

**MONOSODYUM ÜRAT KRİSTALLERİ İLE
İNDÜKLENEN İNFLAMASYON KO-KÜLTÜR
MODELİNDE, ENDOTEL HÜCRELERİ
ÜZERİNDE BORTEZOMİBİN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Ayşe ÜNLÜ KÖSE

Eskişehir 2024

**MONOSODYUM ÜRAT KRİSTALLERİ İLE İNDÜKLENEN İNFLAMASYON
KO-KÜLTÜR MODELİNDE, ENDOTEL HÜCRELERİ ÜZERİNDE
BORTEZOMİBİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ayşe ÜNLÜ KÖSE

DOKTORA TEZİ

Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ocak 2024

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ayşe ÜNLÜ KÖSE'nin "Monosodyum urat kristalleri ile indüklenen inflamasyon ko-kültür modelinde, endotel hücreleri üzerinde Bortezomib'in etkilerinin araştırılması" başlıklı tezi 22/01/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakoloji Anabilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Miriş DİKMEN
Üye	: Prof. Dr. Rana ARSLAN
Üye	: Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK
Üye	: Doç. Dr. Semra YİĞİTASLAN
Üye	: Doç. Dr. Gözde AYDOĞAN KILIÇ

Prof. Dr. Saime ÖNCE
Anadolu Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

MONOSODYUM ÜRAT KRİSTALLERİ İLE İNDÜKLENEN İNFLAMASYON KO-KÜLTÜR MODELİNDE, ENDOTEL HÜCRELERİ ÜZERİNDE BORTEZOMİBİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşe ÜNLÜ KÖSE

Farmakoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ocak 2024

Danışman: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Gut, monosodyum urat (MSU) kristallerinin eklem ve çevresindeki yapılar içinde birikmesine yanıt olarak inflamasyon ile karakterize olan metabolik bir hastalıktır.

Tez çalışmasında NF- κ B inhibitörlerinden bortezomibin MSU kristalleri ile indüklenen inflamatuvar yanıt üzerindeki etkisi incelenmiştir. HUVEC ve THP-1 hücreleri kullanılarak *in vitro* gut ko-kültür modeli oluşturularak bortezomibin endotel hücrelerindeki hücre proliferasyonu ve migrasyonuna etkisi, apoptotik etkisi ve inflamasyondaki etkisi araştırılmıştır. Bortezomib ve MSU'nun, hücre canlılığına etkileri THP-1 ve HUVEC hücrelerinde MTT yöntemi ile gerçek zamanlı analiz sisteminde de ko-kültür ortamında HUVEC hücre proliferasyonuna etkileri araştırılmıştır. Bortezomibin endotel hücrelerindeki migrasyona etkisi gerçek zamanlı analiz sistemi ve çizik deneyi ile belirlenmiştir. Ko-kültür inflamasyon ortamında, bortezomibin HUVEC hücrelerinde apoptotik etkisi, kaspaz-3 aktivitesi ve mitokondriyal membran bütünlüğü ile NLRP3 inflamazomla ilişkili TNF- α ve IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 sitokin miktarları akış sitometrisinde analiz edilmiştir.

Sonuç olarak bortezomibin MSU kaynaklı inflamasyonda konsantrasyona bağlı olarak antiinflamatuvar etkileri belirlenmiştir. HUVEC hücre proliferasyonunun bortezomib konsantrasyon artışına bağlı olarak azaldığı görülmüş ve 24. saatteki IC₅₀ değeri 0.127 μ M olarak hesaplanmıştır. Bortezomib *in vitro* gut modelinde apoptotik etkiyi ve kaspaz 3 aktivasyonunu artırmıştır. Özellikle bortezomib konsantrasyonuna bağlı olarak TNF- α , IL-6, IL-8 düzeylerinde azalma ve IL-10'da artış görülmüştür. Elde edilen sonuçlar ışığında gut gibi inflamatuvar hastalıkların tedavisinde bortezomibin terapötik bir madde olarak potansiyel kullanımının literatüre ön veriler kazandıracağını ve klinik ilaç tedavisinde alternatif bir bakış açısı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Bortezomib, HUVEC, THP-1, MSU, İnflamasyon.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE BORTEZOMIB EFFECTS ON ENDOTHELIAL CELLS IN THE INFLAMMATORY CO-CULTURE MODEL INDUCED BY MONOSODIUM URATE CRYSTALS

Ayşe ÜNLÜ KÖSE

Department of Pharmacology

Anadolu University, Institution of Graduate School, January, 2024

Supervisor: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Gout is a metabolic disease characterised by inflammation in response to the deposition of monosodium urate (MSU) crystals in joints and surrounding structures.

In this thesis, the effect of bortezomib, one of the NF- κ B inhibitors, on the inflammatory response induced by MSU crystals was investigated. The effect of bortezomib on cell proliferation and migration, apoptotic effect and effect on inflammation in endothelial cells was investigated by creating an *in vitro* gout co-culture model using HUVEC and THP-1 cells. The effects of bortezomib and MSU on cell viability were investigated by MTT method in THP-1 and HUVEC cells and the effect in HUVEC cell proliferation in co-culture medium in real-time analysis system. The migration effect of bortezomib on endothelial cells was determined by real-time analysis system and scratch assay. In co-culture inflammation medium, the apoptotic effect of bortezomib on HUVEC cells, caspase-3 activity and mitochondrial membrane integrity, and the amounts of NLRP3 inflammasome-associated TNF- α and IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 cytokines were analyzed by flow cytometry.

As a result, concentration-dependent anti-inflammatory effects of bortezomib were determined in MSU-induced inflammation. It was observed that HUVEC cell proliferation decreased depending on the bortezomib concentration increase and IC₅₀ value at 24th hour was calculated as 0.127 μ M. Bortezomib increased apoptotic effect and caspase-3 activation *in vitro* gout model. In particular, TNF- α , IL-6, IL-8 levels decreased and IL-10 level increased depending on the concentration of bortezomib. In the light of the results obtained, we think that the potential use of bortezomib as a therapeutic agent in the treatment of inflammatory diseases such as gout will provide preliminary data to the literature and provide an alternative perspective in clinical drug therapy.

Keywords: Bortezomib, HUVEC, THP-1, MSU, Inflammation.

TEŞEKKÜR

Yoğun bir emek, ciddi bir sabır, çokça fedakarlık ve yüksek kararlılık isteyen zorlu doktora sürecimin; bilimsel olgunlaşmamı sağlaması, yaşama bakış açımı geliştirmesi ve bana kattığı birçok olumlu yönü ile hayatıma farklı bir dokunuş getirmesinin yanı sıra tüm zorluklara ve yoruculuklarına rağmen bitirebilmek oldukça gurur verici.

Doktora süreci ile tanıştığım, tezimi yönlendiren ve gerçekleşmesi için bilgi ve deneyimlerini hiç esirgemeyen, her zaman arkamda desteğini hissettiğim, en çok ihtiyaç duyduğum zamanlarda cesaret veren, fikirlerine her zaman önem verdiğim, hem akademik yönünü hem de kişiliğini örnek aldığım ve hayranlıkla izlediğim, en önemlisi de manevi varlığı ile hocadan öte ablalığımı hissettiğim kıymetli danışman hocam sayın Prof. Dr. Miriş DİKMEN'e;

Sitokin analizleri başta olmak üzere laboratuvar çalışmalarında ve tezimle ilgili konularda bilgi ve tecrübeleriyle maddi ve manevi destek olan, samimi ve destekleyici yaklaşımıyla yanımda hissettiğim değerli hocam sayın Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK'e;

Derslerini severek dinlediğim, tezimin şekillenmesinde emeği olan kıymetli hocam Prof. Dr. Rana ARSLAN'a ve Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nın tüm saygıdeğer üyelerine;

Bu zorlu süreçte laboratuvar ve tez aşamalarımızda birlikte olup birbirimizi motive ettiğimiz canım yol arkadaşım Ecz. Züleyha BARAN'a; laboratuvarında yardımlarını esirgemeyen sevgili Farmasötik Mikrobiyoloji lisansüstü öğrencilerine;

Hayatımın tüm aşamasında sonsuz sevgi ve fedakârlıklarıyla her zaman destek olan, bugünlere gelmemde emekleri çok büyük olan, hep arkamda olduklarını bildiğim, asla haklarını ödeyemeyeceğim, ideallerime inanan ve ulaşmamda bilhassa manevi desteklerini esirgemeyen, umudumu kaybetmeden devam etmem için motivasyonumu sağlayan, varlıklarıyla güç bulduğum canım ailem Hatime ve Ahmet ÜNLÜ'ye; her zaman destekçim olan sevgili kardeşim Uzm. Dr. Nazmi ÜNLÜ'ye;

Anlayışı ve sabrıyla bu zorlu süreçte yanımda olan sevgili eşim Ecz. Muhammet Halim KÖSE'ye ve sonsuz sevgiyle bağlı olduğum, hayatlarının en güzel yıllarını tez sürecimle paylaşan, en zor zamanlarımda bile yüzümü güldüren, küçücük yaşlarına rağmen oldukça anlayışlı olan, stresli zamanlarımda en büyük güç ve motivasyon kaynağım biricik kızım Melisa Sare'ye ve canım oğlum Ömer Asaf'a;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Ayşe ÜNLÜ KÖSE

İÇİNDEKİLER

Sayfa

DOKTORA TEZİ	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
GİRİŞ	1

BİRİNCİ BÖLÜM

1. GENEL BİLGİLER.....	5
1.1. Gut Hastalığı.....	5
1.1.1. Akut gut artriti	8
1.1.2. Kronik (İleri) gut artriti.....	8
1.1.3. Gut tedavisi	9
1.1.4. Gut ile ilişkili faktörler	11
1.1.5. Gut ve inflamasyon.....	12
1.2. Monosodyum Ürat Kristalleri.....	19
1.2.1. Monosodyum ürat kristallerinin gut oluşumundaki rolü.....	20
1.3. Proteazom İnhibitörü “Bortezomib”	23

İKİNCİ BÖLÜM

2. GEREÇLER	28
2.1. Kullanılan Malzemeler	28

2.2. Kullanılan Cihazlar.....	29
-------------------------------	----

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. YÖNTEMLER	31
3.1. Kullanılan Hücre Hatları	31
3.2. Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu.....	31
3.3. Monosodyum Ürat Kristalleri.....	31
3.4. Bortezomib.....	32
3.5. THP-1 İnsan Monositik Hücrelerinin Çoğaltılması.....	32
3.6. HUVEC -İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücrelerinin Çoğaltılması	32
3.7. Hücrelerin Mikroskopik Ortamda İncelenmesi.....	33
3.8. Hücrelerin Cedex Cihazında Sayımı	33
3.9. THP-1 ve HUVEC Hücrelerinde MTT Yöntemi İle Sitotoksisite Deneyleri.....	34
3.10. THP-1 Hücrelerinde MSU Kristalleri Aracılı İnflamatuar Etkinin Belirlenmesi.....	36
3.11. Xcelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA DP) Ko-Kültür Ortamında Hücre Proliferasyon Deneyi	37
3.12. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA DP) Migrasyon Deneyi	39
3.13. İnflamasyon Ortamında HUVEC Hücrelerinde Çizik (Yara İyileşme) Deneyi.....	42
3.14. Akış Sitometride Annexin V-PI Yöntemi ile Apoptotik Etkinin Belirlenmesi.....	43
3.15. Akış Sitometride Kaspaz-3 Aktivasyonunun Belirlenmesi.....	46
3.16. Akış Sitometride JC-1 Boyama Yöntemi İle Mitokondrial Membran Bütünlüğünün Belirlenmesi.....	47
3.17. Akış Sitometride Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi	47

3.17.1. İnterlökin 1-beta (IL-1 β) sitokin analizi.....	48
3.17.2. TNF- α , IL-6, IL-8 ve IL-10 sitokin analizleri.....	48
3.18. İstatistiksel Değerlendirmeler	49

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

4. BULGULAR VE YORUM.....	50
4.1. THP-1 ve HUVEC Hücrelerinde Bortezomib ve MSU Konsantrasyonlarının Sitotoksik Etkileri	50
4.2. THP-1 Hücrelerinde MSU Kristalleri Aracılı İnflamatuar Etkinin Belirlenmesi.....	54
4.3. Ko-kültür ortamında xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi	56
4.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde Bortezomibin HUVEC Hücre Migrasyonuna Etkileri	58
4.5. İnflamasyon Ortamında HUVEC Hücrelerinde Çizik (Yara İyileşme) Deneyi.....	60
4.6. HUVEC Hücrelerinde Flow Sitometrisinde Annexin V-Propidyum İyodür (PI) Yöntemi İle Apoptotik Etkinin Belirlenmesi	61
4.7. HUVEC Hücrelerinde Bortezomibin Kaspaz-3 Aktivasyonuna Etkilerinin Flow Sitometrisinde Belirlenmesi.....	64
4.8. MSU ile Oluşturulan İnflamasyon Modelinde Bortozomibin HUVEC Hücrelerinde Mitokondrial Membran Bütünlüğüne Etkisi.....	67
4.9. MSU İnflamasyon Ortamında HUVEC Hücrelerinde TNF- α , IL- 1 β , IL-6, IL-8 ve IL-10 Düzeyleri	69
4.9.1. MSU inflamasyon ortamında bortezomibin HUVEC hücrelerinde TNF- α düzeyler	69
4.9.2. MSU inflamasyon ortamında bortezomibin HUVEC hücrelerinde IL-1 β düzeyleriHata! Yer işareti tanımlanmamış.	

4.9.3. MSU inflamasyon ortamında bortezomibin HUVEC hücrelerinde IL-6 düzeyleri	74
4.9.4. MSU inflamasyon ortamında bortezomibin HUVEC hücrelerinde IL-8 düzeyleri	76
4.9.5. MSU inflamasyon ortamında bortezomibin HUVEC hücrelerinde IL-10 düzeyleri	78

BEŞİNCİ BÖLÜM

5. TARTIŞMA.....	80
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	93
KAYNAKÇA.....	95
ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 4. 1. Bortezomib konsantrasyonlarının, THP-1 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. ve 48. saatlerdeki % Canlılık Değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (Kontrol %100 kabul edilmiştir; n=8, Ort±SS, p>0.05, p<0.05*, p<0.01**, p<0.001***, p<0.0001****)	52
Tablo 4. 2. Bortezomib konsantrasyonlarının, HUVEC hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. ve 48. saatlerdeki % Canlılık Değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (Kontrol %100 kabul edilmiştir; n=8, Ort±SS, p>0.05, p<0.05*, p<0.01**, p<0.001***, p<0.0001****)	53
Tablo 4. 3. THP-1 monosit ve makrofaj hücrelerinde akış sitometri yöntemi ile belirlenen IL-1β'nın yüzde seviyeleri	55
Tablo 4. 4. Annexin/PI akış sitometrisi analizine göre HUVEC hücrelerindeki canlılık (Q2-LL), erken apoptoz (Q2-LR), geç apoptoz (Q2-UR) yüzdeleri	63
Tablo 4. 5. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, akış sitometri yöntemi ile Bortezomibin farklı konsantrasyonlarda uygulaması sonucu belirlenen % Kaspaz-3 seviyelerinin gösterilmesi.....	66
Tablo 4. 6. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, akış sitometri yöntemi ile Bortezomibin farklı konsantrasyonlarda uygulaması sonucu belirlenen JC-1 seviyelerinin gösterilmesi.....	68
Tablo 4. 7. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, akış sitometri yöntemi ile Bortezomibin farklı konsantrasyonlarda uygulaması sonucu belirlenen TNF-α seviyelerinin gösterilmesi	71
Tablo 4. 8. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, akış sitometri yöntemi ile Bortezomibin farklı konsantrasyonlarda uygulaması sonucu belirlenen IL-1β seviyeleri.....	73
Tablo 4. 9. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, farklı konsantrasyonlarda Bortezomib uygulaması ile belirlenen IL-6 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi	75

- Tablo 4. 10.** HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, akış sitometri yöntemi ile Bortezomibin farklı konsantrasyonlarda uygulaması sonucu belirlenen IL-8 seviyelerinin gösterilmesi 77
- Tablo 4. 11.** HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, akış sitometri yöntemi ile Bortezomibin farklı konsantrasyonlarda uygulaması sonucu belirlenen IL-10 seviyelerinin gösterilmesi 79

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. 1. Gutun patolojik süreçleri ve ana terapötik hedefler.....	7
Şekil 1. 2. NLRP3 inflamazomunun ve çeşitli farmakolojik inhibitörlerin potansiyel blokaj alanlarının şematik gösterimi.....	13
Şekil 1. 3. Gut patogenezinde NLRP3 aktivasyonu ve aracı mekanizmalar.....	21
Şekil 1.4. 26S proteozom kompleksi tarafından düzenlenen NF-κB'nin fonksiyonları.....	25
Şekil 1.5 Bortezomibin molekül yapısı ve inflamazomdaki rolü.....	26
Şekil 3.1. Hücre sayım cihazı (Cedex, Roche).....	34
Şekil 3.2. MTT deneyinin uygulamasının şematize edilmesi.....	36
Şekil 3.3 E-plate ve insert plakasının şematik olarak gösterilmesi.....	38
Şekil 3.4. CIM Plakasına Genel Bakış.....	40
Şekil 3.5. RTCA DP Cihazının Çalışma Prensibi.....	41
Şekil 3.6. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) DP sistemi ve CIM-plate (16 kuyucuklu) plakanın parçaları.....	41
Şekil 4.1. THP-1 (solda) ve HUVEC (sağda) hücrelerinin mikroskopik görüntüsü(4X).....	50
Şekil 4.2 Bortezomib konsantrasyonlarının THP-1 hücrelerinde MTT yöntemine göre hesaplanan 24. ve 48. saatteki % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.2 DMSO, Ort ± SS, p>0.05 fark yok, p<0.05* fark var, p<0.01** önemli derecede fark var, p<0.001*** çok önemli derecede fark var).....	51
Şekil 4.3. Bortezomib konsantrasyonlarının HUVEC hücrelerinde MTT yöntemine göre hesaplanan 24. ve 48. saatteki % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.2 DMSO, Ort ± SS, p>0.05 fark yok, p<0.05*fark var, p<0.01** önemli derecede fark var, p<0.001*** çok önemli derecede fark var).....	52
Şekil 4.4. THP-1 monosit ve makrofaj hücrelerinde akış sitometri yöntemi ile belirlenen IL-1β seviyeleri.....	55

Şekil 4.5.	MSU ile inflamasyon oluşturulan THP-1 monosit ile HUVEC ko-kültür hücre modelinde bortezomib konsantrasyonlarının gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde HUVEC proliferasyon eğrileri (sarı ok: konsantrasyon uygulaması, n=7, Ort ± SS).....	57
Şekil 4.6.	RTCA DP sisteminde bortezomibin HUVEC ve THP-1 hücrelerinin ko-kültüründe 48. saatteki hücre indeks değerlerine göre IC50 değerinin hesaplandığı konsantrasyon-hücre indeksi eğrisi (IC50: 127 nM).....	57
Şekil 4.7.	CIM-plate insert kullanılarak HUVEC hücrelerindeki bortezomib konsantrasyonlarının gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde belirlenen migrasyon eğrileri (n=5, Ort ± SS) (IC50:127nM).....	59
Şekil 4.8.	Bortezomib konsantrasyonlarının HUVEC hücrelerinde hücre migrasyonuna etkilerinin 24. saatteki mikroskopik görüntüsü (4X).....	60
Şekil 4.9.	MSU ile inflamasyon oluşturulmuş THP-1/ HUVEC ko-kültür ortamında çizik deneyinin mikroskopik görüntüleri (10X).....	61
Şekil 4.10.	Apoptotik HUVEC hücre görüntüleri (20X).....	62
Şekil 4.11.	HUVEC tekli ve ko-kültür inflamasyon ortamında Bortezomibin apoptotik etkileri.....	62
Şekil 4.12.	HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, farklı konsantrasyonlarda Bortezomib uygulaması ile Kaspaz-3 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi.....	65
Şekil 4.13.	HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, farklı konsantrasyonlarda Bortezomib uygulamasının mitokondriyal depolarizasyon üzerine etkileri.....	67
Şekil 4.14.	HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, farklı konsantrasyonlarda Bortezomib uygulaması ile TNF- α seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi.....	70
Şekil 4.15.	HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, farklı konsantrasyonlarda Bortezomib uygulaması ile IL-1 β seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi.....	72

Şekil 4.16. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, farklı konsantrasyonlarda Bortezomib uygulaması ile IL-6 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi.....	74
Şekil 4.17. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, farklı konsantrasyonlarda Bortezomib uygulaması ile IL-8 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi.....	76
Şekil 4.18. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, farklı konsantrasyonlarda Bortezomib uygulaması ile IL-10 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi.....	78

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μ	: Mikro
ABD	: Amerika Birleşik Devletler
ALR	: Melanom 2 benzeri reseptörler
ANOVA	: Tek yönlü varyans analizi
ASC	: Apoptozla ilişkili nokta benzeri protein
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
ATP	: Adenozin trifosfat
BMSC	: Kemik iliği stromal hücreler
C	: Celcius
CA	: San Diago
Ca ²⁺	: Kalsiyum iyonu
CARD	: C-terminali kaspaz alım alanı
CI	: Hücre indeksi (Cell index)
CM	: Şartlandırılmış medyum
COVID-19	: Yeni koronavirüs hastalığı-2019 (Corona Virus Disease-2019)
CPPD	: Kalsiyum pirofosfat dihidrat kristal depolanma hastalığı
CRP	: C-reaktif protein
CXCL8	: Nötrofil kemokin IL-8
DAMP	: Tehlikeye/hasarla ilişkili moleküler kalıplar
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
FBS	: Fötal sığır serumu
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
FITC	: Floresan izotiyosiyanat
GSDMD	: Gasdermin D
HUVEC	: İnsan umbilikal ven endotel hücreleri
IC ₅₀	: Medyan inhibitör konsantrasyon
ICAM-1	: Hücreler arası yapışma molekülü
IFN- γ	: İnterferon-gama
IKK	: I κ B kinaz
IL-1	: İnterlökin-1

IL-10	: İnterlökin-10
IL-17A	: İnterlökin-17A
IL-18	: İnterlökin-18
IL-1 β	: İnterlökin-1 β
IL-33	: İnterlökin-33
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
I κ B	: İnhibitör kappa B (Nükleer faktör κ B inhibitörü)
JC-1	: 5,5', 6,6'- tetrachlo-1,1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide
JNK	: C-Jun N-terminal kinaz
K ⁺	: Potasyum iyonu
KN	: Katalog no
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LPS	: Lipopolisakkarit
M	: Molar
MAPK	: Mitojenle aktifleşen protein kinaz
MCP-1	: Monosit kemotaktik protein-1
MM	: Multipl miyelom
MSC	: Mezenkimal kök hücrelerin
MSU	: Monosodyum urat
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
n	: Tekrar sayısı
NAIP	: Apoptoz inhibitör protein
NET	: Nötrofil hücre dışı tuzakları
NF- κ B	: Nükleer faktör-kappa B
NLR	: NOD-benzeri reseptörler
NLRC4	: CARD alanı içeren protein 4
NLRP3	: (NALP3) NLRP3; NLR ailesi pirin alanı içeren protein 3
NSAID	: Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar
Ort	: Ortama
P	: İstatistiksel anlamlılık
PAMP	: Patojene bağlı moleküler patern (patojenle ilişkili moleküler kalıplar)

PBS	: Fosfat tamponlu salin solüsyonu
PET	: Polietilen tereftalat
pH	: Asitlik veya bazlılığının ölçüsü (power of hydrogen)
PI	: Propidyum iyodür
PMA	: Forbol 12-miristat 13-asetat
PS	: Fosfatidilserin
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RPM	: Dakikadaki dönme sayısı (Revolutions per minute)
RTCA DP	: Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi
SAID	: Steroidal antiinflamatuvar ilaçlar
SS	: Standart sapma
STAT-3	: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü-3
THP-1	: İnsan monositik hücreleri
TLR	: Toll benzeri reseptörler
TLR2	: Toll benzeri reseptör 2
TLR4	: Toll benzeri reseptör 4
TNF- α	: Tümör nekroz faktör- α
UA	: Ürik asit
URAT 1	: Ürat taşıyıcı 1
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü

GİRİŞ

Gut hastalığı uzun süreli hiperüriseminin sonucu olarak eklem ve dokularda monosodyum ürat (MSU) kristallerinin birikimi sonucu ortaya çıkan, akut artrit atakları ile karakterize inflamatuvar bir hastalıktır (Johnson ve Rideout, 2004). Gut hastalığının sıklığı toplumun yaşlanması ve hareketsiz yaşam tarzının artması ile birlikte artmaktadır (Kuo vd., 2015). MSU kristallerinin eklem ve eklem dışı yapılar içinde birikmesinden kaynaklanan, eklem şişmesi, kızarıklık ve ağrı gibi klinik belirtileri olan bir metabolik bozukluk olarak da tanımlanır (Liu vd., 2023).

Ürik asit, nükleotid ve adenzin trifosfat metabolizması sırasında üretilir ve insanlarda ürikaz mutasyonunda pürin metabolizmasının bir son ürünüdür. Ürik asidin, NLR ailesi pirin alanı içeren protein 3 (NLRP3) inflamazom aktivasyonunun önemli bir sinyali olduğu bildirilmektedir. Son çalışmalar, ürik asidin doğuştan gelen immün yanıtı harekete geçirdiğini ve inflamasyona karşı edinilmiş immün reaksiyonun inflamatuvar hücrelerini topladığını ortaya koymuştur. MSU kristalleri, makrofajlarda ve monositlerde; İnterlökin-1 β (IL-1 β), İnterlökin-6 (IL-6), İnterlökin-8 (IL-8), İnterlökin-18 (IL-18) ve TNF- α dahil olmak üzere çeşitli sitokinlerin ve kemokinlerin artmış ekspresyonunu indükler. Bunlardan IL-1 β , MSU kristalinin neden olduğu iltihaplanma tepkisinin teşvik edilmesinde yer alan kritik bir sitokindir. Son çalışmalar, ürik asit ile reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunun inflamazom aktivasyonuna katkıda bulunduğunu ve bunun da IL-1 β 'nin olgunlaşmasına ve salgılanmasına yol açtığını göstermiştir (Yin vd., 2019, Luo vd., 2016, Chung vd., 2016, Kim vd., 2016, Pope ve Tschopp 2007).

İnflamazomlar, toksinler veya nanopartiküller gibi çevresel ajanların ve ayrıca monosodyum ürat, adenzin trifosfat (ATP) ve amiloid- β gibi endojen tehlike sinyallerinin aracılık ettiği steril saldırılara anormal yanıtları sınırlandırmanın yanı sıra, mikrobiyal patojenlere karşı konakçı yanıtının anahtar düzenleyicileridir. NLRP3 inflamazom, şu anda en iyi karakterize edilen inflamazomdur ve NOD-benzeri reseptörler (NLR) familyasına ait kompleksteki NLRP3 proteininden dolayı adlandırılır ve aynı zamanda NALP3, CIASI veya pyrin alanı içeren protein 3 olarak da adlandırılır. NLR ailesi, pirin alanı içeren 3 (NLRP3) inflamazom, NLRP3 reseptör proteini, apoptozla ilişkili benek benzeri protein (ASC) ve proteaz kaspaz-1'i içeren bir multiplrotein kompleksidir. NLRP3 inflamazom aktivasyonu, İnterlökin-1 β (IL-1 β) ve İnterlökin-18 (IL-18)'in proformlarını olgun formlarına ayıran aktif kaspaz-1 ile sonuçlanır. NLRP3

inflamasyonunun aktivasyonu, istilacı mikrobiyal patojenleri ortadan kaldırmak için IL-1 β ve IL-18 proinflatuar sitokinlerin salgılanması yoluyla inflamasyonu indükler (Zahid vd., 2019, Caseley vd., 2020, Yin vd., 2019).

İnterlökin-1 (IL-1) sitokin ailesinin bir üyesi olan IL-1 β , kaspaz 1 tarafından aktive edilebilir, bu nedenle NLRP3 inflamasyonunun aktivasyonu, IL-1 β 'nın olgunlaşması ve salgılanması için çok önemlidir. IL-1 β , birincil olarak monositler/makrofajlar tarafından üretilen ve proliferasyon, aktivasyon ve farklılaşma gibi çeşitli immünolojik fonksiyonlarda ve ayrıca ek inflamatuar hücrelerin alımında yer alan güçlü, çok işlevli bir proinflatuar sitokindir. IL-1 β ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), bağışıklık tepkisi, iltihaplanma, doku onarımı ve tümör ilerlemesine aracılık eden önemli proinflatuar sitokinlerdir. IL-1 β ve TNF- α ifadesinin düzenlenmesine, transkripsiyon faktörü Nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) tarafından transkripsiyon seviyesinde aracılık edilir. Sitokinler; enfeksiyon, inflamasyon, sepsis ve kansere karşı konakçı yanıtlarını düzenlemede önemli immünomodülasyon ajanlarıdır. Bu proinflatuar sitokinlerin kalıcı üretimi, ciddi doku tahribatına ve sonunda organ yetmezliğine neden olabilir (Chung vd., 2016, Zhang vd., 2014, Luo vd., 2016).

