



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**BDNF’NİN NLRP3 İNFLAMAZOMU VE NLRP3
ARACILI PİROPTOZ ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Şeniz ERDEM

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ahmet ALVER

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. Şeniz ERDEM

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum, tez çalışmam süresince her aşamada göstermiş olduğu hoşgörü, inanç ve desteğinden dolayı değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ALVER'e,

Hem güzel ahlaki değerlerini hem de akademik başarılarını örnek aldığım Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. Birgül V. KURAL, Prof. Dr. Ahmet MENTEŞE, Doç. Dr. Fulya B. YÜCESAN ve Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin YAMAN'a,

Tez çalışmam süresince katkılarını esirgemeyen Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İsmail ABİDİN'e, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Ersan KALAY, Doç. Dr. Tuba DİNÇER, Dr. Öğr. Üyesi Gökhan YILDIZ ve yüksek lisans öğrencisi Soner KARABULUT'a,

Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm araştırma görevlisi, doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma,

Akademik hayatım boyunca katkılarını esirgemeyen tüm Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Ömrüm boyunca eksikliğini her zaman hissedeceğim canımdan öte, kalbimdeki tüm sevgilerin özü olan biricik anneme,

Her yönüyle hayatıma renk katan değerli eşim Arş. Gör. Mehmet ERDEM'e sonsuz teşekkür ederim.

Arş. Gör. Şeniz ERDEM

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin TDK-2021-9686 ve TSA-2023-10700 No'lu projeleri tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiii
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xviii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnflamazom	3
2.1.1. NLRP3 İnflamazomu	4
2.1.2. NLRP3 İnflamazom Aktivasyonu ve Aktivatörleri	5
2.1.3. Piroptoz: İnflamasyonun Ana Düzenleyicisi	8
2.1.4. NLRP3 İnflamazomunun Hastalıklarla İlişkisi	14
2.2. Nörotrofinler	17
2.2.1. BDNF ve Genel Özellikleri	18
2.2.2. BDNF'nin Genel Fonksiyonları ve Nöroinflamasyon /İnflamasyon Sürecindeki Önemi	20
2.3. Western Blot	23
3. GEREÇ ve YÖNTEM	25
3.1. Gereç	25
3.1.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	25
3.1.2. Kullanılan Ticari Kitler, Antikorlar ve Kimyasallar	26
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Uygulanan Prosedür	28
3.2.2. Farelerin Genotipinin Belirlenmesi	29
3.2.2.1. PCR ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi	30

3.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması	31
3.2.4. Serumda BDNF Seviyesinin Ölçümü	32
3.2.5. Serumda IL-1 β Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi	33
3.2.6. Serumda IL-18 Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi	34
3.2.7. Dokularda NLRP3 İnflamazom Yolu ile İlişkili Protein Seviyelerinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi	36
3.3. İstatistiksel Analiz	42
4. BULGULAR	43
4.1. Farelerin Genotiplenmesi	43
4.2. Serum BDNF Seviyesi Ölçümüne Ait Bulgular	44
4.3. Serum IL-1 β Seviyesi Ölçümüne Ait Bulgular	45
4.4. Serum IL-18 Seviyesi Ölçümüne Ait Bulgular	47
4.5. Deney Gruplarının NLRP3 İnflamazom Yolağı ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları	49
4.5.1. Deney Gruplarının Hipokampus Dokularındaki NLRP3 İnflamazom Yolağı ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları	49
4.5.2. Deney Gruplarının Korteks Dokularındaki NLRP3 İnflamazom Yolağı ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları	52
4.5.3. Deney Gruplarının Karaciğer Dokularındaki NLRP3 İnflamazom Yolağı ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları	55
4.5.4. Deney Gruplarının Epididimal Yağ Dokularındaki NLRP3 İnflamazom Yolağı ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları	58
4.5.5. Deney Gruplarının Kas Dokularındaki NLRP3 İnflamazom Yolağı ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları	61
4.6. Deney Gruplarının Otofaji ve Otofagozom Oluşumu ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları	64
4.6.1. Deney Gruplarının Hipokampus Dokularındaki Otofaji ve Otofagozom Oluşumu ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları	64
4.6.2. Deney Gruplarının Korteks Dokularındaki Otofaji ve Otofagozom Oluşumu ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları	66
4.6.3. Deney Gruplarının Karaciğer Dokularındaki Otofaji ve Otofagozom Oluşumu ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları	68

4.6.4. Deney Gruplarının Epididimal Yağ Dokularındaki Otofaji ve Otofagozom Oluşumu ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları	70
4.6.5. Deney Gruplarının Kas Dokularındaki Otofaji ve Otofagozom Oluşumu ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları	72
4.7. Deney Gruplarının ESCRT-III aracılı Plazma Membran Onarım Sistemi ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları	74
4.7.1. Deney Gruplarının Hipokampus Dokularındaki ESCRT-III aracılı Plazma Membran Onarım Sistemi ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları	74
4.7.2. Deney Gruplarının Korteks Dokularındaki ESCRT-III aracılı Plazma Membran Onarım Sistemi ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları	76
4.7.3. Deney Gruplarının Karaciğer Dokularındaki ESCRT-III aracılı Plazma Membran Onarım Sistemi ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları	78
4.7.4. Deney Gruplarının Epididimal Yağ Dokularındaki ESCRT-III aracılı Plazma Membran Onarım Sistemi ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları	79
4.7.5. Deney Gruplarının Kas Dokularındaki ESCRT-III aracılı Plazma Membran Onarım Sistemi ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları	81
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	83
6. KAYNAKLAR	91
EKLER	110
EK 1. Etik Kurul Onayı	111
EK 2. Etik Kurul Onayı	112
ÖZGEÇMİŞ	113

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. NLRP3 inflamazom aktivatörleri	6
Tablo 2. Piroptozun temel özellikleri	11
Tablo 3. Tez çalışmasında kullanılan cihaz, alet ve malzemelerinin özellikleri	25
Tablo 4. Tez çalışmasında kullanılan kitler, antikorlar ve kimyasallar ile üretici firmaları	26
Tablo 5. Genotipleme için kullanılan primer dizileri	29
Tablo 6. Genotiplemede uygulanan PCR aşamaları	30
Tablo 7. Genotipleme için PCR’da yapılan karışımların içeriği ve miktarları	30
Tablo 8. % 5’lik yükleme jelinin hazırlanması	39
Tablo 9. % 10 ve % 12’lik ayırma jelinin hazırlanması	39
Tablo 10. Serum BDNF seviyelerine ait değerler	44
Tablo 11. Serum IL-1 β seviyelerine ait değerler	46
Tablo 12. Serum IL-18 seviyelerine ait değerler	48
Tablo 13. Hipokampus dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF- κ B p65 protein seviyelerinin sonuçları	50
Tablo 14. Korteks dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF- κ B p65 protein seviyelerinin sonuçları	53
Tablo 15. Karaciğer dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF- κ B p65 protein seviyelerinin sonuçları	56
Tablo 16. Epididimal yağ dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF- κ B p65 protein seviyelerinin sonuçları	59
Tablo 17. Kas dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF- κ B p65 protein seviyelerinin sonuçları	62
Tablo 18. Hipokampus dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin sonuçları	65

Tablo 19. Korteks dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin sonuçları	67
Tablo 20. Karaciğer dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin sonuçları	69
Tablo 21. Epididimal yağ dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin sonuçları	71
Tablo 22. Kas dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin sonuçları	73
Tablo 23. Hipokampus dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen VPS4A protein seviyelerinin sonuçları	75
Tablo 24. Korteks dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen VPS4A protein seviyelerinin sonuçları	77
Tablo 25. Karaciğer dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen VPS4A protein seviyelerinin sonuçları	78
Tablo 26. Epididimal yağ dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen VPS4A protein seviyelerinin sonuçları	80
Tablo 27. Kas dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen VPS4A protein seviyelerinin sonuçları	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	NLRP3 inflamozom bileşenleri ve kompleksi	5
Şekil 2.	NLRP3 inflamazom aktivasyonu	8
Şekil 3.	Gasdermin poru ve piroptoz	10
Şekil 4.	ESCRT-III aracılı plazma membran onarımı	13
Şekil 5.	BDNF'nin sentezi ve salgılanma mekanizması	18
Şekil 6.	BDNF Standart grafiği	32
Şekil 7.	IL-1 β standart grafiği	34
Şekil 8.	IL-18 standart grafiği	36
Şekil 9.	Hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas dokularında protein miktarını hesaplamak için kullanılan standart grafiği	38
Şekil 10.	PCR ürünlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü	43
Şekil 11.	Serum BDNF analiz sonuçları	45
Şekil 12.	Serum IL-1 β analiz sonuçları	47
Şekil 13.	Serum IL-18 analiz sonuçları	48
Şekil 14.	Hipokampus dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF- κ B p65 protein seviyelerinin sonuçları	51
Şekil 15.	Korteks dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF- κ B p65 protein seviyelerinin sonuçları	54
Şekil 16.	Karaciğer dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF- κ B p65 protein seviyelerinin sonuçları	57
Şekil 17.	Epididimal yağ dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF- κ B p65 protein seviyelerinin sonuçları	60
Şekil 18.	Kas dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF- κ B p65 protein seviyelerinin sonuçları	63

Şekil 19.	Hipokampus dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin sonuçları	66
Şekil 20.	Korteks dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin sonuçları	68
Şekil 21.	Karaciğer dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin sonuçları	70
Şekil 22.	Epididimal yağ dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin sonuçları	72
Şekil 23.	Kas dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin sonuçları	74
Şekil 24.	Hipokampus dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen VPS4A protein seviyelerinin sonuçları	76
Şekil 25.	Korteks dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen VPS4A protein seviyelerinin sonuçları	77
Şekil 26.	Karaciğer dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen VPS4A protein seviyelerinin sonuçları	79
Şekil 27.	Epididimal yağ dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen VPS4A protein seviyelerinin sonuçları	80
Şekil 28.	Kas dokusu örneklerinde Western blot yöntemiyle analiz edilen VPS4A protein seviyelerinin sonuçları	82
Şekil 29.	BDNF eksikliği ve NLRP3 inflamazom aktivasyonu arasındaki ilişkinin şematik gösterimi	89

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AGE	İleri glikasyon son ürün
AIM2	Absent in melanoma 2
Akt	Protein kinazı B
ALG-2	Apoptoz bağlantılı gen-2
ALIX	Apoptoz bağlantılı gen-2 (ALG-2) ile etkileşen protein X
ALR	AIM2 benzeri reseptör
AMPK	AMP-aktive edici protein kinaz
APS	Amonyum persülfat
ASC	Apoptozla ilişkili speck benzeri protein
ATP	Adenozin trifosfat
ATPaz	Adenozin trifosfataz
Aβ	Amiloid beta
Bad	Bcl-2-ilişkili ölüm promotörü
BCA	Bikinkoninik asit
Bcl-2	B hücreli lenfoma 2
BDNF	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (protein)
<i>Bdnf</i>	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör geni
C/EBPβ	CCAAT arttırıcı bağlayıcı protein beta
CamK	Kalmodulin kinaz
cAMP	Siklik AMP
CLR	C-tipi lektin reseptör
CREB	cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein
DAMP	Hasarlanma ile ilişkili moleküler yapılar
Dfna5	Sendromik olmayan işitme bozukluğu proteini 5
DFNB59	Otozomal resesif sağırılık (autosomal recessive deafness 59)
DTT	Dithiothreitol
ER	Endoplazmik retikulum
ESCRT	Taşıma için gerekli olan endozomal sıralama kompleksi (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport)
FFA	Serbest yağ asitleri

GABA	Gama aminobütirik asit
GAD67	Glutamik asit dekarboksilaz 67
GSDMD	Gasdermin D
HMGB-1	Yüksek mobilite grubu protein 1
HÖAK	Hücre Ölümü Adlandırma Komitesi (Cell Death Nomenclature Committee)
HSP	Isı şok proteini
IFN	İnterferon
IFN-γ	İnterferon gama
IL-10	İnterlökin-10
IL-18	İnterlökin-18
IL-18R	IL-18 reseptörü
IL-1R8	IL-1 reseptörü 8
IL-1β	İnterlökin-1 β
IL-37	İnterlökin-37
IL-4	İnterlökin-4
IL-6	İnterlökin-6
IP3	İnositol trifosfat
IRF1	İnterferon düzenleyici faktör 1
JNK	c-Jun N-terminali kinaz
LC3	Hafif zincir 3
LDH	Laktat dehidrogenaz
LPS	Lipopolisakkarit
LRR	Lösence zengin tekrar domaini
MAMP	Metabolizma ile ilişkili moleküler yapılar
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
mBDNF	Olgun beyin kaynaklı nörotrofik faktör
MMP	Matriks metalloproteinaz
mtDNA	Mitokondriyal DNA
NACHT	Nükleotid bağlama domaini
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NGF	Sinir büyüme faktörü
Nig	Nigerisin

NLR	NOD-benzeri reseptör
NLRC4	NLR-family caspase recruitment domain (CARD)-containing protein 4
NLRP1	NOD-benzeri reseptör ailesi pyrin domain içeren protein 1 (NOD-like receptor family-pyrin domain-containing 1)
NLRP3	NOD-benzeri reseptör ailesi pyrin domain içeren protein 3 (NLR family pyrin domain-containing 3)
NLRP6	NOD-benzeri reseptör ailesi pyrin domain içeren protein 6 (NOD-like receptor family-pyrin domain-containing 6)
NMDAR	N-metil-D-aspartat reseptör
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domains-containing protein 2
Nrf2	Nükleer faktör eritroidden türetilen 2 benzeri 2
NT	Nörotrofin
OxLDL	Okside düşük yoğunluklu lipoprotein
P2X7	P2X purinoseptör 7
p75^{NTR}	p75 nörotrofin reseptörü
PAMP	Patojenle ilişkili moleküler yapılar
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PGC-1α	Peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör gama koaktivatörü 1-alfa
PH	Parkinson hastalığı
PI3K	Fosfatidil inositol-3-kinaz
PLC	Fosfolipaz C
PPAR-γ	Peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gama
PRR	Patern tanıma reseptör
PTM	Posttranslasyonel modifikasyon
PYD	Pirin domaini
RA	Romatoid artrit
RhoA	Ras homolog gen ailesi üyesi A
RIG-I	Retinoik asitle indüklenebilir gen-I
RKIP	RAF-kinaz inhibitör protein
RLR	RIG-benzeri reseptör
ROS	Reaktif oksijen türleri

SDS	Sodyum dodesil sülfat
SIRT1	Sirtuin 1
SMAD3	SMAD aile üyesi 3
SNpc	Substantia nigra pars kompakta
SQSTM1	Sekestozom 1
TAE	Tris-asetik asit-EDTA
TCA	Trikloro asetik asit
TEMED	N,N,N,N-Tetrametil etilen diamin
TLR	Toll-benzeri reseptör
TLR-4	Toll benzeri reseptör-4
TNF-α	Tümör nekroz faktörü alfa
TrkB	Tropomiyozin-ilişkili kinaz B
VGLUT	Veziküler glutamat taşıyıcısı
VPS4A	Vakuolar protein sıralama ile ilişkili protein 4A (Vacuolar protein sorting 4)
α-syn	α -sinüklein
Simgeler	
α	Alfa
β	Beta
°C	Derece santigrat
γ	Gama
κ	Kappa
μ	Mikro
Formüller	
(NH₄)₂S₂O₈	Amonyum persülfat
CH₃COOH	Asetik asit
C₄H₁₀O₂S₂	Dithiothreitol
C₂H₅OH	Etanol
H₃PO₄	Fosforik asit
MgCl₂	Magnezyum klorür
KCl	Potasyum klorür
NaCl	Sodyum klorür

ÖZET

BDNF'nin NLRP3 İnflamazomu ve NLRP3 Aracılı Piroptoz Üzerine Etkisinin İncelenmesi

İnflamazomlar, patojenle ilişkili moleküler yapılar (PAMP) ya da hasarlanma ile ilişkili moleküler yapılar (DAMP) gibi çeşitli uyarılarla aktive olan ve doğuştan gelen bağışıklık yanıtında önemli bir rol oynayan multiprotein komplekslerdir. NOD-benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren protein 3 (NLRP3) inflamazomu aktive olduğunda kaspaz-1 aracılığıyla interlökin-1 β (IL-1 β) ve interlökin-18 (IL-18) gibi sitokinlerin salınımı gerçekleşmektedir. NLRP3 inflamazomu aktive olduğunda hücre ölümü de gerçekleştiğinden, inflamazom aktivasyonunun regülasyonu ve inhibisyonu inflamasyonla ilişkili hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde faydalı bir yol olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, inflamasyonun azaltılmasında immünomodülatör terapötik endojen moleküllere oldukça ihtiyaç vardır. İmmünomodülatör etkilere sahip bir nörotrofin olan beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), aşırı inflamasyonu baskılamak için çekici bir adaydır. Ancak, BDNF'nin NLRP3 inflamazomu ve NLRP3 inflamazomunun neden olduğu inflamatuvar hücre ölüm türü olan piroptozu nasıl etkilediği henüz araştırılmamıştır. Bu çalışmada, BDNF'nin NLRP3 inflamazom aktivasyonu, gasdermin D (GSDMD)-aracılı piroptotik hücre ölümü ve bu yolağın negatif düzenleyicileri üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. *In vivo* modelde, *Bdnf*^{+/+} ve *Bdnf*^{+/-} farelerde lipopolisakkarit (LPS) ve Nigerisin (Nig) uygulanarak NLRP3 inflamazom aktivasyonu sağlandı. NLRP3 inflamazom aktivasyonunun sonunda, serum örneklerinde BDNF, IL-1 β ve IL-18 seviyeleri ELISA yöntemiyle, hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas dokusu örneklerinde ise NLRP3 inflamazom yolağı ve bu yolağın negatif düzenleyicileri ile ilişkili proteinlerin seviyeleri Western blot yöntemiyle belirlendi. BDNF eksikliğinin nükleer faktör kappa B (NF- κ B) inhibisyonu yoluyla NLRP3 inflamazomu ile ilişkili proteinlerin seviyelerini arttırdığı, IL-1 β ve IL-18 salınımını ve piroptotik hücre ölümünü uyardığı ortaya koyuldu. Ayrıca, BDNF eksikliğinin NLRP3 inflamazom aktivasyonunun ve piroptozun inhibisyonunda önemli yollar olan otofajiyi, otofagozom oluşumunu ve plazma membran onarımını inhibe ettiği gösterildi. Sonuç olarak, BDNF eksikliği inflamazom aktivasyonunun ve GSDMD-aracılı piroptozun artmasına neden olmaktadır.

Anahtar Kelimeler: ESCRT-III sistemi, NLRP3 inflamazomu, Otofaji, Piroptoz

ABSTRACT

Investigation of The Effect of BDNF on NLRP3 Inflammasome and NLRP3 Mediated Pyroptosis

Inflammasomes are multiprotein complexes that are activated by various stimuli such as pathogen-associated molecular patterns (PAMP) or damage-associated molecular patterns (DAMP) and play an important role in the innate immune response. When the NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome is activated, cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-18 (IL-18) are released via caspase-1. Since cell death also occurs when the NLRP3 inflammasome is activated, regulation and inhibition of inflammasome activation may be a useful way to treat and prevent inflammation-related diseases. Therefore, immunomodulatory therapeutic endogenous molecules are highly needed to reduce inflammation. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a neurotrophin with immunomodulatory effects, is an attractive candidate for suppressing excessive inflammation. However, how BDNF affects the NLRP3 inflammasome and pyroptosis, a type of inflammatory cell death caused by the NLRP3 inflammasome, has not yet been investigated. In this study, it was aimed to examine the effect of BDNF on NLRP3 inflammasome activation, gasdermin D (GSDMD)-mediated pyroptotic cell death, and negative regulators of this pathway. In the *in vivo* model, NLRP3 inflammasome activation was achieved by applying lipopolysaccharide (LPS) and nigericin (Nig) in *Bdnf*^{+/+} and *Bdnf*^{+/-} mice. At the end of NLRP3 inflammasome activation, the levels of BDNF, IL-1 β and IL-18 in serum samples were determined by ELISA method, and the levels of proteins related to the NLRP3 inflammasome pathway and negative regulators of this pathway in hippocampus, cortex, liver, epididymal adipose and muscle tissue samples were determined by Western blot method. It was revealed that BDNF deficiency increased the levels of NLRP3 inflammasome-related proteins through the activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B), stimulated the release of IL-1 β and IL-18 and pyroptotic cell death. Additionally, BDNF deficiency was shown to inhibit autophagy, autophagosome formation, and plasma membrane repair, which are important pathways in the inhibition of NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis. As a result, BDNF deficiency causes increased inflammasome activation and GSDMD-mediated pyroptosis.

Keywords: Autophagy, ESCRT-III machinery, NLRP3 inflammasome, Pyroptosis

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnflamazomlar, çeşitli patojenik veya fizyolojik uyarılarla aktive edilen, doğuştan gelen bağışıklık yanıtında önemli bir rol oynayan multiprotein komplekslerdir. NLRP3 inflamazomu, çeşitli fizyolojik/patojenik uyarılarla veya doku hasarına yanıt olarak aktive edilen hücre içi multiprotein kompleksidir ve doğuştan gelen bağışıklık sisteminde ve inflamasyonda merkezi bir rolü vardır (1, 2). Bu kompleks; NLRP3, apoptozla ilişkili speck benzeri protein (ASC) ve pro-kaspaz-1'den oluşur (3). NLRP3 proteini, LPS gibi PAMP'ların ve hücre dışı adenosin trifosfat (ATP) ve Nig gibi por oluşturan toksinler gibi DAMP'ların neden olduğu hücrel değişiklikleri algılayan bir "sensör proteini" olarak görev görür (1, 4-8). NLRP3 inflamazom aktivasyonu için priming ve aktivasyon sinyali olmak üzere iki sinyal gereklidir. İlk olarak, priming sinyali, toll-benzeri reseptörler (TLR'ler) gibi patern tanıma reseptörleri (PRR'ler) tarafından indüklenir. TLR'ler LPS gibi PAMP'lar veya diğer endojen faktörler tarafından aktive edilir. Bu sinyal, NF- κ B aracılığıyla NLRP3, pro-IL-1 β ve pro-IL-18'in transkripsiyonunu uyarır (4-8). PAMP'ler veya DAMP'ler gibi bir NLRP3 aktivatörünün tanınmasıyla oluşan aktivasyon sinyali, multiprotein komplekslerinin biraraya gelmesini sağlar ve inflamazom aktivasyonu tamamen uyarılır (9, 10). Aktive NLRP3 inflamazom kompleksi kaspaz-1'in ayrılmasını sağlayarak 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 (3, 11, 12). Ayrıca kaspaz-1, GSDMD'nin bölünmesine de aracılık eder. Bu bölünmeyle oluşan N-terminal fragmenti, plazma membranında por oluşturarak membran bütünlüğü kaybına ve IL-1 β ve IL-18 salınımına neden olur. Böylece GSDMD porları inflamatuvar hücre ölüm türü olan piroptozu uyarmaktadır (13).

NLRP3 inflamazom aktivasyonu ve NLRP3-aracılı piroptotik hücre ölümü, taşıma için gerekli olan endozomal sınıflandırma kompleks-III (endosomal sorting complexes required for transport, ESCRT-III) aracılı plazma membran onarımı, otofaji aktivasyonu gibi farklı moleküler yollar aracılığıyla negatif olarak düzenlenebilir. Otofaji, stres koşullarında hücrel homeostazı korumak için gerekli bir mekanizmadır (14). Otofaji disfonksiyonu hiperinflamasyon ve aşırı inflamazom aktivasyonu gibi hücrel tepkilere yol açabilir (15, 16). Otofaji yoluyla sitozolden inflamazomları aktive eden uyarıların, inflamazom bileşenleri ve sitokinlerin uzaklaştırılmasıyla inflamazom aktivasyonu düzenlenebilir (16-18). İnflamazom aktivasyonunun ardından ESCRT-III sistemi, membran

bütünlüğünü korumak için GSDMD-aracılı piroptozun neden olduğu hasarlı plazma membranlarını onarır (13, 19). Bu süreç hem pro-inflamatuar sitokin sekresyonunu hem de piroptotik hücre ölümünü sınırlandırmaktadır (20, 21).

NLRP3 inflamazomu doğuştan gelen bağışıklık için gereklidir; ancak anormal NLRP3 inflamazom aktivasyonu inflamatuvar, metabolik, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların patogenezi ile ilişkilidir (1, 22, 23). Bu nedenle, bağışıklık homeostazını korumak için NLRP3 inflamazom aktivitesinin sıkı bir şekilde düzenlenmesi gerekir (24). NLRP3 inflamazomunun insan sağlığı ve hastalıkları üzerine artan araştırmalara rağmen, endojen düzenleyici mekanizmaları büyük ölçüde bilinmemektedir. Bu nedenle, inflamazom aktivasyonunun negatif düzenlenmesinde yer alan mekanizmanın anlaşılması, bu hastalıklar için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

BDNF merkezi ve periferel sinir sistemindeki nöronların gelişiminde, sağkalımında ve plastisitesinde hayati bir rol oynayan önemli bir nörotrofindir (25-27). Aynı zamanda enerji homeostazı, beyin ve glukoz metabolizması gibi birçok düzenleyici süreçlerde de rol oynar (27-30). BDNF başlıca beyin ve periferel dokularda (özellikle iskelet kası, karaciğer ve adipoz doku) sentezlenmektedir ve BDNF sinyalindeki fonksiyon bozukluğu veya BDNF eksikliği çok sayıda nörodejeneratif ve metabolik bozukluğun patofizyolojisinde rol oynamaktadır (31-34). Ek olarak, BDNF ayrıca NF- κ B aktivasyonunu, tümör nekroz faktör (TNF), interlökin-6 (IL-6), interferon- γ (IFN- γ) ve IL-1 β proinflamatuar sitokinlerin üretimini ve salgılanmasını inhibe ederek inflamatuvar homeostazı da düzenlemektedir (35-39). Ancak BDNF'nin immünomodülatör aktivite üzerindeki etkilerini konu alan çalışmaların sayısı her geçen gün artmasına rağmen, BDNF'nin NLRP3 inflamazom aktivasyonuna ve GSDMD-aracılı piroptozu olan etkisini araştıran çok sınırlı sayıda çalışma vardır.

Bu tez çalışmasında, *Bdnf*^{+/-} fareler kullanarak, BDNF'nin LPS ve nigerisin ile uyarılan NLRP3 inflamazom aktivasyonuna, GSDMD-aracılı piroptotik hücre ölümüne ve bu yolağın negatif düzenleyicileri üzerine etkisinin *in vivo* olarak araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnflamazom

Doğal bağışıklık sistemleri, enfeksiyonu tanıyan; patojen temizleme ve doku onarımı sürecini PRR'leri (TLR'ler, C tipi lektin reseptörleri (CLR'ler), Nod-benzeri reseptörler (NLR'ler) ve retinoik asitle indüklenebilir gen-I (RIG-I)-benzeri reseptörler (RLR'ler)) aracılığıyla başlatan ilk savunma hattıdır. İnflamasyon sürecinin moleküler mekanizması başlıca inflamazom yolunu içermektedir ve inflamazom aktivasyonu ana bileşendir (7, 11).

İlk olarak 2002 yılında Dr. Jurg Tschopp ve arkadaşları tarafından tanımlanan inflamazomlar, çeşitli fizyolojik veya patojenik uyarılarla aktive edilen polimorfik komplekslerdir. İnflamazomlar, patojenleri ve hasarlı hücreleri temizleme yeteneği sayesinde doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bir bileşenidir (40, 41). İnflamazomlar, DAMP ve PAMP gibi çeşitli uyarıları tanıyan multiprotein kompleksleridir (42, 43). İnflamazomlar aynı zamanda, enfeksiyona sebep olan mikroorganizmalara ve konak proteinlerinden oluşan moleküllere karşı inflamasyonun başlatılması ve kaspaz-1 aktivasyonunun düzenlenmesinde görevli olan bağışıklık yanıtıdır (44).

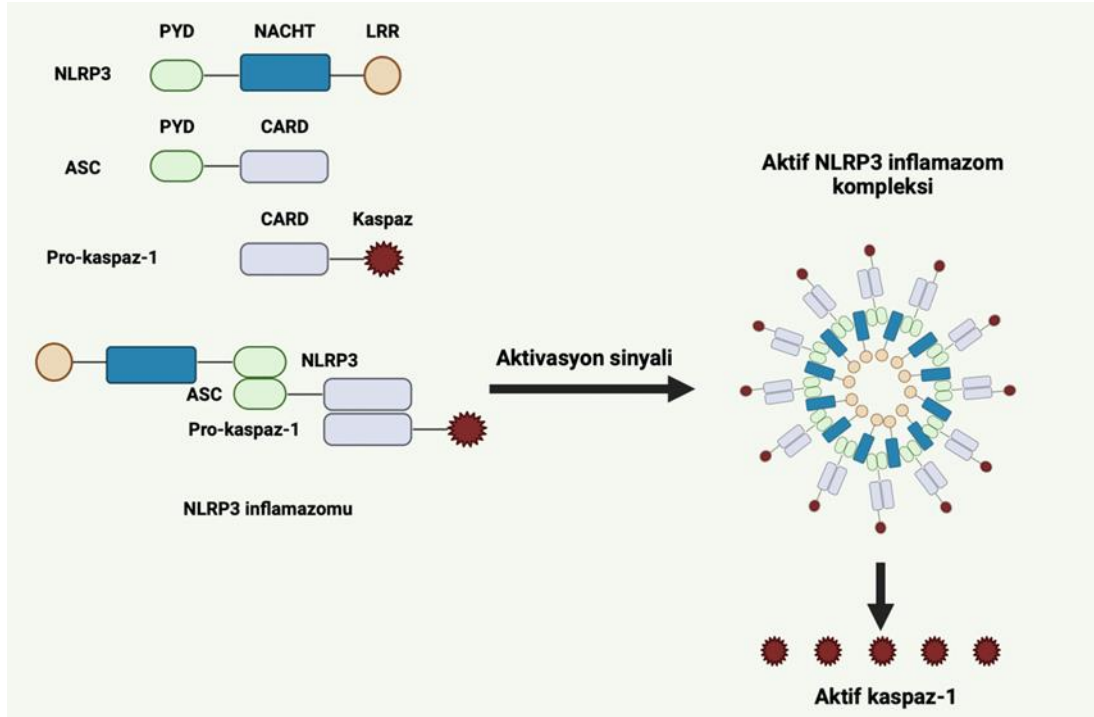
İnflamazom, NLR'ler, AIM2 benzeri reseptörler (ALR'ler) veya pirinin doğrudan veya dolaylı olarak ASC ile biraraya gelerek efektör kaspaz-1 aktivasyonunu sağlayan moleküler bir platformdur. Yapısal olarak, bu sensörlerin N-terminal ucunda bir CARD veya bir pirin (PYD) domaini bulunmaktadır. Adaptör ASC bir PYD ve bir CARD domaininden oluşurken, efektör kaspaz-1 amino ucunda bir CARD domaini, merkezde büyük katalitik domaini (p20) ve karboksi ucunda küçük katalitik domaini (p10) içermektedir (45, 46). Kaspazlar, aktif bölgesinde bulunan sisteinin nükleofilik saldırısıyla substratlarının C-terminal bölgesindeki aspartik asit rezidülerini spesifik olarak bölen sistein bağımlı proteazlardır. Kaspazlar inaktif zimojenler olarak sentezlenir ve proteolitik bölünme ve/veya oligomerizasyon ile aktive olurlar. Kaspazların bir alt kümesi olan inflamatuvar kaspazlar doğuştan gelen bağışıklığa ve inflamasyona aracılık ederler. İnsanlarda bunlar kaspaz-1, -4, -5 ve -12 ve farelerde kaspaz-1, -11 ve -12. Bunlar arasında kaspaz-1 fareler ve insanlarda yüksek oranda korunmuştur (47).

Bugüne kadar, NOD-benzeri reseptör ailesi pyrin domain içeren protein 1 (NOD-like receptor (NLR) family pyrin domain-containing 1 (NLRP1)), NLRP3, NLR-family caspase recruitment domain (CARD)-containing protein 4 (NLRC4), NOD-benzeri reseptör ailesi

pyrin domain içeren protein 6 (NOD-like receptor family-pyrin domain-containing 6 (NLRP6)) ve absent in melanoma 2 (AIM2) inflamazomları dahil olmak üzere çeşitli tipte inflamazomlar tanımlanmıştır (8). NLRP1, NLRP3, NLRP6, AIM2 ve pirinin N-terminal ucunda bir PYD domaini, NLRP1b ve NLRC4'ün ise bir CARD domaini bulunmaktadır. PYD içeren sensör proteinleri, ASC'nin yapısında bulunan PYD domainine bağlanır ve ASC'nin pro-kaspaz-1'in CARD domaini ile etkileşime girerek kaspaz-1'in aktive olmasını sağlar. Buna karşılık, CARD domaini içeren sensör proteinleri ise, ASC olmadan prokaspaz-1'in CARD domainine doğrudan bağlanarak kaspaz-1'i aktive edebilir. Bununla birlikte, ASC'nin varlığı, bir CARD domaini içeren sensör proteinlerinin biraraya gelmesini ve kaspaz-1'in aktivasyonunu artırabilir (45). Bunlar arasında NLRP3 inflamazomu, en iyi karakterize edilen ve bilimsel çalışmalara en fazla konu olan inflamatuvar sensör molekülüdür (8).

