M (2016). Pyroptosis. *Curr Biol* 26(13): R568-R572.
148. Welinder C, Ekblad L (2011). Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *J Proteome Res* 10(3): 1416-1419.
149. Signore M, Reeder KA (2012). Antibody validation by Western blotting. *Methods Mol Biol* 823: 139-55.
150. He DK, Xu N, Shao YR, Shen J (2020). NLRP3 gene silencing ameliorates phosgene-induced acute lung injury in rats by inhibiting NLRP3 inflammasome and proinflammatory factors, but not anti-inflammatory factors. *J Toxicol Sci* 45(10): 625-637.
151. Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
152. Li Y, Xia Y, Yin S, Wan F, Hu J, Kou L, Sun Y, Wu J, Zhou Q, Huang J, Xiong N, Wang T (2021). Targeting microglial α -synuclein/TLRs/NF-kappaB/NLRP3 inflammasome axis in Parkinson's disease. *Front Immunol* 12: 719807.
153. Lee E, Hwang I, Park S, Hong S, Hwang B, Cho Y, Son J, Yu JW (2019). MPTP-driven NLRP3 inflammasome activation in microglia plays a central role in dopaminergic neurodegeneration. *Cell Death Differ* 26(2): 213-228.
154. Li S, Fang Y, Zhang Y, Song M, Zhang X, Ding X, Yao H, Chen M, Sun Y, Ding J, Wang Q, Lu M, Wu G, Hu G (2022). Microglial NLRP3 inflammasome activates neurotoxic astrocytes in depression-like mice. *Cell Rep* 41(4): 111532.
155. Stancu IC, Lodder C, Botella Lucena P, Vanherle S, Gutiérrez de Ravé M, Terwel D, Bottelbergs A, Dewachter I (2022). The NLRP3 inflammasome modulates tau pathology and neurodegeneration in a tauopathy model. *Glia* 70(6): 1117-1132.

156. Arioz BI, Tastan B, Tarakcioglu E, Tufekci KU, Olcum M, Ersoy N, Bagriyanik A, Genc K, Genc S (2019). Melatonin attenuates LPS-induced acute depressive-like behaviors and microglial NLRP3 inflammasome activation through the SIRT1/Nrf2 pathway. *Front Immunol* 10: 1511.
157. Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers* 1: 332-349.
158. Shokrzadeh M, Modanloo M (2017). An overview of the most common methods for assessing cell viability. *JAMDSR* 5: 33-41.
159. Aslantürk, ÖS (2018). In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. Larramendy M, Soloneski S (Ed.), *Genotoxicity-A predictable risk to our actual world*. IntectOpen, London, Sayfa: 64-80.
160. Xu S, Wang J, Jiang J, Song J, Zhu W, Zhang F, Shao M, Xu H, Ma X, Lyu F (2020). TLR4 promotes microglial pyroptosis via lncRNA-F630028O10Rik by activating PI3K/AKT pathway after spinal cord injury. *Cell Death Dis* 11(8): 693.
161. Rayamajhi M, Zhang Y, Miao EA (2013). Detection of pyroptosis by measuring released lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol Biol* 1040: 85-90.
162. Long Y, Liu X, Tan XZ, Jiang CX, Chen SW, Liang GN, He XM, Wu J, Chen T, Xu Y (2020). ROS-induced NLRP3 inflammasome priming and activation mediate PCB 118- induced pyroptosis in endothelial cells. *Ecotoxicol Environ Saf* 189: 109937.
163. Hegde B, Bodduluri SR, Satpathy SR, Alghsham RS, Jala VR, Uriarte SM, Chung DH, Lawrenz MB, Haribabu B (2018). Inflammasome-independent leukotriene B4 production drives crystalline silica-induced sterile inflammation. *J Immunol* 200(10): 3556-3567.
164. Song N, Fang Y, Sun X, Jiang Q, Song C, Chen M, Ding J, Lu M, Hu G (2018). Salmeterol, agonist of β_2 -adrenergic receptor, prevents systemic inflammation via inhibiting NLRP3 inflammasome. *Biochem Pharmacol* 150: 245-255.
165. Damo E, Agarwal A, Simonetti M (2023). Activation of β_2 -Adrenergic Receptors in Microglia Alleviates Neuropathic Hypersensitivity in Mice. *Cells* 12(2): 284.
166. Cheataini F, Ballout N, Al Sagheer T (2023). The effect of neuroinflammation on the cerebral metabolism at baseline and after neural stimulation in neurodegenerative diseases. *J Neurosci Res* 101(8): 1360-1379.