Makrofajlar, hem doğuştan gelen hem de adaptif inflamatuar tepkilerde ana oyuncularlardır. İnflatuar yanıtın uzun süreli aktivasyonunun, arteriyoskleroz, sepsis, obezite, diyabet, çeşitli karaciğer hastalıkları, inflamatuar bağırsak hastalığı, otoimmün hastalıkları, alerji ve kanser gibi çok çeşitli kronik insan hastalıklarına katkıda bulunduğu iyi bilinmektedir. Geleneksel steroid antiinflammatuar ilaçlar (SAID'ler) ve nonsteroidal antiinflammatuar ilaçlar (NSAID'ler), akut inflamatuar bozuklukları tedavi etmek için yaygın olarak kullanılanlardır. Ancak bu konvansiyonel ilaçlar, ciddi yan etkileri nedeniyle kronik inflamatuar hastalıkların tedavisinde başarılı olamamıştır. Daha yüksek potansiyele ve daha düşük toksisiteye sahip yeni antiinflammatuar ilaçların geliştirilmesi ihtiyacı, çeşitli karmaşık inflamatuar hastalıklarla mücadele için acildir (Chung vd., 2016, Zhang vd., 2014, Singh vd., 2019).

Son on yıldır, NLRP3 inflamazom aktivasyon mekanizmasının aydınlatılması için yoğun araştırmalar sürdürülmekte ve çok önemli bilgiler elde edilmektedir. NLRP3 inflamazomu, neredeyse her türlü tehlike sinyalinin tanıma özelliğine sahip olmasıyla öne çıkan ve günümüze kadar en fazla araştırılan inflamazomdur. (Chung vd., 2016). Bununla birlikte, aktivasyon mekanizması henüz tam olarak ortaya çıkarılamamıştır (Şaker, 2022). Anormal NLRP3 inflamazom aktivasyonu, birçok hastalığın, özellikle yaşla ilişkili

rahatsızlıkların, örneğin çeşitli metabolik sendromların ve gut, ateroskleroz, Alzheimer hastalığı ve tip II diyabet dahil olmak üzere metabolik bozuklukların gelişimi; Crohn hastalığı, inflamatuvar bağırsak hastalığı, ülseratif kolit ve kolon kanseri, meme kanseri, melanom, hepatit C virüsü ile ilişkili hepatoselüler karsinom ve gastrointestinal kanserler gibi çeşitli kanserler ile bağlantılıdır (Zahid vd., 2019, Caseley vd., 2020). NLRP3 kaynaklı piroptoz ve IL-1 β ile interlökin-18 (IL-18) salgılanması çeşitli hastalıklarla bağlantılıdır. NLRP3 inflamasyonunun piroptozla ne ölçüde katkıda bulunduğu hala belirsizdir, ancak NLRP3 aktivasyonu, hayati organlarda ciddi hasara neden olabilen piroptoz ile sonuçlanır. Çok sayıda çalışma, inflamasyonun ateroskleroz, diyabet, sepsis, çeşitli karaciğer hastalıkları ve diğer metabolik hastalıklar için önemli bir risk faktörü olduğunu göstermiştir (Zahid vd., 2019, Zhang vd., 2014). MSU kristalleri gibi steril partiküllerin monositlerde/makrofajlarda inflamatuvar indükleyiciler olarak iyi bilinen rolüne rağmen, steril inflamatuvar koşullar altında pro-IL-1 β sentezinin nasıl indüklendiğine dair çok fazla bilgi bulunmamaktadır (Chung vd 2016).

Endotel hücreleri kan damarlarının iç yüzeyini döşer ve damar duvarıyla dolaşan kan arasında ayırıcı bir yüzey oluşturur. İnsan göbek kordonu veninden elde edilen endotel hücreleri (HUVEC) iyi bir endotel hücre kaynağıdır. Vasküler patolojilerde önemli rollere sahip olan ve vücudun her yerine dağılan damarları içten döşeyen endotel hücreleri, önemli fonksiyonlara sahiptir. ROS ve potasyum iyonlarının (K⁺) dışa akımının aktivasyonu da NLRP3 inflamasyonunun aktivasyonuna katılır. Bu nedenle, NLRP3 / IL-1 β yolu, vasküler endotel hücre hasarı ile yakından ilişkili olabilir (Yin vd., 2019, Yazır ve Dalçık 2012).

Bortezomib, klinik çalışmalarda açık arayla en kapsamlı değerlendirilen proteazom inhibitörüdür. Proteazom inhibitörü bortezomib tarafından NF- κ B aktivitesinin inhibisyonu, multipl miyelom ve diğer hematolojik malignitelerde ön tedavi olarak kullanılmıştır (Engür Öztürk, 2020).

Son yıllarda, endotel hücre fonksiyon araştırmaları giderek artan şekilde NLRP3 inflamasyonunun düzenleyici rolüne odaklanılmıştır. Bortezomib, endoteldeki antiinflamatuvar tedavi yaklaşımlarına yeni bir boyut kazandırabilmesi bakımından ilgi çekici bir konu niteliğini taşımaktadır. NLRP3 ile ilişkili inflamasyonuna aracılık eden ve etkileyen faktörler ile endotel hasarına ilişkili hastalıkların tedavisi için bortezomibin antiinflamatuvar etkinliği araştırılmaya değer olduğunu düşünmekteyiz. Bortezomibin,

inflamasyon mekanizmaları üzerindeki etkisi daha iyi bir şekilde aydınlatılması gerekmektedir ve günümüzde bu konuda sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır.

Çalışmamızda NLRP3 inflamazom oluşumunda proteazom inhibitörlerinden (NF- κ B inhibitörlerinden) bortezomibin endotel hücreleri üzerinde olası antiinflamatuvar etkisini aydınlatılabilmek amacıyla, insan monosit hücrelerinden (THP-1) farklılaşmış makrofajlar ile insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) *in vitro* ko-kültür modelleri oluşturularak, bu ko-kültür modellerinde NLRP3 inflamazom mekanizmaları üzerine etkilerinin incelenmesi ve literatüre kazandırılması hedeflenmektedir. Bortezomibin, THP-1 ve HUVEC hücre hattında MSU ile oluşturulan proinflamatuvar sitokinler aracılı NLRP3 inflamazomu ile oluşan inflamasyon üzerindeki ve endoteldeki etkilerinin ortaya konması ve de altta yatan potansiyel mekanizmaların aydınlatılması açısından önem taşımaktadır. Bu çalışmada elde edilecek sonuçlar ile bortezomibin inflamatuvar hastalıkların tedavisinde terapötik bir madde olarak potansiyel uygulaması için önemli bilimsel katkılar sağlaması ve klinik ilaç tedavisinde yeni bir bakış açısı hedeflenmektedir. Böylece erken evrede inflamasyona bağlı oluşabilecek endotel hasarları ve hastalıklar için ümit verici olabilmektedir. Bununla beraber MSU kristallerinin endotel hücreleri üzerindeki etkisine ve bortezomibin klinik kullanımına dair literatürde yeni bir bakış açısı sağlayacaktır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Gut Hastalığı

Gut, çoğunlukla orta yaşlı ve yaşlı erkekler ile menopoz sonrası kadınları etkileyen bir metabolik hastalıktır (Choy vd., 2015). Bütün eklem hastalıklarının %5 ini kapsamaktadır. Epidemiyolojik kanıtlar, gelişmiş ülkelerde nüfusun % 1'inin erkeklerde ve menopoz sonrası kadınlarda en sık görülen gut artritinden etkilendiğini göstermektedir. Gut artriti, hiperürisemili bireylerin eklemlerinde ve bursal dokularında monosodyum urat (MSU) kristalleri şeklinde ürik asit birikimine yanıt olarak ortaya çıkan, güçlü iltihaplanmaya ve dayanılmaz ağrıya neden olan iltihaplı bir reaksiyonun neden olduğu en ağrılı artritir. Ürik asit, hüresel hasar üzerine yüksek miktarlarda üretilen bir pürin metabolizması katabolitidir. Yaralı hücrelerden salınan ürik asit, ürik aside özgü antikolar tarafından bağlanma üzerine MSU kristalleri oluşturur. Monosodyum urat kristallerinin eklem ve periartiküler boşluklarda kronik birikmesi ve bunun yanı sıra kalıcı hiperürisemi durumunda doğuştan gelen bağışıklık sisteminin aktivasyonu, gut artritinin temel mekanizmalarıdır (Liu vd., 2023). Monosodyum urat kristallerinin eklem ve eklem dışı yapılar içinde birikmesinden kaynaklanan, eklem şişmesi, kızarıklık ve ağrı gibi klinik belirtileri olan bir metabolik bozukluk olarak da tanımlanır (Liu vd., 2023). Bu semptomlar, sitokinlerin, kemokinlerin üretimi ve adezyon moleküllerinin hücre yüzeyi ekspresyonu tarafından başlatılan ve yayılan bir dizi olaydan kaynaklanır. Sağlıksız bir yaşam tarzı yaşayan ve sıklıkla tiyazid diüretik, profilaktik aspirin ve alkol tüketen bireylerde görülme sıklığı ve yaygınlığı önemli ölçüde artmaktadır (Elliott vd., 2003; Vanltallie T.B., 2010).

Gut hastalığının patofizyolojik süreci dört ana aşamaya ayrılabilir; asemptomatik hiperürisemi, MSU kristallerinin birikimi, akut gut artritinin klinik görünümü ve akut ataklar arasındaki interkritik gut (akut gut ataklarına yol açan kristallerin birikimine karşı vücudun bağışıklık tepkisiyle kemiğin tofus erozyonunun ileri aşaması) şeklindedir. Her aşamanın süresi bireysel olarak eşlik eden endojen ve ekzojen faktörlere bağlı olarak değişir (Limon, 2022; Gu vd., 2023; Peng vd., 2023).

Asemptomatik hiperürisemi serum ürik asit seviyesinin 6.8 mg/dl nin üzerinde olduğu ve klinik olarak gut artritinin olmadığı durumdur. Pürin metabolizmasının bir ürünü olan ürik asit (UA), esas olarak bağırsaklar ve böbrekler tarafından atılır. Daha sonra, UA düzeyleri doygunluk eşiğinin üzerine çıktığında, kanda iğne benzeri kristaller

halinde çökelir. Gut hastalığının patojenik yolu, MSU'nun makrofajlar tarafından fagositozunu içerir, bu da alındıktan sonra ikili bir sinyal yolu aracılığıyla interlökin-1 β (IL-1 β) dahil olmak üzere bir dizi inflamatuvar sitokin salınmasını teşvik ederek yoğun bir inflamatuvar yanıtı tetikler. Geç evrelerde gut taşları ve monosodyum üratın çekirdek olduğu kompleks kronik granülasyon dokuları oluşur (Limon, 2022; Gu vd., 2023; Peng vd., 2023).

Akut gut artritinde, ürat kristalleri yaralı dokuda inflamatuvar bir süreci başlatır; böylece nötrofiller, makrofajlar ve monositler dahil fagositik hücreler sitokinler, kemokinler ve interlökinler dahil olmak üzere çeşitli kimyasal araçların salınmasını tetikler (Barros vd., 2021). Serum ürik asit seviyesinin gutun patogeneziyle yakından ilişkili olduğu ve MSU kristallerinin aracılık ettiği birçok hücrel ve humoral immün aktivasyon mekanizmasının, akut gut atağının anahtar faktörü olduğu düşünülmektedir. Akut gutun başlangıcı genellikle 2 hafta içinde doğal olarak hafifler, ancak tekrarlayan kronik gut ataklarından sonra bir dizi eklem ve sistemik semptom ortaya çıkabilir. Toplumda yaklaşık %5 oranında görülür ve bunların yaklaşık %20-25'inde gut hastalığı gelişir (Limon, 2022; Zhao vd., 2023).

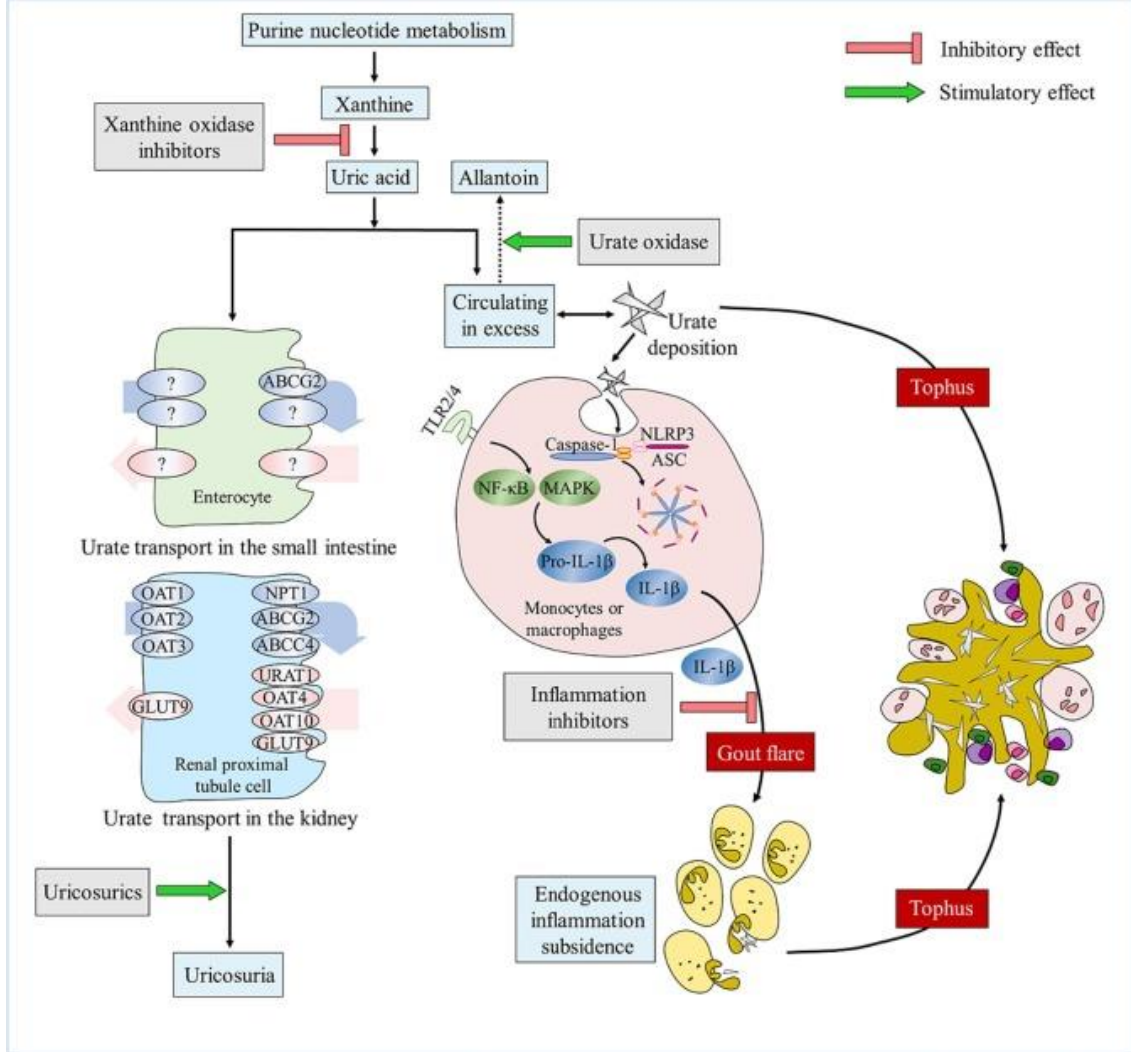
Gut artritinde ara dönem atağın olmadığı dönemdir. Birkaç aydan birkaç yıla kadar sürebilir. Hastalık tedavi edilmezse ataklar arası dönem kısalmış, atak süresi uzar ve oligopoliartiküler ataklar gelişir (Limon, 2022).

Kronik gut artritinde önemli bulgu tofus oluşumudur. Tofüslere bağlı eklem deformiteleri görülür ve eklem hareket kısıtlılığına yol açabilir. (Limon, 2022).

Kristal kaynaklı diğer artropatilerin de gutun yanı sıra aşırı IL-1 β üretimine bağlı olduğu görülmektedir. Dikkat çekici bir şekilde, tüm bu koşullar, etkilenen dokularda nötrofillerin birikmesi ve alevlenen bir inflamatuvar hastalık ile karakterize edilir. Örneğin 'pseudogout', kalsiyum-pirofosfat kristallerinin birikmesiyle tetiklenen inflamatuvar bir eklem hastalığıdır. Gut hastalığına benzer şekilde eklemlerin içinde ve çevresinde hidroksiapatit kristallerinin birikmesi, ki bu tipik olarak kalsifik periartirit olarak kendini gösterir, IL-1 β salınımını ve inflamasyon nöbetlerini tetikler (Schett vd., 2016).

Klinik olarak gut ve psödogut, eklemlerde ödem ve eritem ve de buna bağlı olarak şiddetli ağrı, intraartiküler ve periartiküler boşluklarda güçlü nötrofil infiltrasyonu ile ilişkili durumlar ile alakalıdır. Patojenik kristal aracılı IL-1 β olgunlaşmasının inflamazom bileşenleri olan NALP3 (NLRP3; NLR ailesi pirin alanı içeren protein 3), ASC ve kaspaz-1 gerektirdiğine dair bulgulara dayanarak, hem gut hem de psödogut etiyolojik ajanlarının

(MSU gibi) inflamazoma bağımlı bir şekilde inflamasyona aracılık ettiği öne sürülmektedir (Şekil 1.1) (Choy vd., 2015, Chu vd., 2017).



Şekil 1. 1. Gutun patolojik süreçleri ve ana terapötik hedefler (Peng vd., 2023)

Gut hastalığının klinik belirtileri, tedavi edilmediği takdirde hareket kısıtlılığına ve etkilenen eklem ve dokularda ileri derecede erozyona yol açarak yaşam kalitesini ciddi şekilde etkileyebilen şiddetli ağrıyla birlikte akut, kendi kendini sınırlayan bir artritir. Eş zamanlı olarak şiddetli gut hastalarında kronik böbrek hastalığı veya idrar taşları gibi komplikasyonlar görülme eğilimi gösterir ve sonunda böbrek yetmezliği ortaya çıkabilir (Peng vd., 2023).

1.1.1. Akut gut artriti

Monositler ve makrofajlar, ikili bir sinyal yoluyla nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanını, lösin açısından zengin tekrarı ve NLRP3 inflamatuvarını aktive etmek için biriken MSU kristallerine karşı bir bağışıklık tepkisi üretir. İlk olarak, toll benzeri reseptör 4 (TLR4) ve toll benzeri reseptör-2 (TLR2), pro-IL-1 β ve inflamazom bileşenlerini sentezlemek için nükleer faktör kappa-B (NF- κ B) ve mitojenle aktifleşen protein kinazı (MAPK) uyarır; ikinci olarak, MSU kristalleri kaspaz-1'in aktivasyonunu indükler ve NLRP3 inflamazomunun mikrotübül aracılı montajını tamamlar, bu da pro-IL-1 β 'yı olgun IL-1 β 'ya dönüştürür. Sadece iki aşamalı süreç NLRP3 inflamazomunu aktive edebilir ve bu da eklemlerde belirgin inflamasyon semptomları olmaksızın MSU birikimi klinik fenomenini açıklamaktadır. IL-1 β reseptörüne bağlanır ve IL-8 ile monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin aşağı yönlü bir sinyal kaskadını tetikleyerek nötrofillerin toplanmasına ve aktivasyonuna ve diğer çözünür proinflamatuvar araçların indüklenmesine yol açar. Sonuç olarak, guttan etkilenen bölgeler yoğun bir inflamatuvar yanıtı tetikleyen çok sayıda yanlılıkla aktive olmuş bağışıklık hücresi ve sitokin içerir (Peng vd., 2023).

Etkilenen eklemlerde şişlik kızarıklık, hassasiyet, şiddetli ağrı görülür. Artrit genellikle monoartiküler olup en sık ayak birinci metatars eklemlerinde görülür. Daha az sıklıkla tarsal, ayak bileği, diz, el bileği, el parmakları ve omuz eklemlerinde de tutulum görülebilir. Ultrasonografik görüntüleme akut gut artritinde eklem çevresinde yumuşak doku ödemi ve vaskülarizasyon artışı gözlenir (Limon, 2022).

1.1.2. Kronik (İleri) gut artriti

Gut taşları, ilerlemiş gut hastalığının spesifik bir belirtisidir ve çeşitli yerlerde oluşabilir. Bu taşlar, MSU'nun merkezi bir çekirdeği ile karmaşık bir kronik granülomatöz yapıya sahiptir ve çevresi inflamatuvar hücreler ile bağ dokusu içerir. İnflamasyonun kendiliğinden gerilemesi sırasında nötrofiller tarafından oluşturulan nötrofil hücre dışı tuzakları (NET'ler), MSU aracılığıyla kristal çekirdekleri geliştirebilir ve gut taşlarının oluşumunda önemli bir rol oynayabilir. Gut taşı oluşumu, agregasyonu ve kristallerin osteoblastlarla yapışması kıkırdak dokusunu aşındırarak kemik erozyonuna ve eklem hasarına neden olur. Osteoklast bozukluğu gut kemiği erozyonunun patogenezi ile ilişkilidir (Peng vd., 2023).

Kronik gut artritinde önemli bulgu tofus olsa da her zaman görülmeyebilir. Ürat kristallerinin birikimi ile oluşan tofus, hiperürisemi süresi ve derecesi ile ilişkilidir. En sık parmaklarda, el bileğinde, kulak kepçesinde, olekranon bursada görülür. Ultrasonografik görüntüleme eklem kıkırdağının yüzeyel kenarında ekojenite artmış, düzensiz bir bant görülür (Limon, 2022).

Kronik gutta, sürekli ağrı ve hafif inflamasyon, periferik dolaşımdaki mononükleer hücrelerde kaspazın kalıcı aktivitesi ile devam ediyor olabilir. Daha yoğun lokalize inflamasyon zirvelerinin oluşması, kristal çökmesi ile NPRL3'ün lokal olarak uyarılmasının bir sonucu olabilir (Puren vd., 1999).

1.1.3. Gut tedavisi

Gut hastalığı tedavi edilebilir bir hastalıktır. Gut tanısı etkin tedavisi olmasına rağmen hale tanı ve tedavide hatalar gözlenmektedir. Gut tedavisi esas olarak akut ataklara karşı antiinflamatuvar tedavi ve aralıklı dönemlerde ürat düşürücü tedaviden oluşur. Vücudun gut taşlarına verdiği inflamatuvar yanıt nedeniyle şiddetli ağrı ile atak geçirilmektedir. Gutun ilk tedavisi, iltihabı ve ağrıyı azaltan farklı inflamatuvar yolaklar için, siklooksijenaz inflamatuvar ilaçları inhibe eden nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, tubulin üzerinde etkili olan kolşisin, anti-inflamatuvar özelliklere sahip kortikosteroidler ve anahtar İnterlökin-1 (IL-1) inhibitörleri dahil olmak üzere farklı antiinflamatuvar ilaçlar klinik olarak akut krizle mücadele etmeyi amaçlamaktadır ve gutun etkili bir şekilde önlenmesi için kullanılmaktadır. Akut ataktan sonraki 12 saat içinde kolşisin almak semptomları hızla hafifletebilir, ancak dar terapötik penceresi ve yüksek advers reaksiyon insidansı genellikle NSAID'leri alternatif olarak kullanır. Akut kriz çözüldüğünde, daha sonraki atakları önlemek amacıyla allopurinol ve febüksostat antihiperürisemik ilaçların yanı sıra ksantin ve hipoksantinin ürik asite metabolize edilmesinden sorumlu enzimi inhibe eden ksantin oksidaz inhibitörleri ürik asit üretimini kontrol etmek için kullanılır (Limon, 2022; Santos, 2016; Azevedo vd., 2017). Eklem veya sistemik kortikosteroidlerin iyileştirici etkileri zayıftır ve önemli etkileri vardır, bu nedenle klinik olarak nadiren kullanılırlar. Buna ek olarak, hastalar geleneksel anti-inflamatuvar tedavilere yanıt vermediğinde veya tolerans göstermediğinde, İnterlökin-1 (IL-1) inhibitörleri terapötik olarak daha faydalıdır (Gottlieb vd., 2022; Peng vd., 2023). Probenesid ve benzbromaron gibi ürikozürük ilaçlar da kronik gut tedavisinde kullanılmaktadır. Bu ilaçlar, ürat taşıyıcı 1 (URAT 1) gibi vücuttaki ürik asit böbrek

taşıyıcılarını inhibe edebilmektedir (Pérez Ruiz, 2011 ; Azevedo vd., 2017). Bununla birlikte, bahsedilen bu ilaçların tümü, gastrointestinal ve renal toksisiteye bağlı istenmeyen yan etkilerle ilişkilidir (Mediavilla ve Miguel, 2011).

Akut gut artriti tedavisinde ilk amaç artriti tedavi ederek ağrıyı azaltmaktır. Akut gut atağı tedavisinde NSAİİ ve kolşisin ilk tercih edilen ilaçlardır. NSAİİ kullanamayan hastalarda intraartiküler veya sistemik steroidler verilir. Geleneksel steroidal anti-inflamatuar ilaçlar (SAID'ler) ve nonsteroid antiinflamatuar ilaçlar (NSAID'ler), akut inflamatuvar bozuklukları tedavi etmek için yaygın olarak kullanılır. Ancak bu konvansiyonel ilaçlar, ciddi yan etkileri nedeniyle kronik inflamatuvar hastalıkların tedavisinde tam anlamıyla başarılı sayılmamaktadır. Daha yüksek potansiyele ve daha düşük toksisiteye sahip yeni antiinflamatuar ilaçların geliştirilmesi ihtiyacı, çeşitli karmaşık inflamatuvar hastalıklarla mücadele için önemlidir (Limon, 2022; Chung vd., 2016; Zhang vd., 2014; Singh vd., 2019).

Gut hastalığının patogenezi iyi anlaşıldığından, kolşisin, allopurinol ve makromoleküler ilaç urat oksidaz gibi çeşitli ilaçlar on yıllardır klinik kullanımdadır. Kolşisin tedavisine 6-12 ay devam edilmelidir. Dirençli gut artritinde IL-1R antagonistleri kullanılabilir. Nüksleri önlemek ve dokularda urat birikimini azaltmak için urat düşürücü tedaviler verilmelidir. Ürik asit düzeyini düşüren ilaçlar ürik asit yapımını azaltan ve ürik asit atılımını artıran ilaçlar olarak ikiye ayrılır. Allopürinol ksantin oksidaz inhibitörü olup ürik asit yapımını azaltır. Allopürinol intoleransı veya etkisizliği olan hastalarda selektif ksantin oksidaz inhibitörü febuksostat kullanılabilir. Ürikozürik ajanlar (probenesid veya benzbromaron) proksimal tübülü etkileyerek ürikozürik etki gösterir. Peptoglikaz, kombine rekombinan ürikaz enzimidir. Konvansiyonel tedavilere dirençli gut artritinde kullanılabilir. Bununla birlikte, geleneksel farmasötik formülasyonlar inflamatuvar lezyonları hedefleyememekte, hatta sistemik dolaşımda hızla inaktive olmakta, bu da etkinliğin azalmasına ve sistemik yan etkilere neden olmaktadır (Limon, 2022; Peng vd., 2023).

Bugüne kadar, IL-1'in dört güçlü inhibitörü klinik kullanım için mevcuttur veya geç aşama klinik geliştirme aşamasındadır. Bunlar yalnızca etkili tedaviler oluşturmakla kalmayıp, aynı zamanda IL-1'in insan hastalıklarındaki rolüne ilişkin anlayışı geliştirmeye de yardımcı olmuştur (Schett vd., 2016).

1.1.4. Gut ile ilişkili faktörler

Gut hastalığı ile ilişkili faktörler arasında yaş, cinsiyet, eşlik eden komorbiditeler ve inflamatuvar aktivite gibi çeşitli faktörler bulunmaktadır. Erkeklerde daha sık görülür ve yaşla yakından ilişkilidir (Doherty, 2009). Yaş ilerledikçe gut hastalığı sıklığında artış olduğu görülmüştür (Karabay, 2012; Gerçeker vd., 2021). Epidemiyolojik çalışmalar, gut artrit prevalansında önemli bölgesel, ırksal ve cinsiyet farklılıkları olduğunu, erkek/kadın oranının 2:1 ile 8:1 arasında değiştiğini göstermiştir. Artan yaş, köklü sağlıksız beslenme, erkek cinsiyeti ve etnik köken gibi genetik olmayan faktörler, yüksek serum urat konsantrasyonu için potansiyel risk faktörleridir ve bunun genel olarak gut artritinin oluşumu ve gelişimi ile pozitif olarak ilişkili olduğuna inanılmaktadır (Liu vd., 2023). Zenci ırkında nadir görülmektedir. Puberte sonrası devrede çocuklarda nadir karşılaşılmaktadır. Gutlu hastaların %10-20'sinde familial karakter saptanmıştır (Hazıcı, 2003). Gut normalde genetik, yapısal ve çevresel risk faktörlerinin etkileşiminden kaynaklanır (Doherty, 2009).