2.1.1. NLRP3 İnflamazomu

Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bir bileşeni olan NLRP3 inflamazomu; innate immün reseptör proteini NLRP3, adaptör protein ASC ve inflamatuvar proteaz kaspaz-1'den oluşan sitozolik multiprotein kompleksidir (48). NLRP3, üç ana domainden oluşmaktadır: karboksi ucunda lösince zengin tekrar domaini (LRR), merkezde nükleotid bağlama domaini (NACHT) ve amino ucunda 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 (49). NLRP3 aracılı inflamazom aktivasyonunu sağlayan PAMP ve DAMP dahil olmak üzere çeşitli uyarılara 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 (50, 51). 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 (40). 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 (43, 52-54). NLRP3 inflamazom bileşenleri ve kompleksi Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. NLRP3 inflamazom bileşenleri ve kompleksi (Otlu'dan, 55)

2.1.2. NLRP3 İnflamazom Aktivasyonu ve Aktivatörleri

PAMP'lar ve DAMP'lar aracılığıyla NLRP3 inflamazom aktivasyon mekanizması, priming ve aktivasyon sinyalinden oluşan iki aşamalı bir süreçtir. İlk sinyal olan priming aşaması iki fonksiyona sahiptir. İlk fonksiyonu, NLRP3, pro-IL-1 β 'nın ve pro-IL-18'in inflamazom bileşenlerinin ekspresyonunu uyarmaktır. Priming aşaması sırasında, endojen sitokinler (IL-1, TNF- α , IFN), TLR'ler veya sitokin reseptörleri (IL-1R ve TNFR) NF- κ B'nin aktivasyonunu uyarır. NF- κ B daha sonra NLRP3, pro-IL-1 β ve pro-IL-18'in transkripsiyonunu uyarır (5, 6, 56, 57). Priming aşamasının ikinci fonksiyonu ise, NLRP3'ün fosforilasyon/ defosforilasyon, sumolasyon, ubiquitinasyon/ deubikitinasyon, asetilasyon/deasetilasyon ve nitrosilasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlarını (PTM'ler) sağlamaktır. Kısaca, priming aşaması hem transkripsiyonel düzenleme ve hem de PTM'ler aracılığıyla NLRP3 inflamazom aktivasyonu için çok önemlidir (46, 48, 50, 58).

İkinci aşama olan “aktivasyon” aşamasında, NLRP3 inflamazom aktivasyonu için eksojen/patojen türevli veya endojen tehlike sinyalinden oluşan bir sinyal gerekmektedir. NLRP3 inflamazomunu aktive eden sinyaller; konakçıdan türetilen moleküller, amiloidojenik proteinler, α -sinüklein (α -syn), metabolik stres kaynaklı moleküller, çevresel

tahriş edici maddeler, bakteriyel por oluşturan toksinler, cildi tahriş edici maddeler ve tüm patojenlerdir (50, 58). NLRP3 inflamazom aktivatörleri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. NLRP3 inflamazom aktivatörleri (Paik’ten, 50; Zangiabadi’dan, 58)

DAMP	Vücut-kaynaklı	ATP, kolesterol kristalleri, palmitat, çözünür ürik asit, α -syn, amiloid β ($A\beta$), 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 ve RNA-DNA hibridi
	Viral	Çift ve tek sarmallı RNA

Ayrıca aktivasyon aşamasında, mitokondriyal disfonksiyon, reaktif oksijen türleri (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 hücresel olaylarda da NLRP3 inflamazom kompleksinin oluşmasına katkıda bulunabilir (6, 45, 46, 51, 56).

Potasyum salınımı: K^+ salınımı veya hücre içi potasyum düzeyinin azalması, Nig (K^+/H^+ iyonoforu) ve hücre dışı ATP gibi NLRP3 agonistleri tarafından indüklenen NLRP3 inflamazom aktivasyonuna neden olmaktadır (50). ATP, hücre membranında bulunan purinerjik reseptör ailesinin bir ligand kapılı iyon kanalı olan P2X purinoseptör 7'nin (P2X7) aktivasyonunu sağlayarak hem ATP-kapılı katyon kanalının açılmasını sağlar hem de panneksin-1 aracılığıyla por oluşumuna neden olur. Böylece hücre içerisindeki K^+ iyonlarının serbest kalmasına izin verir. Bununla birlikte, Nigerisin de panneksin-1 aracılığıyla por oluşturup K^+ akışını sağlayarak NLRP3 inflamazom aktivasyonunu indükler (59). ATP ve por oluşturuucu toksinlere ek olarak, alüminyum, silika ve kalsiyum pirofosfat kristallerinin tümü K^+ akışı yoluyla NLRP3 inflamazom aktivasyonunu sağlar (60).

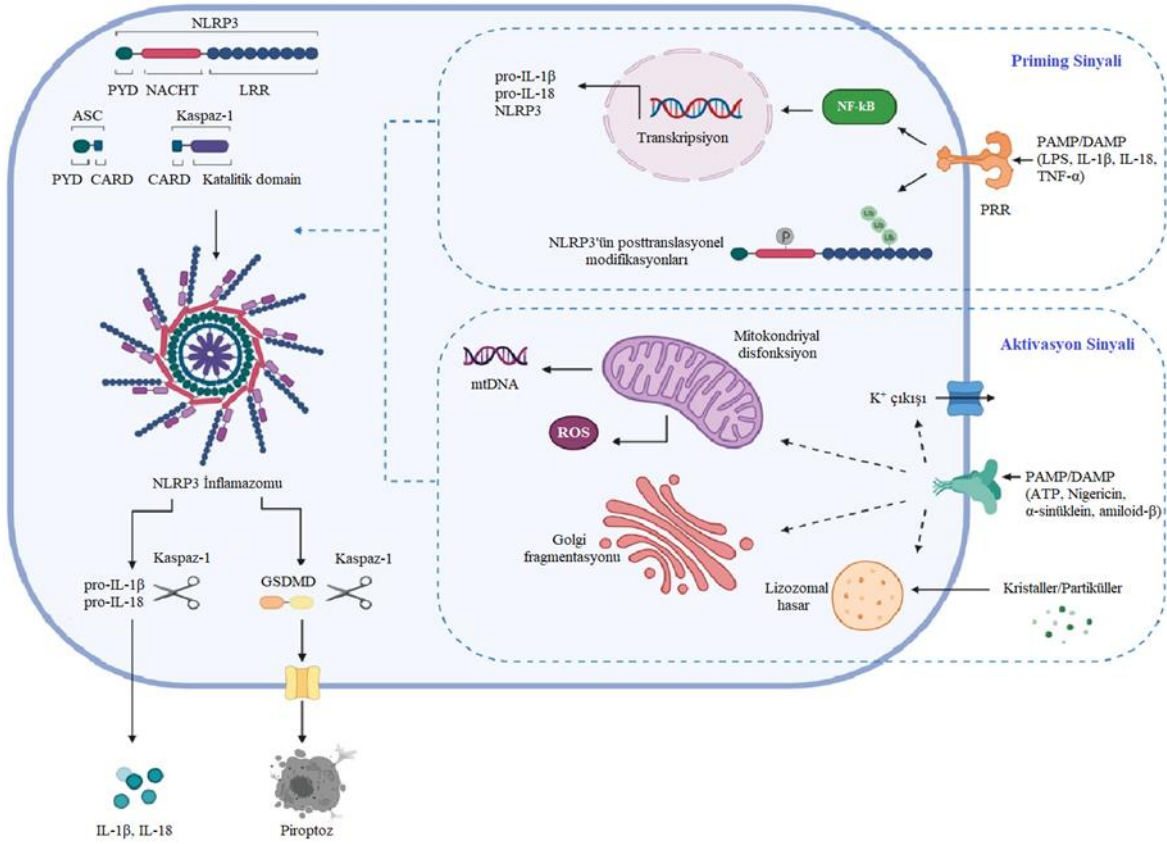
Ca^{2+} mobilizasyonu: Ca^{2+} mobilizasyonu, proliferasyon, farklılaşma, transkripsiyon, hücre metabolizma ve hücre ölümü dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçleri kontrol

etmektedir. Bu tür Ca^{2+} mobilizasyonu, bazal durumda düşük sitoplazmik Ca^{2+} seviyelerinin korunmasıyla mümkün olmaktadır (61). Ca^{2+} mobilizasyonu ya plazma membran kanallarının açılmasıyla ya da Ca^{2+} 'nın sitozole akışını sağlamak için endoplazmik retikulum (ER)-bağlı hücre içi Ca^{2+} depolarının salınması ile gerçekleşir. Böylece intraselüler Ca^{2+} seviyelerindeki değişiklikler NLRP3 inflamazom aktivasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca, K^+ akışı, Ca^{2+} girişi için plazma zarında bir karşı iyon olarak hareket ederek Ca^{2+} mobilizasyonunu düzenleyebilir. Bu nedenle, Ca^{2+} girişi ve K^+ akışı NLRP3 inflamazom aktivasyonunda koordineli olarak çalışmaktadır. Örneğin ATP, reseptörü P2X7 aracılığıyla zayıf bir Ca^{2+} girişini indükleyerek ve K^+ akışını koordine ederek Ca^{2+} 'nın mobilizasyonunu sağlar. K^+ akışı, ER bağlantılı Ca^{2+} depolarının salınımını ve ardından plazma Ca^{2+} kanallarının açılmasını destekler. Ek olarak, Nig, alüminyum, monosodyum ürat kristalleri tarafından indüklenen NLRP3 inflamazom aktivasyonunun, yukarıda belirtildiği gibi K^+ akışına ek olarak Ca^{2+} girişine de bağlı olduğu gösterilmiştir (46).

Lizozomal hasar: Lizozomal hasar ve lizozomal proteazlardan katepsinlerin (özellikle katepsin B) salınımı NLRP3 inflamazom aktivasyonunu uyarmaktadır. NLRP3 inflamazom aktivasyonunu sağlayan tehlike sinyalleri arasında ürik asit, kolesterol kristalleri, A β , α -syn, alüminyum, monosodyum ürat, silika ve asbest gibi kristaller ve partiküler maddeler yer almaktadır. Makrofajlar, nötrofiller ve mikrogialar gibi doğal immün hücreleri bu partiküleri içine alarak uzaklaştırılmasını sağlar. Öte yandan, lizozom içindeki fazla partikül yükü lizozomun stabilitesini bozarak ve katepsin B'nin sitozol içine sızmasına yol açarak NLRP3 inflamazom aktivasyonunu başlatmaktadır (50, 62, 63).

Mitokondriyal disfonksiyon: Mitokondri, hücrelerimizde enerji üreten organeldir. Mitokondri homeostazı bozulduğunda doğuştan gelen bağışıklık sisteminin muhtemel tetikleyicileri olarak merkezde yer almaktadır. Ayrıca, mitokondri ve DNA'ları nükleer genomdan bağımsız olarak replike olur ve bu işlem sırasında mitokondriyal DNA (mtDNA) proofreading yapılmadığından, yaşlanma ve oksidatif stresle ilgili hatalara karşı oldukça hassas olmaktadır (64). Aynı zamanda mitokondri ROS kaynağıdır ve mitokondriyal solunum zincirinin inhibisyonuyla oluşturulan mtROS NLRP3 inflamazom aktivasyonuna dahil olmaktadır. mtROS/mitokondriyal oksidatif stres hem mtDNA'nın sitozole salınmasına hem de mtDNA'da anormal değişikliklere (özellikle mtDNA oksidasyonu) neden olmaktadır. Bu şekilde yine hücre içi mtDNA'da TLR4/ interferon düzenleyici faktör (IRF1) aracılığıyla NLRP3 inflamazom aktivasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca, sitozolik

Ca^{2+} artışı mitokondride Ca^{2+} 'un aşırı yüklenmesine neden olmaktadır. Bu aşırı artış mitokondriyal disfonksiyonunu indükleyerek NLRP3 inflamazom aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu bilgiler birlikte ele alındığında, NLRP3 inflamazom aktivasyonunda mitokondriyal disfonksiyonun, mtROS ve mtDNA'nın bir rol oynadığı düşünülmektedir (5, 11). Ayrıca, mitokondriye özgü bir fosfolipid olan ve mitokondrinin iç zarında yer alan kardiyolipin NLRP3'ün LRR'lerini bağlamak için dış zara yönelmektedir (65). NLRP3 inflamazom aktivasyonu Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. NLRP3 inflamazom aktivasyonu (McKee'den, 66)

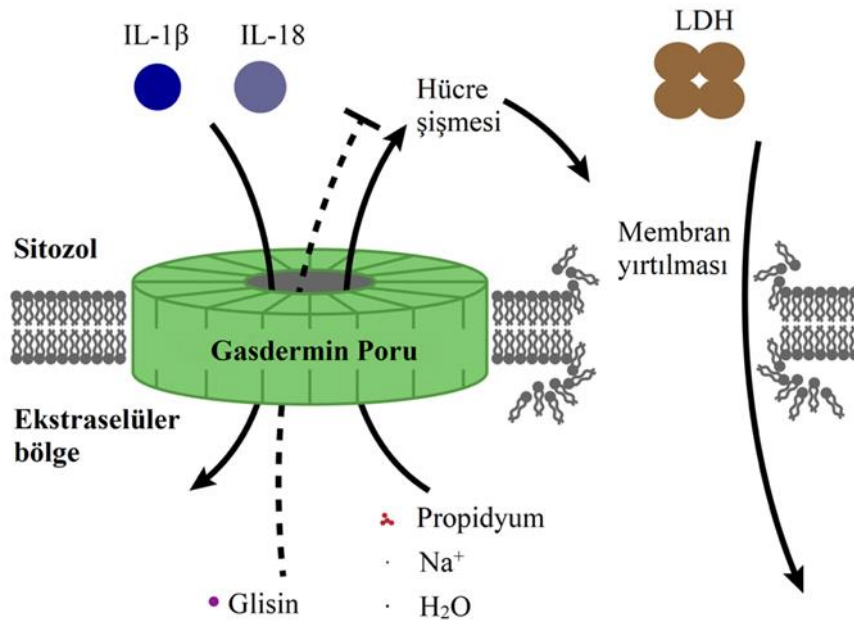
2.1.3. Piroptoz: İnflamasyonun Ana Düzenleyicisi

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 (67). Morfolojik kriterlere dayanan hücre ölümünün ilk

sınıflandırması 1970'lerde patologlar tarafından önerilmiştir. Patologlar, hücre ölümünün tip I (apoptoz), tip II (otofaji) ve tip III (nekroz) olmak üzere üç ana formu olduğunu öne sürmüşlerdir (68). En son hücre ölümü sınıflandırması, Hücre Ölümü Adlandırma Komitesi (Cell Death Nomenclature Committee, HÖAK) tarafından formüle edilmiş ve önerilmiştir. Genel olarak, hücre ölümü, hücre ölümü 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 (48, 69). HÖAK son yıllarda ferroptoz, nekroptoz, entotik hücre ölümü, netotik hücre ölümü, partanatolar, lizozom bağımlı hücre ölümü, otofaji, alkaliptoz, oksiptoz ve piroptoz gibi birçok yeni düzenlenmiş hücre ölümü modeli tanımlanmıştır (70).

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 (71). Olgun kaspaz-1'in, inflamazom aracılı inflammatuar hücre ölümünden sorumlu oligomerik membran porlarının oluşumunu sağlayan GSDMD'nin proteolitik bölünmesine aracılık ettiği keşfedilmiştir (13, 53). Bu nedenle, piroptoz 2015 yılında gasdermin aracılı programlı ölüm olarak tanımlanmıştır (72). Gasdermin süper ailesi, insanda gasdermin A/B/C/D (GSDMA/B/C/D), gasdermin E ve otozomal resesif sağırılık (autosomal recessive deafness 59 (DFNB59))'dan, farelerde ise Gsdma1-3, Gsdmc1-4, Gsdmd, sendromik olmayan işitme bozukluğu proteini 5 (Dfna5) ve Dfnb59'dan oluşmaktadır. Bu korunmuş proteinler arasında, GSDMD ve DFNA5, piroptotik hücre ölümünde en çok çalışılan proteinlerdir. DFNB59 hariç tüm bu proteinler, iki korunmuş domainden oluşur: N-terminal por oluşturucu domain ve C-terminal baskılayıcı domain (sırasıyla, PFD ve RD) (73). N-terminal domaini muhtemelen por oluşumundan dolayı sitotoksik aktiviteye sahipken, C-terminal domaini oto-inhibitördür ve bu sitotoksisteye karşı koruma sağlar (74). GSDMA, GSDMB, GSDMC, GSDMD ve GSDME'nin N-terminal domaini aracılığıyla piroptozu uyarmaktadır. NLRP3 inflamazom aktivasyonunu takiben, inflammatuar kaspazlar (farelerde kaspaz-1 ve -11 ve insanlarda kaspaz-1, -4 ve -5), özellikle kaspaz-1, sitozolik bir protein olan GSDMD'nin proteolitik

olarak bölünmesini indükler ve N-terminal domainini C-terminal oto-inhibitör domaininden ayrılmasını sağlayarak aktive eder (75). İnflamatuar kaspazlara ek olarak, diğer proteazların (nötrofil elastaz veya katepsin G) GSDMD'yi proteolitik olarak bölünmesini (N-terminal fragmenti (p30) ve C-terminal fragmenti (p20)) sağladığı rapor edilmiştir, bu da GSDMD'nin birçok sinyal yollarıyla hem piroptotik hücre ölümünün bir substratı ve yürütücüsü olarak kullanılabileceğini hem de IL-1 β ve IL-18'in sekresyonu için gerekli olduğunu düşündürmektedir (75, 76). Bu aktivasyon neticesinde GSDMD'nin N-terminal domaini (p30), fosfatidilinositol fosfatlar, fosfatidilserin ve kardiyolipin dahil olmak üzere membran lipidlerine doğrudan bağlanabilir. Plazma zarı 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 zarı üzerinde 10-20 nm'lik çapta sitoplazmik oligomerik porlar oluşur (75, 77). Bu porlar hücre membran bütünlüğünün bozulmasına, hücre içi ozmotik basıncın artmasına ve IL-18 (5.0 nm), IL-1 β (4.5 nm), su (0.275 nm), Na⁺ (0.277 nm), glisin (0.97 nm), laktat dehidrogenaz (LDH) (9.6 nm), yüksek mobilite grubu protein 1 (HMGB-1) ve ısı sok proteini (HSP) gibi moleküllerin sekresyonunu sağlayarak inflamasyonun yayılmasına katkı sağlar (8, 13, 77-79). GSDMD poru ve piroptoz Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. Gasdermin poru ve piroptoz (Kovacs'tan, 77)

GSDMD'nin aktivasyonu plazma membran bütünlüğü kaybına neden olduğu için piroptoz süreci başlatmış olur. 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 (48). Piroptozun temel özellikleri Tablo 2'de verilmiştir.

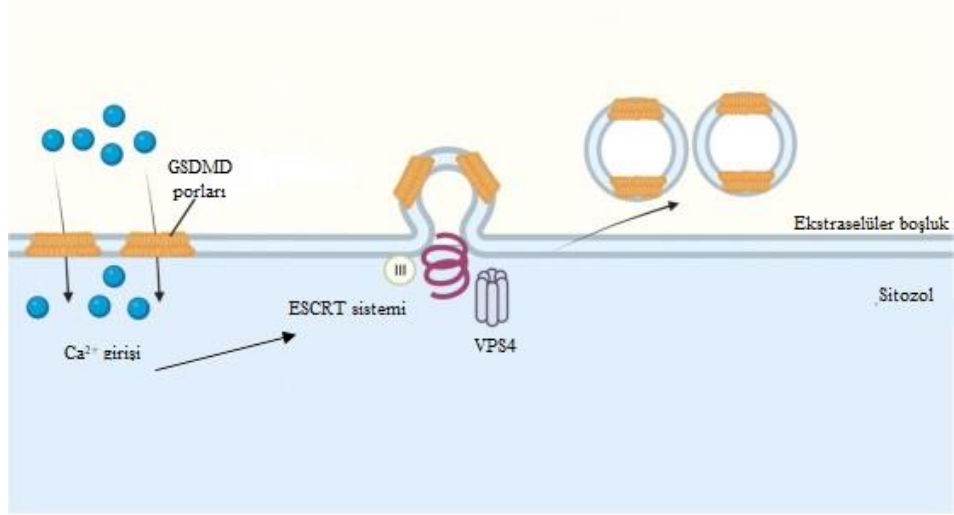
Tablo 2. Piroptozun temel özellikleri (Huang'dan, 48)

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. Hücresel şişme ve plazma zarı yırtılması görülür.
İnflamatuar yanıtı	Pro-inflamatuar
Salınan içerikler	IL-1 β , IL-18, IL-1 α , HMGB1 ve LDH

Piroptozun düzenlenmesi tam olarak tanımlanmamakla birlikte bu alandaki çalışmalar gün geçtikçe atmaktadır. Piroptozun derecesi, artan inflamazom aktivasyonu ile artmaktadır (8, 12). Yüksek düzeyde piroptoz, inflammatuar semptomların şiddetlenmesine, hücre ölümüne ve ciddi doku/organ yetmezliğine neden olabilir (80). Ayrıca birçok organelin ve plazma zarının sitozole bakan iç yüzü benzer lipidlerden (fosfatidilinositol fosfat, fosfatidilserin ve kardiyolipin) oluşmaktadır. Örneğin, endoplazmik retikulumda GSDMD poru oluşursa, sitozole kalsiyum depolarından kalsiyum akışı sağlanabilir (77).

NLRP3 inflamazom aktivasyonu ve NLRP3-aracılı piroptotik hücre ölümü farklı moleküler yollarla düzenlenebilir. Bu yollar; ESCRT-III aracılı plazma membran onarımı, otofagozom aktivasyonu, interlökin-37 (IL-37)'nin IL-18 reseptörü (IL-18R) /koreseptör IL-1 reseptörü 8 (IL-1R8 veya SIGIRR) ile etkileşimi veya SMAD aile üyesi 3 (SMAD3) reseptörüne bağlanması aracılığı ile gerçekleşebilir.

ESCRT-III aracılı plazma membran onarımıyla: ESCRT-III; Vps20 (CHMP3), Snf7 (CHMP4A, B, C), Vps24 (CHMP3) ve Vps2 (CHMP2A, B)'den oluşan dört çekirdek alt birimden ve Did2 (CHMP1A, B), Vps60 (CHMP5) ve Ist1 (hIst1) yardımcı proteinlerinden oluşur. Bu alt birimler sitozolde inaktif monomerler halinde bulunurlar. Membranlar üzerinde geçici ESCRT-III heteropolimer yapısı oluşturmak için biraraya gelirler. ESCRT-III alt birimleri, dört α -heliks yapıdan oluşan ortak bir çekirdek alanı paylaşır (81). Vakuolar protein sıralama ile ilişkili protein 4A (Vacuolar protein sorting 4 (VPS4A)), onarıcı kapasiteyi artırarak hücreye hayatta kalma avantajı sağlamaktadır. Vps4, bir tip I AAA'dır (çeşitli hücresel aktivitelerle ilişkili ATPaz) ve ESCRT mekanizmasının tek ATP tüketen faktörüdür. Bireysel ESCRT-III alt birimlerini sitoplazmaya geri salan ESCRT-III polimerlerini sökmek için ATP hidrolizi gereklidir (82). GSDMD gözeneklerinden kalsiyum akışı, ESCRT'yi hasarlı membran alanlarına doğru çekerek hücrelerde membran onarımını başlatan bir sinyal olarak hizmet etmektedir. 2018 yılında Science dergisinde yayınlanan bir makalede, Rühl ve arkadaşları, ESCRT-III aracılı membran onarımının GSDMD'nin neden olduğu piroptotik hücre ölümünü geciktirebileceğini veya önleyebileceğini ortaya koymuşlardır (20). Bu ESCRT-III aracılı onarım, GSDMD porlarını çıkararak membran bütünlüğünü korumakta ve piroptoz sırasında yüksek oranda porlu hücrelerin nihai ozmotik parçalanmasını önlemektedir (20, 21). ESCRT-III aracılı plazma membran onarımı, inflamazom aktivasyonundan sonra IL-1 β ve IL-18 pro-inflamatuar sitokin sekresyonunu ve piroptozu sınırlandırmaktadır. Böylece, ESCRT-III sistemi GSDMD'nin neden olduğu hasarlı plazma membranlarını onarımını sağlayarak piroptotik hücre kaderini negatif olarak düzenlemektedir (20). ESCRT-III aracılı plazma membrane onarımı Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. ESCRT-III aracılı plazma membrane onarımı (Rühl ve Broz’dan, 83)

Otofagozom aktivasyonu aracılığıyla: Otofaji, stres koşulları sırasında hücrel homeostazı sürdürmek için gerekli bir mekanizmadır (84). Bu nedenle otofaji, yeni ve daha sağlıklı hücreler elde etmek için agregre veya yanlış katlanmış proteinlerin yıkımında, hücre içi patojenlerin ortadan kaldırılmasında ve hasarlı organellerin temizlenmesinde önemli bir rolü olan hücre içi bir süreçtir. Otofajideki bozukluklar hiperinflamasyon ve aşırı inflamazom aktivasyonu ile inflamatuvar hastalıklara yol açmaktadır (15, 16). Bu nedenle, otofaji NLRP3 inflamazom aktivasyonu ile yakından ilişkilidir. Birçok çalışma ile, otofajinin sitozolden inflamazomu aktive eden uyaranları uzaklaştırarak ve NLRP3 inflamazom bileşenlerini degrade ederek NLRP3 inflamazom aktivasyonunu negatif olarak düzenlediği gösterilmiştir (16, 17). İnflamazom bileşenleri LC3 bağlayıcı adaptör protein p62'ye bağlı degradasyonu ile aşırı inflamazom aktivasyonu önlenir. Monositlerde NLRP3 inflamazom aktivasyonu üzerine, NLRP3 ve ASC inflamazom bileşenleri p62 tarafından tanınır ve otofagozomlarla birlikte lokalize olur. Bu NLRP3 inflamazomunun otofagozomlar tarafından yutulabileceğini ve degrade olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, farmakolojik olarak otofajinin inhibisyonu ve p62 kaybı, NLRP3 inflamazom aktivasyonunu büyük ölçüde arttırmaktadır (15, 16).

IL-37’nin IL1R/IL-18 hücre yüzey reseptörleri ile etkileşimi ve SMAD3 reseptörüne bağlanması aracılığıyla: IL-1 sitokin ailesinin yeni bir üyesi olan IL-37, doğal bağışıklık sistemi tarafından indüklenen geniş etkili, güçlü bir anti-inflamatuardır. IL-37 iki farklı yolla immün sistemi inhibe edebilir. Birinci yol, IL-37’nin IL1R/IL-18 hücre yüzey

reseptörleri ile etkileşimi sonucu immün sistemin inhibisyonudur. IL-37, IL-18 ile iki benzer amino asit rezidüsüne sahiptir ve dolayısıyla hücre dışı IL-37, sinyal yolunun iletimini baskılamak için IL-18R ve IL-1R8 ile etkileşime girer. Böylece, IL-37-IL-1R8-IL-18R kompleksi hem anti-inflamatuar sinyal yollarını aktive eder hem de NLRP3 inflamazom aktivasyonunu baskılar (85-87). İkinci yol ise, IL-37'nin SMAD3 reseptörüne bağlanması sonucu immün sistemin inhibisyonudur. Hücre içindeki IL-37, fosforile veya fosforile olmayan Smad3 ile etkileşime girer ve onun çekirdeğe translokasyonunu teşvik eder. Böylece nükleusta pro-inflamatuar sitokinlerin (IL-1 β , IFN- γ , IL-6 ve TNF- α) gen ekspresyonunu inhibe eder (88).

2.1.4. NLRP3 İnflamazomunun Hastalıklarla İlişkisi

Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, sağlıkta ve hastalıkta çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Enfeksiyona karşı ilk savunma hattını temsil eder ve doku onarımı, yara iyileşmesi ve apoptotik hücrelerin ve hücre kalıntıların temizlenmesinde rol oynar. Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin aşırı aktivasyonu, sistemik veya lokal inflammatuar komplikasyonlara yol açabilir ve inflammatuar hastalıkların gelişimine katkıda bulunabilir (89). Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bir bileşeni olan NLRP3 inflamazomunun anormal/ aşırı aktivasyonu, metabolik hastalıklar (obezite, ateroskleroz, tip 2 diyabet), kardiyovasküler hastalıklar (iskemik ve iskemik olmayan kalp hastalığı), inflammatuar sorunlar (karaciğer hastalıkları, inflammatuar bağırsak hastalıkları, gut mikrobiyomu, romatoid artrit), kas hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, multipl skleroz, amyotrofik lateral skleroz ve diğer nörolojik bozukluklar) gibi çeşitli inflammatuar hastalıkların patogenezi ile ilişkilidir (23, 90, 91). Yanlış katlanmış protein agregatları ve bu hastalıklara eşlik eden belirli metabolitlerin anormal birikimi, bu hastalıkların başlamasında ve ilerlemesinde kritik bir rol oynayan NLRP3 inflamazomunun doğrudan aktivatörleri olduğu kanıtlanmış endojen DAMP'lardır (92). Bu nedenle, istenmeyen aşırı inflamasyonu önlemek için NLRP3 inflamazom aktivasyonunun sıkı bir şekilde düzenlenmesi gerekmektedir.

Kronik, düşük dereceli, metabolik inflamasyon “metaflamasyon” obezite ile ilişkili bozuklukların patogenezinde çok önemlidir (93). Obezite, ektopik lipid birikimine ve serbest yağ asitlerinin seviyelerinin artmasına yol açan adipositlerin kronik inflamasyonu ile karakterize edilmektedir. Bu nedenle serbest yağ asitlerinin yüksek seviyeleri bir tehlike

sinyal molekölü olarak NLRP3 inflamazom aktivasyonuna neden olur. Aynı zamanda obezite, tip 2 diyabet ve ateroskleroz gibi çeşitli metabolik bozuklukların gelişimine de katkı sağlamaktadır (23). Ayrıca obezite birçok organı (pankreatik, adipoz, hepatik, kalp ve kas dokusu) da etkilemekte ve kronik metabolik ve inflamatuvar değışikliklere neden olmaktadır. Bu değışiklikler, bozulmuş insülin duyarlılığına, pankreas β -hücre disfonksiyonuna, alkole bağı olmayan yağlı karaciğer hastalığına ve ateroskleroza katkı sağlamaktadır (94). Yapılan araştırmalar sonucunda hücre kültürü (adipositler), deney hayvanları (ob/ob veya yüksek yağlı diyetle oluşturulmuş obez hayvanlar) ve insan (obez hastalar) çalışmalarında NLRP3, ASC, kaspaz-1, IL-18 ve IL-1 β ekspresyonlarının upregüle olduğu bulunmuştur (23).

Diyabet hastalığında metabolik bir stres olan serbest yağ asitleri, hiperglisemi ve glukoz kontrolündeki bozukluklar immün fonksiyon bozukluğuna yol açmaktadır (95-97). Glukozun, NLRP3 inflamazomunun etkili aktivatörlerinden biri olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, diyabetin ayırt edici özelliklerinden biri olan hiperglisemi (glukotoksisitenin) DAMP olarak fonksiyon göstererek NLRP3 inflamazom aktivasyonuna yol açar (98-100).

Ateroskleroz patogeneğinde rol alan ATP, yüksek glukoz, kolesterol kristallerinin, serbest yağ asitlerinin ve okside LDL seviyelerindeki artış NLRP3 inflamazom aktivasyonuna yol açarak immün sistemi bozmaktadır (23, 92). Ayrıca, iskemik kalp hastalığı ve iskemik olmayan kalp hastalığında NLRP3 inflamazom aktivasyonunun bu hastalıkların patogeneğinde rolü olduğu ve NLRP3, IL-18, IL-1 β , ROS'ları arttığı görölmektedir (23).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, NLRP3 inflamazom aktivasyonu karaciğer hastalıklarının (karaciğer fibrozu, alkole bağı olmayan yağlı karaciğer hastalığı, karaciğer yağlanması hastalığı) patogeneğinde önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. İnflamazom bileşenlerinin kupffer, hepatosit ve sinüzoidal endotel hücreleri gibi çeşitli karaciğer hücrelerinde sentezlenmektedir ve karaciğer hastalıklarında NLRP3, ASC, kaspaz-1, IL-18 ve IL-1 β ekspresyonları upregüle olmaktadır (23, 101).

Romatooid Artrit (RA), geri dönüşü olmayan eklem yıkımı ve sinoviyal inflamasyon ile karakterize edilen otoinflamatuvar bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda, RA hastalarında sinoviyal sıvılarında ve dolaşımdaki makrofajlarda/monositlerde, nötrofillerde ve dendritik hücrelerde inflamazom bileşenlerinin (NLRP3, ASC, kaspaz-1, IL-18 ve IL-1 β , mRNA ve protein ekspresyonu) arttığı görölmüştür (23).

Depresyon, dünya çapında 264 milyon insanı etkileyen yaygın ve ciddi bir duygudurum bozukluğudur. Günlük yaşamdaki stresli durumlara tepki olarak kısa süreli ruh hali değişimlerinin aksine, depresyon belirtileri uzun süre devam etmektedir. Depresyon sadece günlük yaşamı etkilemekle kalmaz, aynı zamanda intihara da yol açabilir. Stres, depresyon için önemli bir risk faktörüdür. Stresin inflamasyonu indükleyebildiği ve depresif semptomların anti-inflamatuar ajanlarla kontrol altına alınabileceği bilinmektedir. Bu nedenle, NLRP3 inflamazomu, stress durumlarını immün aktivasyonuna bağlayan bir köprü olarak fonksiyon göstermektedir. NLRP3 inflamazomunun depresyon ve duygudurum bozukluklarının patogeneziindeki rolü hem hayvan modellerinde hem de hastalarda gösterilmiştir. Majör depresif bozukluğu olan hastalardan alınan periferik mononükleer hücrelerde hem NLRP3 hem de kaspaz-1 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (102, 103).

Beyinde striatum/substantia nigra pars kompakta (SNpc) bölgelerinde bulunan dopaminerjik nöronların dejenerasyonu/ölümü, α -syn proteinini içeren anormal protein kümeleri olan Lewy cisimciklerinin varlığı ve mikroglioz (aktive mikrogliyal hücrelerin birikmesi) Parkinson hastalığı (PH)'nın en önemli nöropatolojik ayırt edici özellikleridir (104, 105). PH'nın patogenezi çok karmaşıktır ve hastalığın gelişimi birçok faktörün kombinasyonunun bir sonucudur. Yoğun araştırmalara rağmen, dopaminerjik nöronların ölüm nedenini açıklayan birleşik bir teori bulunmamaktadır (106). Nöronal dejenerasyona neden olan mekanizmalar tam olarak açıklanamamasına rağmen nöronal dejenerasyonda, α -syn proteostazının bozulması, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, kalsiyum homeostazı, aksonal taşıma, eksitotoksinite, nörotrofik faktörlerin eksikliği, ubiquitin-proteazom sistemin bozulması ve nöroinflamasyon gibi çok sayıda yolun ve mekanizmanın rol aldığı düşünülmektedir. Bu nedenle nöronal dejenerasyona neden olan bu mekanizmalar aracılığıyla NLRP3 inflamazom aktivasyonu gerçekleşmektedir (107, 108).