167. Ryan KJ, Griffin É, Yssel JD, Ryan KM, McNamee EN, Harkin A, Connor TJ (2013). Stimulation of central β_2 -adrenoceptors suppresses NF κ B activity in rat brain: a role for I κ B. *Neurochem Int* 63(5): 368-378.
168. Blevins HM, Xu Y, Biby S, Zhang S (2022). The NLRP3 Inflammasome Pathway: A Review of Mechanisms and Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Front Aging Neurosci* 14: 879021.



YAYINLAR

1. Doğu Karahan, Hasan Ata Bolayır, Aslı Bolayır, Bilgehan Demir, Önder Otlı, **Mehmet Erdem** (2024). Can serum interleukin 34 levels be used as an indicator for the prediction and prognosis of COVID-19? PLOS ONE (yayımlanmak üzere kabul edildi).
2. Nevsun Pihtili Tas, Rabia Aydoğan Baykara, Ali Gurbuz, Erkan Cure, Medine Cumhur Cure, **Mehmet Erdem**, Adem Kucuk, Tugce Tasar Yildirim (2024). PCSK9 and Apelin in Fibromyalgia Syndrome. Archives of Rheumatology (yayımlanmak üzere kabul edildi).
3. Nurcan Kırıcı Berber, Siahmet Atlı, Ayşegül Altıntop Geçkil, **Mehmet Erdem**, Tuğba Raika Kıran, Önder Otlı, Erdal İn (2024). Diagnostic Value of Galectin-3 in Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Medicina 60(4): 529.
4. Kıran TR, Otlı Ö, **Erdem M**, Geçkil AA, Berber NK, İn E (2023). The effects of disease severity and comorbidity on oxidative stress biomarkers in obstructive sleep apnea. Sleep Breath 1-13.
5. Berber NK, Geçkil AA, Altan NÖ, Kıran TR, Otlı Ö, **Erdem M**, İn E (2023). Efficacy of Serum Apelin and Galectin-3 as Potential Predictors of Mortality in Severe COVID-19 Patients. J Med Virol 95(2): e28494.
6. Geçkil AA, Kıran TR, Berber NK, Otlı Ö, **Erdem M**, İn E (2022). Carbonic anhydrase IX as a marker of disease severity in obstructive sleep apnea. Medicina 58(11): 1643.
7. Otlı Ö, **Erdem M**, Korkmaz K, Ota Günay Ö, İn E, Kıran TR, Bay Karabulut A (2022). Effect of altered iron metabolism on hyperinflammation and coagulopathy in patients with critical COVID-19: a retrospective study. Int J Acad Med Pharm 4(1): 60-64.
8. Mentese A, Dogramaci S, Demir S, Yaman SO, Ince I, Altay DU, **Erdem M**, Turan I, Alver A (2021). The effect of homocysteine on the expression of CD36, PPAR γ , and C/EBP α in adipose tissue of normal and obese mice. Arch Physiol Biochem 127(5): 437-444.
9. **Erdem M**, Karahan SC, Mentese A, Özer Yaman S, Demir S (2021). The Assessment of Oxidative Stress Biomarkers in Different Serum and Plasma Specimens. Erciyes Med J 43(6): 541-547.

10. Keser H, Doğramacı Ş, Şahin E, Sağlam N, **Erdem M**, Alver A, Aydın-Abidin S (2020). The TrkB agonist 7,8-dihydroxyflavone improves sensory-motor performance and reduces lipid peroxidation in old mice. *Gen Physiol Biophys* 39(5): 471-479.
11. Ardic S, Gumrukcu A, Gonenc Cekic O, **Erdem M**, Reis Kose GD, Demir S, Kose B, Yulug E, Mentese A, Turedi S (2019). The value of endoplasmic reticulum stress markers (GRP78 and CHOP) in the diagnosis of acute mesenteric ischemia. *Am J Emerg Med* 37(4): 596-602.
12. Mentese A, Erkut N, Demir S, Ozer Yaman S, Sumer A, **Erdem M**, Alver A, Sonmez MG (2018). Serum carbonic anhydrase I and II autoantibodies in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Centr Eur J Immunol* 43 (3): 276280.