Gut son yıllarda prevalansı artan yaygın bir inflamatuvar artrittir. Önemli bir belirleyici, ürik asit seviyelerinin, urat kristal oluşumu için doyma noktasının üzerine çıkma derecesidir; bu, esasen renal uratin verimsiz atılımından kaynaklanır (Doherty, 2009).

Hiperürisemiye neden olan durumlar arasında en sık; obezite, pürinden zengin diyet, kronik böbrek yetmezliği, hipertansiyon, metabolik sendrom, alkolizm, pürin metabolizma bozuklukları ve bazı ilaçlar (siklosporin, tiyazid diüretikleri, pirazinamid, düşük doz aspirin) yer alır. Daha nadir görülen nedenler olarak; tümör lizis sendromu, psöriyazis ve myeloproliferatif hastalıklar sayılabilir (Limon, 2022; Bodakçi ve Vasi, 2020).

Gutun küresel prevalansı son birkaç on yılda tip 2 diyabet, hipertansiyon, metabolik sendrom, obezite, koroner arter hastalığı ve kronik böbrek hastalığı gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak artmaktadır. Et, fruktoz ve alkol içeren yüksek pürinli diyetler, aile mirası, yüksek ürik asit seviyelerine yol açan ilaçların yaygın kullanımı (örneğin, tiazidler ve siklik diüretikler, niasin ve kalsinörin inhibitörleri) ve inorganik toza maruz kalma, başlıca hastalık indükleyicileridir (Peng vd., 2023).

Guta sıklıkla dislipidemi, metabolik bozukluklar, kardiyovasküler hastalık ve böbrek hastalığı eşlik eder (Ndrepepa, 2018). Hiperürisemi ve gut hastalarında büyük olasılıkla böbrekler etkilenmiştir, bu da ürik asit böbrek taşlarının oluşmasına ve böbrek

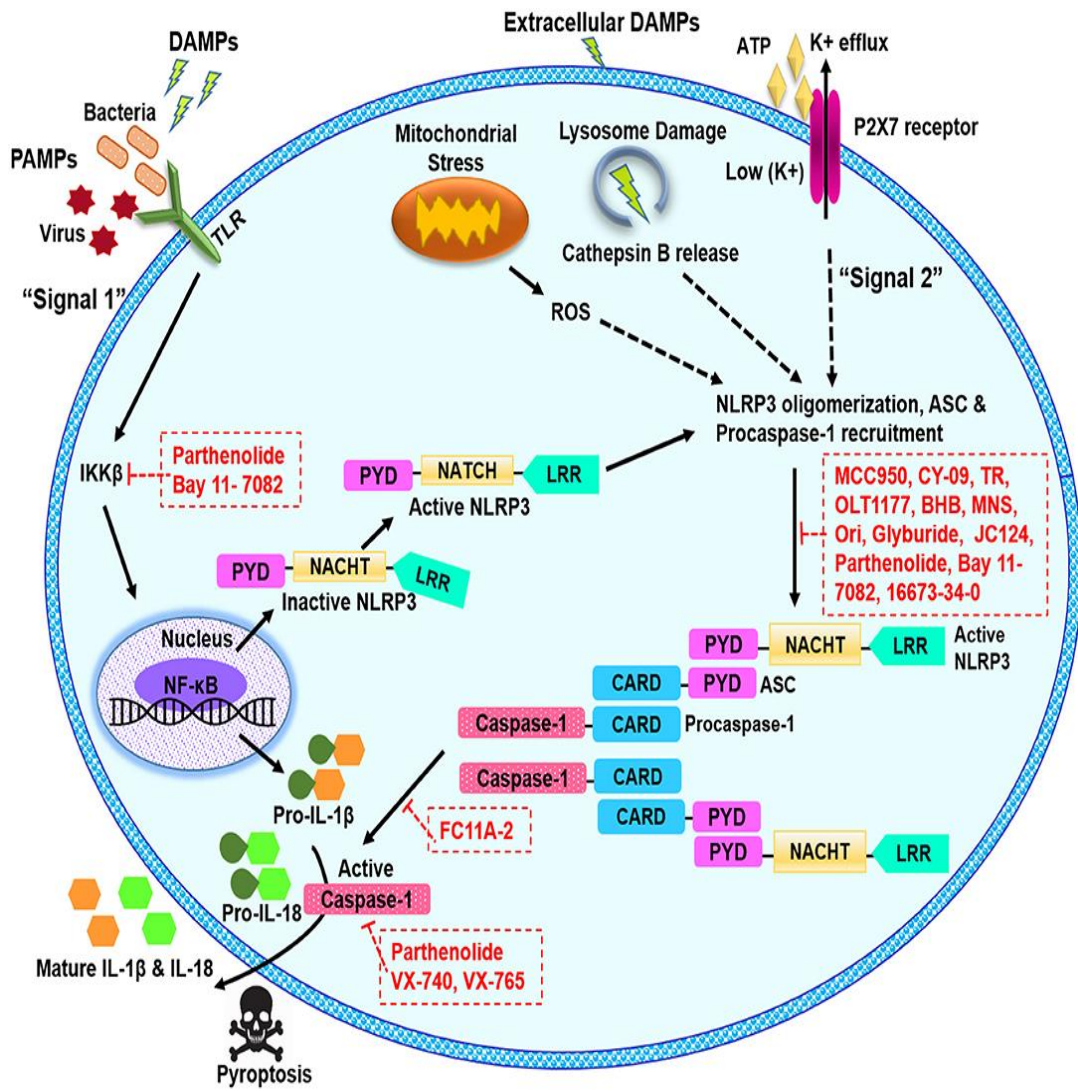
fonksiyonlarının azalmasına neden olur. Hiperürisemi ve tekrarlanan gut atakları, böbreklerin fonksiyonuna zarar verebilir ve böbrek fonksiyonunun bozulması, karşılıklı olarak nedensel ve yakından ilişkili olan hiperürisemi ve gut ataklarına daha da yol açabilir. Gut hastalarında endotel hücre hasarına ve vasküler düz kas hücresi çoğalmasına yol açan hiperürisemi vardır (Wang vd., 2022).

Yeni koronavirüs hastalığı (COVID-19) hastalığı ile ilgili olarak da bazı risk faktörleri gut hastalığı ile ilişkilendirilebilir. Özellikle erkek hastalarda ileri yaş, diyabet, obezite, hipertansiyon, kronik renal yetmezlik, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar ve immün yetmezlik gibi eşlik eden komorbid hastalıklar, COVID-19'un ağır seyretme olasılığını artırabilir. Ancak, bu ilişkilerin kesinliği tam olarak kanıtlanmamıştır (Tekin ve Demirtürk, 2021; Terkeltaub, 2010).

1.1.5. Gut ve inflamasyon

İnflamasyonlar, sitozolik protein komplekslerinin bir sınıfıdır. Patojenleri algılamak ve fizyolojik ve patolojik koşullar altında inflamatuvar yanıtları başlatmak için sitozolik doğuştan gelen bağışıklık sinyali reseptörleri olarak hareket ederler (Bai vd., 2020). İnflamasyonlar, toksinler veya nanopartiküller gibi çevresel ajanların ve zararlı endojen sinyallerinin (monosodyum ürat, ATP ve amiloid- β gibi) aracılık ettiği, mikrobiyal patojenlere karşı inflamatuvar yanıtta anahtar düzenleyicilerdir. Son zamanlarda sitoplazmada patojenle ilişkili moleküler kalıpları (PAMP) ve tehlikeye/hasarla ilişkili moleküler kalıpları (DAMP) tanıyan nod benzeri reseptör (NLR) ailesi, özellikle de NLRP3 ilgi çekmiştir. İnflamasyon adı verilen bir kompleks üreten NLRP3, interlökin-1 β (IL-1 β) ve interlökin-18 (IL-18) gibi önemli proinflamatuvar sitokinlerin salınmasını indükleyen hücre içi sinyal yollarının aktivasyonuna yol açar. NLRP3 inflamasyon, en iyi bilinen inflamasyondur ve NLR familyasına ait komplekste bulunan NLRP3 proteininden dolayı bu şekilde adlandırılır. NLRP3 inflamasyonu, NLRP3 reseptör proteini, ASC ve proteaz kaspaz 1'i içeren bir multiprotein kompleksidir. İyonik akış, mitokondriyal disfonksiyon ve ROS üretimi ve lizozomal hasar dahil olmak üzere NLRP3 uyarıcıları tarafından indüklenen çoklu moleküler ve hücresel sinyal olaylarının NLRP3 inflamasyonunu aktive ettiği gösterilmiştir. NLRP3 inflamasyonunun aktivasyonu, patojenleri ortadan kaldırmak için interlökin-1 β (IL-1 β) ve interlökin-18 (IL-18) proinflamatuvar sitokinlerin salgılanması yoluyla inflamasyonu indükler. IL-1 β ve IL-18 üretimi inflamasyonun aktivasyonunu gerektiren iki aşamalı bir süreçtir. Toll benzeri

reseptörlerin (TLR) uyarılmasıyla her iki inflamatuvar sitokinin öncül formu olan prointerlökin-1 β ve prointerlökin-18'in Nükleer faktör kapa B (NF- κ B) aracılı gen transkripsiyonu meydana gelir. Prointerlökin IL-1 β ve prointerlökin IL-18'in ise aktif şekilleri olan IL-1 β ve IL-18'e dönüşümleri için NLRP3 aracılı inflamazom aktivasyonu ile prokaspaz-1'in kaspaz-1'e dönüşümü gereklidir. IL-1 β ve IL-18'in proformlarını olgun formlarına dönüştüren kaspaz-1'in uyarılması ile NLRP3 inflamazom aktivasyonu gerçekleşir. Aktif kaspaz-1; prointerlökin-1 β ve prointerlökin-18'in IL-1 β ve IL-18'e dönüşümünü gerçekleştirir. TLR'lerin aktive olmasıyla pro-IL-1 β ve pro-IL-18 ile beraber NF- κ B aracılı NLRP3'ün de gen transkripsiyonu artar (Şekil 1.2) (Afonina, 2015; Yin vd., 2019; Kelley vd., 2019; Zahid vd., 2019; Zhang vd.,2020; He vd., 2023).



Şekil 1. 2. NLRP3 inflamazomunun ve çeşitli farmakolojik inhibitörlerin potansiyel blokaj alanlarının şematik gösterimi (Zahid vd., 2019)

NPRL3 inflamatuvar makromoleküllerinin oligomerizasyonu, IL-1 β ve IL-18 gibi inflamatuvar sitokinlerin salgısının artmasına neden olur (Martinon vd., 2006, Cavalcanti vd., 2016). Bu sitokinler sırayla proinflamatuvar aracılardan bir dizisini tetikleyerek endotelial aktivasyona ve lökosit toplanmasına yol açar. Bu sürece ikincil olarak dahil olan ana sitokinler IL-8 (nötrofil alımı ve aktivasyonu), IL-6 (inflamatuvar sürecin amplifikasyonu, kemik hasarına olası katkı) ve TNF- α 'dır (proinflamatuvar aktivasyon, olgunlaşma ve monositler makrofaja dönüşümünde artırır) (Cavalcanti vd., 2016; Terkeltaub vd., 1991; Choe vd., 2011; Rose ve John, 2012; di Giovine vd., 1991). IL-18, gutta IL-6 düzeylerinin yanı sıra inflamatuvar aktivite ile ilişkilidir; IL-6 ise klinik ve laboratuvar aktivite, tofus ve eklem deformatelerinin varlığı ile ilişkilidir ve bu patolojinin prognostik bir belirteci olabilir. Literatürde, MSU tarafından uyarıldığında, artan IL-1 β , IL - 6 ve İnterlökin-17A (IL-17A) üretimiyle birlikte, doğuştan gelen bağışıklık aktivasyonunda yer alan moleküllerin nasıl davrandığına dair önemli deneysel kanıtlar bulunmaktadır (Cavalcanti vd., 2016; Amaral vd., 2012 ; Conforti-Andreoni vd., 2011; Inokuchi vd., 2006 ; Liu-Bryan vd., 2005 ; Martin vd., 2009 ; Martin vd.,2010 ; Martin vd., 2011 ; Martinon vd., 2006; Mylona vd., 2012; Ruggiero vd., 2006; Steiger ve Harper, 2014 ; Torres vd.,2009 ; Urano vd., 2002).

IL-1 β , MSU kristallerinin tetiklediği akut gut iltihabında önemli bir rol oynar. Olgun IL-1 β 'nın sentezi, işlenmesi ve salınması sıkı bir şekilde düzenlenen olaylardır. İnterlökin-1 (IL-1) sitokin ailesinin bir üyesi olan IL-1 β , kaspaz-1 tarafından aktive edilebilir, bu nedenle NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu, IL-1 β 'nın olgunlaşması ve salgılanması için çok önemlidir. ProIL-1 β genellikle uyarılmamış monositlerde ve makrofajlarda saptanmaz, ancak transkripsiyonel seviyede uyarılması gerekir (Landis ve Haskard, 2001; Burns vd., 2003). IL-1 β 'nın monositlerden, makrofajlardan ve nötrofillerden salınması, hücre içi öncü proteininin (pro-IL-1 β) enzimatik olarak işlenmesini gerektirir. Bu adım iki farklı yolla gerçekleşebilir. Pro-IL-1 β 'nın kaspaz-1 aracılı bölünmesi, inflamatuvar (inflamatuvar bağımlı IL-1 β aktivasyonu) adı verilen hücre içi bir protein kompleksinin aktivasyonuna bağlıdır. Alternatif olarak ise pro-IL-1 β , nötrofilden türetilmiş serin proteazlar tarafından, inflamatuvar aktivasyondan bağımsız bir süreçte bölünebilir (Afonina vd., 2015). IL-1 β , birincil olarak monositler makrofajlar tarafından üretilen ve proliferasyon, aktivasyon ve farklılaşma gibi çeşitli immünolojik fonksiyonlarda ve inflamatuvar yanıtın oluşumunda yer alan çok işlevli bir proinflamatuvar sitokindir (Chung vd., 2016). İşlevsel olarak olgun IL-1 β , bağışıklık sisteminde güçlü bir

proinflamatuvar aracı olarak görev yapar ve doğuştan gelen bağışıklık hücrelerini enfeksiyon bölgesine toplar ve modüle eder (Liu vd., 2023). IL-1 β , ateş, ağrı eşliği, vazodilatasyon ve hipotansiyonu kontrol eden genlerin ekspresyonunu indükler ve alımı, bağışıklık hücrelerinin enfekte veya hasarlı dokulara infiltrasyonunu kolaylaştıran bir endotel hücre tepkisine yol açar. IL-1 β , doku seviyesinde vazodilatasyona yol açan, granüositlerin iltihaplı dokuya çekilmesini teşvik eden ve prostaglandinlerin ekspresyonunu indükleyen oldukça güçlü bir proinflamatuvar araçtır (Schett vd., 2016). Önemli miktarda IL-1 β birikimi, kıkırdak ve kemiğe zarar veren matriks parçalayıcı enzimlerin aktivasyonuna yol açabilir (Liu vd., 2023).

Sitokinler; enfeksiyon, inflamasyon, sepsis ve kansere karşı konakçı yanıtlarını düzenlemede önemli immünomodülasyon ajanlarıdır. IL-1 β ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), immun yanıtta, inflamasyonda, doku onarımı ve tümör patogeneğinde rolü olan önemli proinflamatuvar sitokinlerdir. IL-1 β ve TNF- α ifadesinin düzenlenmesine, transkripsiyon faktörü NF- κ B aracılık eder. TNF- α , NF- κ B'yi aktive eder ve adezyon moleküllerinin (vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve hücreler arası yapışma molekülü-1'i (ICAM-1)) ekspresyonunu artırır (Hideshima vd., 2001; Li vd., 2000). Proinflamatuvar sitokinlerin kalıcı üretimi, ciddi doku tahribatına ve sonunda organ yetmezliğine neden olabilir (Chung vd., 2016).

Tümör nekroz faktör geni, tümör nekroz faktörü (TNF) süper familyasına ait çok fonksiyonlu bir proinflamatuvar sitokini kodlamaktadır. Bu sitokin aslında makrofajlar tarafından salgılanır. Birçok otoimmün hastalıkta, kanser ve insülin direnci de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda ve inflamasyonun başlamasında kilit rol üstlenmektedir (Wang vd., 2020). Bu sitokin, hücre farklılaşması ve çoğalması, lipid metabolizması, apoptoz ve pıhtılaşma dahil olmak üzere geniş bir biyolojik süreç yelpazesinin düzenlenmesinde yer alır. Farelerde yapılan nakavt çalışmaları da bu sitokinin nörokoruyucu işlevini göstermiştir (Görgülü, 2019). Romatoid artrit, obezite ve neoplazmlar gibi hastalıklarda TNF- α ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. Hücresel olarak Deoksiribo nükleik asit (DNA) hasar cevabı, akut inflamatuvar cevap, kalsiyum aracılı sinyal, hücre aktivasyonu-çoğalması-ekstravazasyon, sirkadiyen ritim, apoptotik süreç, kortikal aktin hücre iskelet organizasyonu, hücre dışı matris organizasyonu, bağışıklık cevabı, ölüm indükleyen sinyal kompleksi, savunma cevabı, MAPK kaskadı, endotel hücre apoptotik süreci, C-Jun N-terminal kinaz (JNK) kaskadı, transkripsiyonun

negatif regülasyonu, mitotik hücre döngüsünün negatif düzenlenmesi, sitokin regülasyonu gibi birçok önemli fizyolojik süreçte rol oynamaktadır (Görgülü, 2019). Monosodyum urat (MSU) kristalleri, proinflamatuvar özelliklere sahip bir sitokin olan TNF- α 'nın, insan kan monositleri tarafından üretimi için doza bağlı bir uyarıcı etkiye sahiptir (Di Giovine vd.; 1991). TNF- α ; hücre proliferasyonu, doğal ve kazanılmış immünite ve apoptoziste rolü olan önemli proinflamatuvar özelliklere sahip bir sitokindir. TNF- α sinyal iletiminde; NF- κ B olarak bilinen transkripsiyon faktörü en önemli faktörlerden biridir. NF- κ B hücre çoğalması, hücre canlılığı ve aktivasyonundan ve de inflamatuvar süreçteki en önemli transkripsiyon faktörlerinden biridir (Wang vd., 2020). TNF- α reseptörlerinin (pek çok hücrede bulunmakla beraber), proinflamatuvar etkisi endotel lökosit hücreleri ve damar endoteli arasındaki ilişkiye bağlanmaktadır (Wang vd., 2020).

Kaspazlar gerek ölüm reseptörleri yolu, gerekse mitokondriyal apoptozda rol alan proteazlardır (Kaufmann ve Hengartner, 2001). Kaspazlar hücre yaşama fonksiyonlarını düzenleyen, hücre ölümü ve inflamasyon süreçlerinde rol alan endoproteaz enzimleridir (Gökhaner, 2018). Kaspaz-1, bir inflamasyona dahil olduktan sonra yakın kaynaklı otokatalitik aktivasyon yoluyla aktive edilir. Aktif kaspaz-1, pro-IL-1 β ve pro-IL-18 sitokinlerini olgun ve biyolojik olarak aktif formlarına ayırır. IL-1 β , ateş, ağrı eşiği, vazodilatasyon ve hipotansiyonu kontrol eden genlerin ekspresyonunu indükler ve alımı, bağışıklık hücrelerinin enfekte veya hasarlı dokulara infiltrasyonunu kolaylaştıran bir endotelial hücre tepkisine yol açar. IL-18, interferon-gama (IFN- γ) üretimi için gereklidir ve adaptif bağışıklığa aracılık eden ko-stimülatör bir sitokindir. Aktif kaspaz-1 ayrıca, Gasdermin D (GSDMD) 'nin N-terminal alanının plazma membranında gözenekler oluşturmaya izin veren GSDMD'yi parçalar, böylece piroptoz olarak adlandırılan litik, proinflamatuvar hücre ölümünü tetikler. Piroptoz, hücre içi patojenleri replikatif nişlerinden çıkmaya zorlar, onları diğer bağışıklık faktörlerine maruz bırakır ve ayrıca bağışıklık sistemini enfeksiyona yanıt vermeye hazırlamak için sitokin salınımını ve DAMP'ların oluşumunu tetikler (Kelley vd., 2019). Kaspaz-3, apoptoz mekanizmasının tamamlanma fazında yer alan ve apoptozun sonlandırılmasından sorumlu (sonlandırıcı) kaspazlardan biridir (Slee vd.,2001). Bazı kaspazlar, proapoptotik faktör olmaktan ziyade, doğal bağışıklık cevabının önemli aracılığı olarak işlev görürler. Kaspaz 1, 4, 5, ve 12 insandaki inflamatuvar alt kümeyi oluşturmaktadır (Martinon vd., 2002). Şimdiye kadar inflamasyon kaspazları sadece

vertebralarda bulunmuştur. Kaspaz-12 genelde, enfeksiyonlarla indüklenen inflamasyon sürecinde negatif düzenleyici olarak bilinir. Çünkü inflamazom komplekslerinde kaspaz-1 aktivasyonunu inhibe eder, bu şekilde enfeksiyona bağlı oluşan sepsise cevap olarak salınan proinflamatuvar IL-1 β ve IL-18 sitokinlerinin üretimini engeller. Buna karşın, kaspaz-4 ise enfeksiyon varlığındaki inflamasyon yanıt süreçlerinde pozitif etkili olan bir kaspazdır. (Cadena ve Massieu, 2016; Gökhaner, 2018).

Makrofajlar, hem doğuştan gelen hem de adaptif inflamatuvar tepkilerde ana faktörlerdir. İnflamatuvar yanıtın uzun süreli aktivasyonunun, arteriyoskleroz, sepsis, obezite, diyabet, çeşitli karaciğer hastalıkları, inflamatuvar bağırsak hastalığı, otoimmün hastalıkları, alerji ve kanser gibi çok çeşitli kronik insan hastalıkların oluşumuna katkısı iyi bilinmektedir. MSU kristalinin neden olduğu patolojik olaylar, öncelikle insan monositlerinde veya aktive edilmiş THP-1 makrofajlarda incelenmiştir. Çalışmaların çoğu, pro-IL-1 β üretmek için forbol 12-miristat 13-asetat (PMA) ile farklılaştırılmış THP-1 hücrelerini kullanmıştır (Chung vd., 2016; Zhang vd., 2014; Singh vd., 2019).

Endotel hücreleri immünoinflamatuvar yanıtta önemli oyuncular (Lin vd., 2011). Endotel hücreleri, kan damarlarının ve lenfatiklerin iç duvarında yer alan oldukça farklılaşmış düz hücrelerden oluşan bir tabakadır ve damar duvarıyla dolaşıdaki kan arasında ayırıcı özel bir yüzey oluşturur. Endotel hücrelerinden oluşan vasküler endotel, vasküler geçirgenliğin korunmasının önündeki ana engeldir ve metabolitlerin merkezi hedefidir (Chen vd., 2021). İnsan göbek kordonu veninden elde edilen endotel hücreleri (HUVEC) iyi bir endotel hücre kaynağıdır. Çünkü bu hücreler endotel hücrelerin temel özelliklerine sahiptir. Vücudun her yerine dağılmış olan damarları içten döşeyen ve vasküler patolojilerde önemli rollere sahip olan endotel hücreleri, önemli işlevlere sahiptir (Yin vd., 2019; Yazır ve Dalçık, 2012). Endotel hücreleri, inflamatuvar yanıtın lokalizasyonunu ile lökosit ve plazma proteinlerinin dokulara erişimini kontrol eder. İnflamasyon bölgelerinde, endotel hücreleri birçok inflamatuvar adezyon molekülünü, sitokinleri ve kemokinleri yukarı doğru düzenler. Endotelial aktivasyon, inflamatuvar yanıtın işaretlerinden biridir. Lokal endotel hücreleri lökosit yapışmasını ve göçünü desteklemediği sürece lökositler endotel hücrelerine yapışamaz ve iltihaplı dokulara ulaşamaz (Ley, 2008). Bu arada, reaktif oksijen türlerinin (ROS) aktivasyonu ve potasyum iyonlarının (K⁺) dışı transmembranel akışı da NLRP3 inflamasyonunun aktivasyonuna katılır. Bu nedenle, NLRP3 / IL-1 β yolu, vasküler endotelial hücre hasarı ile yakından ilişkili olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada, HUVEC'ler, MSU'nun

NLRP3/IL-1 β 'yı aktive ettiği ve ayrıca ROS aktivasyonu ile *in vitro* K⁺ dışı transmembranel akışı yoluyla vasküler endotel hücre hasarını indüklediği mekanizmaları araştırmak için kullanılmıştır (Yin vd., 2019; Yazır ve Dalçık, 2012). IL-1, TNF ve lipopolisakkarit (LPS) ayrıca nötrofiller için güçlü bir kemotaktik aracı olan kemokin (IL-8) sentezlemek üzere endotel hücrelerini aktive edebilir (Lin vd., 2011).

Anormal NLRP3 inflamazom aktivasyonu, birçok hastalığın, özellikle yaşla ilişkili rahatsızlıkların, örneğin çeşitli metabolik sendromların ve gut, ateroskleroz, Alzheimer hastalığı ve tip II diyabet dahil olmak üzere metabolik bozuklukların gelişimi; Crohn hastalığı, inflamatuvar bağırsak hastalığı, ülseratif kolit ve kolon kanseri, meme kanseri, melanom, hepatit C virüsü ile ilişkili hepatoselüler karsinom ve gastrointestinal kanserler gibi çeşitli kanserler ile bağlantılıdır. NLRP3 kaynaklı piroptoz ve IL-1 β ile IL-18 salgılanması çeşitli hastalıklarla bağlantılıdır. NLRP3 inflamazom aktivasyonu, hayati organlarda ciddi hasara neden olabilen piroptoz ile sonuçlanır. Çok sayıda çalışma, inflamasyonun ateroskleroz, diyabet, sepsis, çeşitli karaciğer hastalıkları ve diğer metabolik hastalıklar için önemli bir risk faktörü olduğunu göstermiştir (Zahid vd., 2019; Zhang vd., 2014). Yaşamın ilerleyen dönemlerinde ortaya çıkan birçok yaygın hastalığın patogenezi, kronik inflamasyondan etkilenmektedir. NLRP3, bu tür steril inflamatuvar sinyaller için birincil sensördür, bu nedenle de çeşitli hastalıklarda kronik inflamatuvar doku reaksiyonlarının önemli bir tetikleyicisidir (Şaker ve Polat, 2022).

İnflamasyonda inflamazom aktivasyonunun düzenlenmesi

Büyük bir hücre içi multimerik protein kompleksi olan inflamazom, nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı ve lösine zengin tekrar içeren reseptörleri (NLR) içeren veya melanom 2 benzeri reseptörlerde (ALR) bulunmayan sitozolik sensörler, apoptotik benek içeren protein (ASC) veya NLR ailesi C-terminali kaspaz alım alanı (CARD) içeren protein 4 (NLRC4) olarak adlandırılan adaptör proteinler ve efektör protein pro-kaspaz-1'den oluşur. Farklı sensörler, farklı patojenle ilişkili moleküler kalıpları (PAMP'ları) veya hasarla ilişkili moleküler kalıpları (DAMP'ları) tanıyarak ASC ile etkileşime girerek inflamazom toplanmasını başlatır. Sensörle aktive olan ASC benekler halinde toplanarak pro-kaspaz-1'i toplar, bu da yakınlıkla indüklenen kaspaz-1 otoproteolizine yol açar, ardından IL-1 β ve IL-18 olgunlaşmasının yanı sıra GSDMD bölünmesine yol açar. Sonuçta inflamatuvar sitokin salgılanmasına ve piroptoz olarak adlandırılan bir tür proinflamatuvar programlanmış hücre ölümüne neden olur. Spesifik

olarak NLRC4, NLR ailesi, apoptoz inhibitör protein (NAIP) tanıma ve NLRC4 inflamazom montajı sırasında ASC oligomerizasyonu arasında bir köprü görevi görür (Yang vd., 2019; Schett vd., 2016).