Alzheimer hastalığının patogeneziinde rol alan ve beynin hipokampus ve korteks bölgelerinde biriken amiloid plaklar ve hücre dışı (ekstraselüler) tau proteinleri, beynin en önemli bağışıklık hücreleri olan mikrogliyal tarafından çevrenir ve A β ve tau agregatlarına bağlı olarak mikrogliyal aktivasyon gerçekleşir. Bu aktivasyon da doğal immün yanıt olan NLRP3 inflamazom aktivasyonunu uyarmaktadır. Aktif mikrogliyal tarafından oluşturulan inflamatuvar hasarın hastalığın erken aşamalarında ortaya çıktığı düşünülmektedir. Kalıcı mikrogliyal NLRP3 inflamazom sinyali, aşırı A β ve tau birikimine, mikrogliyalın A β ve tau agregatlarını temizleme kapasitesinin azalmasına ve mikrogliyal işlev bozukluğuna yol açar.

Gerçekten de son zamanlarda yapılan çalışmalar, şiddetli Alzheimer hastalığının artan mikrogial işlev bozukluğu ile ilişkili olduğunu göstermektedir (56, 109). Bu nedenle A β ve tau agregatları, beyinde ciddi seviyede NLRP3 inflamazom aktivasyonuna yol açarak Alzheimer hastalığı patofizyolojisine, hastalığın ilerlemesine ve bilişsel azalmaya neden olur (56, 110, 111).

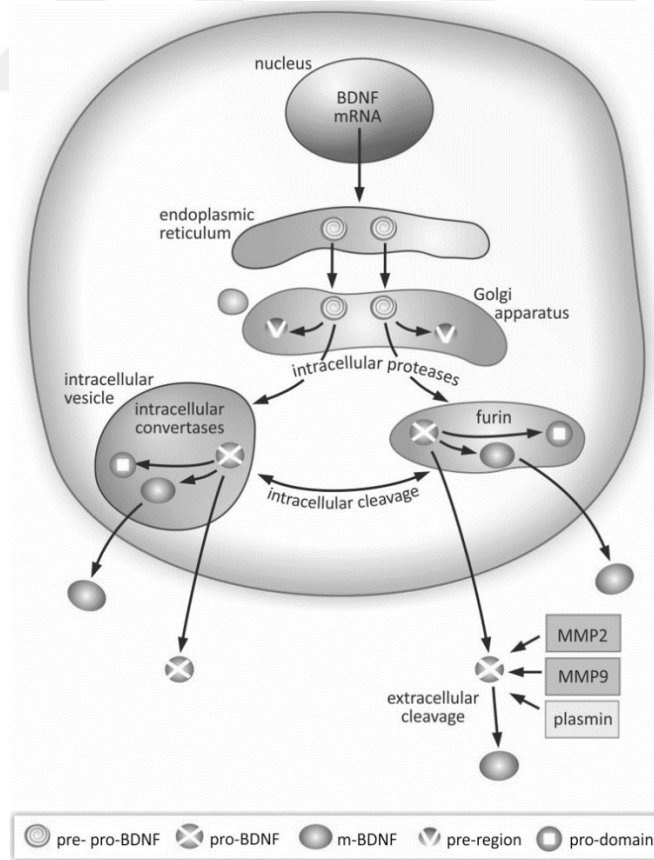
Özetle inflamazom, çeşitli inflamatuvar, metabolik, nörolojik ve kardiyovasküler hastalıklarda önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, bazı inflamatuvar hastalıkların tedavisi için umut verici bir hedef olabilir (23). Daha etkili terapötik bileşiklerin geliştirilmesi için, NLRP3 inflamazom aktivasyonunu tetikleyen veya inhibe eden sinyal yollarının/ moleküllerinin tam olarak anlaşılmasına dayanmaktadır (102).

2.2. Nörotrofinler

Nörotrofinler hem merkezi hem de periferel sinir sistemlerinde nöronların sağkalımını, gelişimi ve fonksiyonlarını kontrol eden temel büyüme faktörü sınıfıdır. Spesifik olarak, nörotrofinler normal beyin gelişimi, homeostazın ve plastisitenin temel düzenleyicileri olarak tanımlanmıştır. Nörotrofinler, nöronların sağkalımını sürdürebilmesi, işlevlerini yerine getirebilmesi, nörotransmitter salınımını sağlaması, nöronları oksidatif stresten ve apoptozdan koruması, nörogenezin uyarılmasına katkıda bulunması ve sinaptik plastisitenin düzenlenmesi gibi işlevlere sahiptir. Nörotrofin sınıfı, sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin-3 (NT-3), NT-4/5, NT-6 ve NT-7 'den oluşur. Bu moleküller, yüksek derecede yapısal ve biyolojik olarak homoloji (~%50 olduğu tahmin edilmektedir) ve aynı zamanda işlenmelerinde benzerlik gösterirler (örneğin, her nörotrofin olgunlaşmamış bir proizoform olarak sentezlenir). Bu moleküllerin her biri, trofik etkilerini sergilemek için aynı kökenli bir yüksek afiniteli reseptöre bağlanmayı sağlayan "olgun" izoformu oluşturmak üzere parçalanan bir prodomain içerir. Bu nörotrofinler etkilerini, transmembran reseptör sistemlerine (tropomiyozin-ilişkili kinaz B (TrkB) ve p75 nörotrofin reseptörü (p75^{NTR})) bağlanmasına bağlıdır. Bütün nörotrofinler p75^{NTR} reseptörüne bağlanır. Ancak, olgun nörotrofinler belirli bir spesifite gösterdiği farklı Trk (TrkA, TrkB, TrkC) reseptörlerine bağlanır. NGF TrkA reseptörüne, NT4 ve BDNF TrkB reseptörüne, NT-3 ise bütün TrkC reseptörlerine bağlanabilir (112-115).

2.2.1. BDNF ve Genel Özellikleri

Nörotrofin ailesinin bir üyesi olan BDNF'nin sentezi ve olgunlaşması, birkaç öncü izoformun oluşumunu içeren çok aşamalı bir süreçtir (116). BDNF, sitoplazmada endoproteazlar tarafından veya hücre dışı matriske bulunan plazmin veya matriks metalloproteinazlar (MMP; MMP2 ve MMP9) tarafından olgun BDNF (mBDNF)'ye bölünebilen bir pro-BDNF'ye dönüştürülür (31, 117). Bu süreçlerde, sitoplazmada, BDNF proteini sentezlenir ve endoplazmik retikulumda bir öncü form olan pre-pro-BDNF olarak katlanır. Daha sonra pre-bölge dizisinin proBDNF izoformunu üretmek için bölündüğü Golgi aygıtına taşınır. Bu proteinin, bir N-terminal pro-domaini 129 amino asitten, C-terminali olgun domaini ise 118 amino asitten oluşmaktadır. Pro-BDNF trans-golgi ağında intraselüler proteazlar tarafından (protein konvertaz 1 veya furin enzimi aracılığıyla) hücre içinde proteolitik kesime uğrayarak 14 kDa molekül ağırlığına sahip mBDNF oluşur. mBDNF, granüller şeklinde dendritic ve aksonal uç bölgelere salgılanır (33, 116, 118). BDNF'nin sentezi ve salgılanma mekanizması Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. BDNF'nin sentezi ve salgılanma mekanizması (Kowiański'den, 116)

BDNF, düşük afiniteli p75^{NTR} (Kd ~1.0 nM) ve yüksek afiniteli TrkB (Kd = 9.9 nM) reseptörlerine bağlanarak fonksiyonlarını gerçekleştirir. Hem olgun BDNF'nin hem de pro-BDNF'nin düşük afiniteli p75^{NTR} reseptörüne ve prodomain yoluyla sortilin reseptörüne bağlanması (proBDNF/p75/sortilin kompleksi) c-Jun N-terminali kinaz (JNK), Ras homolog gen ailesi üyesi A (RhoA) ve NF-κB sinyal yollarının aktivasyonu ile apoptozu tetiklemektedir (31, 117, 119). Diğer taraftan, mBDNF'nin yüksek afiniteli TrkB reseptörüne bağlanması, reseptörün dimerizasyonunu tetikler ve ardından kinaz aktivasyonunu başlatır. Bu aşamada tirozin rezidülerinden otofosforilasyon meydana gelir ve p85 (PI-3 kinazın katalitik olmayan altbirimi), Shc (SH2-içeren dizi) gibi hücre içindeki hedef proteinlere bağlanma bölgeleri oluşturulur. Bu proteinlerin aktive olmasıyla, RAS/mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), fosfatidil inositol-3-kinaz (PI3K) ve fosfolipaz C-γ (PLC) gibi bir dizi sinyal iletim yollarını aktive ederek hücrenin yaşamsal fonksiyonlarına (kalsiyum homeostazını düzenlemek ve anti-apoptotik B hücreli lenfoma 2 (Bcl-2)'yi indüklemek için) katkı sağlamaktadır. Bu sinyal kaskadları, Ca²⁺ alımında, transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonunda ve Bdnf geninin *de novo* ekspresyonunda bir artışa neden olmaktadır (31, 119, 120). PI3K yolu, protein kinazı B'yi (Akt) aktive eder. Bunun sonucunda, hem Bcl-2-ilişkili ölüm promotörünü (Bad) inhibe eder ve hem de anti-apoptotik proteinlerin, örneğin Bcl-2, ekspresyonunu arttırarak hücrenin hayatta kalmasını sağlar. Ayrıca, Akt fosforilasyonu pro-apoptotik proteinlerin (kaspaz-9 ve Forkhead) ekspresyonunun inhibisyonuna da neden olmaktadır. PLC-γ yoluyla inositol trifosfatın (IP3) reseptörünün aktivasyonu, hücre içi kalsiyum depolarının salınmasına yol açar ve transkripsiyon faktörü cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB) aracılığıyla kalmodulin kinaz (CamK) aktivitesinin ve dolayısıyla sinaptik plastisitenin artmasına yardımcı olur. MAPK yolu, hücre büyümesine ve farklılaşmasına yardımcı olur. MAPK ve PI3K yolları uzun vadeli transkripsiyonel etkiler içerirken, PLCγ aracılı bir yanıt hızlı, kısa vadeli etkilerden sorumludur (119).

BDNF ve yüksek afiniteli reseptörü TrkB başlıca beyinde (özellikle korteks, hipokampus, striatum, serebellum, amigdala, lateral hipotalamus, ventral tegmental alan ve substantia nigra, nöronlarda, mikrogliyalarda ve astrositlerde) sentezlenmesinin yanında iskelet kası, karaciğer, yağ dokusu kalp, gut, timüs ve dalak gibi periferik dokularda da sentezlenmektedir (31, 33, 37, 121, 122).

***Bdnf*^{+/-} Fare Modeli:** BDNF'nin fizyolojik rolünü daha iyi anlayabilmek için, *Bdnf*^{+/-} fareler kullanılmaktadır (123). *Bdnf*^{+/-} farelerde, BDNF kodlayan alellerin birinden yoksun olup BDNF konsantrasyonlarının beyinde, periferel dokularda ve dolaşımda yaklaşık %50 azalması ile karakterize bir knockdown modeldir ve bu fareler ölümcül olmayan anormallikler sergilemektedir. *Bdnf*^{+/-} fareler dış görünüş olarak farklılık göstermezler. Ayrıca, bu fareler normal hayat sürelerine ve üreme özelliklerine sahiptirler. Üretim aşamasında, genellikle *Bdnf*^{+/+} dişi ve heterozigot *Bdnf*^{+/-} erkek fareler kullanılmaktadır ve yavruların genotipleri belirlenir. Canlı farelerden genotiplenme yapmak için genellikle kuyruk ucundan doku örneği alınır ve bu doku örneği lizis tamponuyla homojenize edilerek polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile farelerin genotipleri belirlenir. *Bdnf*^{+/-} farelerde *Bdnf* kodlama bölgesinin bir alleli yerine neomisin geni koyulmuştur. Bu nedenle neomisin bandının varlığı *Bdnf*^{+/-} fare olduğunun bir belirticidir (124, 125). *Bdnf*^{+/-} fareler anksiyete, azalmış lokomotor aktivite, öğrenme ve hafıza gibi nöronal fonksiyonlarda bozulmalar görülürken, aynı zamanda diyabetik, hiperfajik ve obez karaktere yatkınlık gösterirler (126-128).

2.2.2. BDNF'nin Genel Fonksiyonları ve Nöroinflamasyon / İnflamasyon Sürecindeki Önemi

Beyinde ve periferel dokularda oldukça bol miktarda bulunan BDNF çok çeşitli fonksiyonlara sahiptir (31). BDNF-TrkB sinyal yolunun, merkezi ve periferel sinir sisteminin gelişimi/korunması, nöronal plastisite (hafıza, öğrenme), sinaptogenez (yeni sinaps oluşumu), sinaptik plastisite, nöronların gelişimi/farklılaşması/sağkalımı, nörorejenerasyon, dendritik dallanma ve uyarıcı ve engelleyici nörotransmitter profillerinin modülasyonu, anoreksigenez, uyku kontrolü, beyin metabolizması ve enerji homeostazının regülasyonu gibi birçok mekanizmada rol alarak hücrenin korunmasına ve hücrel metabolizmanın dengesine katkı sağlar (30, 31, 33, 129-132). BDNF normal kas kütlesi ve fonksiyonunun devam etmesi için önemlidir. Kas hücreleri ile yapılan çalışmalarda, miyoblast progenitörlerinin korunmasında ve miyojenik farklılaşmanın erken aşamalarında BDNF'nin gerekli olduğu gösterilmiştir. Son zamanlarda ise, kas kaynaklı BDNF'nin, otokrin etkiyle AMP-aktive edici protein kinaz (AMPK) aracılı yağ oksidasyonunu indüklediği gösterilmiştir (126). BDNF'nin reseptörü olan TrkB'nin aktivasyonu, nöronlarda mitokondri sayısını arttıran peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör gama koaktivatörü 1-alfa (PGC-1 α)'nın ekspresyonunu artırdığı gibi, aynı zamanda enerji

dönüşümünü destekleyerek nöronları oksidatif stresin etkilerine karşı koruduğu tespit edilmiştir (33). BDNF eksikliğinin, enerji metabolizması ve oksidatif stres ile ilişkili olan transkripsiyon faktörlerini, özellikle PGC-1 α ve peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gama (PPAR- γ)'yı etkilediği; bu durumun da antioksidan enzim genlerinin düzenlenmesini değiştirebildiği bulunmuştur (133). BDNF, hipokampal nöronları glutamat toksisitesinden korumaktadır (134). BDNF ve TrkB etkileşimi, glutamatın glutamik asit dekarboksilaz 67 (GAD67) yoluyla gama aminobütirik asite (GABA) dönüştürülmesi, glutamat ve GABA'nın taşınması, N-metil-D-aspartat reseptör (NMDAR) aktivasyonu ve Akt'nin aktivasyonu gibi reaksiyonlarda katalitik bir etki gösterir. BDNF'nin azalması, PLC- γ , NMDAR ve Akt aktivasyonunda, GABA oluşumunda, glutamat ve GABA taşınmasında gecikmelere neden olmaktadır. Bu kilit oyuncular, zamana duyarlı nörotransmitter salınımını beyin sinyalini ve nöroplastik fonksiyonları etkileyebilir. Örneğin şizofren patogenezinde, hipokampüste artan glutamat seviyelerinin azalan BDNF (azalan BDNF GAD67 aracılı GABA sentezini baskılar) kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca BDNF eksikliği, veziküler glutamat taşıyıcısı (VGLUT) yoluyla bozulmuş taşınmaya karşılık gelmekte ve böylece glutamaterjik hücrelerdeki hücre içi glutamat seviyeleri daha da artmaktadır (135). Parikh ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, BDNF heterozigot farelerde (*Bdnf*^{+/-}) glutamin seviyelerinin yüksek olduğu bulunmuştur (136, 137). Literatür incelendiğinde BDNF-TrkB sinyal yolunun aktive olmasıyla nükleer faktör eritroidden türetilen 2 benzeri 2 (Nrf2)'nin aktive edildiği, BDNF eksikliğinin ise glutamat ve glutamin seviyelerini artırdığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (135-138).

BDNF'nin Parkinson, Alzheimer, Huntington hastalığı ve depresyon gibi nörolojik hastalıkların patogenezinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (139, 140). BDNF /TrkB sinyali Alzheimer hastalığının patolojisinde rol alan amiloidojenik süreçlerde önemli bir düzenleyicidir (106). Yapılan çalışmalar, BDNF polimorfizmlerinin ve insan beynindeki azalmış BDNF seviyelerinin Alzheimer hastalığının patogenezi ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir (131). Benzer şekilde, yüksek BDNF ekspresyonunun, ilerleyen Alzheimer hastalığı nöropatolojisinde bilişsel azalmayı yavaşlattığı gösterilmiştir. BDNF'nin, A β ve tau tarafından indüklenen sitotoksik etkilere, davranışsal performansları iyileştirmeye, nöronal kaybın azalmasına, sinaptik dejenerasyonun ve nöroenez bozukluğunun önlenmesine ve öğrenme eksikliklerine karşı nörokoruyucu etkileri mevcuttur (130, 131, 141, 142). APP transgenik farelerde BDNF gen aktarımının, öğrenmeyi ve

hafızayı geliştirdiği ve APP mutasyonunun neden olduğu sinaps ve hücre kaybını önlediği bulunmuştur (143, 144). BDNF'nin doğuştan gelen bağışıklık hücrelerin (mikroglia) proliferasyonunu sağlayarak bağışıklık sisteminde de önemli fonksiyonları bulunmaktadır (145).

Merkezi ve periferel sinir sistemindeki önemli rollerinin dışında, son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar BDNF'nin obezite, tip 2 diyabet, ateroskleroz gibi metabolik hastalıklarla ilişkili olduğunu göstermiştir (32-34). Hayvan ve insan çalışmalarından elde edilen birçok veri neticesinde BDNF'nin yeme davranışlarının düzenlenmesinde önemli bir fonksiyona sahip olduğu ve bu yüzden obezite ve tip 2 diyabet gelişiminde patojenik bir role sahip olabileceği gösterilmiştir. Keza yapılan pek çok çalışma ile diyabetik farelere yapılan BDNF uygulanmasının glukoz metabolizmasını (insülin duyarlılığını ve pankreas insülin üretimini artırarak) ve lipid metabolizmasını iyileştirdiği, yiyecek tüketimini baskıladığı gösterilmiştir (146-149). Dahası, BDNF'nin diyabetik farelerde fazla enerji tüketimini arttırdığı da gösterilmiştir (150). BDNF'nin periferel dokularda (karaciğer, kas, adipoz doku, pankreas), TrkB/CREB aracılığıyla hepatik glukoneogenezi azaltarak, glukoz, insülin, leptin seviyelerini azaltarak, pankreas yorgunluğunu önleyerek ve besin alımını azaltarak insülin duyarlılığını iyileştirdiği bilinmektedir. Bu nedenle, BDNF, bu etkilerinden dolayı "metabokin" olarak da adlandırılmaktadır (151). BDNF reseptörü TrkB'nin iki izoformu vardır: ekstraselüler ligand bağlama domaini ve sinyal iletiminde kullanılan intraselüler kinaz domainine sahip tam uzunlukta bir reseptör (TrkB.FL) ve kinaz aktivitesi olmayan bir TrkB reseptörü (TrkB.T1). TrkB.FL merkezi ve peripherel sinir sistemi nöronlarında sentezlenirken, TrkB.T1 sinir sistemi dışında yaygın ekspresyon göstermektedir. Fulgenzi ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada BDNF'nin yeni metabolik bir fonksiyonunu keşfetmişlerdir. Bu çalışmada, BDNF'nin TrkB.T1 reseptörü aracılığıyla pankreas β hücrelerinde insülin salgılanmasını düzenlediğini bulmuşlardır. Burada, TrkB.T1'den yoksun farelerde, bozulmuş glukoz toleransı ve insülin sekresyonu gözlenmiştir. Pankreas β hücresindeki BDNF-TrkB.T1 sinyali, hücre içi depolardan kalsiyum salınımını tetikleyerek glukoz kaynaklı insülin salgılanmasını artırmaktadır. Ek olarak, BDNF'nin farklılaşmış insan kas hücreleri tarafından da salgılanması ve TrkB.T1 yoluyla insan pankreas adacıklarında insülin salgılanmasını indüklediği bulgusu, merkezi sinir sistemi aktivitesinden bağımsız olarak metabolizma üzerinde BDNF'nin yeni bir düzenleyici işlevi tanımlanmıştır (27).

BDNF'nin anti-inflamatuar ve immünomodülatör etkiler gösterdiği, aynı zamanda hem nöroinflamasyon hem de sistemik inflamasyon ile de yakından ilişkisi olduğu gösterilmiştir (129, 152, 153). Tüm bu etkileri göz önüne alındığında, BDNF nörotrofin olmasının yanında immünotrofin ve metabotrofin olarak da değerlendirilmektedir (154). Nöroinflamasyon süreçlerinde BDNF'nin, çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda mikrogial aktivasyonu hafiflettiğine dair çalışmalar mevcuttur (39, 155-157). BDNF'nin çeşitli yollarla mikrogial aktivasyonunu doğrudan etkileyebilmektedir. BDNF reseptörü TrkB'ye bağlanarak ERK aktivasyonunu ve CREB fosforilasyonunu indükleyerek NF- κ B'nin aktivitesini ve bazı anti-inflamatuar genlerin transkripsiyonunu baskılayabilir. Ayrıca, BDNF/TrkB/Akt sinyal yolu aracılığıyla, CREB fosforilasyonunu indükleyerek NF- κ B ve glikojen sentaz kinaz 3'ün aktivitesini baskılamaktadır. Başka bir yolla da BDNF/TrkB/MAPK sinyal yoluyla p38 ve JNK fosforilasyonunun azalmasına neden olmaktadır (31, 38). *Bdnf*^{+/-} farelerin fenotipinin veya azalmış BDNF seviyelerinin artan inflamasyon ile yakından ilişkili olabileceği birçok çalışma ile göstermiştir (158, 159). Bu hipotez, artan inflamasyonun BDNF seviyelerini düşürebileceği gerçeğiyle de desteklenmektedir (160). Noren Hooten ve arkadaşları, BDNF'nin inflamasyonu ve oksidatif stresi azalttığını bulmuşlardır (161). Xu ve arkadaşları, BDNF/TrkB sinyal yolunun aktive edilmesiyle, NF- κ B gibi pro-inflamatuar transkripsiyon faktörlerinin downregüle olduğunu ve anti-inflamatuar etkinin görüldüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca BDNF'nin, TNF- α , IL-1 β ve IL-6'nın ekspresyonunu baskıladığını, anti-inflamatuar bir parametre olan interlökin-10 (IL-10) ekspresyonunu ise artırdığını belirtmişlerdir (162). Jiang ve arkadaşları BDNF'nin, IL-10 ekspresyonunu artırarak ve TNF- α ekspresyonunu azaltarak anti-inflamatuar etki sergilediğini göstermişlerdir (39).

2.3. 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 lizatu 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 kırılkan 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 (163, 164).

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 (165).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihaz, alet ve malzemeler Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Tez çalışmasında kullanılan cihaz, alet ve malzemelerinin özellikleri

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	Üretici Firma / Model
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
Mikrodalga Fırın	Altus ALMD 171
Mikropleyt okuyucu	Molecular Devices Versa Max
pH-metre	Hanna Instruments HI 9321
Çalkalayıcı inkübatör	ShellLab/Sheldon S14-2
Orbital karıştırıcı	Nüve SL 350
Shaker cihazı	Bio-Rad UltraRocker
Manyetik karıştırıcı	Ikamag RH
Sonikatör	Sonics-Vibracell VCX500
Buz makinası	Hoshizaki FM-80KE
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
Elektroforez Tankı	Thermo EC300
Termocycler	Applied Biosystems

Tablo 3. Tez çalışmasında kullanılan cihaz, alet ve malzemelerinin özellikleri (Devamı)

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	Üretici Firma / Model
Termomikser	Thermo Scientific Digital DryBath
Farklı hacimlerde otomatik pipetler	Eppendorf
Dikey elektroforez ve immüno blot sistemi	Bio-Rad
Çeşitli hacimlerde steril pipet uçları	Nest
1.5 mL’lik mikrosantrifüj tüpü	Kirgen
Biyokimya Tüpleri	BD Vacutainer
Çeşitli cam malzemeler	Isolab

3.1.2. Kullanılan Ticari Kitler, Antikorlar ve Kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan kitler, antikorlar ve kimyasallar üretici firmaları ile birlikte Tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 4. Tez çalışmasında kullanılan kitler, antikorlar ve kimyasallar ile üretici firmaları

Kullanılan kitler, antikorlar ve kimyasallar	Üretici Firma / Kod
Mouse BDNF ELISA kiti	Abnova, 381238504
Mouse IL-1 β ELISA kiti	Thermo Scientific, 88-7013-22
Mouse IL-18 ELISA kiti	Thermo Scientific, 88-50618-22
BCA protein miktar tayini kiti	Thermo Scientific, 23225
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad, 170-5060
Anti-NF- κ B p65, Monoclonal	Cell Signaling Technology, 8242S
Anti-NLRP3, Monoclonal	Abcam, ab263899
Anti-Kaspaz-1 (p20), Monoclonal	AdipoGen, AG-20B-0042
Anti-GSDMD, Monoclonal	Abcam, ab219800
Anti-LC3B (E5Q2K), Monoclonal	Cell Signaling Technology, 83506S
Anti-SQSTM1/p62 (D6M5X), Monoclonal	Cell Signaling Technology, 23214S
Anti-VPS4A (A-11), Monoclonal	Santa Cruz, sc-393428
Anti- β -Actin, Monoclonal	Cell Signaling Technology, 3700S

Tablo 4. Tez çalışmasında kullanılan kitler, antikorlar ve kimyasallar ile üretici firmaları
(Devamı)

Kullanılan kitler, antikorlar ve kimyasallar	Üretici Firma / Kod
Anti-GAPDH (14C10), Monoclonal	Cell Signaling Technology, 2118S
Goat Anti-Rabbit HRP	Bio-Rad, 170-5046
Goat Anti-Mouse HRP	Bio-Rad, 170-5047
GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase Seti	Promega, M7805
Deoksinükleotid (dNTP) seti	GeneDireX, DN040-4000
BDNF ve Neomisin Primerleri	Integrated DNA Technologies
Proteinaz K from <i>Tritirachium album</i>	Serva, 33755.02
Agaroz	Sigma-Aldrich, A9539
Etidyum Bromür	Sigma-Aldrich, E7637
Nigerisin (sodium salt)	Cayman Chemical, 11437
LPS from <i>Escherichia coli</i> O55:B5	Sigma-Aldrich, L2880
Proteaz ve fosfataz inhibitör kokteyli	Sigma-Aldrich, PPC1010
Phosphate buffered saline (PBS) tablet	Thermo Scientific Oxoid™, BR0014G
Etanol (C ₂ H ₅ OH)	Sigma-Aldrich, 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-Aldrich, D0632
RIPA Lysis and Extraction Buffer	Serva, 39244.01
Tris-base	Sigma-Aldrich, T1503
Gliserol	Sigma-Aldrich, 49770
Bromfenol mavisi	Merck, 1.08122.005
İzopropanol	Labkim, P.0428.01.21
Trikloro asetik asit (TCA)	Merck, 1.00810.1000

Tablo 4. Tez çalışmasında kullanılan kitler, antikorlar ve kimyasallar ile üretici firmaları
(Devamı)

Kullanılan kitler, antikorlar ve kimyasallar	Üretici Firma / Kod
Asetik asit (CH ₃ COOH)	Sigma-Aldrich, 2722
Metanol	Merck, 1.06009.2511
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma-Aldrich, 27816
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-Aldrich, 04102
Nitroselüloz membran (0.45 µm)	Bio-Rad, 1620115
Whatman kâğıdı 3 mm	Ge-Healthcares, 3030-861
Yağsız süt tozu	Bağdat Baharat, 2495

3.2. Yöntem

3.2.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Uygulanan Prosedür

KTÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na yapılan 2021/27 ve 2023/5 protokol numaralı karar (Bkz. Ek 1 ve Ek 2 Etik Kurul Onayı) ile etik kurul onayı alındıktan sonra 8-10 haftalık erkek C57BL6/J ırkına ait *Bdnf*^{+/+} ve *Bdnf*^{+/-} fareler üretildikleri ve barındırıldıkları KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi.

Kuyruk uçlarından alınan doku örnekleri kullanılarak Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda PCR ile BDNF için genotipleme yapıldıktan sonra, *Bdnf*^{+/+} ve *Bdnf*^{+/-} fareler deneyler için yine aynı yerde, 12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsü olan ortam sağlanarak barındırılıp beslendi. Deney gruplarındaki farelere su ve yem ise *ad libitum* olarak verildi.

Deney hayvanlarının genotipleri belirlendikten sonra intraperitoneal olarak LPS ve nigerisin uygulanarak *in vivo* NLRP3 inflamazom aktivasyonu gerçekleştirildi. NLRP3 inflamazom aktivasyonu sonrasında, tüm fareler dekapite edildikten sonra elde edilen serum örnekleri, hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas (vastus lateralis) dokuları biyokimyasal analizler yapılana kadar -80 °C'de saklandı.

3.2.2. Farelerin Genotipinin Belirlenmesi

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

50 mM potasyum klorür (KCl), 10 mM Tris, 2.5 mM magnezyum klorür (MgCl₂), 0.1 mg/mL jelatin, % 0.45 nonidet P-40 ve % 0.45 Tween-20 içeren Lizis Tamponu: 0.372 g KCl, 0.121 g Tris ve 0.05 g MgCl₂ bir miktar saf suda çözöldü ve 1 M HCl ile pH 8.3'e ayarlandı. Çözeltiye son olarak 10 mg jelatin, 450 µL nonidet P-40, 450 µL Tween-20 eklendi ve son hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Genotipleme işlemi için, farelerin kuyruk uçlarından alınan doku örneklerinden genomik DNA ekstrakte edildi ve Korte ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem esas alınarak standart PCR ile genotipleme yapıldı (125). 1.5 mL'lik DNA/RNAaz içermeyen reaksiyon tüplerine konulan doku örnekleri üzerine 195 µL lizis tamponu ve 5 µL proteinaz K (20 mg/mL) eklendi ve reaksiyon tüpleri 55 °C'ye ayarlanan termomikserde gece boyunca inkübe edildi. Ardından, proteinaz K'nın inhibe olması için 95 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Eğer doku homojenatları aynı gün içinde çalışılmıyacaksa -20 °C'de saklanır.

BDNF ve neomisin primerlerini içeren iki ayrı karışım, PCR reaksiyonları için hazırlandı. Her bir PCR reaksiyon tüplerine 19 µL hazırlanan karışımdan ve 1.1 µL doku homojenatı eklenerek reaksiyonlar oluşturuldu. Tüm örnekler Bdnf ve neomisin genleri için standart PCR cihazında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütöldükten sonra fareler *Bdnf*^{+/+} ve *Bdnf*^{+/-} olarak tanımlandı.

BDNF ve neomisin genlerine ait ileri ve geri primer dizileri Tablo 5'te verilmiştir. Genotipleme için uygulanan PCR aşamaları Tablo 6'da, PCR'da kullanılan karışımların içeriği ve miktarları ise Tablo 7'de yer almaktadır.

Tablo 5. Genotipleme için kullanılan primer dizileri

Hedef Gen	Primer Dizisi
BDNF	İleri Primer: 5'-ACC ATA AGG ACG CGG ACT TGT AC-3' Geri Primer: 5'-GAA GTG TCT ATC CTT ATG AAT CGC-3'
Neomisin	İleri Primer: 5'-GAT TCG CAG CGC ATC GCC TT-3' Geri Primer: 5'-GAA GTG TCT ATC CTT ATG AAT CGC-3'

Tablo 6. Genotiplemede uygulanan PCR aşamaları

Aşamalar	Sıcaklık/süre
Ön denatürasyon	94 °C / 5 dakika
Denatürasyon	94 °C / 30 saniye
Yapışma	54 °C / 1 dakika
Uzama	72 °C / 1 dakika
Son uzama	72 °C / 7 dakika
Bekleme	10 °C / ∞

Tablo 7. Genotipleme için PCR’da yapılan karışımların içeriği ve miktarları

PCR Karışımlarının İçeriği	Hacim (µL)
Tampon	2
MgCl ₂ (25 mM)	1.2
dNTP (10 mM)	0.5
İleri Primer	0.5
Geri Primer	0.5
Taq Polimeraz	0.25
Deiyonize su	14.05
DNA	1.2

3.2.2.1. PCR ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezinde Yürütülmesi

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Tris-asetik asit-EDTA (TAE) Elektrofrez Tamponu: 242 g Tris, 37.2 g Na₂EDTA.2H₂O bir miktar saf suda çözüldü ve üzerine 57.1 mL asetik asit eklendi. Bu çözeltinin pH’sı 1 M NaOH ile 8.5’e ayarlandı ve son hacim deiyonize su ile 1 L’ye tamamlandı. Hazırlanan Tris-asetik asit-EDTA tamponu 50 kat seyreltilerek hem elektrofrez tamponunun hem de agaroz jelin hazırlanması için kullanıldı.

Etidyum Bromür Çözeltisi: 100 mg etidyum bromür 10 mL deiyonize suda çözülerek 10 mg/mL’lik stok çözelti elde edildi ve +4 °C’de saklandı. Bu çözeltiyi hazırlarken, eldiven ve koruyucu gözlük kullanımına özen gösterilmelidir.

% 2'lik Agaroz Jel Hazırlanması: 2 g agaroz, 100 mL TAE tampon içerisinde mikrodalga fırında yaklaşık 2 dakika boyunca çözünmesi sağlandı. Sonrasında jel karışımına 5 µL etidyum bromür eklenerek iyice karıştırıldı. Hazırlanan agaroz jel, bir kalıba döküldü ve taraklar yerleştirildi. Taraklar jel katılaştıktan sonra dikkatlice çıkarıldı ve elektroforez tankına yerleştirildi.