BİLDİRİLER

1. Hande Gülbenk, **Mehmet Erdem**, Tuğba Raika Kıran (2024). Molecular Mechanisms in Non-alcoholic Steatohepatitis Inflammation. 8th International ICONTECH Congress on Innovative Surveys in Positive Sciences, Baku, 16-18 March 2024, 680-699.
2. Buse Semerci Arıkan, **Mehmet Erdem**, Tuğba Raika kıran (2024). Carbohydrate and Protein Metabolism in Alzheimer's Disease. International Scientific Compilation Research Congress, Ankara, 11-12 February 2024, 87-103.
3. Zeynep Güçtekin, **Mehmet Erdem**, Ümran Karabulut Doğan, Engin Yıldırım, Tuğba Raika Kıran (2023). Evaluation of vascular tone in patients with menorrhagia. 4th ISPEC International Congress on Contemporary Scientific Research, Ganja, 14-15 November 2023, 566.
4. **Mehmet Erdem**, Tuğba Raika Kıran, Önder Otlı (2022). Demir bağımlı hücre ölümü: Ferroptoz. 4th International Euroasian Conferance on Science, Engineering and Technology, Ankara, 14-16 December 2022, 70.
5. **Erdem M**, Dogramaci S, Alver A, Mentese A, Abidin I, Demir S, Karahan SC (2018). Altered neuropeptide y and ghrelin levels BDNF heterozygous mice. 43rd FEBS Congress, Prague, 07-12 July 2018, 166.
6. Doğramacı Ş, **Erdem M**, Alver A, Mentese A, Aydın-Abidin S, Özer Yaman S, Ince I, Bodur A, Karahan SC (2018). Evaluation of FNDC5/Irisin levels of BDNF heterozygous mice. 43rd FEBS Congress, Prague, 07-12 July 2018, 167.

7. Ardiç Ş, Uslu Z, Gönenç Çekiç Ö, Yadigaroglu M, **Erdem M**, Menteşe A, Abanoz B, Türedi S (2018). Subaraknoid Kanama Şüphesi Olan Hastalarda Bakılan UCH-L1 Düzeyinin Tanı ve Prognozadaki Yeri. 6. Avrasya Acil Tıp Kongresi&14. Türkiye Acil Tıp Kongresi, Antalya, 8-11 Kasım 2018, 217.
8. Ardiç Ş, Gümrükçü A, Gönenç Çekiç Ö, **Erdem M**, Reis Köse GD, Demir S, Köse B, Yuluğ E, Menteşe A, Türedi S (2018). Endoplazmik retikulum stres markırlarının (GRP78 ve CHOP) akut mezenter iskemi tanısındaki değeri. Yeri. 6. Avrasya Acil Tıp Kongresi&14. Türkiye Acil Tıp Kongresi, Antalya, 8-11 Kasım 2018, 180.
9. **Erdem M**, Karahan SC, Menteşe A, Özer Yaman S, Demir S (2017). Farklı tüplere alınan kan örneklerinde tayin edilen oksidatif stres biyobelirteçlerinin değerlendirilmesi. 28. Uluslararası Biyokimya Kongresi, Erzurum, 19-23 Eylül 2017, 34.
10. Doğramacı Ş, Menteşe A, Demir S, Özer Yaman S, İnce İ, Us Altay D, **Erdem M**, Turan I, Alver A (2017). Homosisteinin normal ve obez farelerin yağ dokusunda CD36, PPAR gamma and C/EBP alpha gen ekspresyonu üzerine etkisi. 28. Uluslararası Biyokimya Kongresi, Erzurum, 19-23 Eylül 2017, 23.
11. Menteşe A, Erkut N, **Erdem M**, Özer Yaman S, Demir S, Alver A, Sonmez M (2016). Serum carbonic anhydrase autoantibodies and chronic lymphocytic leukemia. 41st FEBS Congress, Aydın, 3-8 September 2016, 253.
12. Malkoç M, Us Altay D, Şen T, Özer Yaman S, Şahin E, Doğramacı Ş, Akbulut K, **Erdem M**, Alver A (2015). Paklitaksel ile tedavi edilmiş meme kanserli sıçanlarda arı sütünün CA 15-3 seviyesine etkisi. XXVII Ulusal Biyokimya Kongresi, Antalya, 3-6 Kasım 2015, 161.
13. Demir S, Menteşe A, Karahan SC, Esen M, Tat M, **Erdem M**, Doğramacı Ş (2015). Serum kolesterol düzeyi ve iskemi modifiye albümin arasındaki ilişkinin incelenmesi. XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Antalya, 3-6 Kasım 2015, 229.

ÖDÜLLER / TEŞVİKLER/ BURSLAR

1. Yayın Teşvik Ödülü, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), 2023
2. Yayın Teşvik Ödülü, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), 2019

3. 43. FEBS Kongresi, Katılım-Konaklama-Seyahat Bursu, Prag, Çek Cumhuriyeti, Temmuz 2018
4. 28. Uluslararası Biyokimya Kongresi, Katılım-Konaklama-Seyahat Bursu, Erzurum, Eylül 2017

HOBİLER

1. Gitar çalmak
2. Tenis oynamak
3. Kamp yapmak