Özellikle NLRP3 inflamasyonu; hücre dışı ATP, nigerisin, ürik asit kristalleri, glukoz, kolesterol, çift sarmallı DNA veya ATP gibi çok sayıda PAMP ve DAMP tarafından indüklenir. Bu ligandların yapıları aynı olmadığından, tehlike sinyallerinin NLRP3'ü etkinleştirmek için ortak bir aşağı akışa sahip olduğu ve reaktif oksijen türleri (ROS) birikimi, lizozomal yırtılma, K⁺ akışı ve kalsiyum (Ca²⁺) akışı gibi iyi kurulmuş mekanizmaların NLRP3 ile aktive edilen bir sürece özel olmadığı varsayılmaktadır (Yang vd., 2019).

Steril inflamasyon

Steril inflamasyon, patogenezin patojen istilasından bağımsız olduğu gut, ateroskleroz ve nöroinflamasyon gibi geniş bir inflamatuvar hastalık spektrumunu içerir. Çoklu endojen sinyaller NLRP3 inflamazom aktivasyonunu tetikleyebildiğinden, NLRP3 inflamazom çeşitli inflamatuvar hastalıkların gelişiminde rol oynamıştır (Yang vd., 2019).

IL-1 β aktive edildikten sonra lokal düzeyde güçlü proinflamatuvar sitokinler olarak görev yapar ve vazodilatasyonu tetiklemektedir. Monositler ile nötrofilleri doku hasarı ve stres bölgelerine çeker. Sistemik olarak IL-1 sitokinleri hipotalamik ateş tepkisini ve hiperaljeziyi teşvik eder. Kontrolsüz IL-1 aktivasyonu, inflamasyonla ilişkili genlerde mutasyonların olduğu nadir kalıtsal sendromlar veya nötrofil infiltrasyonu ve IL-1 aktivasyonu ile karakterize edilen gut gibi daha sık görülen hastalıklar dahil olmak üzere bazı inflamatuvar hastalıkların merkezi bir bileşenidir (Schett vd., 2016).

1.2. Monosodyum Ürat Kristalleri

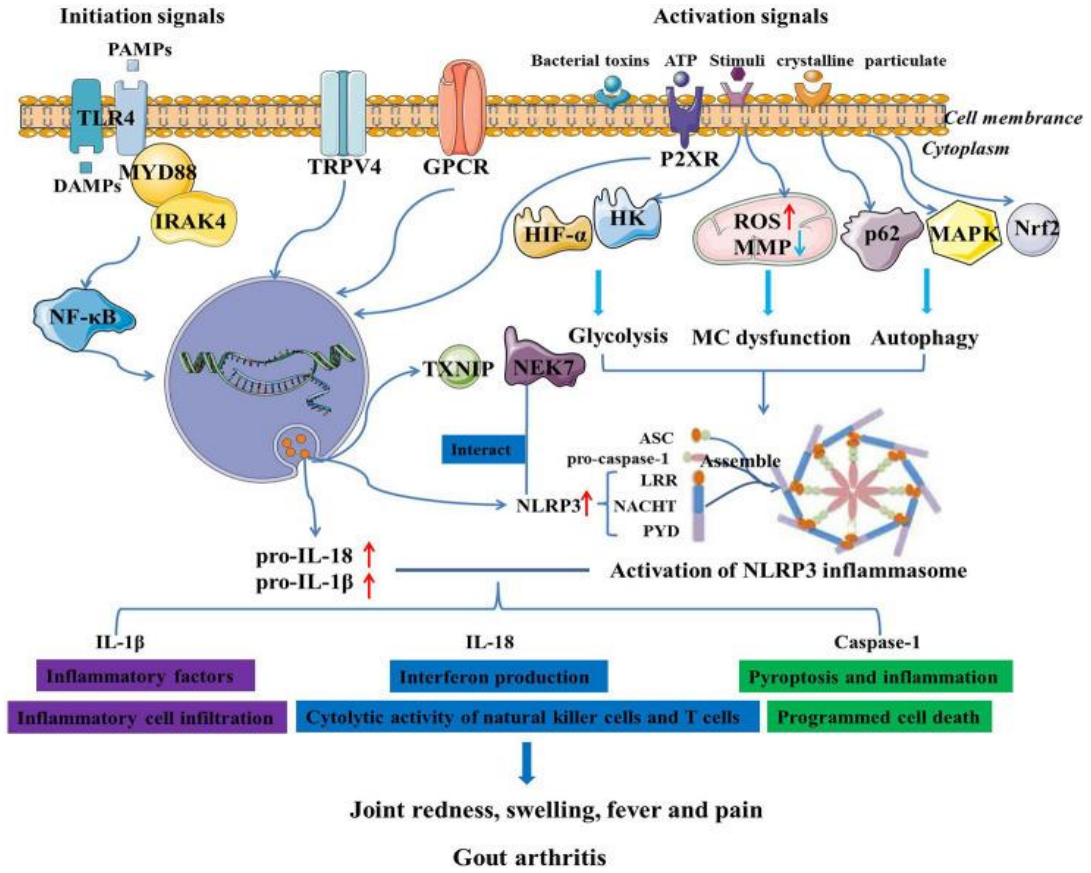
Ürik asit, hücre sel hasar üzerine yüksek miktarlarda üretilen bir pürin metabolizması katabolitidir (Dhanasekar vd., 2015). Ürik asit, nükleotid ve adenozin trifosfat metabolizması sırasında üretilir ve insanlarda ürikaz enzim eksikliğine bağlı pürin metabolizmasının bir son ürünüdür (Yin vd., 2019; Luo vd., 2016; Chung vd., 2016; Kim vd., 2016; Pope ve Tschopp, 2007). Yaralı hücrelerden salınan ürik asit, ürik aside özgü antikörler tarafından bağlanma üzerine MSU kristalleri oluşturur (Dhanasekar vd., 2015). MSU, pürin metabolizmasının son ürünü olarak oluşan ürik asidin kristal formasyonudur (Bodakçi ve Vasi, 2020).

Ürik asit, fizyolojik koşullar altında (pH 7.4) esas olarak düşük çözünürlüklü bir sodyum tuzu (MSU) olarak bulunan zayıf bir asittir. Vücut sıvılarındaki MSU seviyeleri çözünürlük sınırını (380 µmol/L) aştığında, iğne benzeri aşırı doymuş MSU kristalleri oluşur. Düşük sıcaklık, düşük kan akışı, yüksek sodyum iyonu konsantrasyonu ve kırık ve sinovyal sıvı bileşenlerinin bulunduğu fizyolojik ortamda, MSU kristallerinin birikme olasılığı daha yüksektir ve bu da ilk olarak birinci metatarsofalangeal eklemden, el eklemlerinde ve periferik eklemlerde ortaya çıkan gut hastalığına neden olur. Asemptomatik hiperürisemi hastalarında MSU birikimi, klinik olarak belirgin bir gut için bir sonraki kontrol noktası olarak kabul edilir (Chhana vd., 2019; Peng vd. 2023).

1.2.1. Monosodyum ürat kristallerinin gut oluşumundaki rolü

Gut hastalığı, eklem ve dokularda monosodyum ürat kristallerinin birikmesi sonucu ortaya çıkan, akut artrit atakları ile gelişen inflamatuvar bir hastalıktır (Limon, 2022). Ürik asidin, NLRP3 inflamazom aktivasyonunun önemli bir sinyali olduğu bildirilmektedir. Son çalışmalar, ürik asidin doğuştan gelen immün yanıtı harekete geçirdiğini ve inflamasyona karşı edinilmiş immün reaksiyonun inflamasyondaki rolünü ortaya koymuştur (Yin vd., 2019; Luo vd., 2016; Chung vd., 2016; Kim vd., 2016).

Kristal kaynaklı hastalıkların prototipi olan gut, ürik asit kristallerinin dokularda birikmesi ile karakterize edilir. Ürik asidin sodyum kristalleri, makrofajlar tarafından hızla tanınan ve yutulan ve nötrofiller tarafından saldırıya uğrayan iğne şeklinde yapılar oluşturur. Ürat kristallerindeki yüksek sodyum konsantrasyonu nedeniyle, fagositler tarafından yutulmaları hücre içi sodyum içeriğini aniden artırır. Ortaya çıkan hücre içi hiperosmolarite, hücre içine telafi edici bir su akışını tetikler ve hücrede şişmeye yol açar; normal osmolarite geri kazanılırken, hücre içi potasyum içeriği azalır ve bu da inflamazomun aktivasyonuna neden olur. Ürik asit kristallerinin varlığı, NLRP3 inflamatuvar makromoleküllerinin oligomerizasyonuna ve işlevsiz aktivitesine neden olur; kaspaz-1'in hiperaktivitesine neden olur (Martinon vd., 2002). Aktif kaspaz-1, pro-IL-1β ve pro-IL-18 sitokinlerini olgun ve biyolojik olarak aktif formlarına dönüştürür. Daha sonra IL-1β salınımı, vazodilatasyon ve bağışıklık hücrelerinin (tercihen nötrofiller) kristal birikim bölgesine hızlı bir şekilde toplanmasıyla büyük bir inflamatuvar yanıtı teşvik eder ve akut bir gut atağı ile sonuçlanır (**Şekil 1.3**) (Schiltz, 2002; Joosten, 2010; Schorn, 2011; Martinon vd., 2006; Schett vd., 2016; Şaker ve Polat, 2022).



Şekil 1. 3. Gut patogenezinde NLRP3 aktivasyonu ve aracı mekanizmalar (Liu vd., 2023) (*Monosodyum ürat (MSU) kristalleri, doğuştan gelen bağışıklıkta merkezi bir rol oynayan büyük bir hücre içi multiprotein kompleksi olan NLRP3 inflamazomunun indükleyicileridir. NLRP3 inflamazom aktivasyonu, LPS gibi mikrobiyal moleküller tarafından sağlanan bir ilk sinyali ('priming') ve bakteriyel toksinler, endojen moleküller veya MSU kristalleri gibi kristal yapılar dahil olmak üzere çok çeşitli uyarılar tarafından sağlanan ikincil bir sinyal gerektirir. Bu, NLRP3 inflamazomunun multimerizasyonunu ve IL-1β ve IL-18'in salgılanmasını ve ardından olgunlaşmasını sağlayan kaspaz-1 aktivasyonunu tetikler (Schroder vd., 2010; Franchi vd., 2012).*

Monosodyum ürat kristalleri eklem aralığındaki makrofajlarca fagosite edilir ve fagolizozomal membran oluşur. Kristaller bu membranı hasarlar ve tüm içerik konak hücreye zarar vererek hücrenin parçalanmasına neden olur. Hasarlı hücreden salınan kristaller immün sistemi aktive olur. Makrofaj, kondrosit, mast hücre ve dendritik hücreler devreye girerek kompleman yolu uyarılır. Fagositler sinovyal hücrelerden ve diğer hücrelerden araşidonik asit metabolitleri, lizozomal proteazlar, IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α gibi sitokin ve mediatörlerin yapımını ve salınımını artırır. Nötrofil kemotaksisi

olur ve inflamasyonun devamlılığı sağlanır. IL-8, lökotrien B4, IL-1 ve C5A kristalle indüklenen inflamasyona karışan kemotaktik moleküllerdir (Limon, 2022). MSU kristalleri, makrofajlarda ve monositlerde; IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18 ve TNF- α dahil olmak üzere çeşitli sitokinlerin ve kemokinlerin artmış ekspresyonunu indükler. MSU kristalleriyle karşılaşan monositler, IL-1 β , TNF- α ve IL-6 ve nötrofil kemokin IL-8 (CXCL8) dahil olmak üzere sitokinleri eksprese eder ve serbest bırakır. Çalışmalar, MSU kristallerinin etkilerinin TNF- α 'dan bağımsız olduğunu ortaya çıkarmıştır çünkü IL-1 β , TNF- α 'dan önce salınır ve IL-1'in IL-1R antagonisti ile inhibisyonu, TNF- α ekspresyonunu bastırır. Monosodyum urat kristalleri, proinflamatuvar özelliklere sahip bir sitokin olan tümör nekroz faktörünün (TNF) insan kan monositleri tarafından üretimi için doza bağlı bir uyarıcı sağlar (di Giovine vd., 1991). MSU kristalleri gibi steril partiküllerin monositlerde/makrofajlarda inflamatuvar indükleyiciler olarak iyi bilinen rolüne rağmen, steril inflamatuvar koşullar altında pro-IL-1 β sentezinin indüklemeye mekanizmasına dair çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Bunlar arasında IL-1 β , MSU kristalinin neden olduğu inflamasyon aktivasyonunda yer alan kritik bir sitokindir. Son çalışmalar, ürik asit ile ROS oluşumunun inflamazom aktivasyonuna katkıda bulunduğunu ve bunun da IL-1 β 'nin olgunlaşmasına ve salgılanmasına yol açtığını göstermiştir (Yin vd., 2019; Luo vd., 2016; Chung vd., 2016; Kim vd., 2016; Pope ve Tschopp, 2007). Ürat aynı zamanda İnterlökin-33 (IL-33) ile de ilişkilidir (Klück vd., 2020). Yapılan çalışmalarda sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında gut hastalarında serum IL-33 ekspresyonu ağırlıklı olarak arttığı ve böbrek hasarı olmayan hastalarda IL-33 seviyeleri daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Duan vd., 2016).

Gut, eklemlerde monosodyum urat kristal birikiminin ayırt edici özelliği olan kronik bir inflamatuvar artrit şeklidir ve klinik belirtiler ağırlıklı olarak yaşlanma ile şiddetlenir (Lee vd., 2017). Mekanistik olarak MSU, mitokondriyal disfonksiyon gibi MSU kaynaklı hücre içi hasar nedeniyle NLRP3 inflamazom aktivasyonunu tetikler, bu da sürekli IL-1 β salgılanmasına ve sonuçta şiddetli ağrıya yol açar (Richette ve Bardin, 2010).

Erken epidemiyolojik çalışmalar, alkol ve fruktoz gibi çeşitli diyet faktörlerinin gutun ilerlemesiyle ilgili olduğunu bildirmiş ve kalori kısıtlaması gibi metabolik arabuluculuk için terapötik stratejilerin gutta serum urat seviyelerini etkili bir şekilde azalttığı doğrulanmıştır. Endojen beta-hidroksibutirat seviyelerini yükselten ketojenik diyetler ile tedavilerde NLRP3 ve IL-1 β gen ekspresyonunun aşağı regülasyonu

gösterilmiştir, bu da metabolik düzenlemenin doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini değiştirerek iltihabı hafifletmek için çok önemli olduğunu düşündürür (Yang vd., 2019, Goldberg vd., 2017).

Her ne kadar artrosonografi veya polarizasyon mikroskobu ile tespit edilen MSU kristalleri gut artrit için kesin kanıtlar olsa da, gut artrit seyrinde NLRP3 inflamatuvar aktivasyonunun kesin moleküler mekanizması hala gizemli olup gut artritinin erken teşhisini ve tedavisini ciddi şekilde kısıtlamaktadır (Liu vd., 2023).

1.3. Proteazom İnhibitörü “Bortezomib”

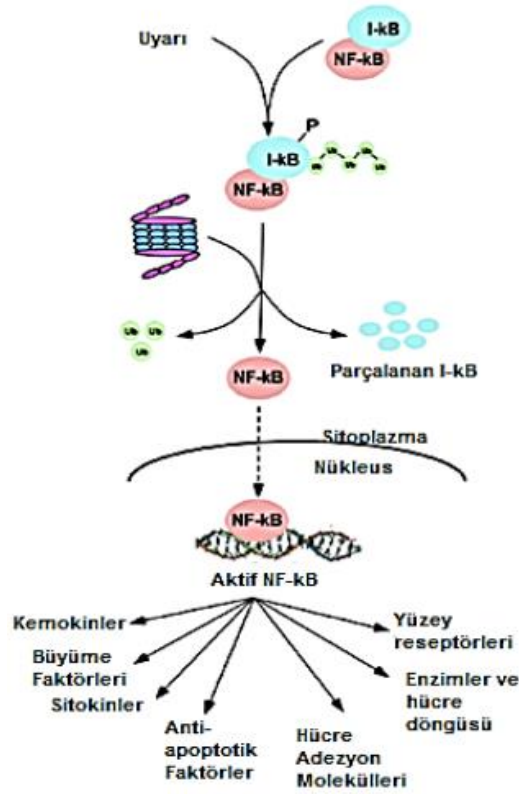
Proteazom, tüm ökaryotlar, bazı bakteriler ve arkeobakterilerde bulunan organizma ve hücrenin yaşamı için gerekli olan ve proteolitik aktivitesiyle intrasellüler proteinleri degrade eden bir enzim kompleksidir (Dilber, 2020; Mani ve Gelmann, 2005; Bladé vd., 2005). Proteazom tüm ökaryotlarda hem çekirdekte hem de sitoplazmada yüksek seviyelerde bulunur. Proteozomlar, treonin proteazlar olarak adlandırılan bir proteolitik enzim sınıfına aittir. Proteozomun yapısal olarak 26S proteazomu olmakla birlikte 2 ana bölümden oluşur; Ubikitin tanıma bölgelerini ve protein parçalanması için ATPazları içeren 19S düzenleyici başlıklar ile enzimatik aktiviteyi içeren 20S çekirdeğidir. Her simetrik halka, bir kanalın etrafına yerleştirilmiş yedi proteinden oluşur. Hücre içi homeostaz için çok önemli olan ve hücre içi proteinlerin %80-90'ını parçalamadan sorumlu olan ubikütin-proteazom sisteminin bir parçasıdır. Hasarlı proteinlerin parçalanması da dahil olmak üzere birçok hücre içi fonksiyona hizmet etmenin yanı sıra, inflamatuvar süreçleri, viral saçılımı, hücre döngüsünü, büyümeyi ve farklılaşmayı etkileyen birçok düzenleyici proteinin modülasyonundan da sorumludur. Proteazom inhibitörleri ayrıca çok sayıda hücre döngüsü inhibitör proteinini stabilize edebilir ve hücre döngüsünün durdurulmasına ve apoptoza neden olarak tümör gelişimini sınırlandırabilir. Daha önceleri hasarlı ve sorunlu proteinleri yok eden bir sistem olarak düşünülmüş olmasına rağmen, son veriler aynı zamanda birçok hücre fonksiyonunun kontrolünü sağlayan çok sayıda kritik proteinin devrinden ve düzenlenmesinden de sorumlu olduğunu göstermiştir (Elliott vd., 2003; Dilber, 2020; Hochstrasser, 1995; Ri, 2016; Ciechanover, 1994).

Proteazom, çeşitli tümör hücreleri ve normal hücrelerin de hücre çoğalmasının, apoptozunun ve farklılaşmasının kontrol edilmesinde önemli bir rol oynar. 26S proteazom aktivitesini inhibe eden bortezomibin birçok katı tümöre karşı in vivo ve in

vitro çalışmalarda belirgin etkileri vardır. 26S proteazomu, tüm ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında ve çekirdeğinde eksprese edilen multikatalitik bir enzim kompleksidir. Hücre döngüsünü, hücre yapışmasını, transkripsiyonu, apoptozu, MHC sınıf I molekülleri tarafından antijen sunumunu ve anjiyogenezi düzenleyen hücre içi proteinlerin hızlı bozunmasını katalize eden, lizozomal olmayan, ATP'ye bağımlı proteolitik yol için gerekli bir enzim kompleksidir. Sonuç olarak ubiquitin proteazom yolu çok sayıda hücre içi proteinin aktivitesini ve seviyesini düzenler (Elliott vd., 2003).

Ubikitin-proteazom sistemi, NF- κ B'nin aktivasyonunda çok önemli bir rol oynar. Dinlenme koşulları altında NF- κ B, sitoplazma içindeki I κ B ile bir kompleks içinde tutulur. Hücrelerin inflamatuvar sitokinler, TNF- α gibi proinflamatuvar faktörlerle uyarılması, I κ B'nin I κ B kinaz (IKK) kompleksi tarafından fosforilasyonunu indükler ve I κ B'nin 26S proteazomu tarafından ubiquitinasyona ve takiben degradasyonuna aracılık eder. NF- κ B, inhibitör kompleksten salınarak serbestleşir, çekirdeğe transloke olur ve ICAM-1, VCAM ve E-selektin dahil olmak üzere inflamatuvar yanıtta aracılık eden bir dizi geni işleminden geçirir. Bu yapışma molekülleri, dolaşımdaki lökositlerin iltihap bölgelerine toplanmasında rol oynar. Monositlerin iltihaplı endotel tabakasına yapışması sonrasında damar duvarına sızması, aterogenezdeki ilk basamaklardır. Ayrıca, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, vasküler endotelial hücrelerde adezyon molekülü ekspresyonuna yol açan yollar ile yakından ilişkilidir (**Şekil 1.4**) (Ludwig vd., 2009).

Proteazomun inhibisyonu, son yıllarda klinik olarak etkili bir antikanser terapötik yaklaşımı olarak ortaya çıkmıştır. Fare modelleri ve hücre kültürleri kullanılarak yapılan son araştırmalar, proteazom inhibitörlerinin hücre çoğalmasını (proliferasyonunu) düşürdüğünü, çoklu mekanizmalar aracılığıyla hematolojik ve solid malignitelere apoptozu indüklediğini, bu şekilde tümör büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir (Engür vd., 2016; Dou ve Li, 1999; Engür ve Dikmen, 2017). Tümör hücrelerindeki ubiquitin-proteazom yolağının inhibisyonu tümör proapoptotik ve supresör proteinlerin birikimine neden olmaktadır. Bu sebeple kanser tedavisinde bu yolağının hedef alınması geçerli bir seçenek olmakla birlikte son yıllarda proteazom inhibisyonu ilaç direnci ve kanser araştırmalarında önemli bir yere sahip olmuştur (Anderson, 2009; Catley vd., 2008). Proteazom inhibitörlerinin hayvan modellerinde veya Alzheimer hastalığı, amiyotropik lateral skleroz, otoimmün tiroid hastalığı, kaşeksi, greft reddi, hepatit B, inflamatuvar barsak hastalığı, sepsis ve sistemik lupus eritematozus gibi çok sayıda başka hastalıkta umut verici sonuçlar göstermiştir (Elliott vd., 2003).

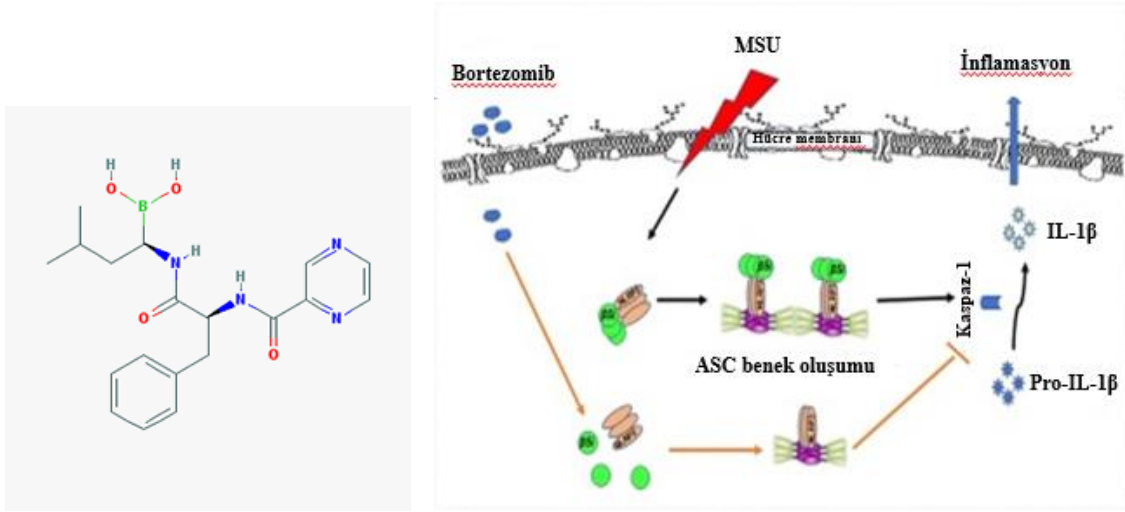


Şekil 1. 4. 26S proteazom kompleksi tarafından düzenlenmesi yapılan NF-κB'nin fonksiyonları (Frankland-Searby ve Bhaumik, 2012; Engür Öztürk, 2020)

Ubikitin-proteazom sisteminin inhibitörleri, proliferatif ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde yeni ve umut verici bir yaklaşım sunmaktadır. Antiproliferatif ve proapoptotik özelliklerinin ötesinde, proteazom inhibitörleri, inflamatuvar transkripsiyon faktörü nükleer faktör kappa B'nin (NF-κB) aktivasyonunu bloke etme yeteneklerine dayalı olarak güçlü antiinflamatuvar özellikler ortaya koymaktadır. Proteazom tarafından parçalanan diğer substratlar, birçok hastalık durumunda iltihaplanma sürecine dahil olan ilgili proteinlerin aktivasyonuna yol açar. Bu aktive edilmiş proteinlerin (NF-κB gibi transkripsiyon faktörlerinin) inhibisyonu, çok sayıda hayvan modelinde fizyolojik iyileşmelere yol açan inflamatuvar kaskadı başarılı bir şekilde hafifletebilir. Bu nedenle, proteazom inhibisyonu, inflamatuvar hastalıkların tedavisi için yeni bir yaklaşımı temsil etmektedir (Elliott vd., 2003; Meiners vd., 2008).

Bortezomib, klinik çalışmalarda en kapsamlı ve en çok değerlendirilen proteazom inhibitörüdür. Bortezomib, protein yıkımını kontrollü bir şekilde düzenleyerek hücrede oldukça önemli rol oynayan bir enzim kompleksi olan 26S proteazomun treonin kalıntısını geri dönüşümlü ve spesifik olarak inhibe eden yapısında bor içeren bir

moleküldür. Yüksek afinite ve özgüllüğüne ek olarak aynı zamanda proteozomun çok daha uzun süreli ve çok seçici inhibitörleridir. Bortezomib, çok çeşitli kanser hücre hatlarına karşı son derece yüksek etki göstermiştir. Proteozom inhibitörü bortezomib tarafından NF- κ B aktivitesinin inhibisyonu, multipl miyelom ve diğer hematolojik malignitelerde ön tedavi olarak kullanılmıştır. NF- κ B inhibisyonu, tümör sağkalımın ve büyümesinin önlenmesi, apoptozun indüklenmesi dâhil birçok çeşitli moleküler düzeyde etkinliğe sahiptir. Manto hücreli lenfoma ile Multiple myeloma (MM) tedavisinde klinik kullanım amacıyla Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış birinci nesil proteozom inhibitörü ailesinin üyesidir (Şekil 1.5) (Elliott vd., 2003; Engür vd., 2016; Engür Öztürk, 2020).



Şekil 1. 5. Bortezomibin molekül yapısı ve inflamazomdaki rolü (Chen vd., 2022'den uyarlanmıştır.)

Bortezomib protein degradasyonunda önemli rol oynayan 26S proteazomunu β -alt biriminin kimotripsin benzeri aktif bölgesini geri dönüşümlü olarak inhibe eder. Bu kompleksin inaktivasyonu, transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'nin inaktivasyonuna yol açar. Uyarılmamış hücrelerde düzenleyici protein İnhibitör kappa B (I κ B), NF- κ B'ye bağlanır ve böylece NF- κ B aktivasyonunu ve çekirdeğe translokasyonu inhibe eder. Bortezomib aktivitesi, MAP kinaz sinyal yolağını, Multipl miyelom (MM) hücre proliferasyonunu inhibe eder, kaspaz bağımlı apoptozu indükler ve NF- κ B'yi inhibe edip, adezyon molekül ekspresyonunu ve Multipl miyelom (MM) hücrelerinin kemik iliği stromal hücrelerine (BMSC'ye) bağlanmasının azalmasına yol açarak ortadan kaldırır (Bladé vd., 2005; Elliott vd., 2003; Zadeoğulları, 2010). Genel olarak bortezomib, sitokinlerin (IL-6 gibi), büyüme faktörlerinin (insülin benzeri büyüme faktörü gibi),

hücre adezyon moleküllerinin (hücre içi adezyon molekülü, vasküler hücresel adezyon molekülünün gibi) artan ekspresyonunu inhibe eder (Zadeoğulları, 2010; Adams, 2004).

Bir boronik asit dipeptidi olan proteazom inhibitörü bortezomib, nükleer faktör- κ B'nin aktivasyonunu bloke eder, böylece multipl miyelom hücre-BMSC bağlanmasının neden olduğu IL-6'nın yukarı regülasyonunu inhibe eder; aynı zamanda deksametazon, alkilleyici ajanlar ve antrasikline dirençli multipl miyelom hücrelerinde doğrudan apoptozu indükler ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) sekresyonunu ve ilişkili anjiyogenezi azaltır. Proteazom inhibitörlerinin hayvan modellerinde antianjiyogenik aktivite gösterdiği daha önce gösterilmiştir; ancak bortezomibin multipl miyelom hastasından türetilen endotel hücreleri üzerindeki antianjiyogenik etkileri tanımlanmamıştır (Elliott vd., 2003).