PCR örnekleri üzerine 3 µL yükleme boyası ilave edildi. Bu karışımdan 13 µL alınarak uygun kuyucuklara yüklendi. Sonrasında jel, ürünlerin göçü için 100 volt, 300 mA'de 30 dakika boyunca yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel UV ışıktaki görüntülendi ve fotoğrafı çekildi (Şekil 10).

Elektroforez işlemi sonucu elde edilen agaroz jel görüntülerinin sonuçlarına göre, hem *Bdnf* hem de neomisin genine sahip fareler *Bdnf*^{+/-}, sadece *Bdnf* genine sahip olan fareler *Bdnf*^{+/+} olarak tanımlandı.

3.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Bdnf^{+/+} ve *Bdnf*^{+/-} olarak tanımlanan farelere intraperitoneal olarak LPS ve Nigerisin uygulanarak NLRP3 inflamazom aktivasyonu sağlandı. Farelere diyetler ve su *ad libitum* olarak verildi.

Çalışmamızda her bir grupta 10 fare olacak şekilde 6 grup oluşturuldu ve çalışma gruplarına uygulanacak işlemler aşağıdaki gibi oluşturuldu.

Grup I (*Bdnf*^{+/+}): Hayvanlara intraperitoneal olarak serum fizyolojik enjekte edildi.

Grup II (*Bdnf*^{+/+} + Etanol): Hayvanlara intraperitoneal olarak etanol enjekte edildi.

Grup III (*Bdnf*^{+/+} + LPS + Nigerisin): NLRP3 inflamazom yolunun aktivasyonu için, intraperitoneal olarak 5 mg/kg LPS enjekte edildi. 3 saat sonra intraperitoneal olarak 1 mg/kg Nigerisin enjekte edildi.

Grup IV (*Bdnf*^{+/-}): Hayvanlara intraperitoneal olarak serum fizyolojik enjekte edildi.

Grup V (*Bdnf*^{+/-} + Etanol): Hayvanlara intraperitoneal olarak etanol enjekte edildi.

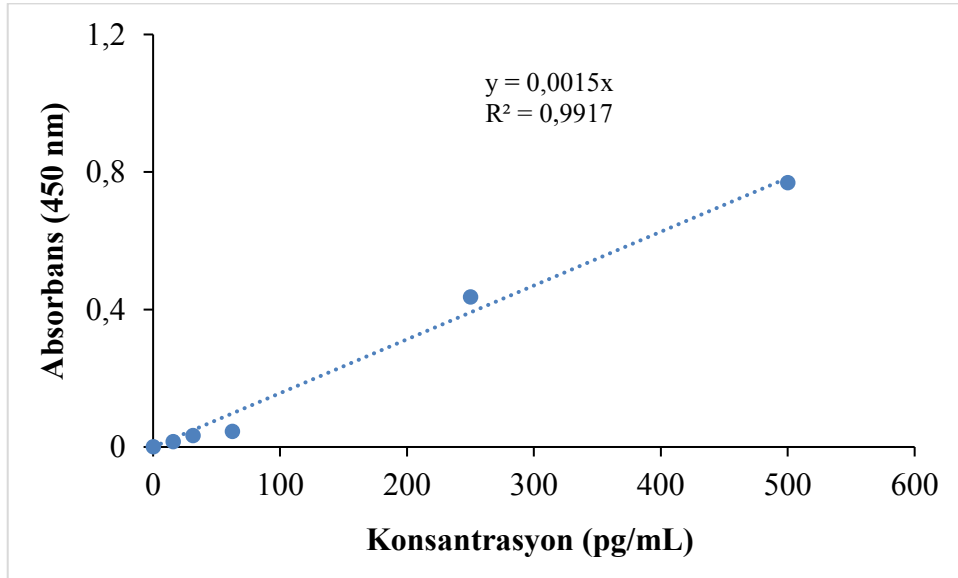
Grup VI (*Bdnf*^{+/-} + LPS + Nigerisin): NLRP3 inflamazom yolunun aktivasyonu için, intraperitoneal olarak 5 mg/kg LPS enjekte edildi. 3 saat sonra intraperitoneal olarak 1 mg/kg Nigerisin enjekte edildi.

Gruplardaki hayvan sayıları, uzun dönemde hayvan kaybı olabilme ihtimali göz önünde bulundurularak kararlaştırılmıştır. Deney gruplarında kullanılacak olan LPS (5 mg/kg) ve Nigerisin (1 mg/kg)'nin dozları literatürle uyumlu olacak şekilde belirlenmiş olup intraperitoneal olarak uygulandı (166-169).

25 mg LPS 25 mL serum fizyolojik ile hazırlandı ve alikotlanarak -20 °C' de saklandı. 10 mg Nigerisin 500 µL etanol ile çözülerek hazırlandı ve alikotlanarak -20 °C' de saklandı. Deney süresinin sonunda, fareler dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Serum seperatörlü tüplere alınan farelerin kanları 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek serum elde edildi. Farelerin hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas dokuları çıkartıldıktan sonra biyokimyasal analizler yapılana kadar -80 °C' de saklandı.

3.2.4. Serumda BDNF Seviyesinin Ölçümü

Serum BDNF seviyeleri, Abnova firması tarafından fareler için üretilen 381238504 ürün kodlu BDNF ELISA kiti kullanılarak ölçüldü. Serum BDNF seviyeleri üretici firmanın yönlendirmeleri doğrultusunda gerçekleştirildi. Kit doğrultusunda serum örnekleri 5 kat seyreltildi. Numune konsantrasyonları Şekil 6'daki standart grafiğine göre pg/mL cinsinden hesaplandı.



Şekil 6. BDNF Standart Grafiği

3.2.5. Serumda IL-1 β Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi

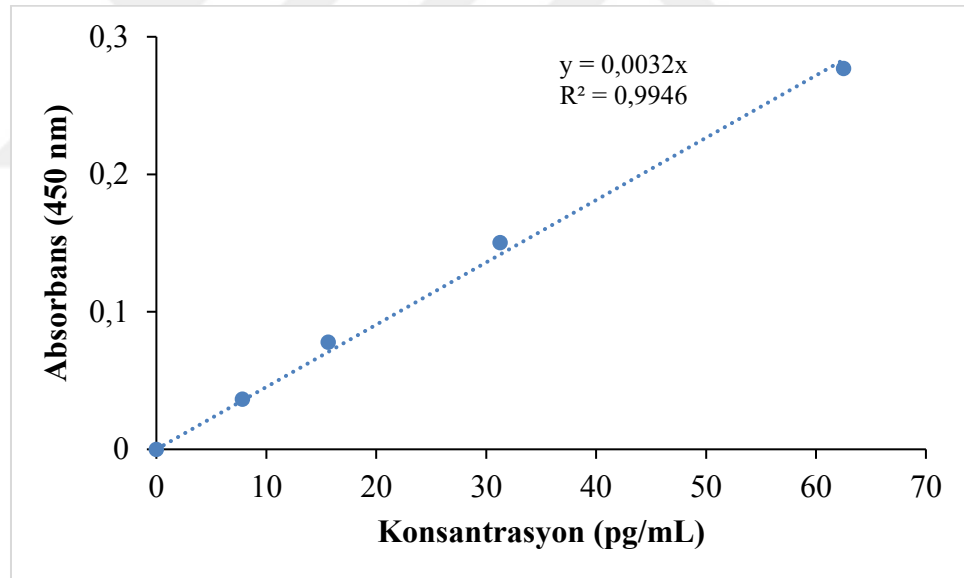
Serum IL-1 β seviyeleri, Invitrogen firması tarafından fareler için üretilen 88-7013-22 ürün kodlu IL-1 β ELISA kiti kullanılarak ölçüldü.

Serum IL-1 β seviyeleri aşağıda belirtilen şekilde saptandı:

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 3 kez yıkama işlemi yapıldı.
3. Yıkama işleminin ardından her bir kuyucuğa bloklama için 200 μ L ELISA/ELISPOT Diluent (1X) eklendi ve plaka bir membran ile kapatılarak oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 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-1 β standartları kit prosedürüne uygun olarak hazırlandı. Standart kuyucuklarına 100 μ L standart, kör kuyucuğuna 100 μ L ELISA/ELISPOT Diluent (1X) ve numune kuyucuklarına 100 μ L 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 yapıldı.
7. Yıkama işleminin ardından tüm kuyucuklara 100 μ L Detection Antibody çözeltisi eklendi ve plaka bir membran ile kapatılarak oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 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 μ L Streptavidin-HRP çözeltisi eklendi. Plaka, tekrardan membran ile kapatıldı ve oda sıcaklığında çalkalayıcıda 30 dakika 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) eklenerek numunelerin renginin sarıya döndüğü gözlemlendi.
13. 450 nm dalga boyuna ayarlanan mikropate okuyucu ile örneklerin absorbansları belirlendi. Sonuçlar pg/mL olarak verildi.

ELISA kitinin içindeki 1000 pg/mL konsantrasyonundaki IL-1β 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 sonuçlarla standart grafiği çizildi. Bu grafik kullanılarak IL-1β miktarları pg/mL olarak belirlendi. IL-1β standart grafiği Şekil 7'de verilmiştir.



Şekil 7. IL-1β Standart Grafiği

3.2.6. Serumda IL-18 Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi

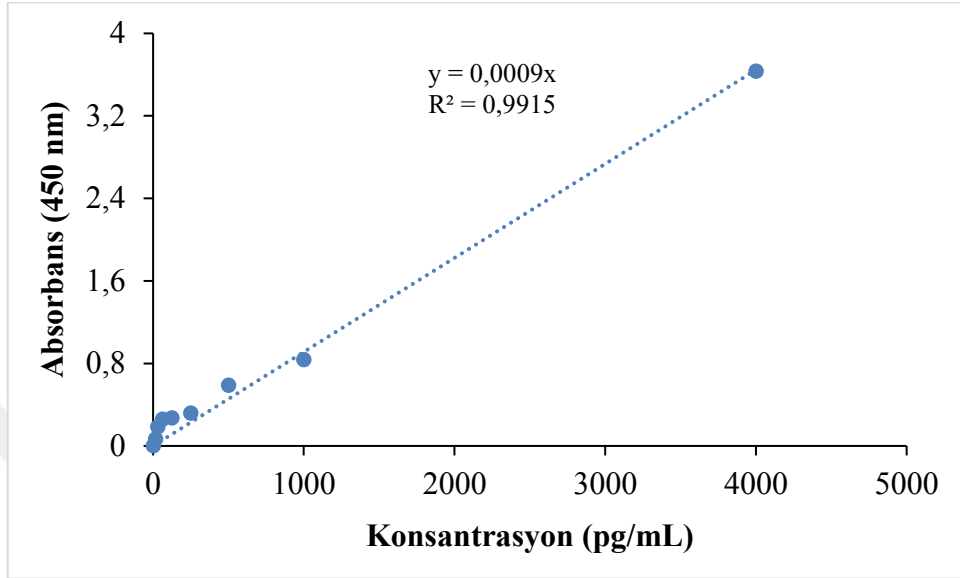
Serum IL-18 seviyeleri, Invitrogen firması tarafından fareler için üretilen 88-50618-22 ürün kodlu IL-18 ELISA kiti kullanılarak ölçüldü.

Serum IL-18 seviyeleri aşağıda belirtilen şekilde saptandı:

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 2 kez yıkama işlemi yapıldı.
3. Yıkama işleminin ardından her bir kuyucuğa bloklama için 250 µL Blocking Buffer eklendi ve plaka bir membran ile kapatılarak oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 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 µL standart, kör kuyucuğuna 100 µL Sample Diluent C eklendi. Numune kuyucuklarına ise 50 µL Sample Diluent C ve 50 µL numune eklendi.
6. Hemen ardından tüm kuyucuklara 50 µL Detection Antibody çözeltisi eklendi ve plaka bir membran ile kapatılarak oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 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, tekrardan membran ile kapatıldı ve oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi.
9. İnkübasyonun ardından plakadaki her bir kuyucuk aspire edildi ve yıkama tamponu ile 3 kez yıkama işlemi yapıldı.
10. Her bir kuyucuğa 100 µL Substrate Solution çözeltisi eklendi 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) eklenerek numunelerin renginin sarıya döndüğü gözlemlendi.
12. 450 nm dalga boyuna ayarlanan mikropate okuyucu ile örneklerin absorbansları 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 sonuçlarla standart grafiği

izildi. Bu grafik kullanılarak IL-18 miktarları pg/mL olarak belirlendi. IL-18 standart grafiği Şekil 8’de verilmiştir.



Şekil 8. IL-18 Standart Grafiği

3.2.7. Dokularda NLRP3 İnflamazom Yolu ile İlişkili Protein Seviyelerinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi

Western blot, herhangi bir örnekten elde edilen ve çok sayıda protein içeren bir karışımın içinden istenen tek bir proteini özğün şekilde tespit etmek için yaygın olarak kullanılan immünolojik yöntemdir. Bu yöntemle, ilgilenilen bir proteinin örnekte varlığı, varsa miktarı yarı kantitatif olarak hesaplanabilir (170, 171).

Hipokampus, Korteks, Karaciğer, Epididimal Yağ ve Kas Dokularından Proteinlerin İzolasyonu

Hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas dokularından proteinlerin eldesi için proteaz ve fosfataz inhibitörü içeren RIPA lizis tamponu (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, % 0.25 deoksikolik asit, % 1 Nonidet P-40, 1 mM EDTA) eklenerek dokular 1 h buz üzerinde bekletildi. İnkübasyon sonrasında tüm doku örnekleri buz üzerinde sonikasyon işlemi yapıldı. Sonikatör 5 saniye ve 3 siklusa (cycle) ayarlandı. Sonikatör jeneratörünün güç potansiyometresi % 50’ye ayarlandı. Sonikasyon işlemi 3 kere tekrar

edildi. Sonikasyonun ardından 20000 g'de, 4 °C'de 25 dk santrifüj edilerek protein elde edildi. Deneyler gerçekleştirilene kadar -80 °C derin dondurucuda muhafaza edildi.

Protein Miktar Tayini

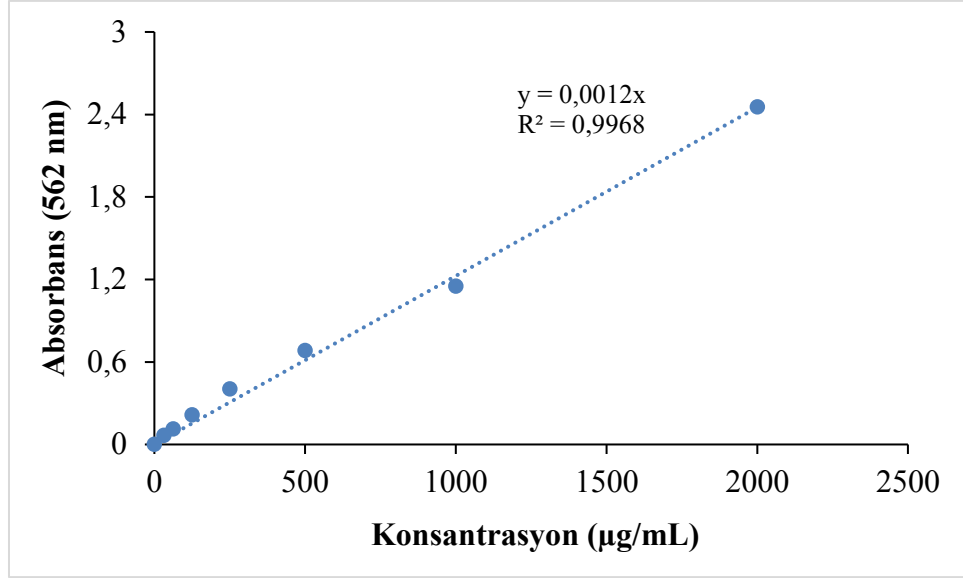
Hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas dokularından proteinleri elde edildikten sonra konsantrasyonları bikinkoninik asit (BCA) yöntemi kullanılarak analiz edildi. Bu yöntem, alkali ortamda mevcut proteinler tarafından Cu^{2+} 'nin Cu^{1+} 'e indirgenmesi esasına dayanır. Oluşan bakır katyonunun (Cu^{1+}) BCA ile reaksiyona girmesiyle kolorimetrik tayin gerçekleştirilir.

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 standartı 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 sonuçlarla standart grafiği çizildi. Bu grafik kullanılarak protein miktarları $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlendi.

96 kuyucuklu pleytlere 25'er μL standart, kör ve numune 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 9'da standart grafiği verilmiştir.



Şekil 9. Hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas dokularında 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 suda çözülerek, pH'sı 1 M HCl ile 8.8'e ayarlandı. Son 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 suda çözülerek, pH'sı 1 M HCl ile 6.8'e ayarlandı. Son hacim 1 L'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

% 10 (w/v) SDS: 5 g SDS 50 mL deiyonize suda çözülerek oda sıcaklığında saklandı.

% 10 (w/v) APS: 100 mg APS 1 mL deiyonize suda çözüldü. İhtiyaca 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 çözüldü 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 suda çözülerek oda sıcaklığında saklandı. Deneyde kullanılacak olan SDS-PAGE yürütme tamponu 1X olacak şekilde seyreltilti.

Hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas dokularından elde edilen total protein, SDS-PAGE aşaması Laemmli tarafından belirtilen yöntemle gerçekleştirildi (172).

Ayırma ve Yükleme Jellerinin Hazırlanması

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

Tablo 8. % 5'lik yükleme jelinin hazırlanması

Kimyasallar	2 x (1 mm)*
ddH₂O	3.08 mL
Acrylamid (% 40 acrylamid 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

*: İki tane jelin hazırlanması için gerekli olan kimyasalların hacimleri

Tablo 9. % 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
Acrylamid (% 40 acrylamid 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

*: İki tane jelin hazırlanması için gerekli olan kimyasalların hacimleri

Kontaminasyon riskini veya jel artıklarını önlemek için camlar önce saf su, sonrasında % 70'lik etil alkol ile temizlendi. Camlar kurulandıktan sonra uzun ve kısa camlar birleştirilerek jel hazırlama standına yerleştirildi. İlk olarak Tablo 9'da 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 düzgün bir şekilde polimerizasyonunu sağlamak için üzerine soğuk % 99.7'lik izopropanol ilave edildi ve yaklaşık 30-60 dk beklendi.

Polimerizasyonun ardından jelin üzerindeki izopropanol uzaklaştırıldı ve jelin üzeri distile suyla yıkandı. Tablo 8'e göre hazırlanan yükleme jeli hızlı bir şekilde ayırma jelinin üzerine ilave edildi. 10 kuyucuklu taraklar % 70'lik etil alkolle temizlendikten 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 distile su ile yıkandı. Sonrasında jel dikkatli bir şekilde yükleme standına yerleştirildikten sonra tank içerisine yerleştirildi. 1X SDS-PAGE yürütme tamponu ile tank dolduruldu.

Hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas dokularından elde edilen protein homojenatları -80°C derin dondurucudan 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. Kaynatma işlemi sonrası numuneler hızlı bir şekilde oda sıcaklığında santrifüj edildi. Ardından tanka yerleştirilen jelin ilk kuyucuğuna 2 µL protein markırı diğer kuyucuklara ise 20-30 µL (20-30 µg) numune yüklendi. Jel 75 Volt'da 15 dk, ardından 100 Volt'da 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 birbirinden dikkatli ve yavaş bir şekilde ayrıldı. Jelin üzerinden kısa cam kaldırıldıktan sonra jelin numune içermeyen kısımları spatula yardımıyla kesilip uzaklaştırıldı. Ardından western blot uygulamasına 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'sı 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 antikor üreten firmanın önerdiği koşullara göre seyreltilerek hazırlandı.

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

Blotlama işlemi için ilk olarak 4 tane ince Whatman kâğıdı ve 2 tane sünger yatak transfer tamponu içerisinde ıslatıldı. Blotlama kasetinin siyah yüzüne ıslak 1 tane sünger yatak yerleştirildi. Sonrasında ıslak 2 tane ince Whatman kâğıdı 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 membran üzerine yerleştirildi. Sonrasında ıslak 2 tane ince Whatman kâğıdı jel üzerine hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek yerleştirildi. Son olarak ıslak sünger yatak Whatman kağıdının en üstüne konularak blotlama kaseti kapatıldı. Kutuplara dikkat edilerek hazırlanan kaset tanka yerleştirildi. Transfer tamponu ile tank doldurulduktan sonra tank içerisine ısınmayı önlemek için 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 antikor (anti-NLRP3 (1:1000), anti-kaspaz-1 p20 (1:1000), anti-gasdermin D (1:1000), anti-NF- κ B p65 (1:750), anti-LC3B (1:1000), anti-SQSTM1/p62 (1:1000), anti-VPS4A (1:1000), anti- β -aktin (1:5000) ve anti-GAPDH (1:5000) antikor çözeltisi) içerisinde oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından membran 10'ar dakika arayla 3 kez 1X-TBST ile yıkandı. Ardından, primer antikora uygun sekonder antikor 1:10000 oranında seyreltilerek hazırlanan çözelti içerisinde oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından membran tekrar 10'ar dakika arayla 3 kez 1X-TBST ile yıkandı. Yıkama işlemlerinden sonra membran üzerine Clarity™ Western ECL Substrate çözeltisi eklendi ve membranlarda kemilünesans görüntüleme yapıldı. Bant yoğunluğu analizi Image Lab™ programı (Bio-Rad Laboratories, USA) ile yapıldı. Hipokampus, korteks, karaciğer ve epididimal yağ dokularına ait sonuçlar β -aktin'e, kas dokularına ait sonuçlar ise GAPDH'a oranlanarak verildi.

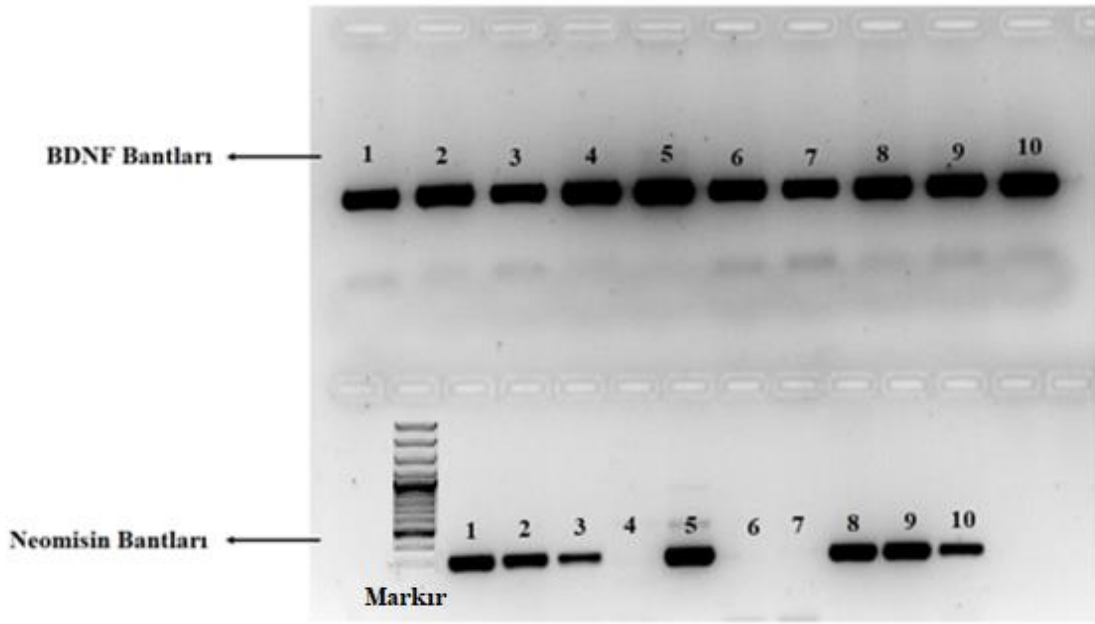
3.3. İstatistiksel Analiz

Deney verilerinin analizi SPSS (IBM Statistics 25, New York, NY, USA) programı ile yapıldı. Grupların dağılımları Kolmogorov Smirnov testi ile belirlendi. Gruplar arasındaki istatistiksel fark Kruskal Wallis varyans analizi ile belirlendi. Gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalar Mann–Whitney U testi ile yapıldı. BDNF, IL-1 β ve IL-18 verileri medyan-çeyrekler arası aralık (IQR) şeklinde ifade edildi. Diğer veriler ortalama $\pm$ standart hata (ortalama $\pm$ S.E.M.) olarak ifade edildi. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Farelerin Genotiplenmesi

Farelerin kuyruk uçlarından alınan doku örnekleri, bölüm 3.2.2’de açıklanan yöntem kullanılarak standart PCR ile genotipleme işlemi yapıldı. BDNF ve neomisin geninin birer alleleline sahip fareler *Bdnf*^{+/-}, BDNF geninin her iki alleleline sahip olan fareler *Bdnf*^{+/+} olarak tanımlandı. BDNF için gerçekleştirilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 10’da verilmiştir.



Şekil 10. PCR ürünlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. Üst kısımda BDNF bantları, alt kısımda neomisin bantları görülmektedir. 10: Pozitif Kontrol, 1-9: Çalıştığımız örnekler

4.2. Serum BDNF Seviyesi Ölçümüne Ait Bulgular

Bdnf^{+/-} farelerde serum BDNF seviyeleri *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi (p<0.001). Serum BDNF seviyeleri, LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} ve *Bdnf*^{+/-} farelerde azalmıştı (sırasıyla, p=0.001 ve p=0.004) ve LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} farelerde serum BDNF seviyeleri, LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} ile kıyaslandığında daha düşük olduğu gözlemlendi (p=0.01). Gruplardaki serum BDNF seviyelerinin medyan ve IQR değerleri ve istatistiksel anlamlılık derecelerinin dağılımı Tablo 10 ve Şekil 11’de gösterilmiştir.

Tablo 10. Serum BDNF seviyelerine ait değerler

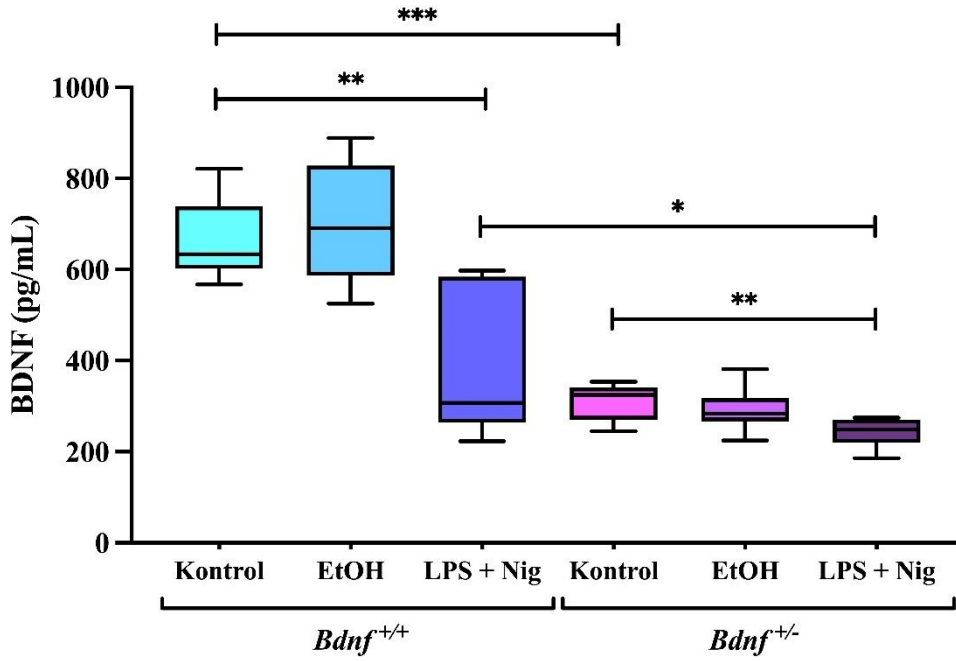
	BDNF (pg/mL)
<i>Bdnf</i> ^{+/+}	(633.82) 602.07-738.86
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + Etanol	(690.48) 586.30- 828.08
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + LPS + Nig	(307.41) ^a 264.21- 584.41
<i>Bdnf</i> ^{+/-}	(324.79) ^a 270.49- 340.86
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + Etanol	(283.68) 267.22- 317.45
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + LPS + Nig	(248.78) ^{b,c} 220.00- 270.20

Değerler medyan-IQR şeklinde verildi.

^a: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p<0.001 düzeyde anlamlı farklı

^b: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p=0.004 düzeyde anlamlı farklı

^c: *Bdnf*^{+/+} + LPS + Nig grubuna göre p=0.01 düzeyde anlamlı farklı



Şekil 11. Serum BDNF analiz sonuçları (n=10) [(^{*} p<0.05, ^{**} p<0.01, ^{***} p<0.001)]

4.3. Serum IL-1 β Seviyesi Ölçümüne Ait Bulgular

In vivo NLRP3 inflamazom aktivasyonundan sonra, BDNF eksikliğinin IL-1 β sitokin seviyelerine etkisi ELISA yöntemiyle belirlendi. *Bdnf*^{+/-} farelerinde IL-1 β seviyeleri, *Bdnf*^{+/+} fareleri ile kıyaslandığında anlamlı derecede yüksek bulundu (p=0.016). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} ve *Bdnf*^{+/-} farelerde IL-1 β seviyelerinin arttığını (sırasıyla, p<0.001 ve p<0.001) ve bunun *Bdnf*^{+/+} farelerde ise anlamlı derecede tersine döndürdüğünü (p=0.002) göstermiştir. Gruplardaki serum IL-1 β seviyelerinin medyan ve IQR değerleri ve istatistiksel anlamlılık derecelerinin dağılımı Tablo 11 ve Şekil 12’de gösterilmiştir.

Tablo 11. Serum IL-1 β seviyelerine ait değerler

	IL-1 β (pg/mL)
<i>Bdnf</i> ^{+/+}	(18) 11.61- 26.45
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + Etanol	(17.43) 13.48- 27.45
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + LPS + Nig	(52.23) ^{b,d} 43.65- 65.84
<i>Bdnf</i> ^{+/-}	(31.19) ^a 18.56- 35.47
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + Etanol	(29.48) 14.47- 35.15
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + LPS + Nig	(77.96) ^c 62.96- 92.80

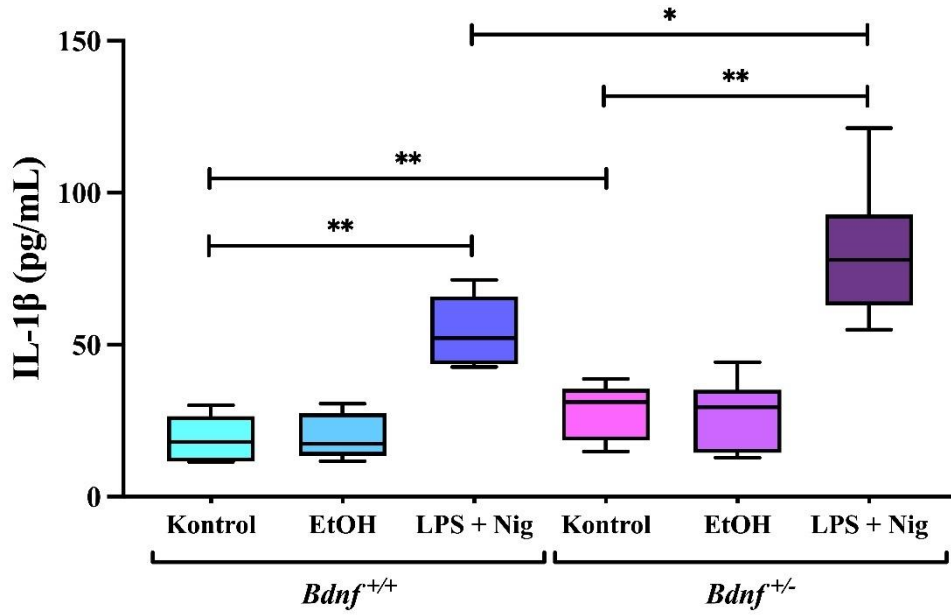
Değerler medyan-IQR şeklinde verildi.

a: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p=0.016 düzeyde anlamlı farklı

b: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p<0.001 düzeyde anlamlı farklı

c: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p<0.001 düzeyde anlamlı farklı

d: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p=0.002 düzeyde anlamlı farklı



Şekil 12. Serum IL-1β analiz sonuçları (n=10) [(^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001)]

4.4. Serum IL-18 Seviyesi Ölçümüne Ait Bulgular

In vivo NLRP3 inflamazom aktivasyonundan sonra, BDNF'nin IL-18 sitokin seviyelerine etkisi ELISA yöntemiyle belirlendi. *Bdnf*^{+/-} farelerinde IL-18 seviyeleri, *Bdnf*^{+/+} fareleri ile kıyaslandığında arttığı gözlemlendi (p=0.016). Elde edilen verilerde, LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} ve *Bdnf*^{+/-} farelerde IL-18 seviyelerinin arttığını (sırasıyla, p<0.001 ve p<0.001) ve bunun *Bdnf*^{+/+} farelerde ise anlamlı derecede tersine döndürdüğünü (p=0.002) göstermiştir. Gruplardaki serum IL-18 seviyelerinin medyan ve IQR değerleri ve istatistiksel anlamlılık derecelerinin dağılımı Tablo 12 ve Şekil 13'te gösterilmiştir.