Bortezomibin kanser hücrelerini öldürme etkinliğinden çok sayıda mekanizmanın sorumlu olduğu belirlenmiştir. Bunlar arasında en bilinenleri; anjiyogenezin inhibe olması, hücre adezyonunun bozulması, endoplazmik retikulum stresinin aktivasyonu, sitokin bağımlı yaşam yollarının kesilmesi, antiapoptotik genlerin down-regülasyonu ile pro-apoptotik genlerin upregülasyonudur (Engür vd., 2015). Proteinleri parçalamaktan sorumlu hücresel yapılar olan proteazomların aktivitesini inhibe ederek çalışır.

2. GEREÇLER

2.1. Kullanılan Malzemeler

Penisilin/Streptomisin	Gibco, ABD
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma Aldrich, Almanya
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma Aldrich, Almanya
RPMI 1640 mediumu	ATCC, ABD
Ham's F12 medium (Ham's Nutrient Mixture F12)	Biochrom AG, Almanya
L-glutamin	Sigma Aldrich, Almanya
Eagle Minimum Essential Medium	Sigma Aldrich, Almanya
Tripsin-EDTA 10X Pan	Biotech, Almanya
Tripan mavisi	Roche, Almanya
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Invitrogen, Almanya
Bortezomib	BioChemica, Almanya
Monosodyum urat kristalleri (MSU)	Invivogen, Fransa
Cytofix/Cytoperm BD	Biosciences, ABD
Annexin V and PI Apoptosis Kit	Biotium, ABD
PE Active Caspase-3 Apoptosis Kiti	Biosciences, ABD
Mitokondriyal Membran Potansiyeli Belirleme Kiti	Biosciences, ABD
PE anti-human TNF- α (LOT:200049)	Beckman, ABD
PE anti-human IL-6 (LOT:2489227)	Invivogen, Fransa
PE anti-human IL-8 (LOT:2489227)	Invivogen, Fransa
PE anti-human IL-10 (LOT: 2265361)	Invivogen, Fransa
FITC anti-human IL-1 β Antibody	Biosciences, ABD
Forbol 12-miristat 13-asetat (PMA)	Sigma Aldrich, Almanya
Lipopolisakkarit (LPS) (KN: L4391)	Sigma Aldrich, Almanya
0.2 mL'lik PCR tüpü	Greiner Bio-One, ABD
10, 100, 1000 ve 5000 μ L'lik pipetör	Eppendorf, Kanada
10, 200, 1000 μ L'lik mikropipet ucu	Greiner bio-one, ABD
12 kanallı otomatik pipet	Axygen, İngiltere
15 ve 50 mL'lik santrifüj tüpleri	Isolab, Almanya
Thermo Flask, Filtreli Kapak (75 cm ²)	Thermo Scientific, ABD
Thermo Flask Filtreli Kapak (25 cm ²)	Thermo Scientific, ABD

2 mL'lik Ependorf tüp	Greiner bio-one, ABD
5-10 ve 25 mL'lik cam pipet	Isotherm, Türkiye
Cedex Smart Slide	Roche, Almanya
Parafilm	Pechiney, Fransa
Şarjlı pipetör	Starlab, Almanya
Kryotüp (2mL)	Greiner Bio-One, ABD
Hücre kazıyıcı	Greiner Bio-One, ABD
6 kuyucuklu hücre kültür plakası	TPP, İsviçre
16 kuyucuklu hücre kültür plakası	TPP, İsviçre
24 kuyucuklu ko-kültür plakası	Corning, ABD
96 kuyucuklu hücre kültür plakası	TPP, İsviçre
Corning® HTS Transwell® 24 kuyucuklu	Corning, ABD
0.4 µM por açıklığına sahip ko-kültür plakası	Corning, ABD
24 kuyucuklu ko-kültür plakası	Corning, ABD
96 kuyucuklu ko-kültür plakası	Corning, ABD
XCELLigence e-plate 16	Roche, Almanya
xCELLigence E-plate 96	Roche, Almanya
xCELLigence CIM-Plate 16	Roche, Almanya
The Oris™ Cell Migration Assay (CMA5.101)	Platypus Technologies, USA
Immunofluorescence Application Kit	Cell Signaling Tech., Hollanda

2.2. Kullanılan Cihazlar

HERAcell 150 Steril CO2 inkübatörü	Thermo Scientific, ABD
Laminer flow kabini	Heal Force, Çin
Masaüstü soğutmalı santrifüj	Eppendorf, Almanya
Otomatik hücre sayımı cihazı Cedex XS	Innovatis, ABD
Derin donduruculu buzdolabı	Altus, Türkiye
Cytation 3 Multi-Mode Reader	Bio-Tek, ABD
RTCA DP	Roche, Almanya
Hassas terazi	Ohaus, Avustralya
Inverted mikroskop	Leica, Almanya
Akış sitometri cihazı	BD Accuri, ABD
Mikro santrifüj	Hettich, Almanya

Otoklav	Alp, Türkiye
Otomatik pipetler	Eppendorf, Almanya
Sterilizatör	Nüve, Türkiye
Su banyosu	Nüve, Türkiye
Vorteks	Daihan, Güney Kore

3. YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Hücre Hatları

Çalışmamızda THP-1 (İnsan monositik hücreleri) (ATCC kodu; TIB-202™) ve HUVEC hücreleri (insan umbilikal ven endotel hücreleri) (ATCC kodu; CRL-1730™) kullanılmıştır. Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC'den) daha önce temin edilmiş olan ve Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Laboratuvarı'nın hücre kültürü stoklarında bulunan hücreler kullanılmıştır.

HUVEC hücreleri; ilk olarak 1984 yılında Hoshi ve arkadaşları tarafından, insan göbek bağı damarından izole edilerek stoklanan primer özellikli ve sağlıklı damar endotel hücreleridirler (Hoshi ve McKeehan, 1984; Jaffe vd., 1973; Varol, 2017). Hücrelerin yaklaşık olarak 2 katına çıkma zamanları 36 saattir. Endotel hücre fonksiyonlarını belirlemek amacıyla en sık kullanılan hücreler; HUVEC hücrelerdir (Çakiris, 2012).

THP-1 (İnsan monositik hücreleri) hücre hattı, akut monositik lösemili 1 yaşındaki Japon erkek hastadan elde edilmiş monositik hücre hattıdır. Işık mikroskopisinde yuvarlak, büyük ve tek tek hücreler şeklinde görünmektedir. Hücrelerin yaklaşık olarak 2 katına çıkma zamanı 35-50 saattir (Çakiris, 2012).

3.2. Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu

Deneylerde kullanılan malzemeler, tek kullanımlık ve sterildir; kontaminasyonun oluşmaması için kapak bölümleri alüminyum folyoyla sarılmış şekilde, metal ve cam malzemelerin sterilizasyonu amacıyla kuru hava sterilizatöründe 180°C'de 2 saat, pipet uçları ve sıvı solüsyonlar için de 121°C, 1,5 atm basınçta otoklavda 20 dk arındırma işlemleri yapılmıştır. Otoklavlanamayacak sıvılar için ise 0,22 mikron por çapında tek kullanımlık filtreler kullanılmıştır.

3.3. Monosodyum Ürat Kristalleri

Monosodyum ürat (İnvivogen ve CAS No: 1198-77-2) için çözücü olan Fosfat tamponlu salin solüsyonu (PBS) kullanılarak 5mg/ml ana stok ile 100 µg/ml ve 200 µg/ml ara stoklar hazırlanmıştır. Ana stok alikvatlanarak -20 °C'de saklanmıştır. Uygun miktarda PBS ekleyerek dilüsyonlar hazırlanmıştır ve her kullanımdan önce vortekslenmiştir. Araştırmamızda THP-1 hücreleri MSU ile muamele edilerek inflamasyon oluşturulması sağlanmıştır.

3.4. Bortezomib

Bortezomib (BioChemica-A7737, Almanya) çözücüsü olan dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak 100 mM ana stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok alikvatlanarak -80 °C'de saklanmıştır. Hücre kültüründe uygulanacak olan bortezomibin çalışma konsantrasyonları ana stoktan uygun miktarlarda seyreltmelerle taze olarak hazırlanmıştır.

3.5. THP-1 İnsan Monositik Hücrelerinin Çoğaltılması

İnsan monositik hücreleri (THP-1); %95 bağıl nem, %5 CO₂, 37°C'de, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin (100 U/ml penisilin ve 100 mg/ml streptomisin) içeren RPMI-1640 medyumlu kültür ortamında çoğaltılmıştır.

Sıvı azotta saklanan THP-1 hücre hattı içeren kriyo tüpler çıkarıldıktan sonra 37°C'deki su banyosuna konulup eritildikten sonra 15 ml'lik falkona aktarılmıştır. Üzerine yavaşça kültür medyumunu eklenip 1500 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası medyum uzaklaştırılmış ve %10 serum içeren taze medyumda flaslara dağıtılmıştır. Hücre hattı 37°C'de 5% CO₂ içeren inkübatörlerde kültüre edilmiştir. Hücreler günlük olarak ışık mikroskopunda incelenerek flaskta %70-80 oranında hücre yoğunluğuna ulaştıktan sonra pasajlanarak büyümesi sağlanmıştır. Süspansiyon kültür ortamı falkona alınarak 1250 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve hücrelerin üzerine taze medyum eklenmiştir. Homojen dağılımı sağlanacak şekilde karıştırılıp hücre sayım cihazında (Cedex, Roche) sayımları yapılmış ve hücre canlılıkları hesaplanarak besiyeri içinde THP-1 hücrelerinin flaslara pasajı yapılmış ya da deneye alınmıştır (Karakuş, 2016).

3.6. HUVEC -İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücrelerinin Çoğaltılması

HUVEC hücreleri; %95 bağıl nem %5 CO₂, 37°C'de, %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin (100 U/ml penisilin ve 100 mg/ml streptomisin) içeren Ham's F-12 medyumlu kültür ortamında çoğaltılmaktadır.

Sıvı azotta saklanan HUVEC hücre hattı içeren kriyo tüpler çıkarıldıktan sonra 37°C'deki su banyosuna konulup eritildikten sonra 15 ml'lik falkona aktarılmıştır. Üzerine yavaşça kültür medyumunu eklenip 1250 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası medyum uzaklaştırılmış ve %10 serum içeren taze medyumda 5x10⁵ hücre içerecek şekilde 25 cm² 'lik flaslara dağıtılmıştır. Hücre hattı 37°C'de 5% CO₂ içeren inkübatörlerde kültüre edilmiştir. Hücreler günlük olarak ışık

mikroskobunda incelenerek flaskta %70-80 oranında hücre yoğunluğuna ulaştıktan sonra pasajlanarak büyümesi sağlanmıştır. Flaskların üzerindeki medyum çekilip daha önce 37°C'deki su banyosunda ısıtılmış 5 ml PBS ile yıkanmış, sonra tripsinizasyona (Tripsin-Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)) maruz bırakılarak bu yapışkan özellikteki hücrelerin flaskın yüzeyinden sökülmesi sağlanmıştır. Sonra flaskın üzerine daha önce 37 °C'deki su banyosunda ısıtılmış medyum eklenip 1250 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve hücrelerin üzerine medyum eklenmiştir. Homojen dağılımı sağlanacak şekilde karıştırılıp hücre sayım cihazında (Cedex, Roche) sayımları yapılmış ve hücre canlılıkları hesaplanarak besiyeri içinde HUVEC hücrelerinin flasklara pasajı yapılmış ya da deneye alınmıştır (Karakuş, 2016).

3.7. Hücrelerin Mikroskobik Ortamda İncelenmesi

THP-1 ve HUVEC hücrelerinin canlılıkları invert mikroskop aracılığıyla deneylerin her aşamasında kontrol edilmiştir.

3.8. Hücrelerin Cedex Cihazında Sayımı

Hücre kültürü aşamalarında kuyucuklara hücrelerin eşit dağıtılması için hücreler sayılarak ekim yapıldı (Kösem, 2018). Hücrelerin canlılıkları ve sayımları otomatik hücre sayım cihazında (Cedex XS, Roche) Software 1.0.3 programı kullanılarak belirlenmiştir (**Şekil 3.1**).

Flasklarda bulunan HUVEC ve THP-1 hücreleri PBS ile yıkanmıştır. HUVEC hücreleri adhere hücre oldukları için flasktan 1X tripsin-EDTA ile kaldırılırken, THP-1 hücreleri süspansiyon olmaları sebebi ile flasktan direk santrifüj tüpüne alınmışlardır. Santrifüj sonrasında hücre pelleti 1 mL besiyeri içinde homojen olarak seyreltikten sonra 10 µL tripan mavisi solüsyonu ile 10 µL hücre süspansiyonu 10 sn homojen bir şekilde karıştırılmış sonrasında Cedex lamına (smart slide) bu karışımdan 10 µL aktarılmıştır. Hücre sayım cihazı (Cedex, Roche) ile cihaz protokollerine göre hücrelerin sayım işlemi gerçekleştirildikten sonra, seyreltme oranları göz önüne alınarak hesaplamalar yapılmış ve uygun sayılarda canlı hücreler ekilerek deneysel yöntemler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 1. Hücre sayım cihazı (Cedex, Roche)

3.9. THP-1 ve HUVEC Hücrelerinde MTT Yöntemi İle Sitotoksosite Deneyleri

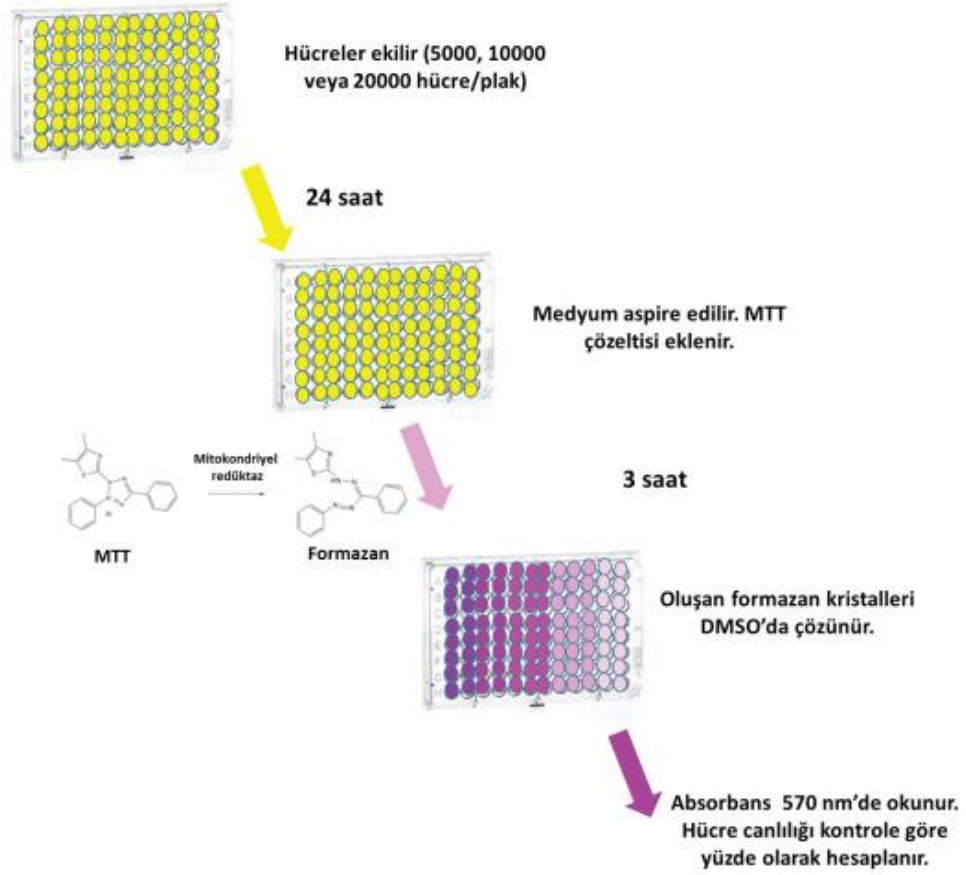
MSU ve bortezomibin HUVEC ve THP-1 hatlarındaki hücre canlılığı üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) yöntemi kullanılmıştır.

Günümüzde sitotoksosite, hücre canlılığı ve hücre proliferasyonunun belirlenmesi için birçok yöntem kullanılmaktadır. Günümüzde hücre proliferasyonu, hücre canlılığı ve sitotoksosite belirleme metodlarından en sık kullanılanı MTT analizidir. *İn vitro* koşullarda hücre canlılığını, metabolizmasını ve sitotoksositeyi belirlemek için uygulanan bu test kantitatif ve kolorimetrik bir yöntemdir (Dikmen, 2017). 1983'te Mosmann tarafından geliştirilen bu yöntem, hücre canlılığı analizlerinin "altın standardı" olarak bilinmektedir. MTT sarı renkli bir formazan tuzdur. Prolifere olan hücreler mitokondriyel dehidrojenaz enzim aktivitesinin artmasıyla, MTT'yi suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüştürür. Bu formazan kristalleri izopropil alkolde veya DMSO'da çözünmektedir. Hücre metabolik aktivite gösterdiğinde daha çok mitokondriyal enzime bulunur ve daha çok tetrazolin tuzunu indirgeyeceği umulur. Formazan kristal oluşumunun daha fazla olduğu kuyularda daha koyu mor renk görülürken daha az olduğu kuyularda ise açık mor rengi görülmektedir. Çözücü (DMSO veya izopropil alkolde) ilavesi ile formazan kristallerinin yoğunluğuna bağlı olarak oluşan renk skalasına göre ölçüm yapılmaktadır. Formazan kristali, ölü hücrelerin varlığında oluşmamaktadır. Bu indirgenme sadece mitokondrial redüktaz enzimi aracılığıyla gerçekleştiği için canlı hücre sayısı formazanın oluşum miktarı ile doğru orantılıdır. Ardından spektrofotometrik olarak hücre canlılığı belirlenir ve kontrol grubu hücrelerinin canlılık değeri %100 kabul edilerek, madde uygulaması yapılan hücrelerin

canlılık değeri yüzde (%) olarak belirlenir (Mosmann, 1983; Erkekoğlu vd., 2021; Kalkan vd., 2016; Kısmalı ve Sel, 2012; Karakuş, 2016; Tokur ve Aksoy, 2007; Salman, 2018).

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{örneğin absorbans değeri}}{\text{kontrolün absorbans değeri}} \times 100$$

Hücreler Cedex (Roche) cihazında sayılmış ve 96 kuyucuklu plakalara (5×10^3 hücre/ kuyucuk) HUVEC ve THP-1 hücreleri ekildikten sonra taze besiyeri ile %5 CO₂ ve 37°C altında hücreler inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücrelerin medyumunu uzaklaştırılarak (THP-1 hücrelerinde uzaklaştırmadan) yerine; aynı plaka ve kuyucuklar kullanılarak MSU (100 µg/ml ve 200 µg/ml) ve bortezomibin farklı konsantrasyonlarını (10 nM, 100 nM, 1 µM, ve 10 µM) içeren medyumlar ilave edilmiştir (HUVEC hücreleri için n konsantrasyonda, THP-1 hücreleri için 2n konsantrasyonda hesaplanmıştır). Kontrol grubundaki hücelere de %0.2 oranında DMSO içeren besiyeri uygulanmıştır. Çalışma solüsyonları her çalışma için yeniden hazırlanarak kullanılmıştır. Hücreler; 24 veya 48 saat süreyle %5 CO₂ ve 37°C altında inkübasyona bırakılmıştır. Her bir inkübasyon süresi sonunda, madde içeren medyum hücrelerden uzaklaştırılmış ve hücreler yeni medyum ortamında stok MTT çalışma solüsyonundan (0.5 mg/mL, HUVEC hücrelerine 10 µL, THP-1 hücrelerine 20 µL) ilave edilerek 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından, MTT çözeltisi içeren medyum ortamı hücrelerden uzaklaştırılarak (HUVEC hücreleri adhere oldukları için kuyucuklar direkt boşaltılarak; THP-1 hücreleri ise süspanse oldukları için kuyucuklar santrifüj edildikten sonra boşaltılarak), her kuyucuktaki hücrelerin üzerine çözücü olarak 100 µL DMSO ilave edilerek ve 15 dk beklendikten sonra mikropilaka okuyucuda 540 nm dalga boyunda oluşan renk değışimlerinin optik yoğunlukları (absorbansları) okutulmuştur (**Şekil 3.2**). Elde edilen absorbans değeri, hücrelerin metabolik aktivitelerini verir ve bu değeri de yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmiştir. Sonuçlar aşağıdaki hücre canlılık formülüne göre hesaplanıp % olarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler ile grafikler oluşturulmuştur. Deneyler, birbirinden bağımsız olarak 3 kez gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 2. MTT deneyinin uygulamasının şematize edilmesi (Erkekoğlu vd 2021)

3.10. THP-1 Hücrelerinde MSU Kristalleri Aracılı İnflamatuar Etkinin Belirlenmesi

THP-1 hücrelerinde MSU kristallerinin inflamasyonun oluşup oluşmadığını belirlemek için MSU ile 24 saat muamele edilen THP-1 monosit ve THP-1 makrofaj hücrelerinde flow sitometride IL-1 β ölçümleri yapılmıştır.

THP-1 makrofaj hücreleri, THP-1 monosit hücrelerinin Forbol 12-miristat 13-asetat (PMA) (Katalog No: P8139, Sigma) ile farklılaştırılması ile elde edilmiştir. Bunun için THP-1 insan monosit hücreleri, 100 ng/mL PMA (%1 serumlu besiyeri içerisinde) ile 24 saat inkübasyona bırakılarak, makrofaj hücrelerine farklılaştırılmıştır. Deneylerden önce PMA'lı medyum ortamdan uzaklaştırılarak, hücreler 24 saat normal besiyerinde inkübasyona bırakılmıştır.

Daha sonra 6 kuyucuklu plakada 500.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde kültüre edilmiş olan THP-1 monosit veya makrofaj hücreleri 100 μ g/ml ve 200 μ g/ml MSU konsantrasyonları ile 24 saat kültür şartlarında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon

sonunda NLRP3 inflamazom aktivasyonunun bir belirteci olan IL-1 β sitokin düzeyleri akış sitometri cihazı ile belirlenip analiz edilmiştir.

Çalışmada LPS (Katolog No: L4391, Sigma) inflamasyon etkeni olduğu için pozitif kontrol amaçlı kullanılmıştır. Lipopolisakkaritler gram-negatif bakterilerin hücre duvarının karakteristik bileşenleridir. Böylece MSU konsantrasyonlarının inflamatuvar etkisi LPS ile karşılaştırılarak ileri deneylerde kullanılacak inflamatuvar etkili MSU konsantrasyonu belirlenmiştir (Zhang vd., 2014).

3.11. Xcelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA DP) Ko-Kültür Ortamında Hücre Proliferasyon Deneyi

Çalışmamızda MTT yöntemiyle seçilmiş olan bortezomibin konsantrasyonlarının, MSU ile indüklenen/indüklenmeyen THP-1 monosit hücreleri ile HUVEC hücrelerinin ko-kültüre edildiği ortamda endotel hücre proliferasyonuna etkileri gerçek zamanlı analiz sistemince araştırılmıştır. HUVEC hücre proliferasyonu üzerine etkileri RTCA DP sistemi kullanılarak gerçek zamanlı bir şekilde kaydedilmiştir.

RTCA ile hücre çoğalması, migrasyon, invazyon, sitotoksosite ve ko-kültür çalışmaları yapılabilmektedir. xCELLigence RTCA DP cihazı ile hücre sayısı, hücre morfolojisi, hücre bağlanması gibi parametreler elektriksel empedansa dayalı ölçümlerle hesaplanabilmektedir. RTCA-DP cihazı, altın elektrotlar ve hassas sensörler içeren özel plakaların (e-plate) tabanına hücrelerin tutunmasıyla oluşan elektriksel sinyali, belirlenen ölçüm aralıklarında ekrana aktarması yöntemiyle devamlı ve gerçek zamanlı veriler oluşturan bir cihazdır. Hücreler elektronik plakaya ekildikten sonra hücre indeksinin uygun düzeye gelmesi için inkübasyona bırakılır. İstenen aralıklarla e-plakadan cihaza aktarılan veriler, literatürde birimsiz “cell index (CI)” (hücre indeksi) olarak kabul edilen bir değer olarak hesaplanır. Hücre indeksi her hücrede farklı şekilde ve sürede artıp azalabilir (Görgülü, 2019; Dikmen vd., 2017; Bird ve Kirstein, 2009). E plaka kuyucuklarındaki hücrelerde proliferasyon arttıkça cihaza aktarılan sinyaller de paralel olarak artmaktadır (Artun, 2018; Limame vd., 2012).

xCELLigence (ACEA Biosciences, San Diego, CA ve Roche Applied Science, Mannheim, Almanya) sistemi; gerçek zamanlı empedans tabanlı hücre analizörü, RTCA tek plaka yapısı ile entegre yazılım programını da içeren RTCA bilgisayarı ve tek kullanımlık bir e-plaka olmak üzere dört ana bileşenden meydana gelmektedir (Ke vd., 2011). Elektrodlu e-plakaların zemininde yer alan mikro-elektrodlar aracılığıyla

İnsertlere de henüz E-plate ile birleştirilmeden önce, THP-1 hücreleri 50.000 hücre/kuyucuk (100 µl) olacak şekilde ekilmiştir etüvde inkübasyona bırakılmıştır. E-plate insert, bir insert bölümü (efektör hücrelerin ko-kültür için ekildiği) ve alt veri alıcı bir plaka (hedef hücrelerin proliferasyonu belirlenmek için ekildiği) ve bir plaka kapağı içerir (**Şekil 3.3**). İnsert kuyularının alt bölümünde ise ko-kültür hücrelerinin birbirine karışmasını engellemek için bir mikro gözenekli polietilen tereftalat (PET) membran yer almaktadır (Bird ve Kirstein, 2009; Engür Öztürk, 2020).

HUVEC hücrelerin uygun hücre indeks değerlerine cihazda belirlendikten sonra, cihaz durdurulmuş alt plakada bulunan HUVEC hücreleri üzerine bortezomib konsantrasyonları (5 µM; 1 µM; 0,1 µM; 0,05 µM) uygulanmıştır. Ko-kültür sürecine hazır olan insert içinde bulunan THP-1 hücreleri üzerine de 200 µg/ml MSU ilave edilmiştir ve e-plate HUVEC hücreleri ile birleştirilmiştir. Ko-kültür ortamında e-plateler cihaza tekrar yerleştirildikten sonra program kaldığı yerden saatte 1 ölçüm alacak şekilde tekrar başlatılmıştır. Her bir kuyudaki elektrodlar aracılığıyla HUVEC hücre proliferasyonu belirli aralıklarla kaydedilen “Cell Index” değerlerine göre analiz edilmiştir (Kaya, 2014; Engür Öztürk, 2020). RTCA DP ile elde edilen hücre indeks değerlerine göre MSU ile indüklenen inflamasyonlu ortamda HUVEC hücrelerinde bortezomibin 48. saatteki IC₅₀ değeri RTCA DP Software 1.2.1 programı kullanılarak hesaplanmıştır (Çakiris, 2012; Varol, 2017; Engür Öztürk, 2020).

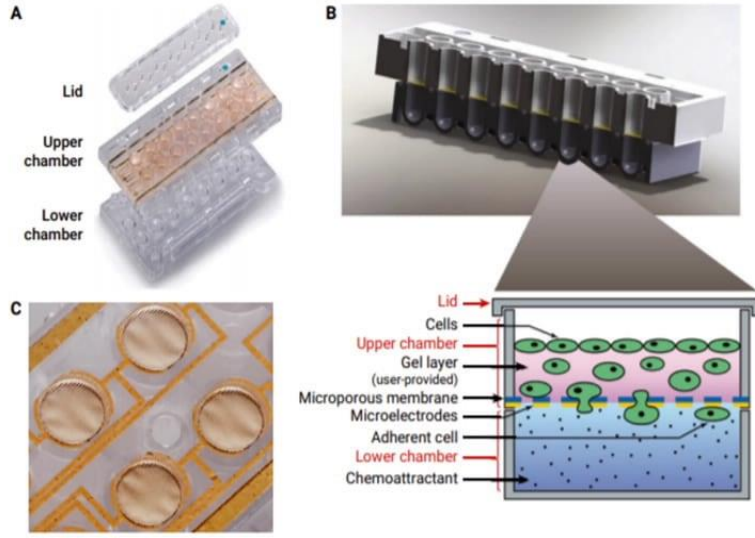
HUVEC + THP-1 Ko-Kültür hücre grupları:

- ✓ Kontrol grubu: HUVEC+THP1 hücreleri (sadece medyum)
- ✓ HUVEC + THP-1 + MSU (200 µg/ml)
- ✓ HUVEC + THP-1 + MSU + Bortezomib (0.05 µM)
- ✓ HUVEC + THP-1 + MSU + Bortezomib (0.1 µM)
- ✓ HUVEC + THP-1 + MSU + Bortezomib (1 µM)
- ✓ HUVEC + THP-1 + MSU + Bortezomib (5 µM)

3.12. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA DP) Migrasyon Deneyi

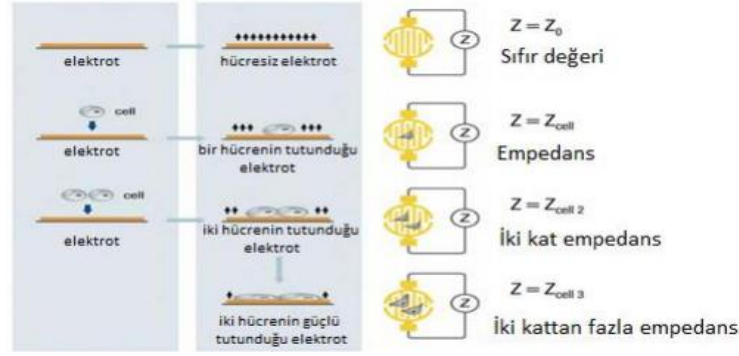
Anjiyojenezin gerçekleşmesi için endotel hücrelerinin göç etmesi gerekmektedir. Bu nedenle bortezomibin sitotoksik olmayan dozlarının HUVEC hücre migrasyonu üzerine etkileri, RTCA DP sistemine uygun şekilde tasarlanan 16 kuyucuklu plakalar (CIM-16) ile belirlenmiştir. CIM-16 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) kodlu bu plakalar; 3 parça ve 2 bölümden oluşmaktadır (**Şekil 3.4**). En altta bulunan

parçaya hücre hattının serum içeren besiyeri, altın kaplı elektrotlar bulunan orta parçaya ise serum içermeyen besiyeri içerisinde hücreler eklenmektedir. Hücrelerin içinde buldukları serumsuz besiyeri ortamından, alt odacığıdaki serumlu besiyeri ortamına geçişleri amaçlanır. Migrasyonu hızlı olan hücreler daha çok alt odacığa geçerek çoğalma eğilimi gösterirler ve geçiş esnasında cihaz tarafından sinyal alınır (Şekil 3.5 ve 3.6) (Bird ve Kirstein, 2009; Kaya, 2014; Engür Öztürk, 2020).



Şekil 3. 4. CIM Plakasına Genel Bakış

(A) CIM-Plaka bileşenleri. (B) CIM-Plaka detayı. Genişletilmiş görünüm, tek bir kuyucuk için üst ve alt bölmeleri gösterir. Üst bölmenin alt yüzeyi, hücrelerin içinden geçebileceği mikro gözenekli bir zardan oluşur. Bu zarın alt tarafındaki altın elektrotlar, yapışık hücrelerin varlığını tespit eder. (C) Altın biyosensörler, PET mikro gözenekli bir membrandan oluşan üst bölmenin alt yüzeyine kaplanmıştır. (<https://www.agilent.com/en/product/cell-analysis/real-time-cell-analysis/rtca-microplates/rtca-cim-plates>).



Şekil 3. 5. RTCA DP Cihazının Çalışma Prensibi (Kaya, 2014)

Migrasyon çalışması için CIM plakasının alt odacıklarına 160 μ L serumlu medyum eklenmiş ve üst odacık ile alt odacık bir hamle de birleştirilmiştir. Ardından üst odacıklara 20 μ L serumsuz medyum ilave edilmiştir. CIM plakalar 1 saat boyunca 37°C'de etüvde inkübasyona bırakıldıktan sonra cihazda ilk ölçüm alınmıştır. Ölçüm alınmasını takiben her üst kuyucuğa HUVEC hücresi (2×10^4 hücre/kuyucuk) ekilmiştir ve hazırlanan bortozomib konsantrasyonları (5 μ M; 1 μ M; 0,1 μ M; 0,05 μ M) serumsuz besiyerinde uygulanmıştır. Ardından cihaza CIM plakalar yerleştirilmiş ve 24 saat boyunca 10 dk'da bir ölçüm olacak şekilde cihaz programlanmıştır (Varol, 2017; Kösem, 2018; Engür Öztürk, 2020; Kaya, 2014).

HUVEC hücre grupları;

- ✓ Kontrol grubu: HUVEC (sadece medyum)
- ✓ HUVEC + Bortezomib (0.05 μ M)
- ✓ HUVEC + Bortezomib (0.1 μ M)
- ✓ HUVEC + Bortezomib (1 μ M)
- ✓ HUVEC + Bortezomib (5 μ M)



Şekil 3. 6. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) DP sistemi ve CIM-plate (16 kuyucuklu) plakanın parçaları (Varol, 2017)

Migrasyonun Morfolojik Analizi

HUVEC hücre migrasyonunun, görsel olarak da belirlemesi için *The Oris™ Cell Migration ölçüm kiti* kullanılmıştır. Kit içeriğinde, hücre ekimi yapılırken tüm 96'lık kuyucuklarda aynı orta noktanın boş kalmasını sağlayan Oris™ Cell Seeding Stoppers ile birlikte bulunan özel bir plaka mevcuttur. Ekim yapıldıktan sonra kitin içinde bulunan Oris™ Stopper Tool isimli özel bir tarak ile stopperlar (tıpalar) çıkarıldıktan sonra, her kuyucukta hücreler için göç edebileceği eşit bir alan oluşmaktadır. İnkübasyon süreleri sonunda kuyucukların görüntüleri alınıp boş alana göç eden hücrelere göre migrasyon analizi yapılır (Kaya, 2014; Ravi vd., 2013).

HUVEC hücreleri flastktan kaldırılarak hücre sayımı Cedex XS cihazı ile yapılmıştır. Her kuyucukta %1 FBS içeren 100 µl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 96'lık özel plakada her kuyucukta yer alan stopperın kenarında oluşan dış halka şeklindeki bölgesine ekilerek 37°C'de hücrelerin plaka tabanına yapışmasına izin verilmiştir. Hücreler ekilerek 24 saat yapışmalarına müsaade edildikten sonra, Oris™ Stopper Tool yardımıyla stopperlar dikkatlice plakadan çıkarıldı. Kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırılmış ve PBS ile kuyucuklar yıkanmıştır. Bortezomib konsantrasyonları (5µM; 1µM; 0,1µM; 0,05µM) 100 µl serumsuz besiyeri içerisinde kuyucuklara dağıtılmıştır. Plakadaki hücreler 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. 24. saatte Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader ile kuyuların fotoğraf çekimleri yapılmıştır. Gruplara ait fotoğraf görüntüleri bulgular kısmında verilmiştir (Kaya, 2014; Ravi vd., 2013; Bartak vd., 2022).

3.13. İnflamasyon Ortamında HUVEC Hücrelerinde Çizik (Yara İyileşme) Deneyi

Yara iyileşme deneyi, hücre göçünü ve hücre-hücre etkileşimini incelemek için kullanılan bir laboratuvar tekniğidir. Aynı zamanda çizik deneyi olarak da bilinir, çünkü hücre tek tabakası üzerinde çizik yapılır ve mikroskopla düzenli aralıklarla görüntü yakalanır. Özellikle bir hücre tabakasının hücre göçünü yarı kantitatif olarak ölçmek için hücre göçü yaklaşımıdır. Çizik; mekanik, termal veya kimyasal hasar gibi çeşitli yaklaşımlarla yapılarak hücrelerin kapatması için hücresiz bir alan oluşturmaktır.

Bu deneyle inflamasyonlu ortamda (MSU uygulanmış THP-1 monosit hücrelerini içeren ortamda) bortezomib uygulanan gruptaki hücrelerin migrasyon değişimi tespit edilmiş ve yara kapanma durumları gözlemlenmiştir.

HUVEC hücreleri %90-100 konfluense ulaşan hücreler 200 µL'lik bir pipet ucuyla çizilerek hücre hatları üzerinde yara iyileştirme kapasitesi araştırılmıştır. MSU ile inflamasyon oluşturulmuş THP-1 monosit hücreleri ile bortezomib konsantrasyonları (5 µM; 1 µM; 0.1 µM; 0.05 µM) uygulanan HUVEC hücrelerinin ko-kültür ortamında 0. ve 24. saatlerdeki yara iyileşme durumları invert mikroskop altında gözlemlenmiş ve fotoğrafları alınmıştır

Bu amaçla, 24 kuyulu plakalara ekilen HUVEC hücreleri (5×10^4 hücre/kuyucuk) 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından steril bir 200 µL'lik bir pipet ucu yardımıyla hücre tabakası düz bir şekilde çizilmiş ve besiyeri uzaklaştırılmıştır. Yapışmayan ve kalkan hücreleri ortamdan uzaklaştırmak için PBS ile kuyular nazikçe yıkanmış ve taze besiyeri içinde bortezomib konsantrasyonları (5 µM; 1 µM; 0.1 µM; 0.05 µM) uygulanmıştır ve Kuyuların 0. saatteki fotoğrafları çekilmiştir. Bu kuyulara, daha önceden 25×10^5 THP-1 hücre/kuyucuk olarak ekilmiş ve MSU (200 µg/ml) ile 24 saat stimüle edilmiş monosit içeren insertler hemen yerleştirilmiştir. Ko-kültür plakaları 24 saat 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakılmış ve 24. saatlik inkübasyon sonunda insertler uzaklaştırılarak HUVEC hücrelerinin çizikli fotoğrafları çekilerek, yara kapanmada hücrelerin migrasyon durumları invert mikroskop altında gözlemlenmiş ve fotoğrafları alınmıştır (Alkaya, 2022; Chen vd., 2021).

3.14. Akış Sitometride Annexin V-PI Yöntemi ile Apoptotik Etkinin Belirlenmesi

Flow sitometre lazer kaynaklı florometre ile parçacık ışık yayılımı analizi bileşiminden oluşur. Flow sitometrede farklı moleküller, hücreler ve parçacıklar, düşük ve dik açılı ışık yayılımı kullanılarak büyüklük ve şekil olarak ayrılabilir. Bu hücreler, moleküller veya parçacıklar özel floresan işaretleyicilerle veya boya işaretli antikorlarla işaretlenebilir. Flow sitometri yardımıyla, floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozun belirlenmesi açısından kullanışlıdır (Güleş ve Eren, 2008).

Floresan mikroskopi çalışmaları, hücre kültürü çalışmasında kullanıldığında, canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanır. Bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozla veya nekroz ile ölüp ölmediklerinin ayırımı, nukleus morfolojisine bakılarak yapılır. Membran lipidlerinden

biri olan fosfatidilserin (PS) canlı hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde bulunmamaktadır. Apoptotik hücrelerde hücre zarında meydana gelen değişiklikler ile birlikte hücre apoptoza giderse; sağlıklı hücre zarlarının iç kısmında bulunan fosfatidilserinler hücre zarının dış yüzüne transloke olarak hücrenin dış kısmına çıkmaktadır. Bu translokasyon, hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde gerçekleşir. Hücre membranının dış yüzeyine yerleşen PS'ye bağlanan Annexin-V, floresan bir maddeyle işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilmektedir. Propidyum iyodid (PI) ise, çift sarmallı RNA ya da DNA'ya bağlanmasından dolayı membran yapısı bozulduğu geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin tespitinde kullanılmaktadır (Zhang vd., 1997; Kopman vd., 1994; Gatti vd., 1998). Annexin V-FITC (green fluorescence- Floresan izotiyosiyanat) ve non-vital boya olan propidium iodide (red fluorescence) ile aynı zamanda boyanan hücreler, canlı hücreler (Annexin V - /PI-), erken apoptotik hücreler (Annexin V+ / PI-), geç apoptotik hücreler (Annexin V+ / PI +) ve nekrotik hücrelerin (Annexin V- /PI +) birbirinden ayırt edilmesine izin verir (Dikmen, 2017; Overbeeke vd., 1998).

2D Kültür için:

HUVEC hücreleri besiyeri ortamında, %5 CO₂, 37°C'de inkübatörde kültüre edilmiştir. Hücrelerin yeterince çoğalması beklendikten sonra hücre sayımı yapılarak HUVEC hücreleri 24 kuyucuklu plakaya besiyeri ortamında hücre 2x10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler 24 saat inkübasyona bırakılarak zemine tutunmaları sağlanmıştır. İnkübasyondan sonra plakadaki HUVEC hücrelerine bortezomib konsantrasyonları (5 µM; 1 µM; 0.1 µM; 0.05 µM) ve 200 µg/ml MSU uygulanmıştır. Daha sonra HUVEC hücreleri plakası 48 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücre sitometrisinde gerekli ölçümler kit prosedürleri uygulanarak yapılmıştır.

HUVEC hücre grupları:

- ✓ HUVEC (Kont. medyum)
- ✓ HUVEC + MSU (+)
- ✓ HUVEC + MSU+ Bort. 0,05 µM
- ✓ HUVEC + MSU+ Bort. 0,1 µM
- ✓ HUVEC + MSU+ Bort. 1 µM
- ✓ HUVEC + MSU+ Bort. 5 µM

Ko-Kültür için:

Ko-kültür çalışmalarında 2 hücrenin aynı ortamda yaşayabilmesi için alt ve üst odacıkları birbirinden ayıran 0.4 µm çapta gözenekleri bulunan bir zar içeren özel ko-kültür plakaları kullanılmıştır. Alt odacığa HUVEC hücreleri ve üst odacığa THP-1 monosit hücreleri belirli sayılarda ekimi yapılarak ko-kültür modeli oluşturulmuştur. Deneyler 24 kuyucuklu ko-kültür plakası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneylerde paralelliğin sağlanması için; her deneyde alt odacığa ekilmiş olan HUVEC hücre sayısının 5 katı miktarda THP-1 hücresi üst odacığa ekilmiştir. Bu doğrultuda 24 kuyucuklu plakalarda üst odacıkta THP-1 hücre sayısı 10^6 iken alt odacıkta HUVEC hücresi 2×10^5 olarak ekilmiştir.

HUVEC hücreleri 24 kuyucuklu plakaların alt odacığında besiyeri ortamında hücre 2×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler 24 saat inkübasyona bırakılarak zemine tutunmaları sağlanmıştır. Aynı şekilde insert (üst kuyucuk) plakaya THP-1 hücre sayısı 10^6 olarak ekilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra alt plakadaki HUVEC hücrelerine bortezomib konsantrasyonları (5 µM; 1 µM; 0.1 µM; 0.05 µM) uygulanmıştır. Daha sonra THP-1 içeren üst plaka, HUVEC içeren alt plaka ile birleştirilerek ko-kültür ortamı elde edilmiş ve THP hücreleri üzerine MSU (200µg/ml) uygulanarak ko-kültür plakası 48 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

HUVEC hücre grupları:

- ✓ HUVEC +THP (Ko-Kültür Kont.)
- ✓ HUVEC + THP + MSU(+)
- ✓ HUVEC + THP + MSU(+) Bort. 0,05 µM
- ✓ HUVEC + THP + MSU(+) Bort. 0.1 µM
- ✓ HUVEC + THP + MSU(+) Bort. 1 µM
- ✓ HUVEC + THP + MSU(+) Bort. 5 µM

Bu çalışmada apoptotik etkinin belirlenmesi amacıyla Annexin-V Apoptosis Detection Kit (Katolog no: 556547, BD) kullanılmış ve kit protokolü uygulanmıştır. Çalışmada yukarıda açıklanan 2D kültür ve ko-kültür deney seti oluşturulmuştur. 48 saat boyunca inkübe edilmiş tekli ve ko-kültür hücre gruplarından, HUVEC hücreleri, tripsinizasyon ile hızlıca kaldırılarak toplanmış ve 1200 rpm'de 5 dk satrifüj edildikten sonra supernatant ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Kalan hücre peleti 2 ml soğuk PBS ile iki kez yıkanmıştır. Daha sonra kalan pellet 100 µl PBS ile tekrardan suspanse edilerek

ependorfa alınmıştır. Aynı bir ependorfa 5 µl Annexin V ve 5 µl PI karşılıklı olarak ilave edildikten sonra resüspanse edilen hücreler eklenmiştir. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 20 dk inkübasyonun sonunda tüplere 250 µl “Annexin V bağlama tamponu” ilave edilerek 30 dk içinde grupların apoptotik okumaları akış sitometri cihazı (Accuri C6, BD) ile yapılmıştır.

3.15. Akış Sitometride Kaspaz-3 Aktivasyonunun Belirlenmesi

Kaspazlar gerek mitokondriyal apoptozda, gerekse ölüm reseptörleri yolunda rolü olan proteazlardır (Kaufmann ve Hengartner, 2001). Kaspaz-3; kaspaz-8 ve kaspaz-9 ile etkileşim halindedir. Kaspaz-3, pek çok proteinin spesifik yıkılımindan sorumlu olan bir ölüm proteaz enzimidir. Kaspaz-3, apoptoz mekanizmasında yer alan kaspazlardan olup hem dışsal (apoptotik) hem de içsel (mitokondriyal) apoptotik yolak üzerinden aktifleşebilmektedir. Kaspaz-3, kromatin kondensasyonundan, DNA fragmentasyonundan ve hücre iskeletine ait proteinlerin yıkımından sorumludur. Bu nedenle bir hücrede apoptozun varlığının en önemli göstergelerinden biri, ilgili hücrede kaspaz-3 enzim aktivitesinin belirlenmesidir (Slee vd., 2001; Engür vd., 2016, Gökhaner, 2018).

Çalışmamızda kaspaz-3 aktivitesi akım sitometri yöntemi ile değerlendirilmiştir. Kaspaz-3 aktivitesini tespit etmek için ilgili kitin (PE Active Caspase-3 Apoptosis Kiti, Katalog no: 550914, BD) protokolü uygulanmıştır. Çalışmada 3.14’te açıklanan 2D kültür ve ko-kültür deney setleri oluşturulmuştur. 48 saat boyunca inkübe edilen tekli ve ko-kültür hücre gruplarından HUVEC hücreleri tripsin ile kaldırılmış ve 1250 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kalan hücre peleti soğuk PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra tüplerdeki süpernatant dökülmüş ve pelletin üzerine hücrelerin geçirgenliğini sağlamak ve fikse etmek amacıyla, 500 µL cytofix/cytoperm solüsyonu eklenerek 20 dk buzun içinde bekletilmiştir. Daha sonra 1250 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiş ve pellet 500 µL “perm wash” ile 2 kez yıkanmıştır. Son yıkamanın ardından hücre pelleti 50 µL perm wash ile resüspanse edildikten sonra 10 µL antibody (PE Rabbit Anti kaspaz-3) eklenerek oda ısısında 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra her bir tüpe 1000 µL perm wash eklenerek santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmasını takiben herbir örneğin pelleti 350 µL perm wash ile flow tüpüne aktarılmış ve akış sitometri cihazında (BD Accuri C6) tüpler okutulularak analiz edilmiştir. (Engür Öztürk, 2020; Dikmen, 2017; Gökhaner, 2018).

3.16. Akış Sitometride JC-1 Boyama Yöntemi İle Mitokondrial Membran

Bütünlüğünün Belirlenmesi

Apoptozda mitokondriyal bozukluğu belirleyen 2 önemli faktör ortaya konmuştur; membran potansiyelinin kaybolması ve mitokondri zarının geçirgenliğinin değişmesi (Chen vd., 2008). Mitokondriyal membran potansiyelinin tespiti amacıyla JC-1 (5,5', 6,6'-tetrachlo-1,1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) kullanılmakta olup bu boya katyonik voltaj bağımlı bir boyadır. JC-1, hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelini ölçülmesine aracılık eder ve bu şekilde mitokondriyal membran potansiyelinin polarizasyon durumunu gösterir (Engür Öztürk, 2020; Iijima, 2006). Mitokondriyal membran potansiyelinin kaybolması apoptozun önemli bir belirteci olarak bilinmektedir (Yao vd., 2007).

Hücrelerin mitokondriyal membran bütünlüğünün tespit edilmesi amacıyla mitokondriyal membran potansiyeli belirleme kitinden (Katalog no: 551302, BD) yararlanılmıştır. Çalışmada 3.14'te açıklanan 2D kültür ve ko-kültür deney setleri oluşturulmuştur. 48 saat inkübe edilen tekli ve ko-kültür hücre gruplarında bulunan HUVEC hücreler hızlıca tripsinizasyon ile kaldırıldıktan sonra 1250 rpm'de 5 dakika satrifüj edilmiş ve süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kit içerisinde bulunan bileşenler, her bir tüpe protokole uygun şekilde konulmuş ve elde edilen çalışma solüsyonu da tüpe eklenerek 15 dk 37°C'de etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra kit içerisindeki 1000 µl Assay solüsyonu ile hücreler yıkanmıştır. Yıkama sonrası, hücreler 250 µl Assay solüsyonu ile resüspanse edilmiş ve akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) okumaları yapılarak analizi gerçekleştirilmiştir.

3.17. Akış Sitometride Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi

Flow sitometre lazer kaynaklı florometre ile parçacık ışık yayılımı analizi bileşiminden oluşur. Flow sitometrede farklı moleküller, parçacıklar ve hücreler, düşük ve dik açılı ışık yayılımı kullanılarak şekil ve büyüklük olarak ayrılabilir. Bu hücreler, parçacıklar veya moleküller özel floresan işaretleyicilerle yada boya işaretli antikorlarla işaretlenebilir (Güleş ve Eren, 2008).

MSU kristalleri ile inflamatuvar ortamda kültüre edilen ve bortezomib konsantrasyonları (5 µM; 1 µM; 0.1 µM; 0.05 µM) uygulanan HUVEC hücrelerinde sitokinlerin seviyeleri, uygun kit protokolleri uygulanarak akım sitometride ölçülmüştür.

Çalışmada 3.14'te açıklanan 2D kültür ve ko-kültür deney setleri oluşturulmuştur. 48 saat inkübasyondan sonra tekli ve ko-kültür hücre gruplarında bulunan HUVEC hücreleri, tripsinizasyon ile hızlıca kaldırılarak toplanmış ve 1250 rpm'de 5 dk satrifüje edildikten sonra süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır. 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda toplanan süpernatantlardan TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 ve IL-10 sitokin seviyeleri flow sitometri yöntemi kullanılarak belirlenerek analiz edilmiştir (Engür Öztürk, 2020; Klück vd., 2021).

3.17.1. İnterlökin 1-beta (IL-1 β) sitokin analizi

Hücrelerde IL-1 β seviyelerini belirlemek için antikora uygun olan fiksasyon ve permeabilizasyon protokolü uygulanmıştır. Çalışma FITC anti-human IL-1 β Antibody (Katalog No: 508206) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

HUVEC ile THP-1 hücreleri ile oluşturulan ko-kültür gruplarından inkübasyon süreleri sonunda HUVEC hücreleri kaldırılarak toplanmış ve 1250 rpm'de 5 dk satrifüj edildikten sonra süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin fiksasyon ve permeabilizasyonu amacıyla 500 μ l cytofix/cytoperm solüsyonu (Katalog no: 550914, BD) eklenerek tüpler 20 dk buz içinde bekletilmiştir. Daha sonra 1250 rpm de 5 dk santrifüj edilmiş ve pellet 500 μ l PBS ile 2 kez yıkanmıştır. Son yıkamayı takiben hücre pelleti PBS içinde 5 μ l antibody ile 30 dakikalık inkübe edilmiş ve PBS ile yıkama yapıldıktan sonra örnekler akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) okutulularak analiz edilmiştir.

3.17.2. TNF- α , IL-6, IL-8 ve IL-10 sitokin analizleri

Antiinflamatuvar etkileri değerlendirmek için, HUVEC hücreleri ile THP-1 hücreleri ile oluşturulan ko-kültür gruplarında inkübasyondan sonra toplanan hücre süpernatantlarından sitokin (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10) seviyeleri ilgili kitlerin protokolleri uygulanarak akış sitometri yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada PE anti-human TNF- α (Beckman Coulter LOT:200049), PE anti-human IL-6 (Invitrogen LOT:2489227), PE anti-human IL-8 (Invitrogen LOT:2489227) ve PE anti-human IL-10 (Invitrogen LOT: 2265361) kiti kullanılmıştır (Engür Öztürk, 2020).

Çalışmada 3.14'te açıklanan 2D kültür ve ko-kültür deney setleri oluşturulmuştur. 48 saat inkübasyondan sonra tekli ve ko-kültür hücre gruplarında HUVEC hücreleri, tripsinizasyon ile hızlıca kaldırılmış ve 1250 rpm'de 5 dk satrifüj edilmiş, süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kalan hücre peleti 2 kez 2 ml soğuk PBS ile yıkanmıştır. Son

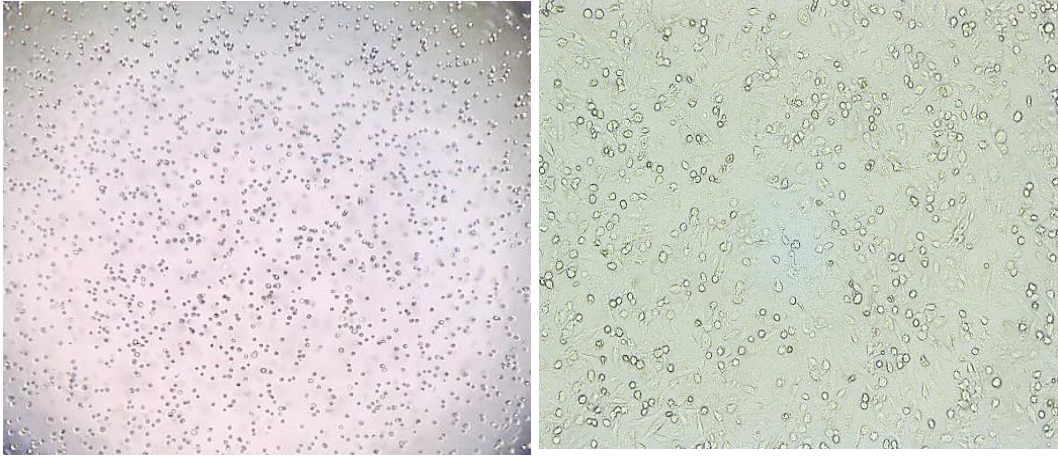
yıkamayı takiben kalan hücre pelleti PBS ile tekrar suspanse edilerek sitokin ölçümlerinde kullanılmıştır. Her sitokin ve deney grupları için ayrı ependorflar kullanılmıştır. Sitokinlerin ölçümü için (TNF- α , IL-6, IL-8 ve IL-10), antikorlardan ayrı ependoflara 5 μ L konulup, üzerine 100 μ l PBS ile resüspanse hücre eklenmiştir. 20 dakika'lık inkübasyonun ardından akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) okunarak analiz edilmiştir (Engür Öztürk, 2020).

3.18. İstatistiksel Değerlendirmeler

Veriler Microsoft Office Excel'de hesaplanarak oluşturulmuştur. Absorbans değerlerine göre % canlılık oranları Excel formülü ile hesaplanmıştır. İstatistiksel analizler Graphpad Prism 9 yazılım programında gerçekleştirilmiştir. Analizlerde hücre kontrol grubunun canlılık değeri %100 kabul edilmiş olup bu değer üzerinden diğer kuyucukların % canlılık verileri hesaplanmıştır (n=8). Ortalama \pm standart sapma (Ort \pm SS) değerleri hesaplanıp, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post-hoc (Tukey) testi kullanılmıştır. Anlamlılık değerleri; $p>0.05$ fark yok, $p<0.05^*$ fark var, $p<0.01^{**}$ önemli derecede fark var, $p<0.001^{***}$ çok önemli derecede fark var olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE YORUM

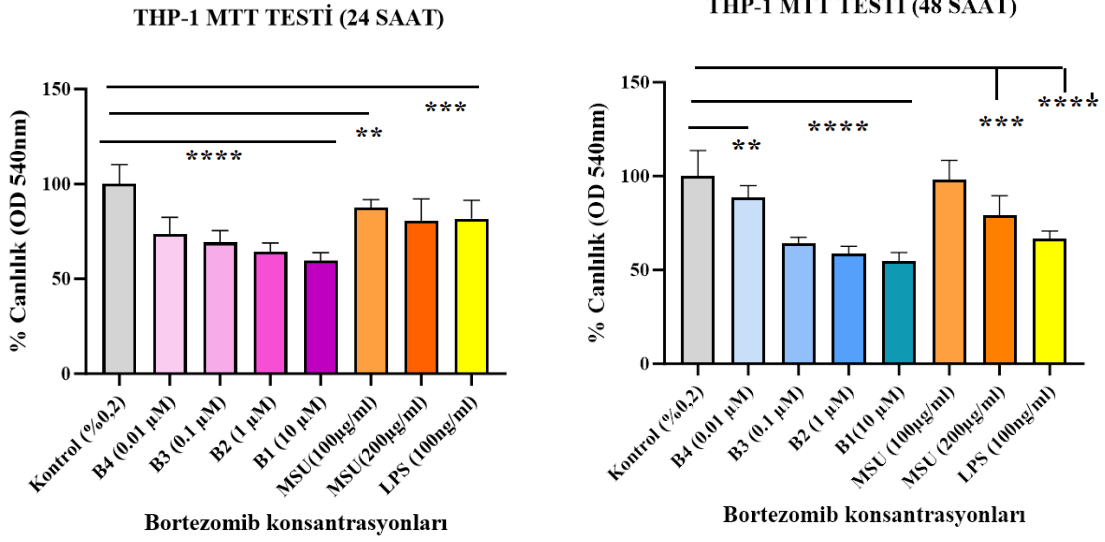
Bu tez çalışmasında İnsan monositik hücreleri (THP-1) ve İnsan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) kullanılmıştır. Uygun besiyerlerinde çoğaltılan hücre hatlarına ait THP-1 hücrelerinin süspansiyon kültür ortamı ile adheren olan HUVEC hücrelerinin ışık mikroskop görüntüsü aşağıda görülmektedir (**Şekil 4.1**).