Tablo 12. Serum IL-18 seviyelerine ait değerler

	IL-18 (pg/mL)
<i>Bdnf</i> ^{+/+}	(125.87) 112.10- 135.79
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + Etanol	(109.33) 90.49- 161.44
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + LPS + Nig	(849.26) ^{b,d} 754.82- 954.71
<i>Bdnf</i> ^{+/-}	(276.79) ^a 232.29- 315.68
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + Etanol	(312.19) 252.59- 357.84
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + LPS + Nig	(2346.54) ^c 1774.06- 2522.46

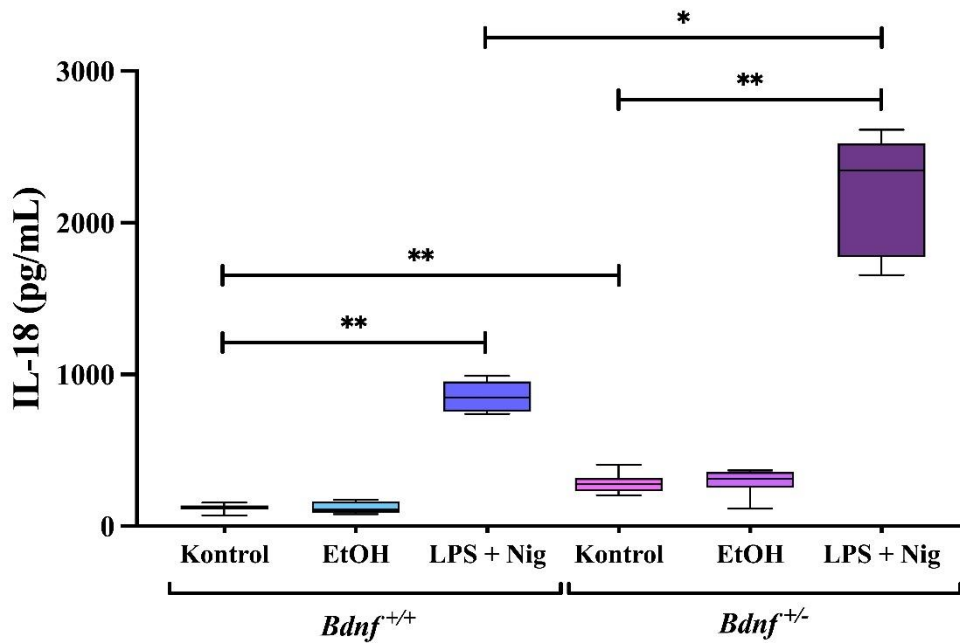
Değerler medyan-IQR şeklinde verildi.

a: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p=0.016 düzeyde anlamlı farklı

b: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p<0.001 düzeyde anlamlı farklı

c: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p<0.001 düzeyde anlamlı farklı

d: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p=0.002 düzeyde anlamlı farklı



Şekil 13. Serum IL-18 analiz sonuçları (n=10) [(^{*} p<0.05, ^{**} p<0.01, ^{***} p<0.001)]

4.5. Deney Gruplarının NLRP3 İnflamazom Yolağı ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları

BDNF'nin hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas dokularında NLRP3 inflamazom yolağı ile ilişkili NLRP3, aktif kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyelerine etkisi western blot yöntemiyle belirlendi.

4.5.1. Deney Gruplarının Hipokampus Dokularındaki NLRP3 İnflamazom Yolağı ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları

Hipokampus dokularında, *Bdnf*^{+/-} farelerde NLRP3, aktif kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyeleri, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında artmıştı (sırasıyla, p=0.007, p=0.016, p=0.006 ve p=0.037). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, NLRP3, aktif kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında arttığını bulduk (sırasıyla, p=0.002, p=0.004, p=0.004 ve p=0.004). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} farelerde, NLRP3, aktif kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında arttığını bulduk (sırasıyla, p=0.004, p=0.004, p=0.004 ve p=0.004). Bu artışın *Bdnf*^{+/+} farelerde ise anlamlı derecede tersine döndürdüğü (sırasıyla, p=0.004, p=0.016, p=0.004 ve p=0.004 (Tablo 13 ve Şekil 14A, B, C, D, E)) gösterilmiştir.

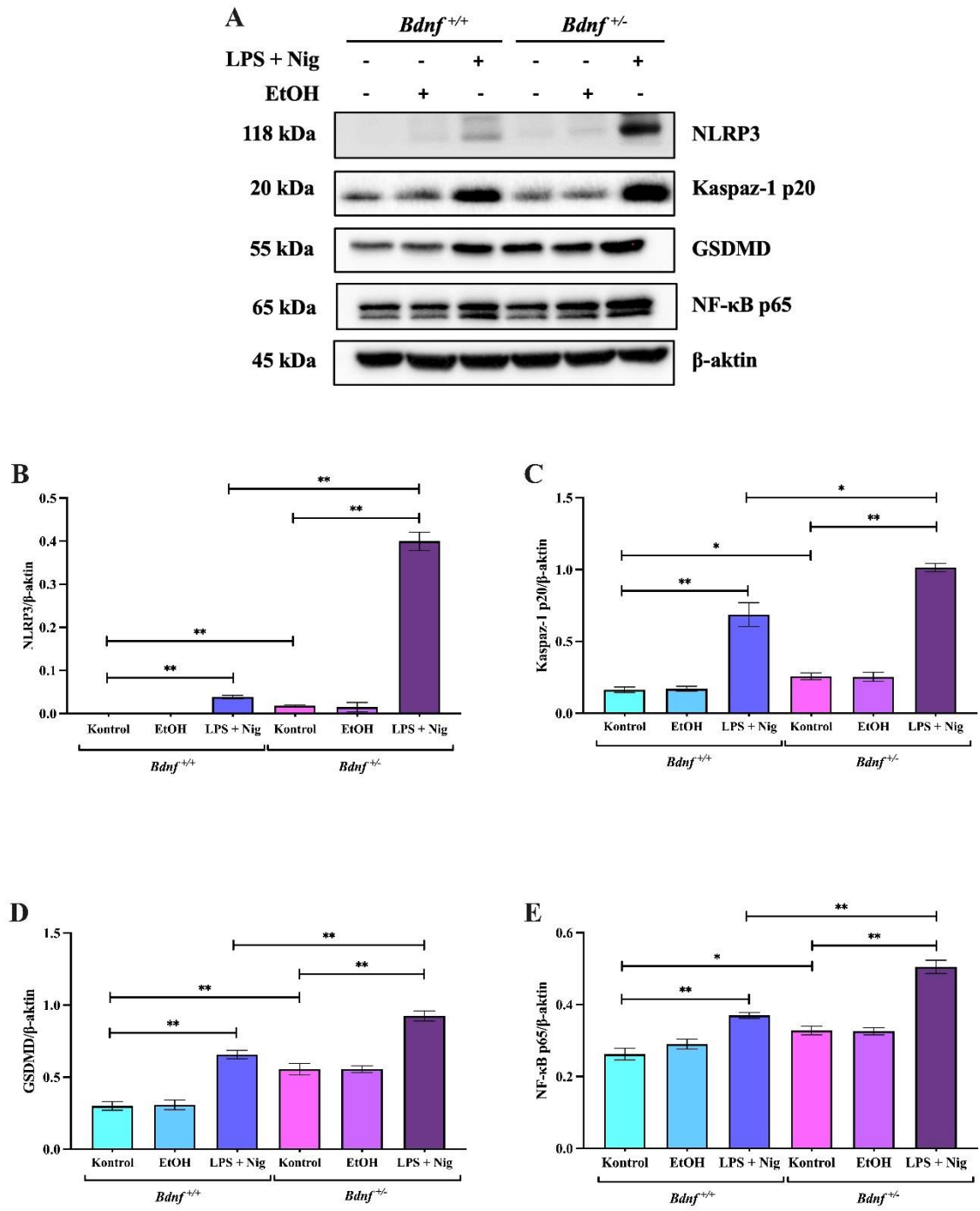
Tablo 13. Hipokampus dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyelerinin sonuçları

	NLRP3	Kaspaz-1 p20	GSDMD	NF-κB p65
<i>Bdnf</i> ^{+/+}	0±0	0.164±0.019	0.300±0.030	0.262±0.016
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + Etanol	0±0	0.17±0.018	0.308±0.033	0.290±0.014
<i>Bdnf</i> ^{+/+} +LPS+ Nig	0.038±0.003 ^{b,d}	0.687±0.083 ^{f,h}	0.657±0.029 ^{j,l}	0.370±0.008 ^{n,p}
<i>Bdnf</i> ^{+/-}	0.018±0.014 ^a	0.258±0.024 ^e	0.555±0.039 ⁱ	0.328±0.012 ^m
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + Etanol	0.015±0.011	0.253±0.031	0.556±0,023	0.326±0.01
<i>Bdnf</i> ^{+/-} +LPS + Nig	0.400±0.021 ^c	1.015±0.029 ^g	0.925±0.036 ^k	0.505±0.018 ^o

NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 proteinlerine ait sonuçlar β-aktin'e oranlanarak verildi.

Değerler ortalama±S.E.M. şeklinde verildi.

- a: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.007 düzeyde anlamlı farklı
b: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.002 düzeyde anlamlı farklı
c: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı
d: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı
e: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.016 düzeyde anlamlı farklı
f: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı
g: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı
h: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.016 düzeyde anlamlı farklı
i: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.006 düzeyde anlamlı farklı
j: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı
k: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı
l: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı
m: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.037 düzeyde anlamlı farklı
n: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.002 düzeyde anlamlı farklı
o: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı
p: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı



Şekil 14. Hipokampus dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyelerinin sonuçları (n=6) [($p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)]

4.5.2. Deney Gruplarının Korteks Dokularındaki NLRP3 İnflamazom Yolağı ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları

Korteks dokularında, *Bdnf*^{+/-} farelerde NLRP3, aktif kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyeleri, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında artmıştı (sırasıyla, p=0.004, p=0.01, p=0.025 ve p=0.016). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, NLRP3, aktif kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında arttığını bulduk (sırasıyla, p=0.004, p=0.004, p=0.004 ve p=0.004). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} farelerde, NLRP3, aktif kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında arttığını bulduk (sırasıyla, p=0.004, p=0.004, p=0.004 ve p=0.006). Bu artışın *Bdnf*^{+/+} farelerde ise anlamlı derecede tersine döndürdüğü (sırasıyla, p=0.004, p=0.004, p=0.004 ve p=0.037 (Tablo 14 ve Şekil 15A, B, C, D, E)) gösterilmiştir.

Tablo 14. Korteks dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyelerinin sonuçları

	NLRP3	Kaspaz-1 p20	GSDMD	NF-κB p65
<i>Bdnf</i> ^{+/+}	0.034±0.001	0.252±0.021	0.323±0.053	0.192±0.015
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + Etanol	0.031±0.002	0.25±0.019	0.347±0.05	0.190±0.01
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + LPS + Nig	0.234±0.011 ^{b,d}	0.693±0.027 ^{f,h}	0.795±0.037 ^{j,l}	0.335±0.02 ^{n,p}
<i>Bdnf</i> ^{+/-}	0.055±0.006 ^a	0.421±0.046 ^e	0.534±0.048 ⁱ	0.268±0.015 ^m
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + Etanol	0.053±0.005	0.424±0.031	0.553±0.046	0.261±0.01
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + LPS + Nig	0.369±0.014 ^c	1.101±0.018 ^g	1.05±0.025 ^k	0.441±0.036 ^o

NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 proteinlerine ait sonuçlar β-aktin'e oranlanarak verildi.

Değerler ortalama±S.E.M. şeklinde verildi.

a: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

b: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

c: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

d: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

e: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.01 düzeyde anlamlı farklı

f: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

g: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

h: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

i: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.025 düzeyde anlamlı farklı

j: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

k: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

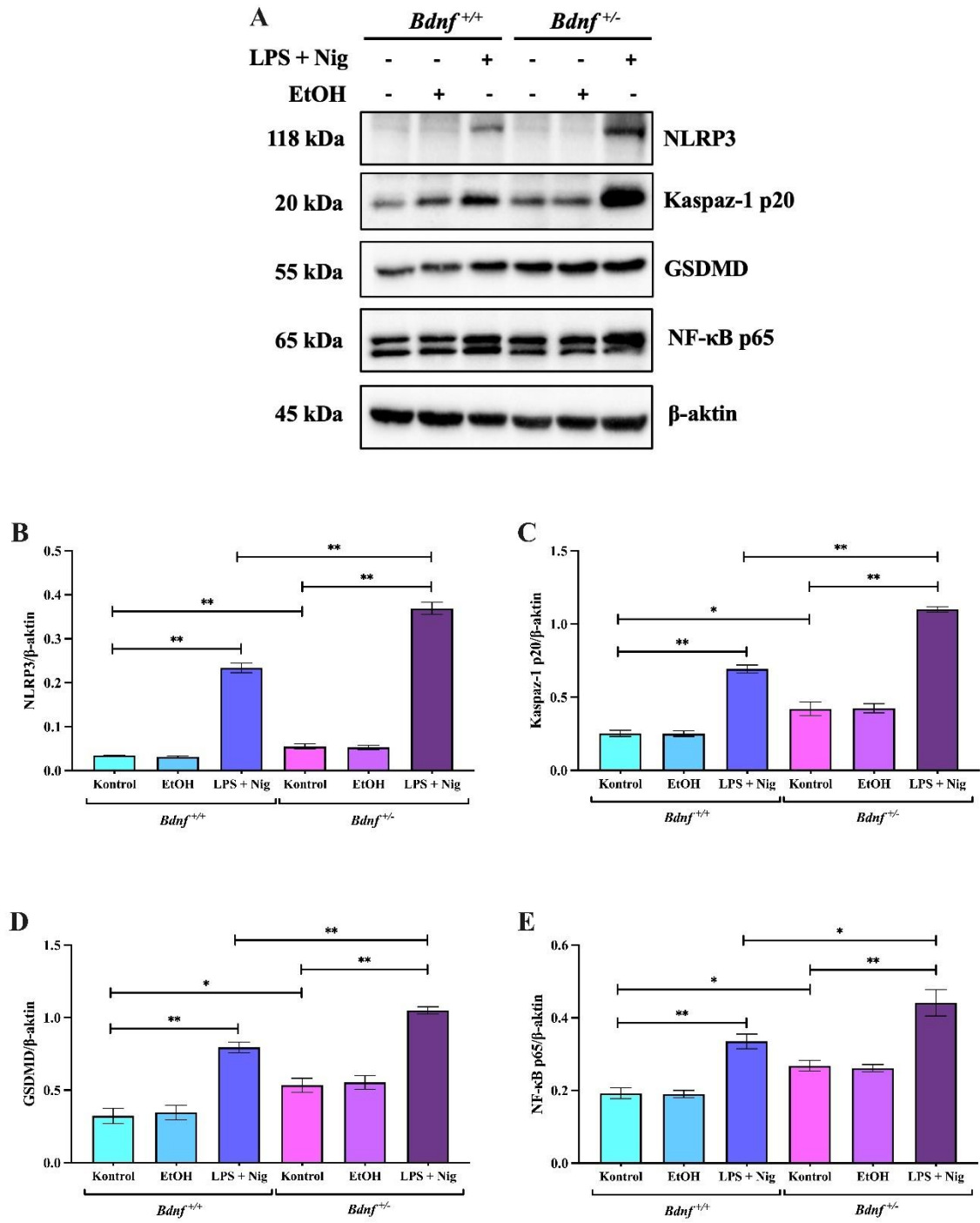
l: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

m: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.016 düzeyde anlamlı farklı

n: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

o: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.006 düzeyde anlamlı farklı

p: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.037 düzeyde anlamlı farklı



Şekil 15. Korteks dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyelerinin sonuçları (n=6) [($p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$)] (A’da NF- κB p65 western görüntüsündeki alttaki bant SQSTM1/p62 proteinine aittir.)

4.5.3. Deney Gruplarının Karaciğer Dokularındaki NLRP3 İnflamazom Yolağı ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları

Karaciğer dokularında, *Bdnf*^{+/-} farelerde NLRP3, aktif kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyeleri, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında artmıştı (sırasıyla, p=0.004, p=0.004, p=0.004 ve p=0.037). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, NLRP3, aktif kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında arttığını bulduk (sırasıyla, p=0.004, p=0.004, p=0.004 ve p=0.004). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} farelerde, NLRP3, aktif kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında arttığını bulduk (sırasıyla, p=0.004, p=0.004, p=0.004 ve p=0.006). Bu artışın *Bdnf*^{+/+} farelerde ise anlamlı derecede tersine döndürdüğü (sırasıyla, p=0.004, p=0.004, p=0.01 ve p=0.025 (Tablo 15 ve Şekil 16A, B, C, D, E)) gösterilmiştir.

Tablo 15. Karaciğer dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyelerinin sonuçları

	NLRP3	Kaspaz-1 p20	GSDMD	NF-κB p65
<i>Bdnf</i> ^{+/+}	0.012±0.002	0.088±0.003	0.259±0.012	0.194±0.022
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + Etanol	0.015±0.002	0.084±0.005	0.289±0.022	0.205±0.024
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + LPS + Nig	0.520±0.076 ^{b,d}	0.705±0.055 ^{f,h}	0.765±0.064 ^{i,l}	0.360±0.029 ^{n,p}
<i>Bdnf</i> ^{+/-}	0.042±0.001 ^a	0.251±0.034 ^e	0.549±0.05 ⁱ	0.286±0.036 ^m
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + Etanol	0.042±0.002	0.244±0.03	0.566±0.026	0.283±0.024
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + LPS + Nig	0.907±0.031 ^c	1.084±0.031 ^g	1.011±0.029 ^k	0.469±0.019 ^o

NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 proteinlerine ait sonuçlar β-aktin'e oranlanarak verildi.

Değerler ortalama±S.E.M. şeklinde verildi.

a: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

b: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

c: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

d: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

e: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

f: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

g: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

h: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

i: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

j: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

k: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

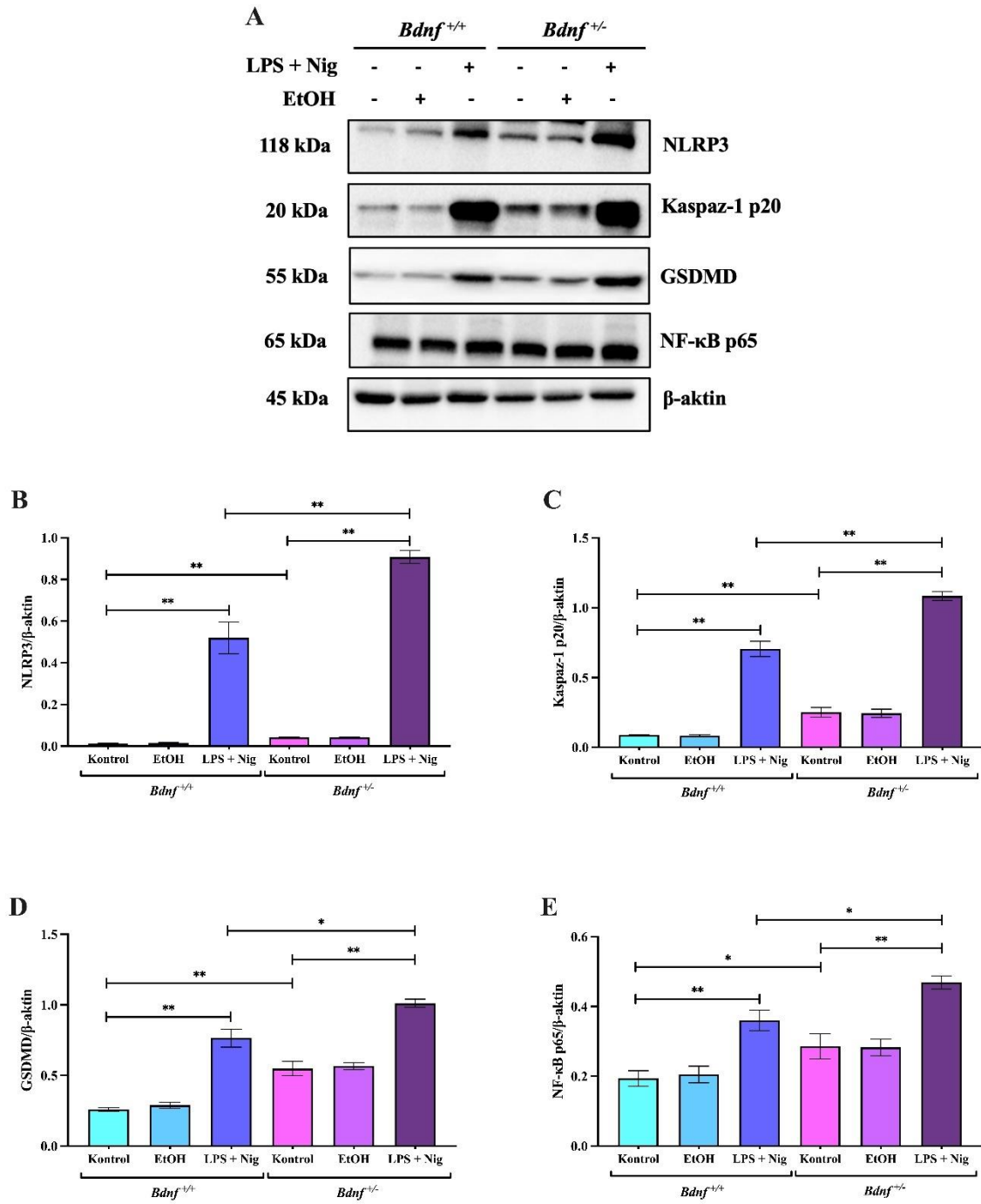
l: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.01 düzeyde anlamlı farklı

m: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.037 düzeyde anlamlı farklı

n: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

o: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.006 düzeyde anlamlı farklı

p: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.025 düzeyde anlamlı farklı



Şekil 16. Karaciğer dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyelerinin sonuçları (n=6) [($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$)]

4.5.4. Deney Gruplarının Epididimal Yağ Dokularındaki NLRP3 İnflamazom Yolağı ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları

Epididimal yağ dokularında, *Bdnf*^{+/-} farelerde NLRP3, aktif kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyeleri, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında artmıştı (sırasıyla, p=0.004, p=0.025, p=0.037 ve p=0.004). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, NLRP3, aktif kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında arttığını bulduk (sırasıyla, p=0.004, p=0.004, p=0.004 ve p=0.004). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} farelerde, NLRP3, aktif kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında arttığını bulduk (sırasıyla, p=0.004, p=0.004, p=0.004 ve p=0.004). Bu artışın *Bdnf*^{+/+} farelerde ise anlamlı derecede tersine döndürdüğü (sırasıyla, p=0.016, p=0.004, p=0.004 ve p=0.004 (Tablo 16 ve Şekil 17A, B, C, D, E)) gösterilmiştir.

Tablo 16. Epididimal yağ dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyelerinin sonuçları

	NLRP3	Kaspaz-1 p20	GSDMD	NF-κB p65
<i>Bdnf</i> ^{+/+}	0.047±0.004	0.387±0.02	0.525±0.04	0.197±0.006
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + Etanol	0.046±0.004	0.382±0.045	0.591±0.06	0.204±0.012
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + LPS + Nig	0.668±0.056 ^{b,d}	0.906±0.08 ^{f,h}	0.986±0.05 ^{i,l}	0.507±0.01 ^{n,p}
<i>Bdnf</i> ^{+/-}	0.093±0.006 ^a	0.595±0.05 ^e	0.691±0.04 ^l	0.400±0.03 ^m
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + Etanol	0.085±0.005	0.649±0.06	0.776±0.06	0.420±0.04
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + LPS + Nig	0.973±0.06 ^c	1.49±0.05 ^g	1.278±0.04 ^k	0.745±0.03 ^o

NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 proteinlerine ait sonuçlar β-aktin'e oranlanarak verildi.

Değerler ortalama±S.E.M. şeklinde verildi.

a: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

b: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

c: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

d: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.016 düzeyde anlamlı farklı

e: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.025 düzeyde anlamlı farklı

f: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

g: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

h: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

i: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.037 düzeyde anlamlı farklı

j: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

k: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

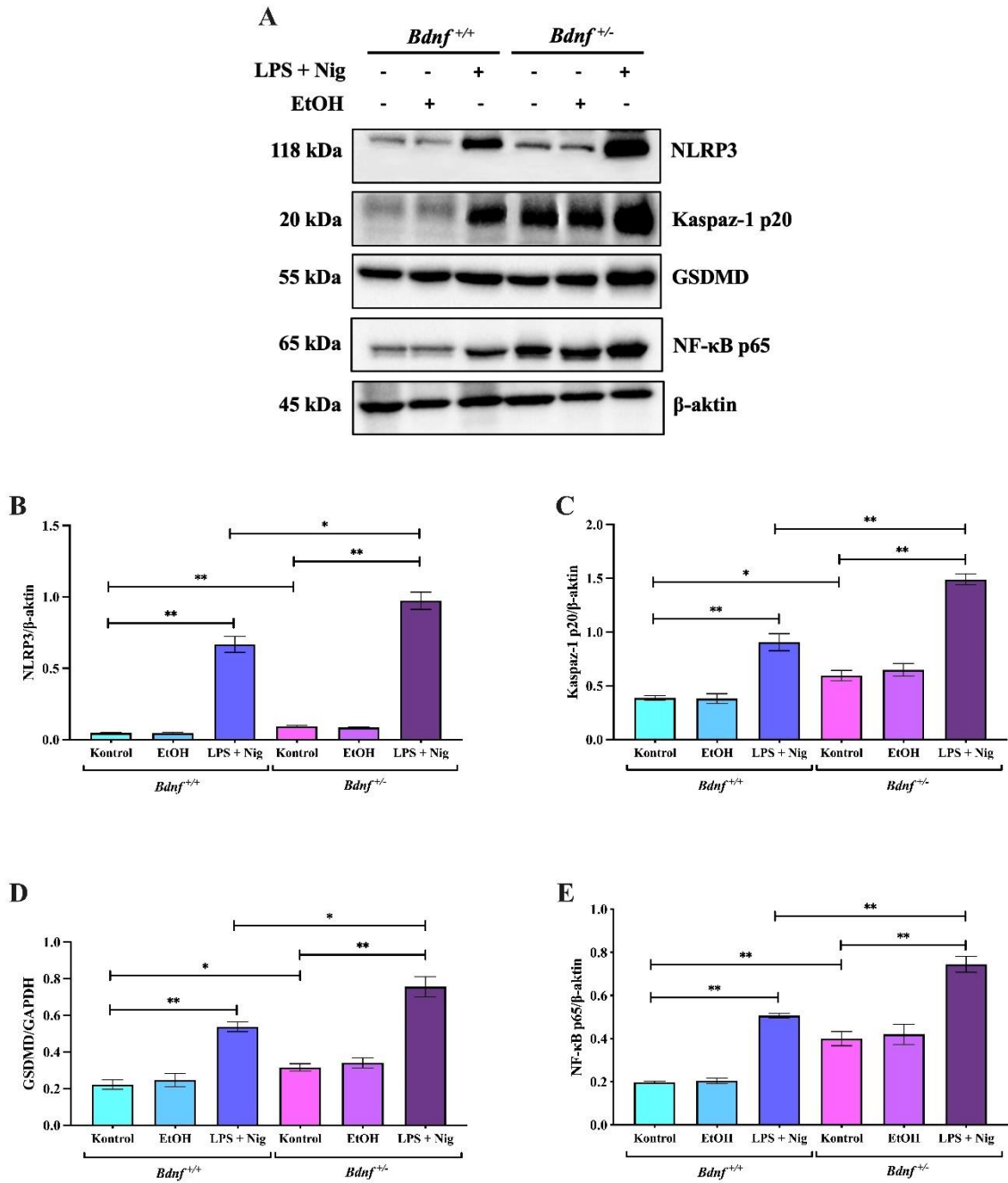
l: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

m: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

n: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

o: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

p: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı



Şekil 17. Epididimal yağ dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyelerinin sonuçları (n=6) [(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001)]

4.5.5. Deney Gruplarının Kas Dokularındaki NLRP3 İnflamazom Yolağı ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları

Kas dokularında, *Bdnf*^{+/-} farelerde NLRP3, aktif kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyeleri, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında artmıştı (sırasıyla, p=0.016, p=0.006, p=0.025 ve p=0.006). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, NLRP3, aktif kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında arttığını bulduk (sırasıyla, p=0.004, p=0.004, p=0.004 ve p=0.004). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} farelerde, NLRP3, aktif kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında arttığını bulduk (sırasıyla, p=0.004, p=0.004, p=0.004 ve p=0.004). Bu artışın *Bdnf*^{+/+} farelerde ise anlamlı derecede tersine döndürdüğü (sırasıyla, p=0.01, p=0.006, p=0.025 ve p=0.016 (Tablo 17 ve Şekil 18A, B, C, D, E)) gösterilmiştir.

Tablo 17. Kas dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyelerinin sonuçları

	NLRP3	Kaspaz-1 p20	GSDMD	NF-κB p65
<i>Bdnf</i> ^{+/+}	0.022±0.002	0.116±0.011	0.222±0.026	0.148±0.008
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + Etanol	0.025±0.003	0.138±0.011	0.247±0.037	0.170±0.017
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + LPS + Nig	0.163±0.022 ^{b,d}	0.595±0.042 ^{f,h}	0.538±0.027 ^{i,l}	0.353±0.04 ^{n,p}
<i>Bdnf</i> ^{+/-}	0.037±0.003 ^a	0.279±0.036 ^e	0.316±0.02 ⁱ	0.258±0.047 ^m
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + Etanol	0.043±0.002	0.300±0.029	0.341±0.027	0.250±0.038
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + LPS + Nig	0.264±0.019 ^c	0.934±0.052 ^g	0.756±0.055 ^k	0.515±0.023 ^o

NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 proteinlerine ait sonuçlar GAPDH'a oranlanarak verildi.

Değerler ortalama±S.E.M. şeklinde verildi.

a: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.016 düzeyde anlamlı farklı

b: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

c: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

d: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.01 düzeyde anlamlı farklı

e: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.006 düzeyde anlamlı farklı

f: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

g: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

h: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.006 düzeyde anlamlı farklı

i: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.025 düzeyde anlamlı farklı

j: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

k: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

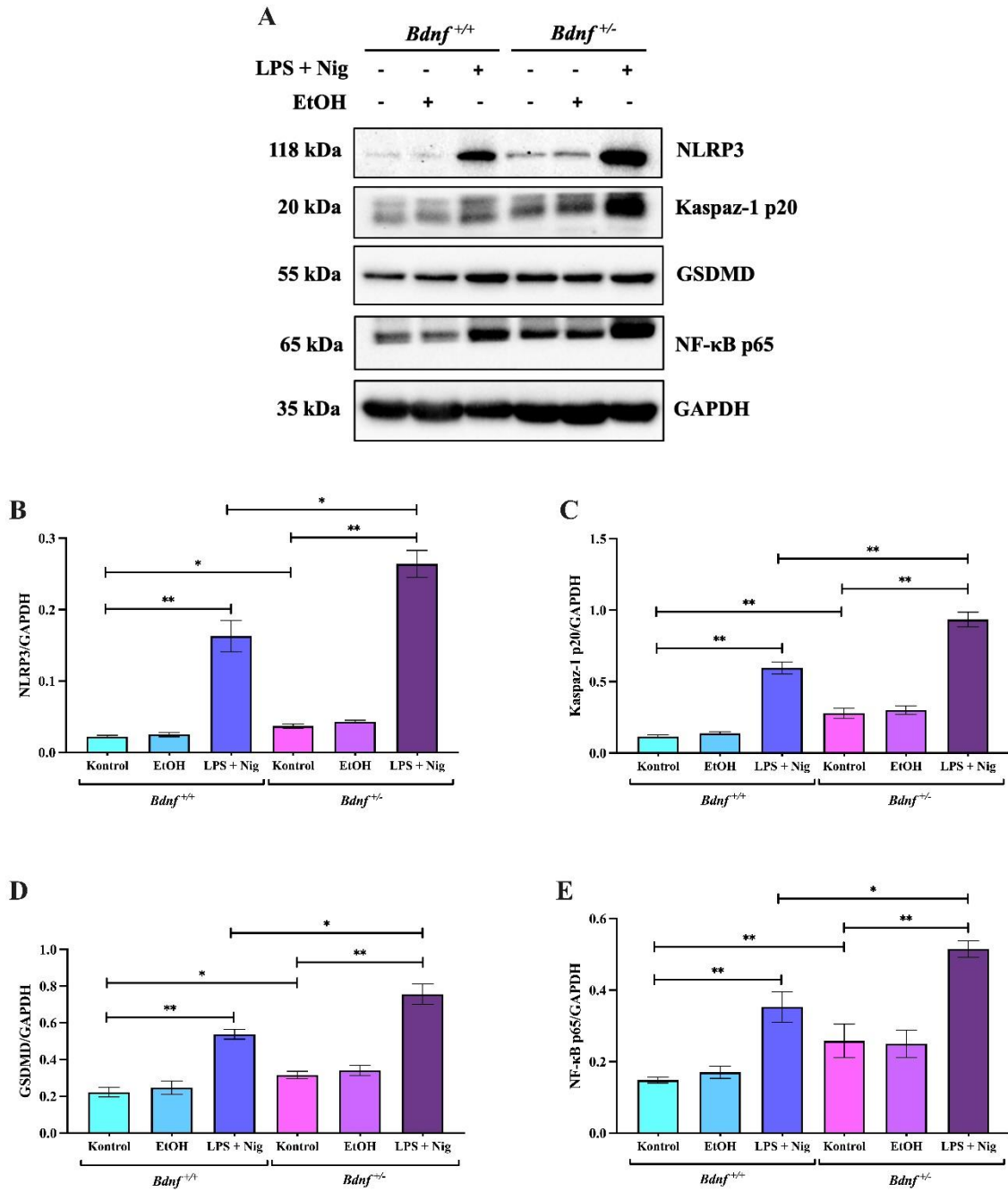
l: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.025 düzeyde anlamlı farklı

m: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.006 düzeyde anlamlı farklı

n: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

o: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

p: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.016 düzeyde anlamlı farklı



Şekil 18. Kas dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD ve NF-κB p65 protein seviyelerinin sonuçları (n=6) [(^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001)]

4.6. Deney Gruplarının Otofaji ve Otofagozom Oluşumu ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları

BDNF'nin hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas dokularında otofaji ve otofagozom oluşumu ile ilişkili LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerine etkisi western blot yöntemiyle belirlendi.

4.6.1. Deney Gruplarının Hipokampus Dokularındaki Otofaji ve Otofagozom Oluşumu ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları

Hipokampus dokularında, *Bdnf*^{+/-} farelerde LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyeleri, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında azalmıştı (sırasıyla, p=0.004 ve p=0.004). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında arttığını bulduk (sırasıyla, p=0.025 ve p=0.013). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} farelerde, LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında arttığını bulduk (sırasıyla, p=0.037 ve p=0.004). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında gelişmiş otofaji belirteçlerine sahip olduğunu bulduk (sırasıyla, p=0.004 ve p=0.004 (Tablo 18 ve Şekil 19A, B, C)).