Şekil 4. 1. THP-1 (solda) ve HUVEC (sağda) hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (4X)

4.1. THP-1 ve HUVEC Hücrelerinde Bortezomib ve MSU Konsantrasyonlarının Sitotoksik Etkileri

THP-1 ve HUVEC hücrelerinde sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla bortezomib (0.01 μ M; 0.1 μ M; 1 μ M ve 10 μ M) konsantrasyonları uygulanmış ve MTT yöntemi ile 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonucunda hücre canlılığına olan etkisi araştırılmıştır. MSU (100 μ g/ml ve 200 μ g/ml) ve LPS (100 ng/ml) konsantrasyonları ile oluşturulan inflamatuvar etkideki hücre canlılığı da değerlendirilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri, hücrelerin metabolik aktivitelerini verir ve bu değer de yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmiştir. Sonuçlar % canlılık olarak hesaplanmıştır (Dikmen, 2017).



Şekil 4. 2. Bortezomib konsantrasyonlarının THP-1 hücrelerinde MTT yöntemine göre hesaplanan 24. ve 48. saatteki % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (Kontrol: %0.2 DMSO, Ort ± SS, $p > 0.05$ fark yok, $p < 0.05$ * fark var, $p < 0.01$ ** anlamlı fark var, $p < 0.001$ *** önemli derecede fark var, $p < 0.0001$ **** çok önemli derecede fark var)

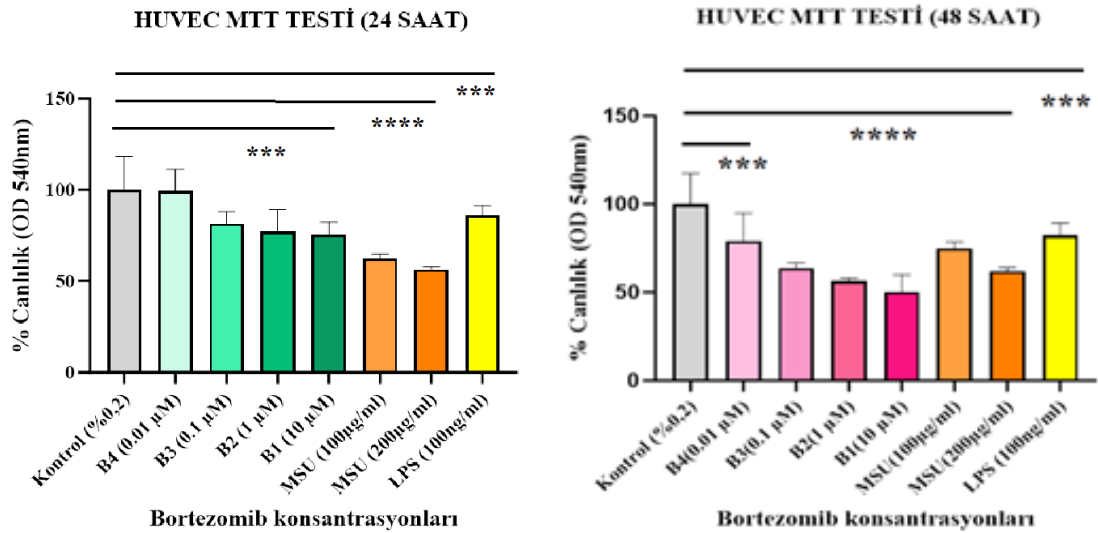
Bortezomib uygulanan THP-1 hücrelerinde % hücre canlılık değerleri, kontrole göre 0.01, 0.1, 1 ve 10 µM bortezomib konsantrasyonlarında 24. saatte sırasıyla; %73.59; 69.22; 64.31; 59.6 ve 48. saatte de sırasıyla %88.86; 64.12; 58.7; 54.6 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri de kontrole göre hem 24. saatte hem de 48. saatte 10 µM bortezomib uygulanan gruplarda $p < 0.0001$; 48. saatte 0.01 µM bortezomib uygulanan grupta $p < 0.01$ olarak belirlenmiştir. MSU (100 µg/ml ve 200 µg/ml) ve LPS (100 ng/ml) konsantrasyonlarında da kontrole göre THP-1 hücre canlılığı 24. saatte sırasıyla; %87.61; 80.74; 81.74 ve 48. saatte de sırasıyla %97.9; 79.12; 66.76 olarak bulunmuştur. İstatistiksel anlamlılık değeri de kontrole göre 24. saatte 100 µg/ml MSU için $p < 0.01$; LPS (100 ng/ml) için de $p < 0.001$ olarak belirlenmiştir. 48. saatte ise 200 µg/ml MSU için $p < 0.001$ ve LPS (100 ng/ml) için $p < 0.0001$ olarak bulunmuştur. MTT sonuçlarına göre, THP-1 hücrelerinde bortezomibin sitotoksik etkileri istatistiksel olarak incelendiğinde hem 24 hem de 48 saat inkübasyon sürelerinde hücre canlılığını %50'nin altına düşürmediği, ancak THP-1 hücrelerinde bortezomibin sitotoksik etkilerinin konsantrasyon ve inkübasyon süresinin artışına bağlı olarak artmış olduğu görülmüştür. İstatistiksel olarak incelendiğinde MSU ve LPS'nin de THP-1 hücrelerinde hem 24 hem

de 48 saat inkübasyon sürelerinde hücre canlılığını %50'nin altına düşürmediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.2 ve Tablo 4.1).

Tablo 4. 1. Bortezomib konsantrasyonlarının, THP-1 hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. ve 48. saatlerdeki % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (Kontrol değeri %100 kabul edilmiştir; n=8, Ort ± SS)

Grup Adı	% Canlılık Değerleri (Kontrol % 100)	
	24. saat	48. saat
B4 (0.01µM)	(73,59 ± 8,9)	(88,86 ± 6,1)**
B3 (0.1µM)	(69,22 ± 6,17)	(64,12 ± 3,28)
B2 (1µM)	(64,31 ± 4,56)	(58,7 ± 3,97)
B1 (10µM)	(59,6 ± 4,19) ****	(54,6 ± 4,72)****
M1 (100µg/ml)	(87,61 ± 4,24)**	(97,9 ± 10,5)
M2 (200µg/ml)	(80,74 ± 11,45)	(79,12 ± 10,53)***
LPS (100 ng/ml)	(81,74 ± 9,68)***	(66,76 ± 4,08)****

THP-1 hücrelerinde bortezomib konsantrasyonlarının MTT yönteminin sonuçlarına göre hesaplanan % hücre canlılık değerleri **Tablo 4.1**'de verilmiştir.



Şekil 4. 3. Bortezomib konsantrasyonlarının HUVEC hücrelerinde MTT yöntemine göre hesaplanan 24. ve 48. saatteki % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (Kontrol: %0.2 DMSO, Ort ± SS, p>0.05 fark yok, p<0.05* fark var, p<0.01**anlamli fark var, p<0.001*** önemli derecede fark var, p<0.0001**** çok önemli derecede fark var)

Bortezomib uygulanan HUVEC hücrelerinde 24. saatte % hücre canlılık değerleri kontrole göre 0.01, 0.1, 1 ve 10 µM bortezomib konsantrasyonlarında sırasıyla; %99.51; 81.69; 77; 75.7 ve 48. saatte de sırasıyla %79.02; 63.73; 56.4; 50.1 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri kontrole göre 24. saatte 10 µM, 48. saatte 0.01 µM bortezomib uygulanan gruplarda $p < 0.001$ olarak belirlenmiştir. MSU (100 µg/ml ve 200 µg/ml) ve LPS (100 ng/ml) konsantrasyonlarında da kontrole göre HUVEC hücre canlılığı 24. saatte sırasıyla; % 62.13; 56.33; 86.12 ve 48. saatte de sırasıyla %74.9; 62.03; 82.2 olarak bulunmuştur. İstatistiksel anlamlılık değeri kontrole göre 24. ve 48. saatlerde MSU (200 µg/ml) grupları için $p < 0.0001$, LPS (100 ng/ml) için de $p < 0.001$ olarak bulunmuştur. MTT sonuçlarına göre, HUVEC hücrelerinde bortezomibin sitotoksik etkileri istatistiksel olarak incelendiğinde hem 24 hem de 48 saat inkübasyon sürelerinde hücre canlılığını %50'nin altına düşürmediği, ancak HUVEC hücrelerinde bortezomibin sitotoksik etkilerinin konsantrasyon ve inkübasyon süresinin artışına bağlı olarak artmış olduğu görülmüştür. İstatistiksel olarak incelendiğinde MSU ve LPS'nin de HUVEC hücrelerinde hem 24 hem de 48 saat inkübasyon sürelerinde hücre canlılığını %50'nin altına düşürmediği gözlemlenmiştir (**Şekil 4.3 ve Tablo 4.2**).

HUVEC hücrelerinde bortezomib konsantrasyonlarının MTT yönteminin sonuçlarına göre hesaplanan % hücre canlılık değerleri **Tablo 4.2**'de verilmiştir

Tablo 4. 2. Bortezomib konsantrasyonlarının, HUVEC hücre hattında MTT yöntemine göre hesaplanan 24. ve 48. saatlerdeki % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (Kontrol %100 kabul edilmiştir; $n=8$, Ort \pm SS)

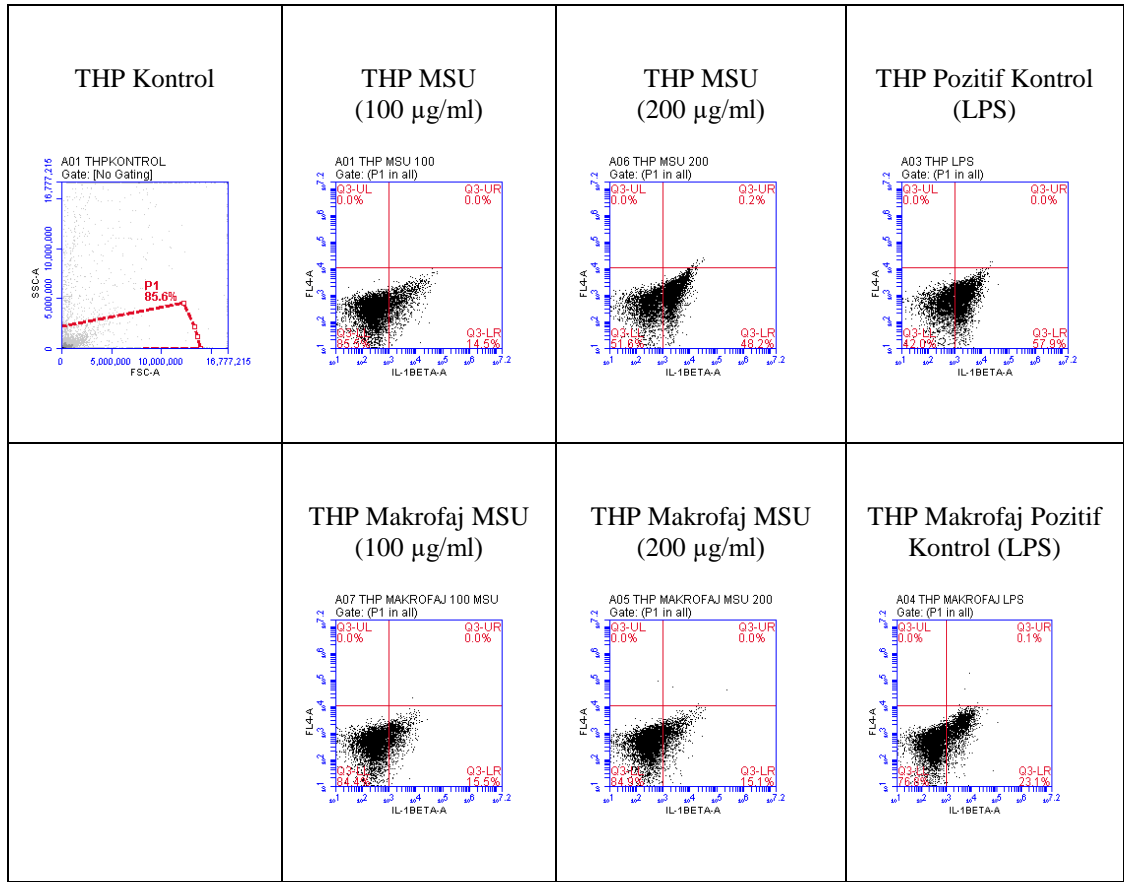
Grup Adı	% Canlılık Değerleri (Kontrol % 100)	
	24. saat	48. saat
B4 (0.01µM)	99,51 \pm 11,7	(79,02 \pm 15,82)***
B3 (0.1µM)	81,69 \pm 6,2	(63,73 \pm 2,93)
B2 (1µM)	(77 \pm 12,23)	(56,4 \pm 1,7)
B1 (10µM)	(75,7 \pm 6,51)***	(50,1 \pm 9,89)
M1 (100µg/ml)	(62,13 \pm 2,81)	(74,9 \pm 3,54)
M2 (200µg/ml)	(56,33 \pm 1,6)****	(62,03 \pm 1,93)****
LPS (100 ng/ml)	(86,12 \pm 5,34)***	(82,2 \pm 6,96)***

MTT sonuçlarına göre, bortezomib gruplarında HUVEC hücre canlılığı en fazla 24. saat inkübasyonda 0,01 µM ve 0,1 µM konsantrasyonlarda olduğu belirlenmiştir. Özellikle hem THP-1 hem de HUVEC hücrelerinde sitotoksik etkilerinin konsantrasyon ve inkübasyon artışına bağlı olarak artmış olduğu görülmüştür.

Proteazom inhibitörleri; çoklu sinyal iletimini, proteazomların fonksiyonlarını inhibe ederek engellemektedirler (Kupperman vd., 2010; Engür ve Dikmen, 2017). Literatürde THP-1 hücreleri ve bortezomibin kullanıldığı kısıtlı sayıda *in vitro* çalışma bulunmaktadır. Bortezomib ile yapılan bir çalışmada, primer monosit hücrelerinde MTT yöntemi ile hücre canlılığı incelenmiş ve bortezomibin 400 nM (0.4 µM) konsantrasyon uygulamasında (4 saatlik inkübasyon) canlılığı kontrole göre yaklaşık yüzde 50'nin altına düşürdüğü ve IC₅₀ konsantrasyonunun 274.0 ± 3.6 nM olduğu bildirilmiştir (Liu vd., 2019). Yapılan başka bir çalışmada, THP-1 hücrelerinde bortezomibin 0-1000 nM konsantrasyon uygulamasında hücre canlılığının kontrole göre %80'in altına düşmediği belirlenmiştir (Choy vd., 2015). Hücre canlılığını değerlendirmek için HUVEC büyümesinin, 24, 48 ve 72 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda (5, 10 ve 20 nM) bortezomib varlığında MTT yöntemi kullanılarak değerlendirildiği bir çalışmada (Wang vd., 2012) HUVEC hücrelerinde bortezomibin sitotoksik etki gösterdiği aktarılmıştır. Farklı bir çalışmada ise Roccaro ve arkadaşları (2006) MTT testi ile 24 saatlik inkübasyonun değerlendirildiği HUVEC hücrelerinde bortezomibin sitotoksikiteyi tetiklemediğini göstermişlerdir. Yapılan başka bir hücre canlılığını belirleme çalışmasında ise 50 nM bortezomib konsantrasyonunun hücre canlılığını %50'nin altına indirmediği bildirilmiştir (Chu vd., 2017). Çalışmamızda MTT yönteminde elde edilen sonuçlar, bu sonuçlarla uyumluluk göstermektedir.

4.2. THP-1 Hücrelerinde MSU Kristalleri Aracılı İnflamatuar Etkinin Belirlenmesi

THP-1 hücrelerinde MSU kristalleri aracılı inflammatuar etkiyi araştırmak için 6 kuyucuklu plakada inflamasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. THP-1 monosit ve THP-1 makrofaj hücrelerinde MSU'nun inflamasyon üzerine etkisi LPS ile karşılaştırılmıştır. THP-1 monosit ve makrofaj hücreleri 100 µg/ml ve 200 µg/ml MSU ile 24 saat muamele edilmiştir. LPS (100 ng/ml) ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Akış hücre sitometri cihazı ile NLRP3 inflamazom aktivasyonunda etkili bir parametre olan IL-1β ölçümü yapılmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4. 4. THP-1 monosit ve makrofaj hücrelerinde akış sitometri yöntemi ile belirlenen IL-1 β seviyeleri

Tablo 4. 3. THP-1 monosit ve makrofaj hücrelerinde akış sitometri yöntemi ile belirlenen IL-1 β 'nin yüzde seviyeleri

Hücre	Deney grubu	IL-1 β (%)	
		R4 (-)	R5 (+)
THP-1 Monosit	MSU 100 μ g/ml	85.5	14.5
	MSU 200 μ g/ml	51.6	48.2
	Pozitif Kontrol (LPS)	42	57.9
THP-1 Makrofaj	MSU 100 μ g/ml	84.4	15.5
	MSU 200 μ g/ml	84.9	15.1
	Pozitif Kontrol (LPS)	76.8	23.1

THP-1 monosit ve makrofaj hücrelerinde MSU (100 ve 200 μ g/ml) aracılı oluşturulan inflamatuvar etkinin belirlenmesi için hücre akım sitometride IL-1 β (+)

düzeyleri analiz edilmiş ve LPS (100 ng/ml) sonuçları ile karşılaştırılarak MSU'nun inflamasyon etkili konsantrasyonu, diğer deneylerde kullanılmak üzere belirlenmiştir.

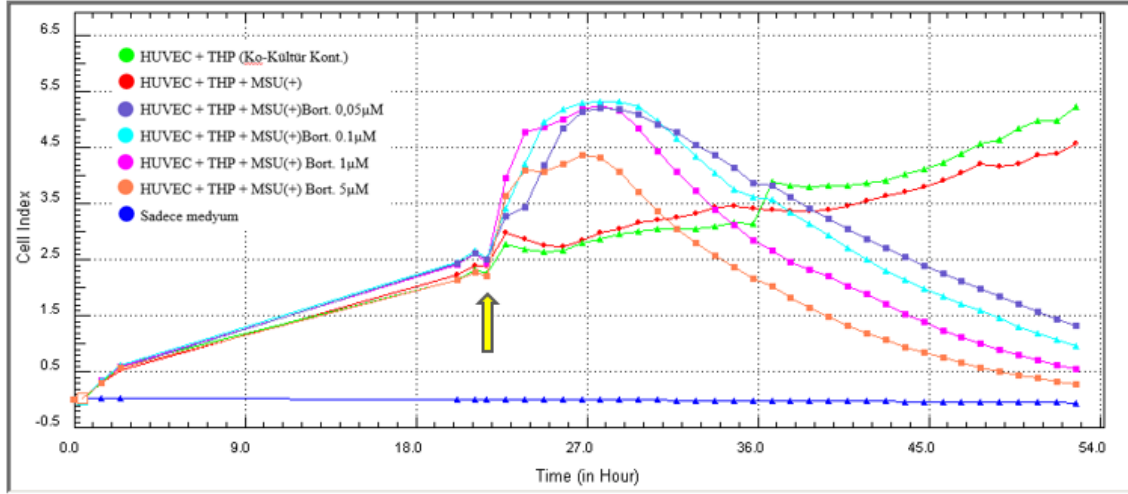
LPS aracılı oluşturulan inflamatuvar tepkinin belirteç sitokinlerinden IL-1 β 'nın flow sitometrisinde yapılan ölçümü incelendiğinde THP-1 monosit hücrelerinde IL-1 β (+) seviyesi %57.9; THP-1 makrofaj hücrelerinde de %23.1 olarak bulunmuştur.

İnflamatuvar tepki incelendiğinde; MSU'nun 100 μ g/ml konsantrasyonunun, THP-1 monosit ve makrofaj hücrelerinde IL-1 β (+) düzeyleri sırasıyla % 14.5 ve %15.5; 200 μ g/ml MSU inkübasyonu sonunda da %48.2 ve 15.1 olarak belirlenmiştir (**Şekil 4.4** ve **Tablo 4.3**). Sonuçlara göre 24 saatlik inkübasyon sonunda en fazla inflamatuvar etkinin 200 μ g/ml MSU uygulanan THP-1 monosit hücrelerinde olduğu görülmüş ve diğer deneysel çalışmalarda *in vitro* Gut modeli oluşturmak için 200 μ g/ml MSU konsantrasyonunun THP-1 monosit hücrelerine uygulanmasının uygun olacağına karar verilmiştir.

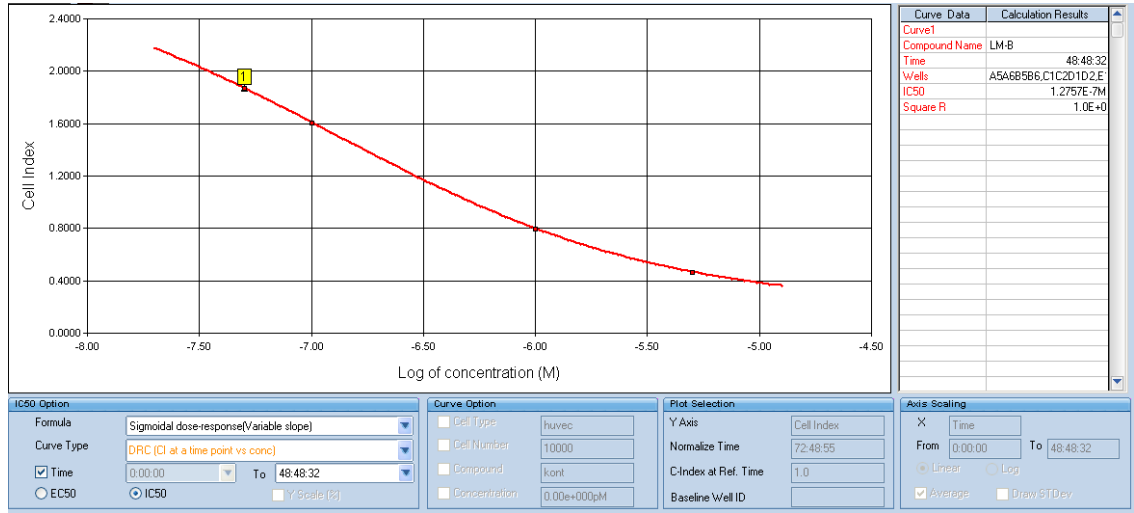
4.3. Ko-kültür ortamında xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde Hücre Proliferasyonun Belirlenmesi

Deney için RTCA Xcelligence cihazında insert içermeyen (2D kültür) ya da insert içeren (ko-kültür) e-plate'ler kullanılmıştır. Bu kapsamda MTT yöntemindeki hücre canlılıkları değerlerine göre belirlenen bortezomib konsantrasyonları (5 μ M, 1 μ M, 0.1 μ M, 0.05 μ M) kullanılmıştır. MSU ile oluşturulan THP-1 monosit inflamasyon ortamında bortezomibin HUVEC hücre indeks değerlerine bakılarak hücre proliferasyonu üzerine etkileri belirlenmiş ve IC₅₀ değeri RTCA DP Software 1.2.1 programı aracılığıyla hesaplanmıştır.

Ko-kültür



Şekil 4. 5. MSU ile inflamasyon oluşturulan THP-1 monosit ile HUVEC ko-kültür hücre modelinde bortezomib konsantrasyonlarının gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde HUVEC proliferasyon eğrileri (sarı ok: konsantrasyon uygulaması, n=7, Ort ± SS)



Şekil 4. 6. RTCA DP sisteminde bortezomibin HUVEC ve THP-1 hücrelerinin ko-kültüründe 48. saatteki IC_{50} değerinin hesaplandığı konsantrasyon-hücre indeksi eğrisi (IC_{50} : 127 nM)

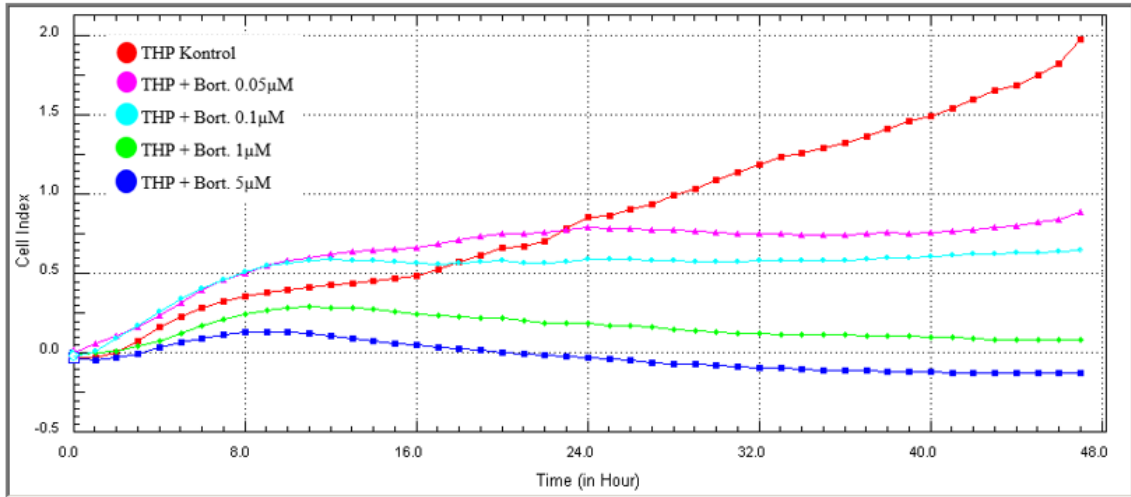
THP-1 ve HUVEC ko-kültüründe bortezomib konsantrasyonlarının antiproliferatif etkileri, gerçek zamanlı olarak (saat başı veri alınarak) ölçülmüştür. RTCA DP Software 1.2.1 programı kullanılarak konsantrasyon-hücre indeksi eğrilerine göre; bortezomibin 24 saatteki IC_{50} değeri 127 nM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). Bortezomib uygulanmasının ardından proliferasyon eğrilerindeki 4-10. saatlerde meydana gelen sıçramalar, ilk temas sonucu hücresel farklılaşmanın da olabileceği

yönünde yorumlanabilir; ilerleyen süreçte ise bortezomibin konsantrasyonu arttıkça, hücre proliferasyonunun da azaldığı gözlemlenmiştir (**Şekil 4.5**).

Çalışmamızda ulaşılan sonuçlara benzer şekilde literatür bilgisine rastlanmaktadır. MM hücrelerinde proteazom inhibitörlerinin proliferasyonu doğrudan inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği Hideshima ve arkadaşları tarafından (2001) bildirilmiştir. Bortezomibin CM'lerle birlikte kültürlenmiş HUVEC'lerin hücre proliferasyonunu doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir (Wang vd., 2012). Bortezomibin, klinik olarak ulaşılabilir konsantrasyonlarda, HUVEC'lerin proliferasyonunu doza bağlı ve zamana bağlı bir şekilde inhibe ettiği yine farklı bir çalışmada gösterilmiştir (Roccaro vd., 2006). Daha önceki çalışmalarda (Podar vd., 2004; Tamura vd., 2010) bortezomibin antianjiyogenik aktivitesinde önemli rol oynayan vasküler endotel hücreleri üzerinde doğrudan negatif proliferatif etkileri bildirilmiştir.

4.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde Bortezomibin HUVEC Hücre Migrasyonuna Etkileri

MSU ve bortezomibin belirlenen konsantrasyonlarının endotel hücre göçü (migrasyon) üzerine aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla RTCA DP modeli ve bu sisteme uygun olarak tasarlanmış olan 16 kuyucuklu plakalar (CIM-plate) kullanılmıştır. Bortezomib konsantrasyonları (5 μ M, 1 μ M, 0.1 μ M, 0.05 μ M) ile HUVEC hücrelerinde gerçek zamanlı migrasyon çalışması gerçekleştirilmiş ve CIM-plakalarda zamana ve bortezomib konsantrasyonlarına bağlı olarak HUVEC hücre migrasyonları izlenmiştir (**Şekil 4.7**).