Tablo 18. Hipokampus dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin sonuçları

	LC3B	SQSTM1/p62
<i>Bdnf</i> ^{+/+}	0.588±0.052	0.474±0.041
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + Etanol	0.597±0.027	0.481±0.042
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + LPS + Nig	0.766±0.027 ^{b,d}	0.638±0.017 ^{f,h}
<i>Bdnf</i> ^{+/-}	0.303±0.025 ^a	0.280±0.013 ^e
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + Etanol	0.313±0.034	0.297±0.011
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + LPS + Nig	0.499±0.059 ^c	0.370±0.013 ^g

LC3B ve SQSTM1/p62 proteinlerine ait sonuçlar β-aktin'e oranlanarak verildi.

Değerler ortalama±S.E.M. şeklinde verildi.

a: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

b: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.025 düzeyde anlamlı farklı

c: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.037 düzeyde anlamlı farklı

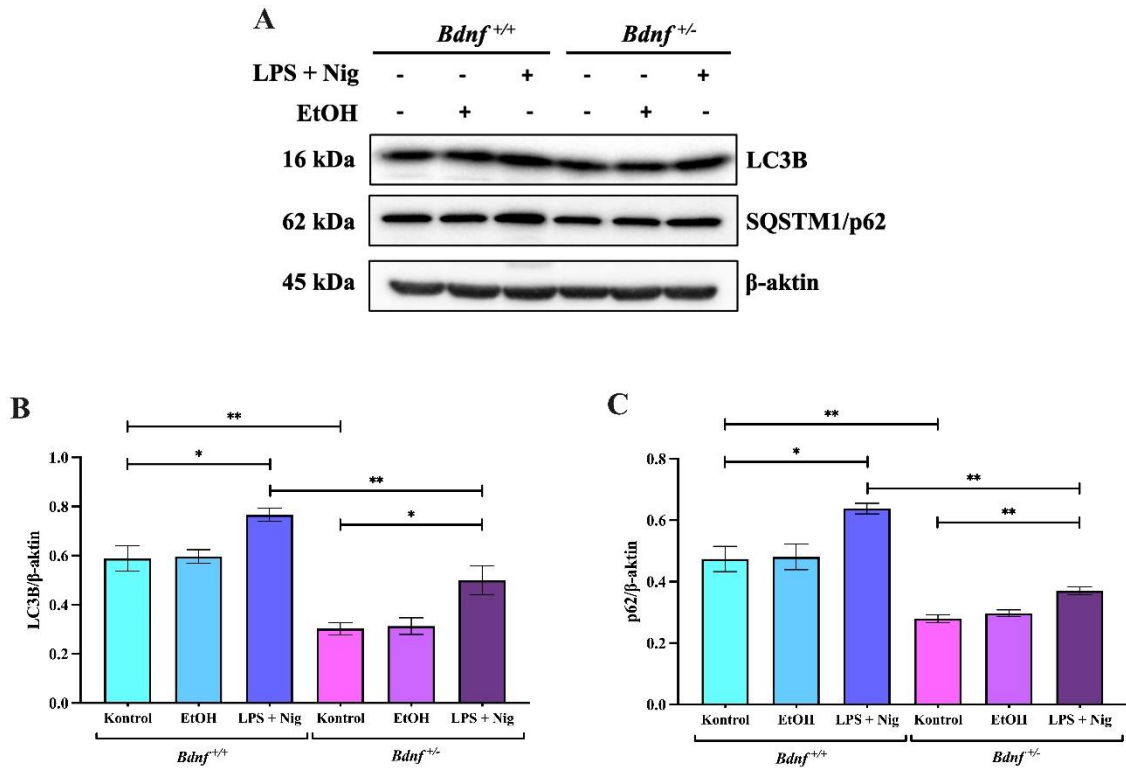
d: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

e: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

f: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.013 düzeyde anlamlı farklı

g: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

h: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı



Şekil 19. Hipokampus dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin sonuçları (n=6) [(^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001)]

4.6.2. Deney Gruplarının Korteks Dokularındaki Otofaji ve Otofagozom Oluşumu ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları

Korteks dokularında, *Bdnf*^{+/-} farelerde LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyeleri, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında azalmıştı (sırasıyla, p=0.01 ve p=0.004). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında arttığını bulduk (sırasıyla, p=0.025 ve p=0.004). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} farelerde, LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında arttığını bulduk (sırasıyla, p=0.025 ve p=0.025). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında gelişmiş otofaji belirteçlerine sahip olduğunu bulduk (sırasıyla, p=0.004 ve p=0.004 (Tablo 19 ve Şekil 20A, B, C)).

Tablo 19. Korteks dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin sonuçları

	LC3B	SQSTM1/p62
<i>Bdnf</i> ^{+/+}	0.556±0.046	0.426±0.033
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + Etanol	0.566±0.031	0.415±0.014
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + LPS + Nig	0.753±0.044 ^{b,d}	0.614±0.012 ^{f,h}
<i>Bdnf</i> ^{+/-}	0.393±0.016 ^a	0.233±0.018 ^e
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + Etanol	0.394±0.043	0.233±0.017
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + LPS + Nig	0.449±0.01 ^c	0.324±0.032 ^g

LC3B ve SQSTM1/p62 proteinlerine ait sonuçlar β-aktin'e oranlanarak verildi.

Değerler ortalama±S.E.M. şeklinde verildi.

a: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.01 düzeyde anlamlı farklı

b: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.025 düzeyde anlamlı farklı

c: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.025 düzeyde anlamlı farklı

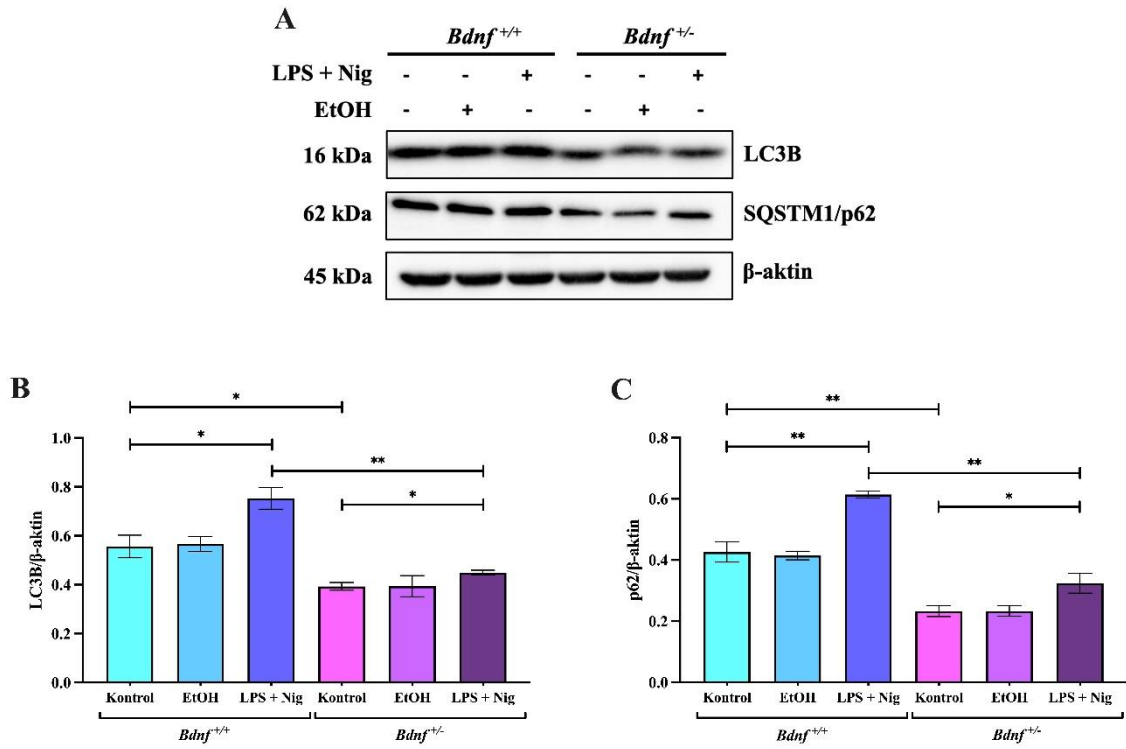
d: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

e: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

f: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

g: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.025 düzeyde anlamlı farklı

h: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı



Şekil 20. Korteks dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin sonuçları (n=6) [($p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$)]

4.6.3. Deney Gruplarının Karaciğer Dokularındaki Otofaji ve Otofagozom Oluşumu ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları

Karaciğer dokularında, *Bdnf*^{+/-} farelerde LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyeleri, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında azalmıştı (sırasıyla, $p=0.004$ ve $p=0.016$). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında arttığını bulduk (sırasıyla, $p=0.004$ ve $p=0.01$). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} farelerde, LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında arttığını bulduk (sırasıyla, $p=0.025$ ve $p=0.016$). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında gelişmiş otofaji belirteçlerine sahip olduğunu bulduk (sırasıyla, $p=0.004$ ve $p=0.004$ (Tablo 20 ve Şekil 21A, B, C)).

Tablo 20. Karaciğer dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin sonuçları

	LC3B	SQSTM1/p62
<i>Bdnf</i> ^{+/+}	0.595±0.043	0.487±0.046
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + Etanol	0.594±0.03	0.489±0.028
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + LPS + Nig	0.846±0.03 ^{b,d}	0.722±0.036 ^{f,h}
<i>Bdnf</i> ^{+/-}	0.287±0.032 ^a	0.268±0.035 ^e
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + Etanol	0.286±0.026	0.273±0.029
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + LPS + Nig	0.457±0.041 ^c	0.411±0.034 ^g

LC3B ve SQSTM1/p62 proteinlerine ait sonuçlar β-aktin'e oranlanarak verildi.

Değerler ortalama±S.E.M. şeklinde verildi.

a: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

b: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

c: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.025 düzeyde anlamlı farklı

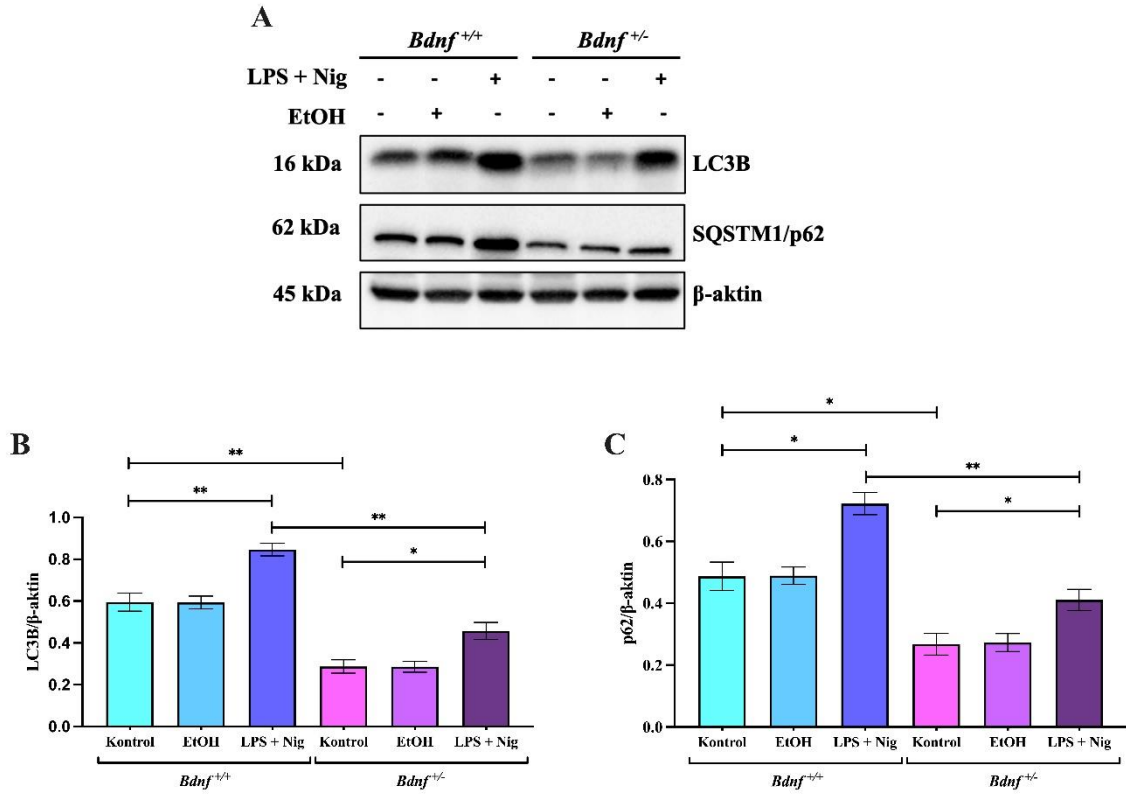
d: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

e: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.016 düzeyde anlamlı farklı

f: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.01 düzeyde anlamlı farklı

g: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.016 düzeyde anlamlı farklı

h: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı



Şekil 21. Karaciğer dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin sonuçları (n=6) [($p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$)]

4.6.4. Deney Gruplarının Epididimal Yağ Dokularındaki Otofaji ve Otofagozom Oluşumu ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları

Epididimal yağ dokularında, *Bdnf*^{+/-} farelerde LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyeleri, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında azalmıştı (sırasıyla, $p=0.01$ ve $p=0.004$). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında arttığını bulduk (sırasıyla, $p=0.01$ ve $p=0.025$). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} farelerde, LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında arttığını bulduk (sırasıyla, $p=0.01$ ve $p=0.016$). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında gelişmiş otofaji belirteçlerine sahip olduğunu bulduk (sırasıyla, $p=0.006$ ve $p=0.004$ (Tablo 21 ve Şekil 22A, B, C)).

Tablo 21. Epididimal yağ dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin sonuçları

	LC3B	SQSTM1/p62
<i>Bdnf</i> ^{+/+}	0.536±0.045	0.670±0.024
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + Etanol	0.531±0.05	0.666±0.025
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + LPS + Nig	0.767±0.06 ^{b,d}	0.838±0.037 ^{f,h}
<i>Bdnf</i> ^{+/-}	0.281±0.02 ^a	0.352±0.025 ^e
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + Etanol	0.281±0.017	0.346±0.015
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + LPS + Nig	0.421±0.035 ^c	0.489±0.031 ^g

LC3B ve SQSTM1/p62 proteinlerine ait sonuçlar β-aktin'e oranlanarak verildi.

Değerler ortalama±S.E.M. şeklinde verildi.

a: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.01 düzeyde anlamlı farklı

b: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.01 düzeyde anlamlı farklı

c: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.01 düzeyde anlamlı farklı

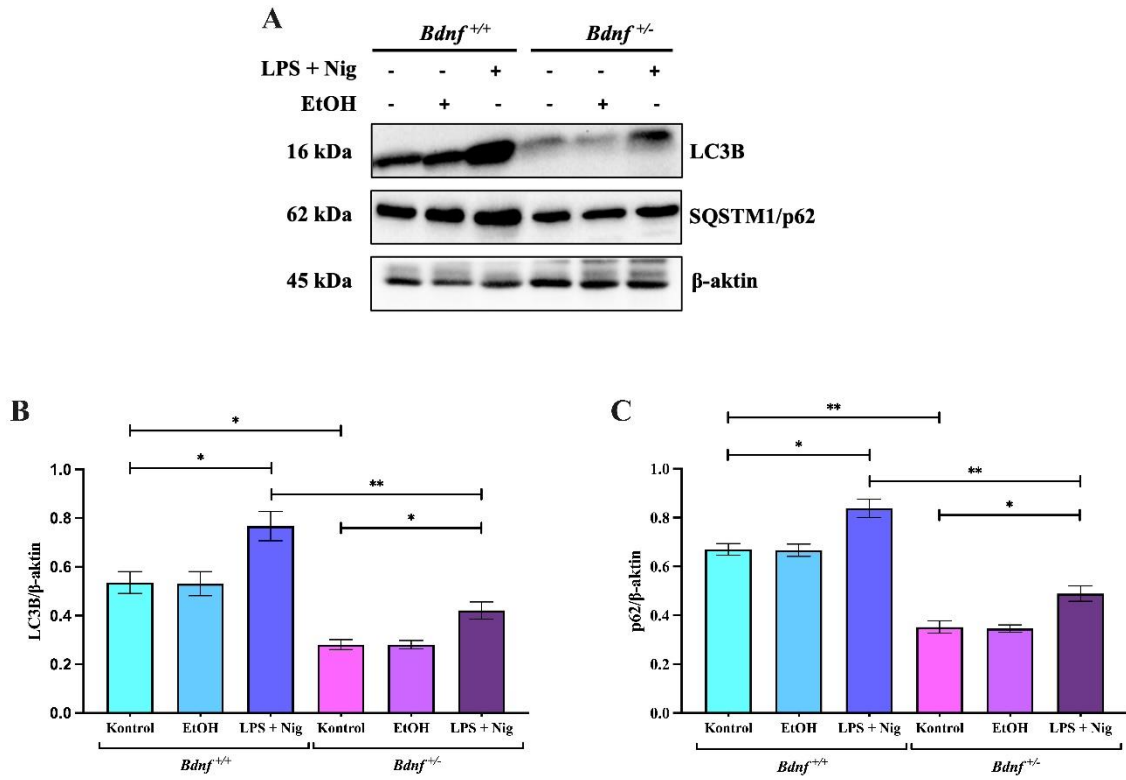
d: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.006 düzeyde anlamlı farklı

e: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

f: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.025 düzeyde anlamlı farklı

g: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.016 düzeyde anlamlı farklı

h: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı



Şekil 22. Epididimal yağ dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin sonuçları (n=6) [(^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001)]

4.6.5. Deney Gruplarının Kas Dokularındaki Otofaji ve Otofagozom Oluşumu ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları

Kas dokularında, *Bdnf*^{+/-} farelerde LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyeleri, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında azalmıştı (sırasıyla, p=0.004 ve p=0.006). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında arttığını bulduk (sırasıyla, p=0.006 ve p=0.016). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} farelerde, LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında arttığını bulduk (sırasıyla, p=0.004 ve p=0.037). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında gelişmiş otofaji belirteçlerine sahip olduğunu bulduk (sırasıyla, p=0.004 ve p=0.004 (Tablo 22 ve Şekil 23A, B, C)).

Tablo 22. Kas dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin sonuçları

	LC3B	SQSTM1/p62
<i>Bdnf</i> ^{+/+}	0.472±0.035	0.453±0.039
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + Etanol	0.475±0.029	0.457±0.045
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + LPS + Nig	0.679±0.024 ^{b,d}	0.603±0.037 ^{f,h}
<i>Bdnf</i> ^{+/-}	0.190±0.012 ^a	0.217±0.033 ^e
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + Etanol	0.208±0.028	0.218±0.011
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + LPS + Nig	0.346±0.022 ^c	0.335±0.029 ^g

LC3B ve SQSTM1/p62 proteinlerine ait sonuçlar GAPDH'a oranlanarak verildi.

Değerler ortalama±S.E.M. şeklinde verildi.

a: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

b: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.006 düzeyde anlamlı farklı

c: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

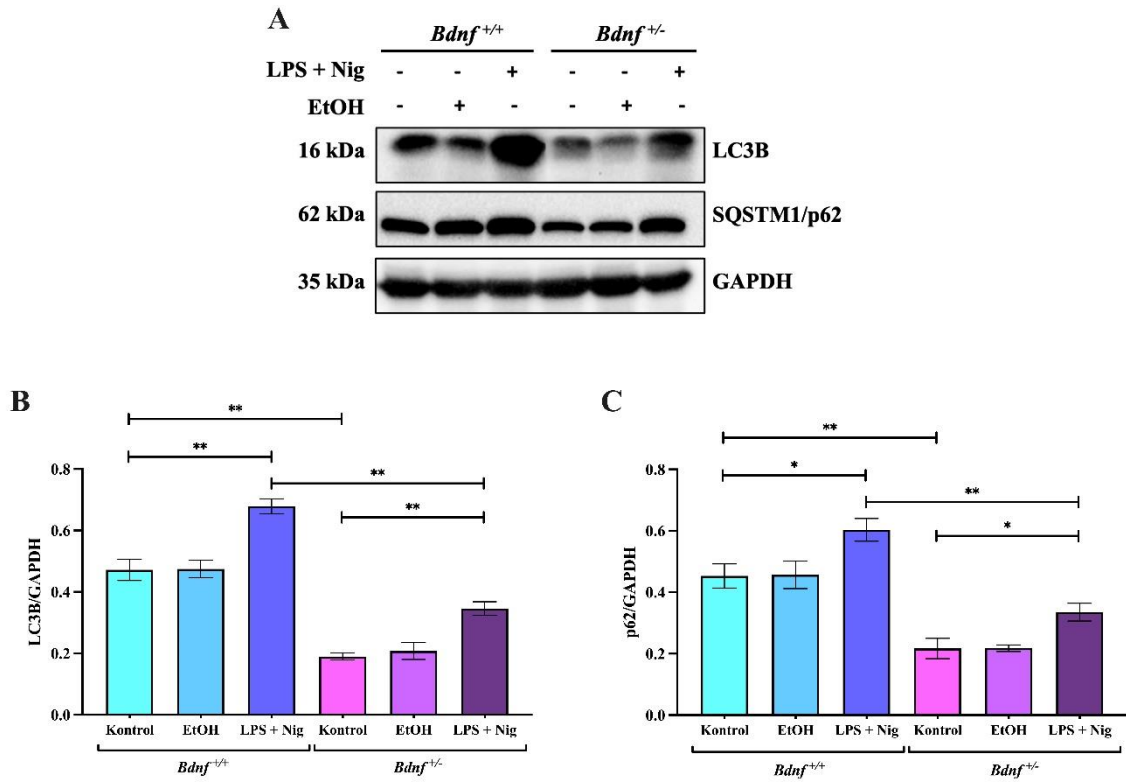
d: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

e: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.006 düzeyde anlamlı farklı

f: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.016 düzeyde anlamlı farklı

g: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.037 düzeyde anlamlı farklı

h: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı



Şekil 23. Kas dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin sonuçları (n=6) [(^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001)]

4.7. Deney Gruplarının ESCRT-III aracılı Plazma Membran Onarım Sistemi ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları

BDNF'nin hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas dokularında ESCRT-III aracılı plazma membran onarım sistemi ile ilişkili VPS4A protein seviyelerine etkisi western blot yöntemiyle belirlendi.

4.7.1. Deney Gruplarının Hipokampus Dokularındaki ESCRT-III aracılı Plazma Membran Onarım Sistemi ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları

Hipokampus dokularında, *Bdnf*^{+/-} farelerde VPS4A protein seviyeleri, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında azalmıştı (p=0.004). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, VPS4A protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında azaldığını bulduk (p=0.025). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} farelerde, VPS4A protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında azaldığını bulduk (p=0.025). LPS+nigerisin

enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında gelişmiş VPS4A protein seviyelerine sahip olduğunu bulduk (p=0.025 (Tablo 23 ve Şekil 24A, B)).

Tablo 23. Hipokampus dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen VPS4A protein seviyelerinin sonuçları

	VPS4A
<i>Bdnf</i> ^{+/+}	0.340±0.021
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + Etanol	0.341±0.03
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + LPS + Nig	0.243±0.029 ^{b,d}
<i>Bdnf</i> ^{+/-}	0.227±0.019 ^a
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + Etanol	0.217±0.027
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + LPS + Nig	0.143±0.016 ^c

VPS4A proteinine ait sonuçlar β-aktin'e oranlanarak verildi.

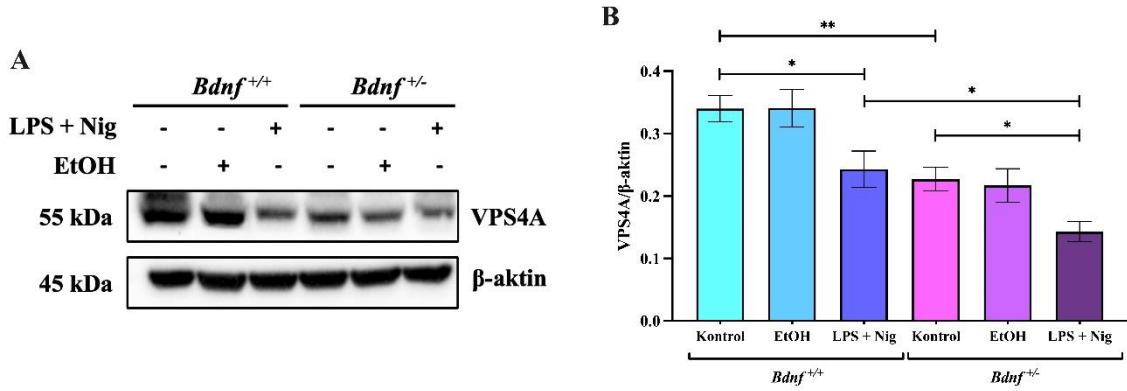
Değerler ortalama±S.E.M. şeklinde verildi.

a: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

b: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.025 düzeyde anlamlı farklı

c: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.025 düzeyde anlamlı farklı

d: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.025 düzeyde anlamlı farklı



Şekil 24. Hipokampus dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen VPS4A protein seviyelerinin sonuçları (n=6) [(^{*} p<0.05, ^{**} p<0.01, ^{***} p<0.001)]

4.7.2. Deney Gruplarının Korteks Dokularındaki ESCRT-III-aracılı Plazma Membran Onarım Sistemi ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları

Korteks dokularında, *Bdnf*^{+/-} farelerde VPS4A protein seviyeleri, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında azalmıştı (p=0.004). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, VPS4A protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında azaldığını bulduk (p=0.025). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} farelerde, VPS4A protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında azaldığını bulduk (p=0.004). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında gelişmiş VPS4A protein seviyelerine sahip olduğunu bulduk (p=0.004 (Tablo 24 ve Şekil 25A, B)).

Tablo 24. Korteks dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen VPS4A protein seviyelerinin sonuçları

	VPS4A
<i>Bdnf</i> ^{+/+}	0.368±0.028
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + Etanol	0.358±0.034
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + LPS + Nig	0.248±0.035 ^{b,d}
<i>Bdnf</i> ^{+/-}	0.186±0.022 ^a
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + Etanol	0.183±0.022
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + LPS + Nig	0.055±0.004 ^c

VPS4A proteinine ait sonuçlar β-aktin'e oranlanarak verildi.

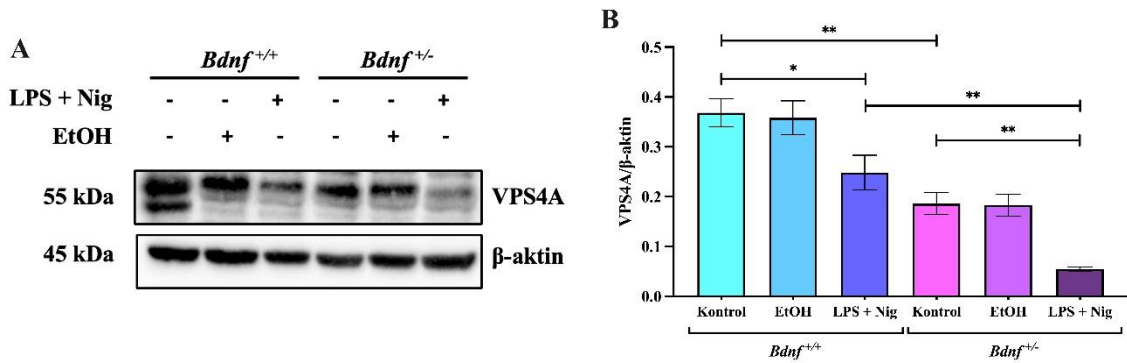
Değerler ortalama±S.E.M. şeklinde verildi.

a: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

b: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.025 düzeyde anlamlı farklı

c: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

d: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı



Şekil 25. Korteks dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen VPS4A protein seviyelerinin sonuçları (n=6) [(^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001)]

4.7.3. Deney Gruplarının Karaciğer Dokularındaki ESCRT-III aracılı Plazma Membran Onarım Sistemi ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları

Karaciğer dokularında, *Bdnf*^{+/-} farelerde VPS4A protein seviyeleri, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında azalmıştı (p=0.004). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, VPS4A protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında azaldığını bulduk (p=0.016). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} farelerde, VPS4A protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında azaldığını bulduk (p=0.004). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında gelişmiş VPS4A protein seviyelerine sahip olduğunu bulduk (p=0.004 (Tablo 25 ve Şekil 26A, B)).

Tablo 25. Karaciğer dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen VPS4A protein seviyelerinin sonuçları

	VPS4A
<i>Bdnf</i> ^{+/+}	0.772±0.056
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + Etanol	0.773±0.06
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + LPS + Nig	0.540±0.033 ^{b,d}
<i>Bdnf</i> ^{+/-}	0.430±0.044 ^a
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + Etanol	0.432±0.045
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + LPS + Nig	0.193±0.027 ^c

VPS4A proteinine ait sonuçlar β-aktin'e oranlanarak verildi.

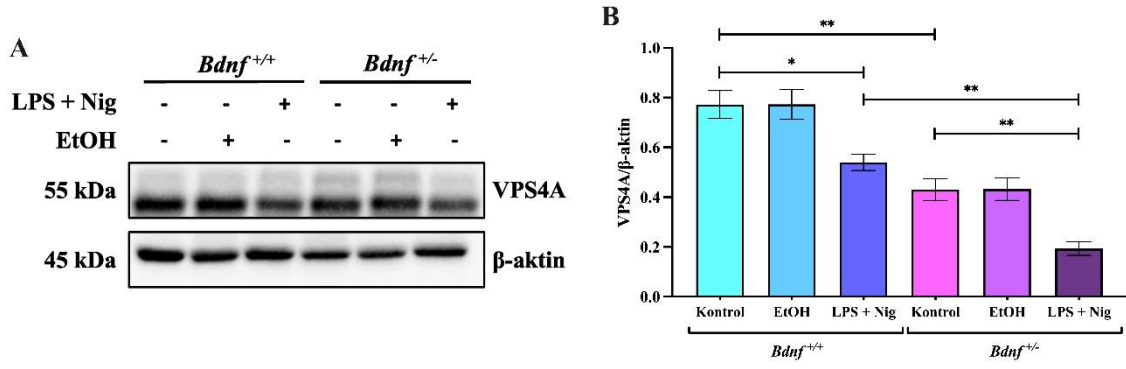
Değerler ortalama±S.E.M. şeklinde verildi.

a: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

b: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.016 düzeyde anlamlı farklı

c: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

d: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı



Şekil 26. Karaciğer dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen VPS4A protein seviyelerinin sonuçları (n=6) [(^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001)]

4.7.4. Deney Gruplarının Epididimal Yağ Dokularındaki ESCRT-III aracılı Plazma Membran Onarım Sistemi ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları

Epididimal yağ dokularında, *Bdnf*^{+/+} farelerde VPS4A protein seviyeleri, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında azalmıştı (p=0.004). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, VPS4A protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında azaldığını bulduk (p=0.006). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} farelerde, VPS4A protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında azaldığını bulduk (p=0.037). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında gelişmiş VPS4A protein seviyelerine sahip olduğunu bulduk (p=0.004 (Tablo 26 ve Şekil 27A, B)).

Tablo 26. Epididimal yağ dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen VPS4A protein seviyelerinin sonuçları

	VPS4A
<i>Bdnf</i> ^{+/+}	0.800±0.026
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + Etanol	0.798±0.056
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + LPS + Nig	0.585±0.041 ^{b,d}
<i>Bdnf</i> ^{+/-}	0.319±0.035 ^a
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + Etanol	0.320±0.031
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + LPS + Nig	0.209±0.031 ^c

VPS4A proteinine ait sonuçlar β-aktin'e oranlanarak verildi.

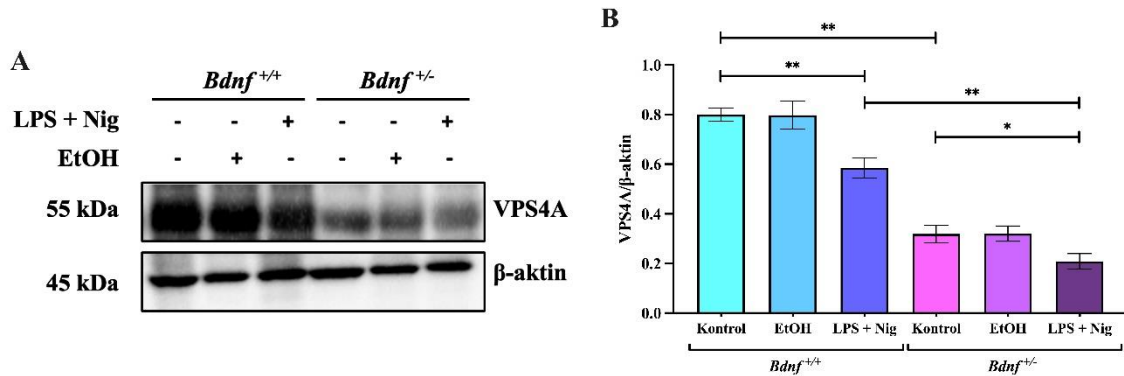
Değerler ortalama±S.E.M. şeklinde verildi.

a: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

b: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.006 düzeyde anlamlı farklı

c: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.037 düzeyde anlamlı farklı

d: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı



Şekil 27. Epididimal yağ dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen VPS4A protein seviyelerinin sonuçları (n=6) [(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001)]

4.7.5. Deney Gruplarının Kas Dokularındaki ESCRT-III aracılı Plazma Membran Onarım Sistemi ile İlişkili Protein Seviyelerinin Analiz Sonuçları

Kas dokularında, *Bdnf*^{+/-} farelerde VPS4A protein seviyeleri, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında azalmıştı (p=0.004). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, VPS4A protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında azaldığını bulduk (p=0.01). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} farelerde, VPS4A protein seviyelerinin, *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında azaldığını bulduk (p=0.006). LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/+} farelerde, LPS+nigerisin enjekte edilmiş *Bdnf*^{+/-} fareler ile kıyaslandığında gelişmiş VPS4A protein seviyelerine sahip olduğunu bulduk (p=0.004) (Tablo 27 ve Şekil 28A, B)).

Tablo 27. Kas dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen VPS4A protein seviyelerinin sonuçları

	VPS4A
<i>Bdnf</i> ^{+/+}	0.588±0.036
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + Etanol	0.585±0.039
<i>Bdnf</i> ^{+/+} + LPS + Nig	0.407±0.042 ^{b,d}
<i>Bdnf</i> ^{+/-}	0.277±0.053 ^a
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + Etanol	0.272±0.04
<i>Bdnf</i> ^{+/-} + LPS + Nig	0.127±0.008 ^c

VPS4A proteinine ait sonuçlar GAPDH'a oranlanarak verildi.

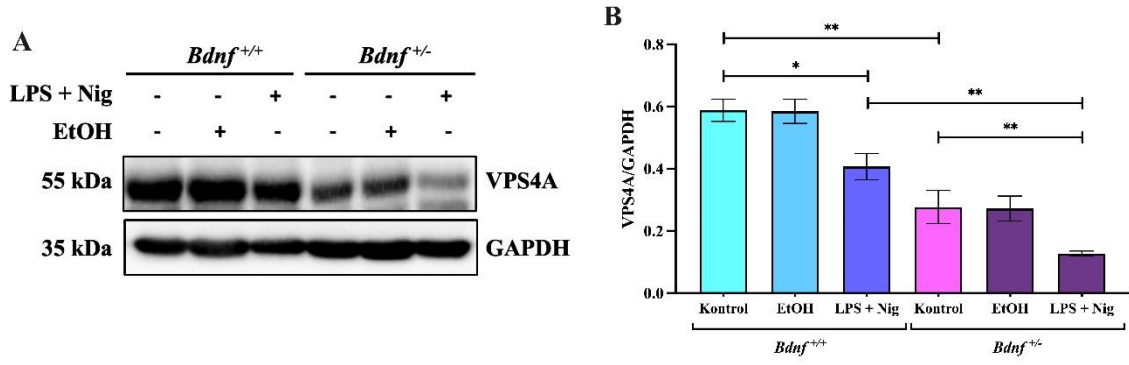
Değerler ortalama±S.E.M. şeklinde verildi.

a: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı

b: *Bdnf*^{+/+} grubuna göre p = 0.01 düzeyde anlamlı farklı

c: *Bdnf*^{+/-} grubuna göre p = 0.006 düzeyde anlamlı farklı

d: *Bdnf*^{+/-} + LPS + Nig grubuna göre p = 0.004 düzeyde anlamlı farklı



Şekil 28. Kas dokusu örneklerinde western blot yöntemiyle analiz edilen VPS4A protein seviyelerinin sonuçları (n=6) [(^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001)]

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kronik inflamasyonla ilişkili hastalıklar dünya çapında büyük bir sağlık yükü oluşturmaktadır. Enfeksiyona ve doku hasarına karşı inflamatuvar yanıtın merkezi tetikleyicileri olarak inflamazomlar birçok hastalığın patogeneğinde anahtar düzenleyiciler olarak rol almaktadır (173). Bu nedenle, inflamasyonun moleküler mekanizması başlıca inflamazom yolunu içermektedir (7). NLRP3 inflamazomu inflamazomlar arasında en iyi karakterize edilen inflamatuvar sensör molekülüdür ve bilimsel çalışmalara en fazla konu olan inflamazom modelidir (8). NLRP3 inflamazomu, patojenlere veya hasar sinyallerine karşı koruyan ve doğuştan gelen bağışıklık sisteminin güçlü bir oyuncusudur (1). PAMP, DAMP ve metabolizma ile ilişkili moleküler yapılardan (MAMP'lar; okside düşük yoğunluklu lipoprotein (OxLDL), serbest yağ asitleri (FFA'lar), glukoz, ileri glikasyon son ürünleri (AGE'ler) ve kolesterol) kaynaklanan sinyaller NLRP3, ASC ve pro-kaspaz-1 proteinlerinin bir araya gelerek NLRP3 inflamazom kompleksinin oluşmasına sebep olur ve ardından kaspaz-1 aktifleşip fonksiyon göstermeye başlar (174, 175). ASC filamenti üzerinde pro-kaspaz-1'in oligomerizasyonu kaspaz-1'e olgunlaşmasını sağlar. Aktif kaspaz-1 proinflamatuvar sitokinler 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. Aktif kaspaz-1 ayrıca, por oluşturan bir protein olan GSDMD'yi aktifleştirerek plazma membranında por oluşmasına ve piroptoz sürecinin başlamasına ve inflamasyonun yayılmasına neden olur (175). Bu nedenle anormal NLRP3 inflamazom aktivasyonu, farklı klinik bağlamlarda konağa zarar verebilecek aşırı ve kendi kendine devam eden inflamasyonla ilişkilidir (22). Anormal NLRP3 inflamazom aktivasyonunun neden olduğu bu aşırı inflamasyon, kanser, metabolik ve nörodejeneratif bozukluklar gibi çok çeşitli hastalıklara neden olmaktadır; ve bu aktivasyon kronik hale dönüştüğünde patolojinin şiddetlendiği ve bu durumun da kanser, metabolik ve nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesinin hızlanmasına sebep olduğu ortaya koyulmuştur (1, 22, 23, 90, 91).

NLRP3 inflamazom aktivasyon modeli oluşturmada önce, tez çalışmasında kullanılacak olan farelerin genotipleri yapıldı. BDNF ve neomisin geninin birer alleline sahip fareler *Bdnf*^{+/-}, BDNF geninin her iki alleline sahip olan fareler *Bdnf*^{+/+} olarak tanımlandı (Şekil 10). Sonrasında, *Bdnf*^{+/-} farelerdeki BDNF eksikliğini nicel olarak göstermek amacıyla farelerde serum BDNF seviyeleri ticari olarak satın alınan ELISA kiti kullanılarak belirlendi (Bölüm 3.2.4). Elde edilen verilerde, *Bdnf*^{+/-} farelerde serum BDNF

seviyeleri *Bdnf*^{+/+} fareler ile kıyaslandığında anlamlı derecede ($p<0.05$) düşük olduğu gözlemlendi (Tablo 10 ve Şekil 11).

NLRP3 inflamazom kompleksi kanonik, kanonik olmayan ve alternatif yollar olmak üzere üç farklı şekilde aktive olabilir. Bu yollar NLRP3 inflamazom kompleksinin oluşumuna ve kaspaz-1 enziminin aktivasyonuna yol açar. Kanonik yolda tamamen NLRP3 inflamazom aktivasyonu gerçekleşir ve bu aktivasyon için iki sinyal gereklidir: priming ve aktivasyon sinyali (48). Bu tez çalışmasında, *Bdnf*^{+/+} ve *Bdnf*^{+/-} farelerde, tam bir NLRP3 inflamazom aktivasyonunun sağlanması için LPS ve nigerisin kullanıldı. *Bdnf*^{+/+} ve *Bdnf*^{+/-} farelere, NLRP3 inflamazom aktivasyonunda birinci sinyal olan “priming” sinyalini aktive etmek için 5 mg/kg LPS, ikinci sinyal olan “aktivasyon” sinyalini aktive etmek için ise 1 mg/kg nigerisin intraperitoneal olarak enjekte edildi ve *in vivo* olarak NLRP3 inflamazom aktivasyon modeli oluşturuldu (166-169). Doğuştan gelen tepkileri uyarmak için yaygın olarak kullanılan LPS, lipofilik bir moleküldür ve kan beyin bariyerini geçebilir (168). İyi bilinen bir PAMP olan LPS, TLR-4’e bağlanarak klasik NLRP3 inflamazom aktivasyonu için gerekli olan priming sinyali olarak görev yapar (176). Nigerisin (bir K⁺/H⁺ iyonoforu), panneksin-1 aracılığıyla hücre içi potasyum seviyelerini azaltarak NLRP3 inflamazom kompleksini indükleyen bir aktivasyon sinyali olarak görev yapar (50, 59, 177). Ek olarak, aktivasyon aşamasında, mitokondriyal disfonksiyon, reaktif oksijen türlerinin üretimi, iyon akışı (K⁺/Cl⁻ akışı ve Ca²⁺/Na⁺ girişi), Ca²⁺ homeostazının bozulması, lizozomal hasar, golgi fragmentasyonu ve metabolik değişiklikler gibi çeşitli moleküler faktörler ve hücresel sinyaller de NLRP3 inflamazom aktivasyonuna katkıda bulunabilir (50). Çalışmamızda LPS ve nigerisin enjekte edilen *Bdnf*^{+/+} ve *Bdnf*^{+/-} farelerde yapılan moleküler testler, NLRP3 inflamazom aktivasyonunun gerçekleştirildiği ortaya koyulmuştur. NLRP3 inflamazom aktivasyonunun doğruluğu, IL-1 β ve IL-18 sitokin seviyelerindeki artış ve hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas dokularında NLRP3 inflamazom protein seviyelerindeki artış ile gösterildi (Tablo 11, Tablo 12, Tablo 13, Tablo 14, Tablo 15, Tablo 16, Tablo 17 ve Şekil 12, Şekil 13, Şekil 14, Şekil 15, Şekil 16, Şekil 17, Şekil 18).

NLRP3 inflamazom yolağı ile ilişkili proteinler ve negatif düzenleyicileri olan NF- κ B p65, NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD, LC3B, SQSTM1/p62 ve VPS4A protein seviyelerinin saptanması için western blot yöntemi sıklıkla tercih edilmektedir (14, 20, 167, 168, 178). Dolayısıyla, bu çalışmada da IL-1 β ve IL-18 sitokin seviyelerinin belirlenmesi

için ELISA; NF- κ B p65, NLRP3, kaspaz-1 p20, GSDMD, LC3B, SQSTM1/p62 ve VPS4A protein düzeylerinin belirlenmesinde ise western blot yöntemi kullanıldı.

Aşırı doku hasarını ve homeostazın bozulmasını önlemek için NLRP3 inflamazom aktivasyonunun sıkı bir şekilde düzenlenmesi ve kontrol edilmesi gerekir (46). Lössince zengin tekrarlı Fli-I ile etkileşen protein 2 (leucine-rich repeat Fli-I-interacting protein 2), A20, küçük heterodimer partner, aril hidrokarbon reseptörü, lipin-2 ve RAF-kinaz inhibitör protein (RKIP) gibi çeşitli endojen negatif regülatörlerin, farklı mekanizmalar aracılığıyla inflamazom aktivasyonunu azalttığı bilinmektedir (179-184). Bu endojen düzenleyiciler NLRP3 inflamazom aktivasyonunu negatif düzenleyerek aşırı inflamasyona ve doku hasarına karşı korumada kritik öneme sahiptir. Bu tez çalışmasında, BDNF'nin NLRP3 inflamazomu üzerine düzenleyici etkisini araştırdık. BDNF eksik farelerde NLRP3 inflamazom aktivasyonuna hassasiyetin arttırdığını gösterdik. Elde ettiğimiz sonuçlar, BDNF'nin doğrudan NLRP3 inflamazom aktivasyonunun engellenmesiyle ilişkili olduğuna dair veriler sunmaktadır.

BDNF, nörolojik aktivitelerde önemli rol oynayan çok fonksiyonlu bir nörotrofindir (185). Beyinde ve periferel dokularda oldukça bol miktarda bulunan BDNF, merkezi ve periferel sinir sisteminin gelişimi, sinaptogenez, sinaptik plastisite, nörogenez, nöronal olgunlaşma, nöronal plastisite, anoreksijenez, beyin metabolizmasının ve enerji homeostazının regülasyonu gibi birçok sinyal yolunda önemli bir düzenleyicidir (30, 31, 33, 129-132, 186). Ancak, BDNF'nin fonksiyon bozukluğu aynı zamanda inflamatuvar hastalıkların patogeneziyle de ilişkilidir (31). BDNF'nin umut verici güçlü immünomodülatör fonksiyonları ve anti-inflamatuvar etkileri, çeşitli hastalıklarda veya hastalık modellerinde tanımlanmıştır (153). Olası yaygın faktörler sitokinlerin düzenlenmesi (anti-inflamatuvar moleküllerin ekspresyonunu ve salgılanmasını artırırken, proinflamatuvar sitokinlerin sekresyonunu inhibe etmek) ve NF- κ B sinyal yolu veya MAPK'nın inhibisyonudur. BDNF, IL-1 β gibi inflamazomla ilişkili sitokinlerin ve TNF- α , IL-6 ve INF- γ gibi inflamazomdan bağımsız sitokinlerin üretimini baskılar (35, 37-39, 161). Ayrıca BDNF, IL-10 ve interlökin-4 (IL-4) gibi anti-inflamatuvar sitokinlerin üretimini de uyarır (35, 37, 39). Parrott ve arkadaşları, akut proinflamatuvar yanıtı arttıran LPS'nin, *Bdnf*^{+/-} farelerde aşırı proinflamatuvar sitokinleri indüklediğini göstermişlerdir. Bu çalışmada, IL-1 β , TNF- α ve IL-6 proinflamatuvar sitokinlerin *Bdnf*^{+/+} kontrol fareleri ile kıyaslandığında *Bdnf*^{+/-} farelerde aşırı eksprese edildiği bulunmuştur (152). Başka bir çalışmada, BDNF/TrkB

eksikliğinin beyin dokularında inflamatuvar sitokinleri arttırdığı rapor edilmiştir (187). Literatürde benzer çalışmalardaki verileri destekleyecek şekilde, sonuçlarımız *Bdnf*^{+/-} farelerde LPS+nigerisin-aracılı artan IL-1 β ve IL-18 salınımı sergilediğini göstermektedir. BDNF'nin LPS+nigerisin hasarı ile artan IL-1 β ve IL-18 seviyelerini anlamlı olarak azalttığı (p<0.05) bulundu (Tablo 11, Tablo 12 ve Şekil 12, Şekil 13). Ek olarak NF- κ B, pro-IL-1 β , pro-IL-18 ve NLRP3 protein sentezini ve NLRP3 inflamazom aktivasyonunu düzenleyen önemli bir transkripsiyon faktörüdür (7). Bu çalışmada, *in vivo* LPS+nigerisin ile oluşturulan NLRP3 inflamazom aktivasyon modelinde, BDNF'nin NLRP3 inflamazom aktivasyonu öncesinde görev alan NF- κ B p65 protein seviyeleri western blot yöntemi ile belirlendi. Buna göre, BDNF'nin NF- κ B'yi inhibe ettiğine dair çalışmalar göz önüne alındığında, sonuçlarımız NLRP3 inflamazom aktivasyonundan bağımsız olarak grupların hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas dokularında, BDNF eksikliği NF- κ B p65 protein seviyelerini anlamlı olarak (p<0.05) arttırdığı gösterildi. Ayrıca, NLRP3 inflamazom aktivasyonu yapılan grupların hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas dokularında, NF- κ B p65 protein seviyelerinin BDNF eksikliği ile anlamlı olarak (p<0.05) arttığı bulundu. Sonuç olarak, BDNF'nin NF- κ B inhibisyonu aracılığıyla NLRP3 inflamazom aktivasyonunu bozduğunu açıkça görülmektedir (Tablo 13, Tablo 14, Tablo 15, Tablo 16, Tablo 17 ve Şekil 14, Şekil 15, Şekil 16, Şekil 17, Şekil 18).

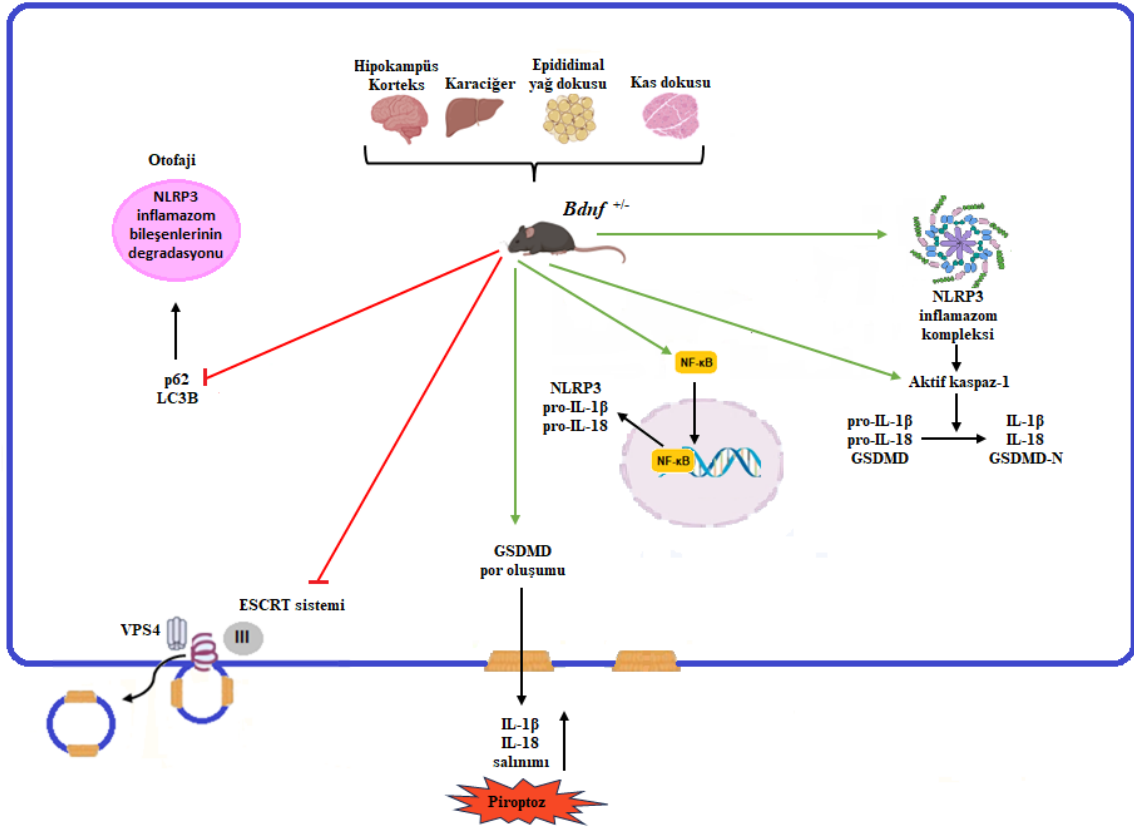
NLRP3 inflamazom aktivasyonu sonucunda kaspaz-1 aktive olmaktadır. Aktif kaspaz-1 daha sonra inaktif pro-IL-1 β ve pro-IL-18'i proteolitik olarak keserek aktif formları olan IL-1 β ve IL-18'e dönüşümünü sağlar ve büyük miktarlarda IL-1 β ve IL-18'in salgılanmasına yol açar. Kaspaz-1 ayrıca GSDMD'nin bölünmesini sağlayarak plazma membranında oligomerize olan ve porlar oluşturan N-terminal fragmentlerinin (GSDMD-N) üretilmesini sağlar. Böylece GSDMD-aracılı piroptoz sürecinin başlamasına ve inflamasyonun yayılmasına neden olur (188, 189). BDNF'nin NLRP3 inflamazom aktivasyonunun kontrolü üzerine olan etkisi hakkında çok az araştırma yapılmıştır. BDNF'nin, KLF2/HK1'e bağımlı glukoz metabolizmasının düzenlenmesi ve mitokondriyal homeostazın korunması yoluyla vasküler endotel hücrelerde oxLDL aracılı NLRP3 inflamazom aktivasyonunu ve NLRP3 inflamazom aracılı piroptozu azalttığı belirtilmiştir (190). Başka bir çalışmada, intranazal BDNF uygulamasının, kronik öngörülemez hafif stresin (chronic unpredictable mild stress, CUMS) neden olduğu depresyon modelinde, farelerin hipokampus dokularında inflamazomla ilişkili protein seviyelerini (NLRP3 ve IL-

1β) azalttığı gösterilmiştir (191). Bu çalışmada, BDNF'nin NLRP3 inflamazom aktivasyonuna ve GSDMD-aracılı piroptoz üzerine etkisi *in vivo* koşullarda incelendi. Bu bağlamda, NLRP3 inflamazomu aktivasyonunun ve piroptozun en önemli belirteçleri olan NLRP3, aktif kaspaz-1 p20 ve GSDMD (western blot yöntemi ile) seviyeleri incelendi. Literatürde benzer çalışmalardaki verileri destekleyecek şekilde, sonuçlarımız NLRP3 inflamazom aktivasyonundan bağımsız olarak grupların hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas dokularında, BDNF eksikliği NLRP3, aktif kaspaz-1 p20 ve GSDMD protein seviyelerini anlamlı olarak ($p<0.05$) arttırarak NLRP3 inflamazom ile ilişkili aktiviteyi ve GSDMD-aracılı piroptozu desteklediği gösterildi. Ayrıca NLRP3 inflamazom aktivasyonu yapılan grupların hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas dokularında, NLRP3, aktif kaspaz-1 p20 ve GSDMD protein seviyelerinin BDNF eksikliği ile anlamlı olarak ($p<0.05$) arttığı tespit edildi (Tablo 13, Tablo 14, Tablo 15, Tablo 16, Tablo 17 ve Şekil 14, Şekil 15, Şekil 16, Şekil 17, Şekil 18).

Otofaji, yanlış katlanmış veya agregre proteinlerin yıkımında, hasarlı organellerin temizlenmesinde ve inflamazom fonksiyonu düzenleyen homeostatik bir süreçtir (18). Otofaji, beclin1, hafif zincir 3 (LC3) A ve B, sekestozom 1 (SQSTM1)/p62 ve sirtuin 1 (SIRT1) dahil olmak üzere çok çeşitli proteinler tarafından düzenlenir. Bunlar arasında LC3B ve SQSTM1/p62, otofaji aktivitesini gözlemlemek için yaygın olarak kullanılan otofaji belirteçleridir. LC3B, otofagozom oluşumunda rol oynamaktadır. SQSTM1/p62, hedef kargo için adaptör olarak otofaji sistemiyle etkileşime giren multi domainlere sahip seçici bir otofaji substratı olarak hizmet etmektedir (192). Otofaji, hiperinflamasyonu ve inflamazomun hiperaktivasyonunu azaltır. Benzer şekilde, inflamazom aktivasyonu, konağı aşırı inflamasyondan korumak için otofajiyi uyarabilir (193). Otofaji yoluyla inflamazom aktivasyonun düzenlenmesi birçok yolla gerçekleşebilir. Bu düzenlenme, endojen inflamazom aktivatörlerin uzaklaştırılması veya inflamazom bileşenlerinin ve sitokinlerinin doğrudan uzaklaştırılması yoluyla sağlanabilir. Dolayısıyla otofaji, inflamazomların ana düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır (15). Otofaji son yıllarda BDNF ile de ilişkilendirilmiştir (84, 194). Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, BDNF/TrkB sinyal yolunun aktivasyonu apoptozun önlenmesine, otofaji ve mitofajinin aktivasyonuna, otofagozom oluşumuna (LC3 ve p62 seviyelerinde artış) ve inflamatuvar yanıtların düzenlenmesine neden olduğu gösterilmiştir (84, 194-199). Bu çalışmada, BDNF'nin NLRP3 inflamazom aktivasyonunun negatif düzenleyicisi olan otofaji üzerine etkisi *in vivo*

koşullarda incelendi. Bu bağlamda, otofajik aktiviteyi gösteren LC3B ve SQSTM1/p62 (western blot yöntemi ile) seviyeleri incelenmiştir. Çalışmamızda, NLRP3 inflamazom aktivasyonundan bağımsız olarak grupların hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas dokularında, BDNF eksikliği LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerini anlamlı olarak ($p<0.05$) azaltarak otofajinin bozulmasına yol açtığı gösterildi. Ek olarak, NLRP3 inflamazom aktivasyonu yapılan grupların hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas dokularında, LC3B ve SQSTM1/p62 protein seviyelerinin BDNF eksikliği ile anlamlı olarak ($p<0.05$) azaldığı belirlendi. Bu sonuçlara göre, BDNF'nin otofajiyi artırarak NLRP3 inflamazom aktivasyonunu hafiflettiği ortaya koyuldu (Tablo 18, Tablo 19, Tablo 20, Tablo 21, Tablo 22 ve Şekil 19, Şekil 20, Şekil 21, Şekil 22, Şekil 23).

ESCRT mekanizması, ESCRT-0, -I, -II ve -III, apoptoz bağlantılı gen-2 (ALG-2) ile etkileşen protein X (ALIX) ve VPS4A dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonel alt birimlerden oluşur (200). ESCRT-bağımlı membran onarımı, GSDMD'nin neden olduğu piroptozu negatif olarak düzenlemektedir (20). ESCRT-III-VPS4A sistemi, GSDMD-aracılı piroptotik plazma membranında por oluşumunu engeller ve NLRP3 inflamazom aktivasyonundan sonra IL-1 β ve IL-18 salgılanmasını negatif olarak düzenler. Böylece bu süreç piroptotik hücre ölümünü sınırlandırmaktadır (20, 21). Bu çalışmada, BDNF'nin GSDMD-aracılı piroptotik hücre ölümünün negatif düzenleyicisi olan ESCRT-III aracılı plazma membrane onarımı üzerine etkisi *in vivo* koşullarda incelendi. Bu bağlamda, plazma membran onarımını gösteren VPS4A (Western blot yöntemi ile) protein seviyeleri incelenmiştir. Çalışmamız NLRP3 inflamazom aktivasyonundan bağımsız olarak grupların hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas dokularında, BDNF eksikliği VPS4A protein seviyelerini anlamlı olarak ($p<0.05$) azaltarak plazma membran hasarını tolere edemediği gösterildi. Ayrıca, NLRP3 inflamazom aktivasyonu yapılan grupların hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas dokularında, VPS4A protein seviyelerinin BDNF eksikliği ile anlamlı olarak ($p<0.05$) azaldığı belirlendi. Bu sonuçlara göre, BDNF'nin ESCRT-III aracılı plazma membran onarımını aktive ederek NLRP3 inflamazom aktivasyonunu baskılamadaki rolünü doğrulamaktadır (Tablo 23, Tablo 24, Tablo 25, Tablo 26, Tablo 27 ve Şekil 24, Şekil 25, Şekil 26, Şekil 27, Şekil 28).



Şekil 29. BDNF eksikliği ve NLRP3 inflamazom aktivasyonu arasındaki ilişkinin şematik gösterimi

Bu çalışma ile, BDNF eksikliğinin inflamazom aktivasyonundan bağımsız olarak immün yanıtı artırabileceği gösterilmiştir. Aynı zamanda, NLRP3 inflamazom aktivasyonu ile, *Bdnf*^{+/-} farelerin NLRP3 inflamazom aktivasyonu artışına daha duyarlı olduğu gösterildi. Çalışmamızda elde edilen verilere dayanarak, *Bdnf*^{+/+} ve *Bdnf*^{+/-} farelerde oluşturduğumuz *in vivo* NLRP3 inflamazom aktivasyon modelinde, BDNF'nin, NF-κB inhibisyonu aracılığıyla NLRP3 inflamazom aktivasyonunu azalttığı ve piroptotik hücre ölümünü engellediği ortaya koyuldu. Ayrıca BDNF'nin NLRP3 inflamazom aktivasyonunu negatif düzenleyicileri olan otofajiyi, otofagozom oluşumunu ve ESCRT-III aracılı plazma membran onarımının aktivasyonunda önemli rolü olduğunu gösterdik. Hipokampus, korteks, karaciğer, epididimal yağ ve kas dokularında artan NLRP3 inflamazom aktivasyonuna karşı bu dokularda BDNF'nin doğuştan gelen immün yanıtı veya inflamasyona karşı koruyucu etkisinin olabileceği görüldü. Sonuç olarak *Bdnf*^{+/-} farelerde, LPS ve nigerisin ile uyarılan NLRP3 inflamazom aktivasyonunun ve GSDMD-aracılı

piroptotik hücre ölümünün ciddi anlamda arttığı gösterilmiştir. Bu durum, BDNF'nin aşırı inflamazom aktivasyonunu kontrol etmek için kullanılabilecek bir terapötik hedef olabilmesi noktasında umut vaat ettiğini göstermektedir.



6. KAYNAKLAR

1. Mayes-Hopfinger L, Enache A, Xie J, Huang CL, Köchl R, Tybulewicz VLJ, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2021). Chloride sensing by WNK1 regulates NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis. *Nat Commun* 12(1): 4546.
2. He H, Jiang H, Chen Y, Ye J, Wang A, Wang C, Liu Q, Liang G, Deng X, Jiang W, Zhou R (2018). Oridonin is a covalent NLRP3 inhibitor with strong anti-inflammasome activity. *Nat Commun* 9(1): 2550.
3. Wang Y, Pei S, Liu Z, Ding Y, Qian T, Wen H, Hsu SW, Zhou Z, Zhang J, Wang H (2023). IRAK-M suppresses the activation of microglial NLRP3 inflammasome and GSDMD-mediated pyroptosis through inhibiting IRAK1 phosphorylation during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Death Dis* 14(2): 103.
4. Lang T, Lee JPW, Elgass K, Pinar AA, Tate MD, Aitken EH, Fan H, Creed SJ, Deen NS, Traore DAK, Mueller I, Stanisic D, Baiwog FS, Skene C, Wilce MCJ, Mansell A, Morand EF, Harris J (2018). Macrophage migration inhibitory factor is required for NLRP3 inflammasome activation. *Nat Commun* 9(1): 2223.
5. Qiu Y, Huang Y, Chen M, Yang Y, Li X, Zhang W (2022). Mitochondrial DNA in NLRP3 inflammasome activation. *Int Immunopharmacol* 108: 108719.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Cui H, Banerjee S, Xie N, Dey T, Liu RM, Sanders YY, Liu G (2023). MafB regulates NLRP3 inflammasome activation by sustaining p62 expression in macrophages. *Commun Biol* 6(1): 1047.
10. dos Santos G, Rogel MR, Baker MA, Troken JR, Urich D, Morales-Nebreda L, Sennello JA, Kutuzov MA, Sitikov A, Davis JM, Lam AP, Cheres P, Kamp D, Shumaker DK, Budinger GR, Ridge KM (2015). Vimentin regulates activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Commun* 6: 6574.

11. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y (2019). The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci* 20(13): 3328.
12. Schroder K, Tschopp J (2010). The inflammasomes. *Cell* 140(6): 821-32.
13. Broz P, Pelegrín P, Shao F (2020). The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. *Nat Rev Immunol* 20(3): 143-157.
14. Gómez-Virgilio L, Silva-Lucero MD, Flores-Morelos DS, Gallardo-Nieto J, Lopez-Toledo G, Abarca-Fernandez AM, Zacapala-Gómez AE, Luna-Muñoz J, Montiel-Sosa F, Soto-Rojas LO, Pacheco-Herrero M, Cardenas-Aguayo MD (2022). Autophagy: A Key Regulator of Homeostasis and Disease: An Overview of Molecular Mechanisms and Modulators. *Cells* 11(15): 2262.
15. Biasizzo M, Kopitar-Jerala N (2020). Interplay Between NLRP3 Inflammasome and Autophagy. *Front Immunol* 11: 591803.
16. Harris J, Lang T, Thomas JPW, Sukkar MB, Nabar NR, Kehrl JH (2017). Autophagy and inflammasomes. *Mol Immunol* 86: 10-15.
17. Cao Z, Wang Y, Long Z, He G (2019). Interaction between autophagy and the NLRP3 inflammasome. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 51(11): 1087-1095.
18. Sun Q, Fan J, Billiar TR, Scott MJ (2017). Inflammasome and autophagy regulation - a two-way street. *Mol Med* 23: 188-195.
19. Yang Y, Wang M, Zhang YY, Zhao SZ, Gu S (2022). The endosomal sorting complex required for transport repairs the membrane to delay cell death. *Front Oncol* 12: 1007446.
20. Rühl S, Shkarina K, Demarco B, Heilig R, Santos JC, Broz P (2018). ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. *Science* 362(6417): 956-960.
21. Evavold CL, Kagan JC (2019). Defying Death: The (W)hole Truth about the Fate of GSDMD Pores. *Immunity* 50(1): 15-17.
22. Zheng D, Liwinski T, Elinav E (2020). Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell Discov* 6: 36.
23. 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.

24. Wang D, Zhang Y, Xu X, Wu J, Peng Y, Li J, Luo R, Huang L, Liu L, Yu S, Zhang N, Lu B, Zhao K (2021). YAP promotes the activation of NLRP3 inflammasome via blocking K27-linked polyubiquitination of NLRP3. *Nat Commun* 12(1): 2674.
25. Varghese N, Buergin D, Boonmann C, Stadler C, Schmid M, Eckert A, Unternaehrer E (2023). Interplay between stress, sleep, and BDNF in a high-risk sample of young adults. *Sci Rep* 13(1): 20524.
26. Shafiee A, Jafarabady K, Rafiei MA, Beiky M, Seighali N, Golpayegani G, Jalali M, Soltani Abhari F, Arabzadeh Bahri R, Safari O, Bakhtiyari M, Alirezaei A (2023). Effect of alcohol on Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) blood levels: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 13(1): 17554.
27. Fulgenzi G, Hong Z, Tomassoni-Ardori F, Barella LF, Becker J, Barrick C, Swing D, Yanpallewar S, Croix BS, Wess J, Gavrilova O, Tessarollo L (2020). Novel metabolic role for BDNF in pancreatic β -cell insulin secretion. *Nat Commun* 11(1): 1950.
28. Rodziewicz-Flis EA, Kawa M, Kaczor JJ, Szaro-Truchan M, Flis DJ, Lombardi G, Ziemann E (2023). Changes in selected exerkines concentration post folk-dance training are accompanied by glucose homeostasis and physical performance improvement in older adults. *Sci Rep* 13(1): 8596.
29. Ameroso D, Meng A, Chen S, Felsted J, Dulla CG, Rios M (2022). Astrocytic BDNF signaling within the ventromedial hypothalamus regulates energy homeostasis. *Nat Metab* 4(5): 627-643.
30. Podyma B, Parekh K, Güler AD, Deppmann CD (2021). Metabolic homeostasis via BDNF and its receptors. *Trends Endocrinol Metab* 32(7): 488-499.
31. Lima Giacobbo B, Doorduyn J, Klein HC, Dierckx RAJO, Bromberg E, de Vries EFJ (2019). Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. *Mol Neurobiol* 56(5): 3295-3312.
32. Jabbari M, Kheirouri S, Alizadeh M (2018). Decreased Serum Levels of Ghrelin and Brain-Derived Neurotrophic Factor in Premenopausal Women With Metabolic Syndrome. *Lab Med* 49(2): 140-146.
33. Marosi K, Mattson MP (2014). BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol Metab* 25: 89-98.
34. Rios M (2013). BDNF and the central control of feeding: accidental bystander or essential player? *Trends Neurosci* 36: 83-90.

35. Yap NY, Toh YL, Tan CJ, Acharya MM, Chan A (2021). Relationship between cytokines and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in trajectories of cancer-related cognitive impairment. *Cytokine* 144: 155556.
36. Caviedes A, Lafourcade C, Soto C, Wyneken U (2017). BDNF/NF- κ B Signaling in the Neurobiology of Depression. *Curr Pharm Des* 23(21): 3154-3163.
37. Papathanassoglou ED, Miltiadows P, Karanikola MN (2015). May BDNF Be Implicated in the Exercise-Mediated Regulation of Inflammation? Critical Review and Synthesis of Evidence. *Biol Res Nurs* 17(5): 521-39.
38. Mee-Inta O, Zhao ZW, Kuo YM (2019). Physical Exercise Inhibits Inflammation and Microglial Activation. *Cells* 8(7): 691.
39. Jiang Y, Wei N, Zhu J, Lu T, Chen Z, Xu G, Liu X (2010). Effects of brain-derived neurotrophic factor on local inflammation in experimental stroke of rat. *Mediators Inflamm* 2010: 372423.
40. 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): 417-26.
41. Sharma D, Kanneganti TD (2016). The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J Cell Biol* 213(6): 617-29.
42. Rathinam VA, Fitzgerald KA (2016). Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. *Cell* 165(4): 792-800.
43. Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J (2011). The inflammasome: an integrated view. *Immunol Rev* 243(1): 136-51.
44. 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.
45. 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.
46. Swanson KV, Deng M, Ting JP (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* 19(8): 477-489.
47. Aglietti RA, Dueber EC (2017). Recent Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Pyroptosis and Gasdermin Family Functions. *Trends Immunol* 38(4): 261-271.

48. Huang Y, Xu W, Zhou R (2021). NLRP3 inflammasome activation and cell death. *Cell Mol Immunol* 18(9): 2114-2127.
49. He Y, Hara H, Núñez G (2016). Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci* 41(12): 1012-1021.
50. 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.
51. 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.
52. Sharma BR, Kanneganti TD (2021). NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases. *Nat Immunol* 22(5): 550-559.
53. 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.
54. Broz P, Dixit VM (2016). Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol* 16(7): 407-20.
55. Otlu 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.
56. 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.
57. Elliott EI, Sutterwala FS (2015). Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. *Immunol Rev* 265(1): 35-52.
58. Zangiabadi S, Abdul-Sater AA (2022). Regulation of the NLRP3 Inflammasome by Posttranslational Modifications. *J Immunol* 208(2): 286-292.
59. Pelegrin P, Surprenant A (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X₇ receptor. *EMBO J* 25(21): 5071-5082.

60. Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez G (2013). K^+ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* 38(6): 1142-1153.
61. Murakami T, Ockinger J, Yu J, Byles V, McColl A, Hofer AM, Horng T (2012). Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(28): 11282-11287.
62. Venegas C, Heneka MT (2019). Inflammasome-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. *FASEB J* 33(12): 13075-13084.
63. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 9(8): 847-856.
64. Harapas CR, Idiatullina E, Al-Azab M, Hrovat-Schaale K, Reygaerts T, Steiner A, Laohamonthonkul P, Davidson S, Yu CH, Booty L, Masters SL (2022). Organellar homeostasis and innate immune sensing. *Nat Rev Immunol* 22(9): 535-549.
65. Iyer SS, He Q, Janczy JR, Elliott EI, Zhong Z, Olivier AK, Sadler JJ, Knepper-Adrian V, Han R, Qiao L, Eisenbarth SC, Nauseef WM, Cassel SL, Sutterwala FS (2013). Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity* 39(2): 311-323.
66. McKee CM, Coll RC (2020). NLRP3 inflammasome priming: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma. *J Leukoc Biol* 108(3): 937-952.
67. Kuang F, Liu J, Tang D, Kang R (2020). Oxidative Damage and Antioxidant Defense in Ferroptosis. *Front Cell Dev Biol* 8: 586578.
68. Schweichel JU, Merker HJ (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7(3): 253-266.
69. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 25(3): 486-541.
70. Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G (2019). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res* 29(5): 347-364.
71. Rashidi M, Wicks IP, Vince JE (2020). Inflammasomes and Cell Death: Common Pathways in Microparticle Diseases. *Trends Mol Med* 26(11): 1003-1020.

72. 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.
73. Yu P, Zhang X, Liu N, Tang L, Peng C, Chen X (2021). Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Signal Transduct Target Ther* 6(1): 128.
74. Aglietti RA, Dueber EC (2017). Recent Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Pyroptosis and Gasdermin Family Functions. *Trends Immunol* 38(4): 261-271.
75. Pandey A, Shen C, Feng S, Man SM (2021). Cell biology of inflammasome activation. *Trends Cell Biol* 31(11): 924-939.
76. 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.
77. Kovacs SB, Miao EA (2017). Gasdermins: Effectors of Pyroptosis. *Trends Cell Biol* 27(9): 673-684.
78. 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.
79. 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.
80. 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.
81. Alonso Y Adell M, Migliano SM, Teis D (2016). ESCRT-III and Vps4: a dynamic multipurpose tool for membrane budding and scission. *FEBS J* 283(18): 3288-3302.
82. Cooper ST, McNeil PL (2015). Membrane Repair: Mechanisms and Pathophysiology. *Physiol Rev* 95(4): 1205-1240.
83. Rühl S, Broz P (2022). Regulation of Lytic and Non-Lytic Functions of Gasdermin Pores. *J Mol Biol* 434(4): 167246.
84. Bak DH, Zhang E, Yi MH, Kim DK, Lim K, Kim JJ, Kim DW (2015). High ω 3-polyunsaturated fatty acids in fat-1 mice prevent streptozotocin-induced Purkinje cell degeneration through BDNF-mediated autophagy. *Sci Rep* 5: 15465.

85. Gritsenko A, Díaz-Pino R, López-Castejón G (2022). NLRP3 inflammasome triggers interleukin-37 release from human monocytes. *Eur J Immunol* 52(7): 1141-1157.
86. Rudloff I, Ung HK, Dowling JK, Mansell A, D'Andrea L, Ellisdon AM, Whisstock JC, Berger PJ, Nold-Petry CA, Nold MF (2020). Parsing the IL-37-Mediated Suppression of Inflammasome Function. *Cells* 9(1): 178.
87. Sun L, Yuan H, Zhao G (2022). IL-37 alleviates Coxsackievirus B3-induced viral myocarditis via inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis. *Sci Rep* 12(1): 20077.
88. Zhao M, Li Y, Guo C, Wang L, Chu H, Zhu F, Li Y, Wang X, Wang Q, Zhao W, Shi Y, Chen W, Zhang L (2018). IL-37 isoform D downregulates pro-inflammatory cytokines expression in a Smad3-dependent manner. *Cell Death Dis* 9(6): 582.
89. Labzin LI, Heneka MT, Latz E (2018). Innate Immunity and Neurodegeneration. *Annu Rev Med* 69: 437-449.
90. Moreno-García L, Miana-Mena FJ, Moreno-Martínez L, de la Torre M, Lunetta C, Tarlarini C, Zaragoza P, Calvo AC, Osta R (2021). Inflammasome in ALS Skeletal Muscle: NLRP3 as a Potential Biomarker. *Int J Mol Sci* 22(5): 2523.
91. Jo EK, Kim JK, Shin DM, Sasakawa C (2016). Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol* 13(2): 148-159.
92. Guo H, Callaway JB, Ting JP (2015). Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med* 21(7): 677-687.
93. Horng T, Hotamisligil GS (2011). Linking the inflammasome to obesity-related disease. *Nat Med* 17(2): 164-165.
94. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature* 481(7381): 278-286.
95. Legrand-Poels S, Esser N, L'homme L, Scheen A, Paquot N, Piette J (2014). Free fatty acids as modulators of the NLRP3 inflammasome in obesity/type 2 diabetes. *Biochem Pharmacol* 92(1): 131-141.
96. Eckold C, Kumar V, Weiner J, Alisjahbana B, Riza AL, Ronacher K, Coronel J, Kerry-Barnard S, Malherbe ST, Kleynhans L, Stanley K, Ruslami R, Ioana M, Ugarte-Gil C, Walzl G, van Crevel R, Wijmenga C, Critchley JA, Dockrell HM, Cliff JM; TANDEM consortium (2021). Impact of Intermediate Hyperglycemia and Diabetes on Immune Dysfunction in Tuberculosis. *Clin Infect Dis* 72(1): 69-78.

97. Donath MY, Dinarello CA, Mandrup-Poulsen T (2019). Targeting innate immune mediators in type 1 and type 2 diabetes. *Nat Rev Immunol* 19(12): 734-746.
98. Luo B, Huang F, Liu Y, Liang Y, Wei Z, Ke H, Zeng Z, Huang W, He Y (2017). NLRP3 Inflammasome as a Molecular Marker in Diabetic Cardiomyopathy. *Front Physiol* 8: 519.
99. Schroder K, Zhou R, Tschopp J (2010). The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science* 327(5963): 296-300.
100. Masters SL, Dunne A, Subramanian SL, Hull RL, Tannahill GM, Sharp FA, Becker C, Franchi L, Yoshihara E, Chen Z, Mullooly N, Mielke LA, Harris J, Coll RC, Mills KH, Mok KH, Newsholme P, Nuñez G, Yodoi J, Kahn SE, Lavelle EC, O'Neill LA (2010). Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes. *Nat Immunol* 11(10): 897-904.
101. Rossato M, Di Vincenzo A, Pagano C, El Hadi H, Vettor R (2020). The P2X7 Receptor and NLRP3 Axis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Brief Review. *Cells* 9(4): 1047.
102. Li R, Wang X, Qin T, Qu R, Ma S (2016). Apigenin ameliorates chronic mild stress-induced depressive behavior by inhibiting interleukin-1 β production and NLRP3 inflammasome activation in the rat brain. *Behav Brain Res* 296: 318-325.
103. Alcocer-Gómez E, de Miguel M, Casas-Barquero N, Núñez-Vasco J, Sánchez-Alcazar JA, Fernández-Rodríguez A, Cordero MD (2014). NLRP3 inflammasome is activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun* 36: 111-117.
104. 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.
105. 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.
106. 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.
107. 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.

108. 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.
109. 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.
110. 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, Kayed R, Golenbock DT, Blum D, Latz E, Buée L, Heneka MT (2019). NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology. *Nature* 575(7784): 669-673.
111. 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.
112. Notaras M, van den Buuse M (2019). Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF): Novel Insights into Regulation and Genetic Variation. *Neuroscientist* 25(5): 434-454.
113. Mitre M, Mariga A, Chao MV (2017). Neurotrophin signalling: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin Sci (Lond)* 131(1): 13-23.
114. Skaper SD (2012). The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol Biol* 846: 1-12.
115. Chaldakov GN, Tonchev AB, Aloe L (2009). NGF and BDNF: from nerves to adipose tissue, from neurokines to metabokines. *Riv Psichiatr* 44(2): 79-87.
116. Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J (2018). BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell Mol Neurobiol* 38(3): 579-593.

117. Palasz E, Wysocka A, Gasiorowska A, Chalimoniuk M, Niewiadomski W, Niewiadomska G (2020). BDNF as a Promising Therapeutic Agent in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* 21(3): 1170.
118. Raefsky SM, Mattson MP (2017). Adaptive responses of neuronal mitochondria to bioenergetic challenges: Roles in neuroplasticity and disease resistance. *Free Radic Biol Med* 102: 203-216.
119. Wurzelmann M, Romeika J, Sun D (2017). Therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and a small molecular mimics of BDNF for traumatic brain injury. *Neural Regen Res* 12(1): 7-12.
120. Khani-Habibabadi F, Askari S, Zahiri J, Javan M, Behmanesh M (2019). Novel BDNF-regulatory microRNAs in neurodegenerative disorders pathogenesis: An in silico study. *Comput Biol Chem* 83: 107153.
121. Rosas-Vargas H, Martinez-Ezquerro JD, Bienvenu T (2011). Brain-derived neurotrophic factor, food intake regulation and obesity. *Arch Med Res* 42: 482-494.
122. Ding H, Chen J, Su M, Lin Z, Zhan H, Yang F, Li W, Xie J, Huang Y, Liu X, Liu B, Zhou X (2020). BDNF promotes activation of astrocytes and microglia contributing to neuroinflammation and mechanical allodynia in cyclophosphamide-induced cystitis. *J Neuroinflammation* 17(1): 19.
123. Abidin İ, Aydin-Abidin S, Mittmann T (2019). Neuronal excitability and spontaneous synaptic transmission in the entorhinal cortex of BDNF heterozygous mice. *Neurosci Lett* 690: 69-75.
124. Abidin I, Köhler T, Weiler E, Zoidl G, Eysel UT, Lessmann V, Mittmann T (2006). Reduced presynaptic efficiency of excitatory synaptic transmission impairs LTP in the visual cortex of BDNF-heterozygous mice. *Eur J Neurosci* 24(12): 3519-3531.
125. Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T (1995). Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(19): 8856-8860.
126. Nguyen VT, Hill B, Sims N, Heck A, Negron M, Lusk C, Galindo CL (2023). Brain-derived neurotrophic factor rs6265 (Val66Met) single nucleotide polymorphism as a master modifier of human pathophysiology. *Neural Regen Res* 18(1): 102-106.
127. Xu B, Xie X (2016). Neurotrophic factor control of satiety and body weight. *Nat Rev Neurosci* 17(5): 282-92.

128. Lebrun B, Bariohay B, Moyse E, Jean A (2006). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and food intake regulation: a minireview. *Auton Neurosci* 126-127: 30-38.
129. Motamedi S, Karimi I, Jafari F (2017). The interrelationship of metabolic syndrome and neurodegenerative diseases with focus on brain-derived neurotrophic factor (BDNF): Kill two birds with one stone. *Metab Brain Dis* 32(3): 651-665.
130. Zhang JC, Yao W, Hashimoto K (2016). Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)-TrkB Signaling in Inflammation-related Depression and Potential Therapeutic Targets. *Curr Neuropharmacol* 14(7): 721-731.
131. Jiao SS, Shen LL, Zhu C, Bu XL, Liu YH, Liu CH, Yao XQ, Zhang LL, Zhou HD, Walker DG, Tan J, Götz J, Zhou XF, Wang YJ (2016). Brain-derived neurotrophic factor protects against tau-related neurodegeneration of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry* 6(10): e907.
132. Smith PA (2014). BDNF: no gain without pain? *Neuroscience* 283: 107-123.
133. Rupérez AI, Gil A, Aguilera CM (2014). Genetics of oxidative stress in obesity. *Int J Mol Sci* 15(2): 3118-3144.
134. Lindholm D, Dechant G, Heisenberg CP, Thoenen H (1993). Brain-derived neurotrophic factor is a survival factor for cultured rat cerebellar granule neurons and protects them against glutamate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 5(11): 1455-1464.
135. Agrawal R, Kalmady SV, Venkatasubramanian G (2017). In SilicoModel-driven Assessment of the Effects of Brain-derived Neurotrophic Factor Deficiency on Glutamate and Gamma-Aminobutyric Acid: Implications for Understanding Schizophrenia Pathophysiology. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 15(2): 115-125.
136. Parikh V, Naughton SX, Yegla B, Guzman DM (2016). Impact of partial dopamine depletion on cognitive flexibility in BDNF heterozygous mice. *Psychopharmacology (Berl)* 233(8): 1361-1375.
137. Dai M, Xia XB, Xiong SQ (2012). BDNF regulates GLAST and glutamine synthetase in mouse retinal Müller cells. *J Cell Physiol* 227(2): 596-603.
138. Ishii T, Warabi E, Mann GE (2019). Circadian control of BDNF-mediated Nrf2 activation in astrocytes protects dopaminergic neurons from ferroptosis. *Free Radic Biol Med* 133: 169-178.

139. Azman KF, Zakaria R (2022). Recent Advances on the Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* 23(12): 6827.
140. Ahmed S, Kwatra M, Gawali B, Panda SR, Naidu VGM (2020). Potential role of TrkB agonist in neuronal survival by promoting CREB/BDNF and PI3K/Akt signaling in vitro and in vivo model of 3-nitropropionic acid (3-NP)-induced neuronal death. *Apoptosis* 26(1-2): 52-70.
141. Zhang L, Fang Y, Lian Y, Chen Y, Wu T, Zheng Y, Zong H, Sun L, Zhang R, Wang Z, Xu Y (2015). Brain-derived neurotrophic factor ameliorates learning deficits in a rat model of Alzheimer's disease induced by $\alpha\beta 1-42$. *PLoS One* 10(4): e0122415.
142. Arancibia S, Silhol M, Moulière F, Meffre J, Höllinger I, Maurice T, Tapia-Arancibia L (2008). Protective effect of BDNF against beta-amyloid induced neurotoxicity in vitro and in vivo in rats. *Neurobiol Dis* 31(3): 316-326.
143. Nagahara AH, Mateling M, Kovacs I, Wang L, Eggert S, Rockenstein E, Koo EH, Masliah E, Tuszynski MH (2013). Early BDNF treatment ameliorates cell loss in the entorhinal cortex of APP transgenic mice. *J Neurosci* 33(39): 15596-15602
144. Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao MV, Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski MH (2009). Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med* 15(3): 331-337.
145. Kozlov EM, Grechko AV, Chegodaev YS, Wu WK, Orekhov AN (2020). Contribution of Neurotrophins to the Immune System Regulation and Possible Connection to Alcohol Addiction. *Biology (Basel)* 9(4): 63.
146. Guzzardi MA, Sanguinetti E, Bartoli A, Kemeny A, Panetta D, Salvadori PA, Burchielli S, Iozzo P (2018). Elevated glycemia and brain glucose utilization predict BDNF lowering since early life. *J Cereb Blood Flow Metab* 38(3): 447-455.
147. Jo YH, Chua SC Jr (2013). The brain-liver connection between BDNF and glucose control. *Diabetes* 62(5): 1367-1368.
148. Yamanaka M, Itakura Y, Tsuchida A, Nakagawa T, Taiji M (2008). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) prevents the development of diabetes in prediabetic mice. *Biomed Res* 29(3): 147-153.

149. Yamanaka M, Tsuchida A, Nakagawa T, Nonomura T, Ono-Kishino M, Sugaru E, Noguchi H, Taiji M (2007). Brain-derived neurotrophic factor enhances glucose utilization in peripheral tissues of diabetic mice. *Diabetes Obes Metab* 9(1): 59-64.
150. Nakagawa T, Tsuchida A, Itakura Y, Nonomura T, Ono M, Hirota F, Inoue T, Nakayama C, Taiji M, Noguchi H (2000). Brain-derived neurotrophic factor regulates glucose metabolism by modulating energy balance in diabetic mice. *Diabetes* 49(3): 436-444.
151. Rozanska O, Uruska A, Zozulinska-Ziolkiewicz D (2020). Brain-Derived Neurotrophic Factor and Diabetes. *Int J Mol Sci* 21(3): 841.
152. Parrott JM, Porter GA, Redus L, O'Connor JC (2021). Brain derived neurotrophic factor deficiency exacerbates inflammation-induced anhedonia in mice. *Psychoneuroendocrinology* 134: 105404.
153. Di Rosa MC, Zimbone S, Saab MW, Tomasello MF. (2021) The Pleiotropic Potential of BDNF beyond Neurons: Implication for a Healthy Mind in a Healthy Body. *Life (Basel)* 11(11): 1256.
154. Wang J, Zhao X, He M (2012). Is BDNF biological link between depression and type 2 diabetes mellitus? *Med Hypotheses* 79(2): 255-258.
155. Jiang Y, Wei N, Lu T, Zhu J, Xu G, Liu X (2011). Intranasal brain-derived neurotrophic factor protects brain from ischemic insult via modulating local inflammation in rats. *Neuroscience* 172: 398-405.
156. Makar TK, Trisler D, Sura KT, Sultana S, Patel N, Bever CT (2008). Brain derived neurotrophic factor treatment reduces inflammation and apoptosis in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 270(1-2): 70-76.
157. Bovolenta R, Zucchini S, Paradiso B, Rodi D, Merigo F, Navarro Mora G, Osculati F, Berto E, Marconi P, Marzola A, Fabene PF, Simonato M (2010). Hippocampal FGF-2 and BDNF overexpression attenuates epileptogenesis-associated neuroinflammation and reduces spontaneous recurrent seizures. *J Neuroinflammation* 7: 81.
158. Bodur A, İnce İ, Kahraman C, Abidin İ, Aydın-Abidin S, Alver A (2019). Effect of a high sucrose and high fat diet in BDNF (+/-) mice on oxidative stress markers in adipose tissues. *Arch Biochem Biophys* 665: 46-56.

159. Lee IT, Sheu WH (2018). Serum Renalase Levels Are Predicted by Brain-Derived Neurotrophic Factor and Associated with Cardiovascular Events and Mortality after Percutaneous Coronary Intervention. *J Clin Med* 7(11): 437.
160. Bahls M, Könemann S, Markus MRP, Wenzel K, Friedrich N, Nauck M, Völzke H, Steveling A, Janowitz D, Grabe HJ, Felix SB, Dörr M (2019). Brain-derived neurotrophic factor is related with adverse cardiac remodeling and high NTproBNP. *Sci Rep* 9(1): 15421.
161. Noren Hooten N, Ejiogu N, Zonderman AB, Evans MK (2015). Protective Effects of BDNF against C-Reactive Protein-Induced Inflammation in Women. *Mediators Inflamm* 2015: 516783.
162. Xu D, Lian D, Wu J, Liu Y, Zhu M, Sun J, He D, Li L (2017). Brain-derived neurotrophic factor reduces inflammation and hippocampal apoptosis in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *J Neuroinflammation* 14(1): 156.
163. 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.
164. Kurien BT, Scofield RH (2015). Western blotting: Methods and protocols. *Methods in Molecular Biology*. Springer Science+Business Media, New York, Sayfa: 17-19.
165. 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.
166. Tarakcioglu E, Tastan B, Ariozi BI, Tufekci KU, Genc S (2022). Melatonin Alters the miRNA Transcriptome of Inflammasome Activation in Murine Microglial Cells. *Neurochem Res* 47(10): 3202-3211.
167. Tastan B, Ariozi 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.
168. Ariozi 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.

169. Lenkiewicz AM, Adamiak M, Thapa A, Bujko K, Pedziwiatr D, Abdel-Latif AK, Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ (2019). The Nlrp3 Inflammasome Orchestrates Mobilization of Bone Marrow-Residing Stem Cells into Peripheral Blood. *Stem Cell Rev Rep* 15(3): 391-403.
170. Welinder C, Ekblad L (2011). Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *J Proteome Res* 10(3): 1416-1419.
171. Signore M, Reeder KA (2012). Antibody validation by Western blotting. *Methods Mol Biol* 823: 139-55.
172. Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
173. Vande Walle L, Lamkanfi M (2024). Drugging the NLRP3 inflammasome: from signalling mechanisms to therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 23(1): 43-66.
174. Wang X, Wang Y, Antony V, Sun H, Liang G (2020). Metabolism-Associated Molecular Patterns (MAMPs). *Trends Endocrinol Metab* 31(10): 712-724.
175. Heneka MT, Kummer MP, Latz E (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol* 14(7): 463-477.
176. Huang Y, Zhou R (2023). Cytosolic transfer of circulating LPS by EVs. *Nat Cell Biol* 25(12): 1729-1731.
177. Pruenster M, Immler R, Roth J, Kuchler T, Bromberger T, Napoli M, Nussbaumer K, Rohwedder I, Wackerbarth LM, Piantoni C, Hennis K, Fink D, Kallabis S, Schroll T, Masgrau-Alsina S, Budke A, Liu W, Vestweber D, Wahl-Schott C, Roth J, Meissner F, Moser M, Vogl T, Hornung V, Broz P, Sperandio M (2023). E-selectin-mediated rapid NLRP3 inflammasome activation regulates S100A8/S100A9 release from neutrophils via transient gasdermin D pore formation. *Nat Immunol* 24(12): 2021-2031.
178. 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.
179. Jin J, Yu Q, Han C, Hu X, Xu S, Wang Q, Wang J, Li N, Cao X (2013). LRRFIP2 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation in macrophages by promoting Flightless-I-mediated caspase-1 inhibition. *Nat Commun* 4: 2075.

180. Vande Walle L, Van Opdenbosch N, Jacques P, Fossoul A, Verheugen E, Vogel P, Beyaert R, Elewaut D, Kanneganti TD, van Loo G, Lamkanfi M (2014). Negative regulation of the NLRP3 inflammasome by A20 protects against arthritis. *Nature* 512(7512): 69-73.
181. Yang CS, Kim JJ, Kim TS, Lee PY, Kim SY, Lee HM, Shin DM, Nguyen LT, Lee MS, Jin HS, Kim KK, Lee CH, Kim MH, Park SG, Kim JM, Choi HS, Jo EK (2015). Small heterodimer partner interacts with NLRP3 and negatively regulates activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Commun* 6: 6115.
182. Huai W, Zhao R, Song H, Zhao J, Zhang L, Zhang L, Gao C, Han L, Zhao W (2014). Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates NLRP3 inflammasome activity by inhibiting NLRP3 transcription. *Nat Commun* 5: 4738.
183. Lordén G, Sanjuán-García I, de Pablo N, Meana C, Alvarez-Miguel I, Pérez-García MT, Pelegrín P, Balsinde J, Balboa MA (2017). Lipin-2 regulates NLRP3 inflammasome by affecting P2X7 receptor activation. *J Exp Med* 214(2): 511-528.
184. Qin Q, Liu H, Shou J, Jiang Y, Yu H, Wang X (2021). The inhibitor effect of RKIP on inflammasome activation and inflammasome-dependent diseases. *Cell Mol Immunol* 18(4): 992-1004.
185. Iu ECY, Chan CB (2022). Is Brain-Derived Neurotrophic Factor a Metabolic Hormone in Peripheral Tissues? *Biology (Basel)* 11(7): 1063.
186. Chen N, Zhao M, Guo Y, Wu N, Cao B, Zhan B, Zhou T, Li Y, Zhu F, Chen W, Li Y, Zhang L (2023). D-mannose is a rapid inducer of ACSS2 to trigger rapid and long-lasting antidepressant responses through augmenting BDNF and TPH2 levels. *Transl Psychiatry* 13(1): 338.
187. Wang ZH, Xiang J, Liu X, Yu SP, Manfredsson FP, Sandoval IM, Wu S, Wang JZ, Ye K (2019). Deficiency in BDNF/TrkB Neurotrophic Activity Stimulates δ -Secretase by Upregulating C/EBP β in Alzheimer's Disease. *Cell Rep* 28(3): 655-669.e5.
188. Toldo S, Abbate A (2023). The role of the NLRP3 inflammasome and pyroptosis in cardiovascular diseases. *Nat Rev Cardiol*. Epub ahead of print.
189. 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.

190. Jin H, Zhu Y, Wang XD, Luo EF, Li YP, Wang BL, Chen YF (2021). BDNF corrects NLRP3 inflammasome-induced pyroptosis and glucose metabolism reprogramming through KLF2/HK1 pathway in vascular endothelial cells. *Cell Signal* 78: 109843.
191. Li XL, Liu H, Liu SH, Cheng Y, Xie GJ (2022). Intranasal Administration of Brain-Derived Neurotrophic Factor Rescues Depressive-Like Phenotypes in Chronic Unpredictable Mild Stress Mice. *Neuropsychiatr Dis Treat* 18: 1885-1894.
192. Kim JS, Bae GE, Kim KH, Lee SI, Chung C, Lee D, Lee TH, Kwon IS, Yeo MK (2019). Prognostic Significance of LC3B and p62/SQSTM1 Expression in Gastric Adenocarcinoma. *Anticancer Res* 39(12): 6711-6722.
193. Cadwell K (2016). Crosstalk between autophagy and inflammatory signalling pathways: balancing defence and homeostasis. *Nat Rev Immunol* 16(11): 661-675.
194. Chen A, Xiong LJ, Tong Y, Mao M (2013). Neuroprotective effect of brain-derived neurotrophic factor mediated by autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Mol Med Rep* 8(4): 1011-1016.
195. Gao LL, Wang ZH, Mu YH, Liu ZL, Pang L (2022). Emodin Promotes Autophagy and Prevents Apoptosis in Sepsis-Associated Encephalopathy through Activating BDNF/TrkB Signaling. *Pathobiology* 89(3): 135-145.
196. Tomoda T, Sumitomo A, Shukla R, Hirota-Tsuyada Y, Miyachi H, Oh H, French L, Sibille E (2022). BDNF controls GABAAR trafficking and related cognitive processes via autophagic regulation of p62. *Neuropsychopharmacology* 47(2): 553-563.
197. Smith ED, Prieto GA, Tong L, Sears-Kraxberger I, Rice JD, Steward O, Cotman CW (2014). Rapamycin and interleukin-1 β impair brain-derived neurotrophic factor-dependent neuron survival by modulating autophagy. *J Biol Chem* 289(30): 20615-20629.
198. Jin H, Zhu Y, Li Y, Ding X, Ma W, Han X, Wang B (2019). BDNF-mediated mitophagy alleviates high-glucose-induced brain microvascular endothelial cell injury. *Apoptosis* 24(5-6): 511-528.
199. Liu HY, Wei HJ, Wu L, Liu SM, Tang YY, Zou W, Wang CY, Zhang P, Tang XQ (2020). BDNF-TrkB pathway mediates antidepressant-like roles of H₂S in diabetic rats via promoting hippocampal autophagy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 47(2): 302-312.

200. Yang Y, Chen HL, Wu SF, Bao W (2023). CHMP4B and VSP4A reverse GSDMD-mediated pyroptosis by cell membrane remodeling in endometrial carcinoma. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1868(1): 130497.





EKLER

YAYINLAR

1. Sahin E, Saglam N, **Erdem Ş**, Alvuroglu E, Abidin I, Yulug E, Alver A (2022). 7,8-Dihydroxyflavone alleviates Endoplasmic Reticulum Stress in cafeteria diet-induced metabolic syndrome. *Life Sci* 306: 120781.
2. 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.
3. Paslı S, Aşık O, İmamoğlu M, Çiçek M, Yadigaroglu M, **Doğramacı Ş**, Menteşe A, Şahin M, Tatlı Ö (2020). The Value of Cardiotrophin-1 in the Diagnosis, Severity, and Prognosis of Pulmonary Embolism. *Eurasian J Emerg Med* 19(2): 71-77.
4. Tatlı O, Yadigaroglu M, Demir S, **Doğramacı Ş**, Cicek M, Imamoglu M, Pasli S, Ardic S, Mentese A, Turedi S (2020). The value of glial fibrillary acidic protein levels in the diagnosis and prognosis of subarachnoid hemorrhage. *Hong Kong Journal of Emergency Medicine*: 1-10.
5. Mentese A, **Doğramacı Ş**, 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.
6. Ardic S, Yilmaz S, Demir S, **Doğramacı Ş**, Altuntas G, Imamoglu M, Mentese A, Turedi S (2019). Endoplasmic reticulum stress markers are of no value in predicting cardiopulmonary resuscitation success and survival in out-of hospital cardiac arrest: A nested case-control study. *Turk J Emerg Med* 19(2): 58-63.
7. Gunaydin M, Ozer V, Kalkan A, Ozer S, Sahin A, Sahin M, Karahan SC, **Doğramacı Ş**, Tatlı O, Gunduz A (2018). The diagnostic value of the serum irisin level in patients with acute pericarditis and acute myopericarditis. *Bratisl Lek Listy* 119(10): 655-659.
8. Menteşe A, Erkut N, Demir S, Özer Yaman S, Sümer A, **Doğramacı Ş**, Alver A, Sönmez M (2017). Autoantibodies Against Carbonic Anhydrase I and II in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Turk J Haematol* 34(4): 307-313.

BİLDİRİLER

1. Şahin E, Sağlam N, **Doğramacı Ş**, Alver A (2020). 7,8-Dihydroxyflavone (7,8-DHF), a TrkB Agonist, Reduces Oxidative Stress in the Liver of Old Mice. 31. National Biochemistry Congress, Gaziantep, Turkey, 18 - 20 December, 2020, ss.1-2

2. Erdem M, **Doğramacı Ş**, 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.
3. **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
4. Yadigaroglu M, Tatlı Ö, Demir S, **Doğramacı Ş**, Çiçek M, Imamoglu M, vd. (2018). The Role of GFAP (Glial Fibrillar Acidic Protein) Level in Diagnosis and Prognosis in Patients with Suspected Subarachnoid Hemorrhage. 6th Eurasian Congress of Emergency Medicine & 14th Turkish Emergency Medicine Congress, Antalya, Turkey, 8-11 November 2018
5. Ardiç Ş, Yılmaz S, Demir S, Gönenç Çekiç Ö, **Doğramacı Ş**, Altuntaş G, vd. (2018). Endoplasmic stress markers (PERK, GRP78 and CHOP) are of no value in predicting cardiopulmonary resuscitation success and survival in out-of hospital cardiac arrest: An observational cohort study. 6th Eurasian Congress of Emergency Medicine & 14th Turkish Emergency Medicine Congress, Antalya, Turkey, 8-11 November 2018
6. **Doğramacı Ş**, Mentese 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.
7. Mentese A, Erkut N, **Doğramacı Ş**, Yaman SO, Demir S, Alver A, Sonmez M (2016). Anti- Carbonic Anhydrase Antibodies in Patients with Acute Myeloid Leukemia. 41st FEBS Congress, Ephesus / Kuşadası, Turkey, Aydın, Türkiye, 3- 8 Eylül 2016, 295
8. 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.
9. Demir S, Mentese 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. Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Incentive Prize, 2024
2. Yayın Teşvik Ödülü, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), 2023
3. Yayın Teşvik Ödülü, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), 2019
4. 43. FEBS Kongresi, Katılım-Konaklama-Seyahat Bursu, Prag, Çek Cumhuriyeti, Temmuz 2018

HOBİLER

1. Kitap okumak
2. Müzik dinlemek
3. Spor yapmak
4. Gezmek