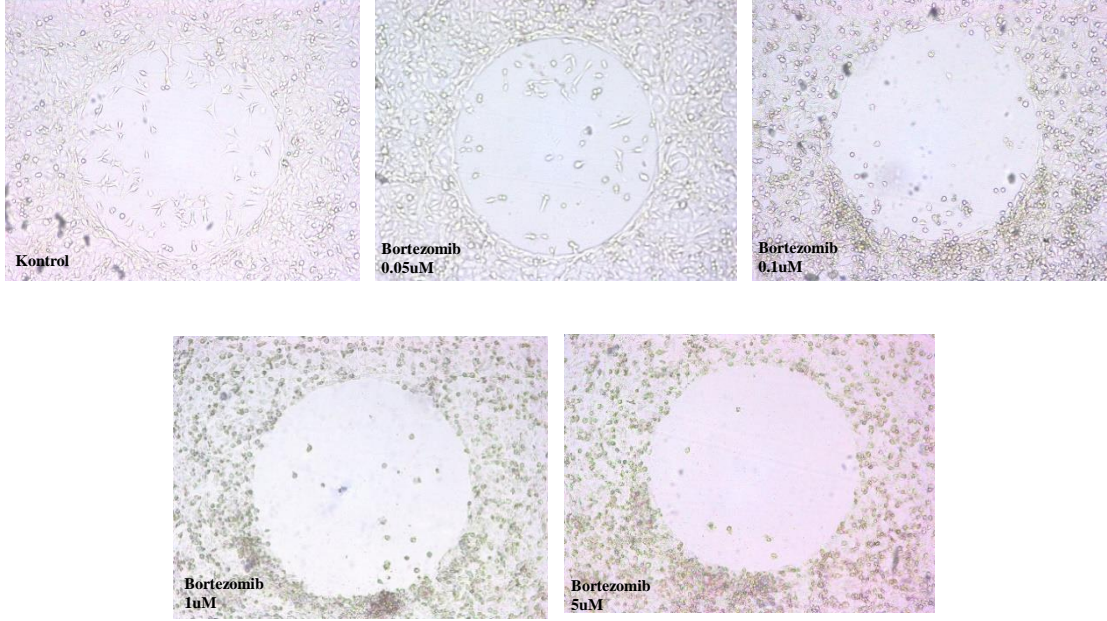
Şekil 4.7. CIM-plate insert kullanılarak HUVEC hücrelerindeki bortezomib konsantrasyonlarının gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde belirlenen migrasyon eğrileri ($n=5$, Ort \pm SS)

Şekil 4.7’de görüldüğü gibi 48 saat inkübasyon sonunda kontrol grubuna göre bortezomibin yüksek dozlarında (5 μ M ve 1 μ M) antiproliferatif etkilere de paralel olarak hücre migrasyon etkisi görülmemiştir. Kontrol grubuna göre tüm bortezomib konsantrasyonları hücre migrasyonu olumsuz etkilemiştir. Bortezomibin düşük dozlarında (0.05 μ M ve 0.1 μ M) ise yüksek konsantrasyonlara göre bir miktar hücre migrasyonu olduğu görülmektedir.

Hücre canlılığının XTT analizleri ile HUVEC hücrelerinde 24 saat boyunca artan konsantrasyonlarda proteazom inhibitörlerinin değerlendirildiği bir çalışmada (Meiners vd., 2008) düşük dozlarda hücre canlılığını etkilemediği ancak yüksek dozlarda azalmış hücre canlılığı izlendiği bildirilmiştir. Sonuçlarımız bu çalışma ile paralellik göstermiştir.

Oris™ Hücre Migrasyon Tekniği ile Morfolojik Analiz

HUVEC hücreleri, serumsuz besiyeri içinde RTCA DP migrasyon yönteminde kullanılan bortezomib konsantrasyonlarıyla “Oris™ hücre migrasyon plakası” kullanılarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader kullanılarak kuyuların mikroskopik fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4.8).



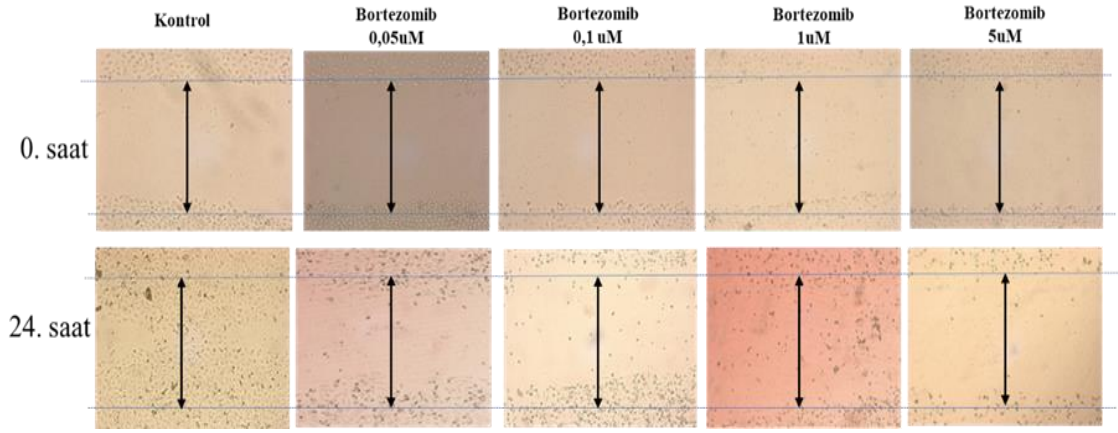
Şekil 4. 8. *Bortezomib konsantrasyonlarının HUVEC hücrelerinde hücre migrasyonuna etkilerinin 24. saatteki mikroskopik görüntüsü (4X)*

Şekil 4.7 ve Şekil 4.8.'de görüldüğü gibi Oris hücre migrasyon deneyi ve RTCA DP sistemi CIM-plate migrasyon deneyi sonuçlarımız birbirine paralellik göstermekte olup kontrol gruplarına göre artan bortezomib konsantrasyonlarında HUVEC hücrelerinin migrasyonu azalmıştır.

Literatürde, yaptığımız migrasyon deneylerinin sonucunu destekleyen çalışmalar da bulunmaktadır. Wang ve arkadaşları (2012) bortezomibin, MSC'lerin CM'lerle birlikte kültürlenmiş HUVEC'lerin göçünü doza bağlı bir şekilde inhibe ettiğini göstermiştir. HUVEC'lerde bortezomib tarafından hücre göçünü önemli ölçüde inhibe ettiği sonucuna ulaşılmıştır (Roccaro vd., 2006).

4.5. İnflamasyon Ortamında HUVEC Hücrelerinde Çizik (Yara İyileşme) Deneyi

MSU ile inflamasyon oluşturulmuş ko-kültür ortamında bortezomib uygulanan gruplardaki HUVEC hücrelerinin migrasyon yetenekleri tespit edilmiştir. Konfluense ulaşan hücreler 200 µL'lik bir pipet ucuyla çizilerek inflamasyon ortamında bortezomib konsantrasyonlarının hücreler üzerinde göç etme kapasiteleri araştırılmıştır. Bortezomib dozları (5µM, 1µM, 0.1µM, 0.05µM) uygulanmış ve 0. ve 24. saatlerdeki HUVEC hücrelerinin yarıyı kapatma durumları invert mikroskop altında gözlemlenerek fotoğrafları çekilmiştir (**Şekil 4.9**).



Şekil 4.9. MSU ile inflamasyon oluşturulmuş THP-1/ HUVEC ko-kültür ortamında çizik deneyi mikroskopik görüntüleri (10X)

Şekil 4.9’da görüldüğü üzere bortezomib konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak 24. saatte HUVEC hücrelerinin migrasyon yeteneklerinin azalarak yara oluşturulan alanlarının kapanmadığı ve dolayısıyla bortezomibin konsantrasyon artışına bağlı olarak inflamasyonlu ortamda da HUVEC hücrelerinde anti-migrasyon etki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.9).

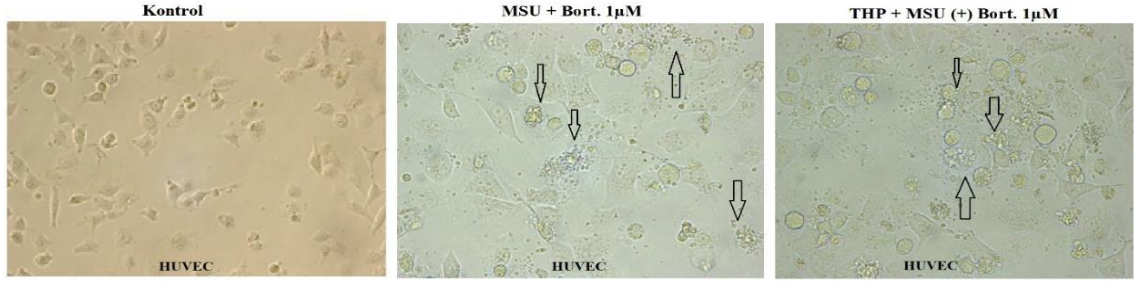
Önceki çalışmalarda (Tamura vd., 2010) vasküler endotel hücrelerinin vasküler geçirgenliğini artırarak hücre büyümesini güçlü bir şekilde inhibe ettiğini bildirmişlerdir. MCF7 hücrelerinin hareket etme yeteneğini ölçmek için çizik yara tahlilinin kullanıldığı bir çalışmada (Mehdizadeh vd., 2021) bortezomibin hücre göçünü azalttığı gösterilmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik gösteren araştırmalara rastlansa da çalışmamız bortezomibin HUVEC hücrelerinin migrasyonuna etkisinin inflamasyon ortamında incelendiği tek çalışmadır.

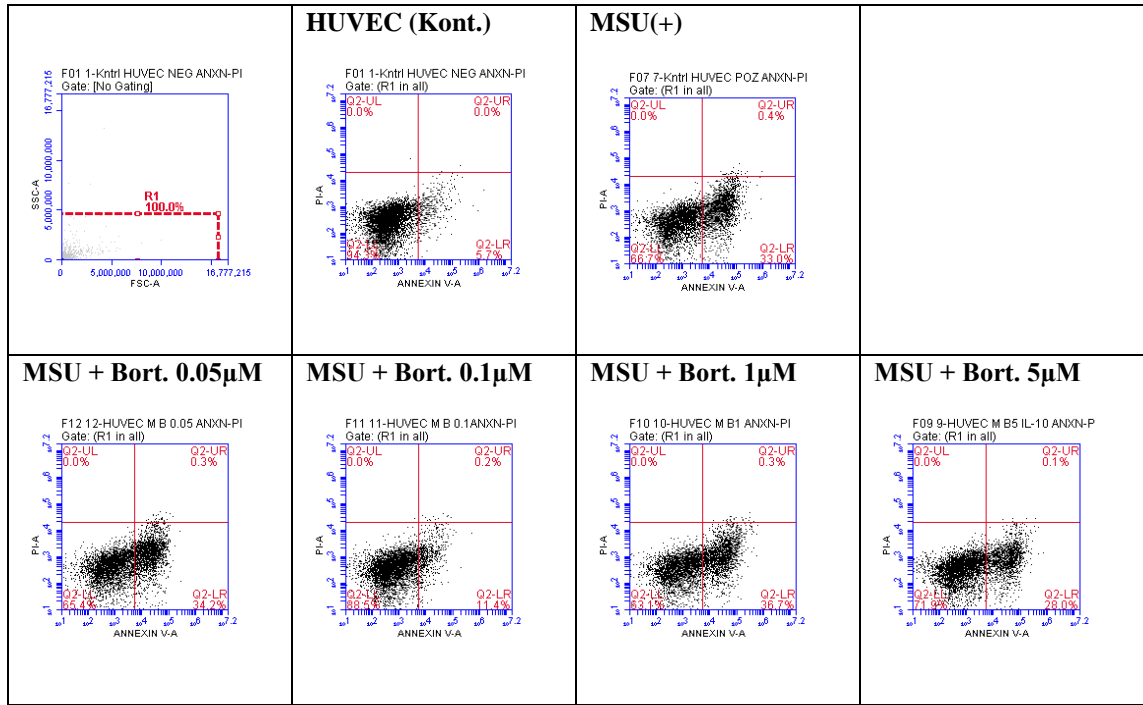
4.6. HUVEC Hücrelerinde Flow Sitometrisinde Annexin V-Propidyum İyodür (PI) Yöntemi İle Apoptotik Etkinin Belirlenmesi

Bortezomib konsantrasyonları uygulanarak 24 saat inkübe edilen tekli ve ko-kültür hücre gruplarında, HUVEC ve THP-1 hücreleri kaldırılmış ve 1250 rpm’de 5 dk satrifüj edilerek supernatantlar ortamdan uzaklaştırılmıştır. Annexin V Apoptosis Detection Kit protokolü uygulanmıştır. 2 ml soğuk PBS ile hücre pelletleri 2 kez yıkandıktan sonra, kalan pelletler 200 µL PBS ile tekrar süspanse edilip ependorfa aktarılmıştır. Boş bir ependorfun 2 yanına karıştırmadan 5 µl Annexin V ve 5 µl PI konulduktan sonra üzerine resuspanse edilen hücreler eklenmiştir. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 25-30 dk inkübe

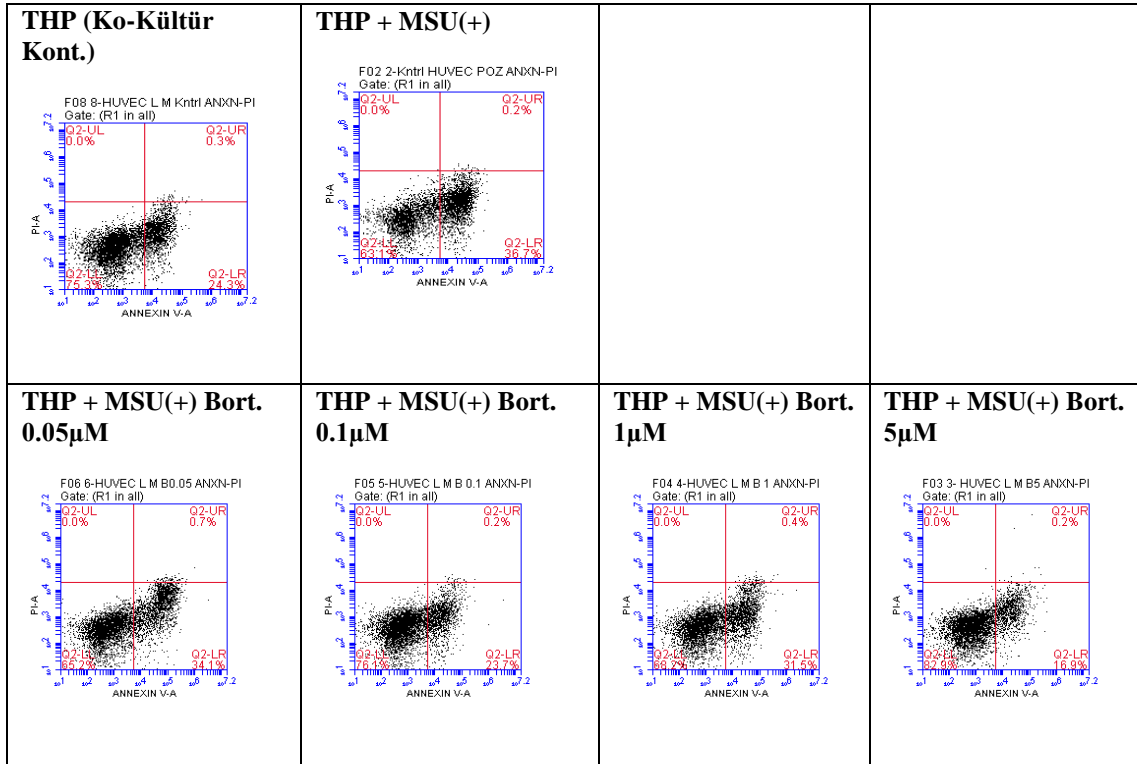
edildikten sonra herbir tüpe 200 µl Annexin V bağlama tamponu (5x) eklenerek grupların 30 dk içinde akış sitometri cihazında (BD Accuri C6) apoptotik okumaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.10, 4.11 ve Tablo 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4. 10. Apoptotik HUVEC hücre görüntüleri (20X)



Şekil 4. 11. HUVEC tekli ve ko-kültür inflamasyon ortamında bortezomibin apoptotik etkileri



Şekil 4. 11. (Devam) HUVEC tekli ve ko-kültür inflamasyon ortamında bortezomibin apoptotik etkileri

Tablo 4. 4. Annexin/PI akış sitometrisi analizine göre HUVEC hücrelerindeki canlılık (Q2-LL), erken apoptoz (Q2-LR), geç apoptoz (Q2-UR) yüzdeleri

Hücre kültür ortamı	Deney grubu	% Değerleri		
		Q2-LL % Canlılık	Q2-LR % Erken apoptoz	Q2-UR % Geç apoptoz
HUVEC	HUVEC (Kont.)	94.3	5.7	0
	MSU(+)	66.7	33	0.4
	MSU + Bort. 0.05µM	65.4	34.2	0.3
	MSU + Bort. 0.1µM	88.5	11.4	0.2
	MSU + Bort. 1µM	63.1	36.7	0.3
	MSU + Bort. 5µM	71.9	28	0.1
HUVEC + THP (Ko-Kültür)	THP (Ko-Kültür Kont.)	75.3	24.3	0.3
	THP + MSU (+)	63.1	36.7	0.2
	THP + MSU (+) Bort. 0.05µM	65.2	34.1	0.7
	THP + MSU (+) Bort. 0.1µM	76.1	23.7	0.2
	THP + MSU (+) Bort. 1µM	68.2	31.5	0.4
	THP + MSU (+) Bort. 5µM	82.9	16.9	0.2

HUVEC 2D kültürde canlı hücrelerin yüzdesi kontrol, MSU(+), MSU + Bort. 0.05µM, MSU + Bort. 0.1µM, MSU + Bort. 1µM ve MSU + Bort. 5µM gruplarında sırasıyla, %94.3, 66.7, 65.4, 88.5, 63.1 ve 71.9 olarak bulunmuştur.

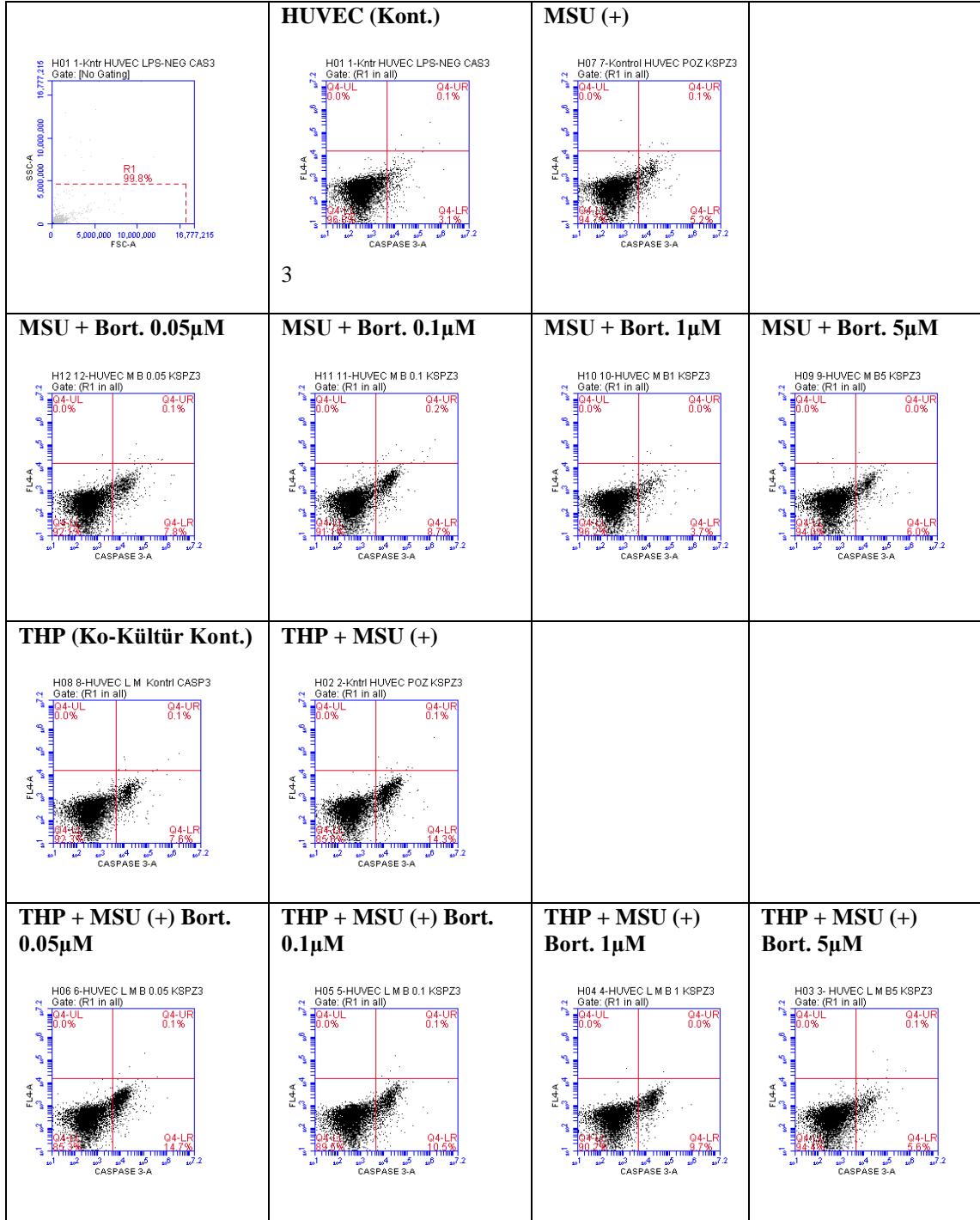
HUVEC ve THP-1 kokültür gruplarında ise canlı hücrelerin yüzdesi kontrol, MSU(+), MSU + Bort. 0.05µM, MSU + Bort. 0.1µM, MSU + Bort. 1µM ve MSU + Bort. 5µM gruplarında sırasıyla, %75.3, 63.1, 65.2, 76.1, 68.2 ve 82.9 olarak belirlenmiştir.

Şekil 4.10, 4.11 ve Tablo 4.4'te görüldüğü gibi kontrole göre inflamasyon ortamında en fazla erken apoptoz, 2D kültürde (tekli kültür) 1µM; ko-kültür grubunda ise 0.05µM bortezomib uygulanan gruplarda olduğu belirlenmiş ve sırasıyla %36.7 ve %34.1 olarak analiz edilmiştir. 24. saatteki erken apoptotik etki incelendiğinde inflamasyon durumunda, tekli kültürde bortezomib 0.1µM; ko-kültürde ise bortezomib 5 µM uygulanan gruplarda önemli derecede apoptozun azaldığı ve hücre canlılığının diğer bortezomib gruplarına göre arttığı belirlenmiştir.

MM hücrelerinde proteazom inhibitörlerinin apoptozu indüklediği Hideshima ve arkadaşları tarafından (2001) bildirilmiştir. THP-1 ile oluşturulmuş kültür modelinde A549 hücrelerinde Annexin V-PI yöntemi kullanılan bir çalışmada (Ozturk vd., 2021) akış sitometrisi analizi sonuçlarına göre bortezomibin apoptotik etkisi %41 olarak belirlenmiştir.

4.7. HUVEC Hücrelerinde Bortezomibin Kaspaz-3 Aktivasyonuna Etkilerinin Flow Sitometrisinde Belirlenmesi

Bir hücrede apoptoz varlığını gösteren en önemli belirteç o hücredeki kaspaz-3 enzim aktivasyonunun belirlenmesidir (Slee vd., 2001; Engür vd., 2016). Kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi için PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit (Katalog no: 550914, BD) protokolü uygulanmış ve akış sitometri cihazında (BD Accuri C6) okutulmuş ve analiz edilmiş ve kaspaz-3 yüzdeleri belirlenmiştir (**Şekil 4.12 ve Tablo 4.5**).



Şekil 4. 12. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, farklı konsantrasyonlarda bortezomib uygulaması ile Kaspaz-3 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi

Tablo 4. 5. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, akış sitometri yöntemi ile bortezomibin farklı konsantrasyonlarda uygulaması sonucu belirlenen % Kaspaz-3 seviyelerinin gösterilmesi

Hücre kültür ortamı	Deney grubu	% Kaspaz-3 Değerleri	
		Q4-LL (-)	Q4-LR (+)
HUVEC	HUVEC (Kont.)	96.6	3.1
	MSU (+)	94.7	5.2
	MSU + Bort. 0.05µM	92.1	7.8
	MSU + Bort. 0.1µM	91.1	8.7
	MSU + Bort. 1µM	96.2	3.7
	MSU + Bort. 5µM	94	6
HUVEC + THP (Ko-Kültür)	THP (Ko-Kültür Kont.)	92.3	7.6
	THP + MSU(+)	85.6	14.3
	THP + MSU(+) Bort. 0.05µM	85.3	14.7
	THP + MSU(+) Bort. 0.1µM	89.5	10.5
	THP + MSU(+) Bort. 1µM	90.2	9.7
	THP + MSU(+) Bort. 5µM	94.4	5.6

HUVEC gruplarında Kaspaz-3 aktivasyonu incelendiğinde kontrole göre en yüksek artış, bortezomib 0.1µM grubunda %8.7, kokültür gruplarında ise bortezomib 0.05µM grubunda %14.7 olarak tespit edilmiştir.

HUVEC gruplarında kaspaz-3 aktivasyon artışı bortezomib dozlarında kontrole göre daha yüksek analiz edilmiştir. Kokültür gruplarındaki Kaspaz-3 aktivasyonu ise bortezomibin artan dozlarıyla azalmıştır.

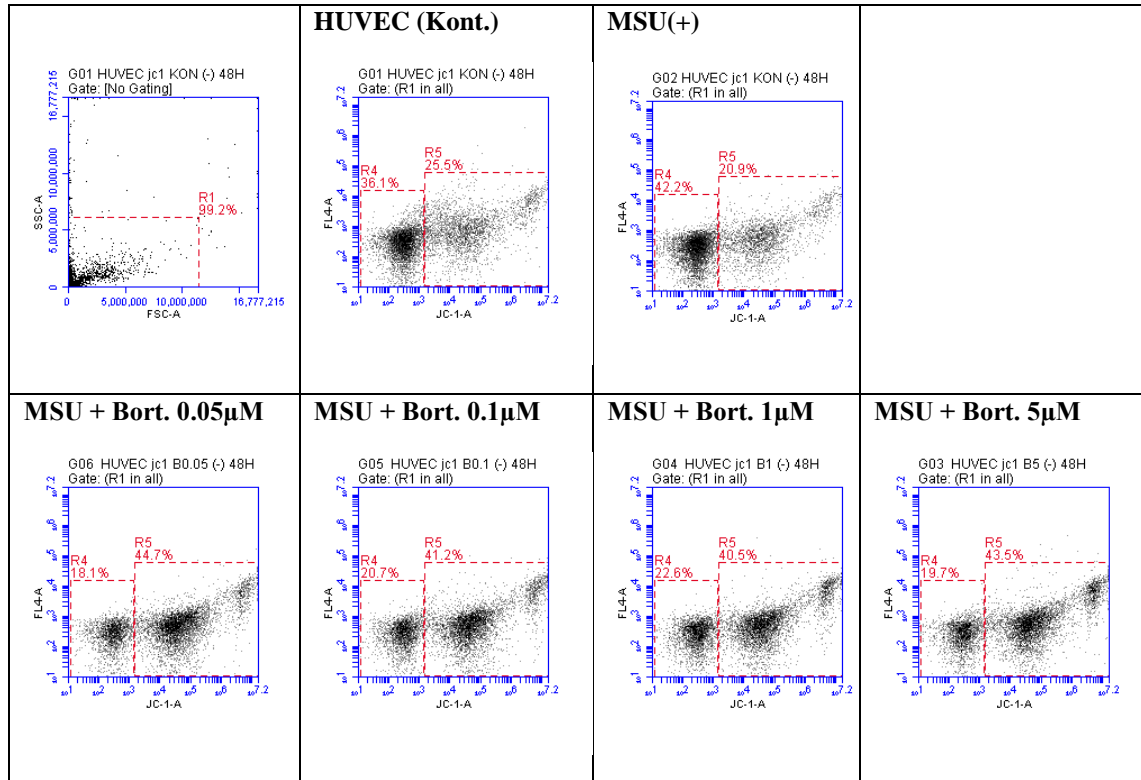
Kaspazlar, inflamasyona ve hücre ölümüne aracılık eden hücre içi sisten proteazlarıdır. Kaspaz-3, hem nekrotik hem de apoptotik hücre ölümünün önemli bir aracısıdır. Kaspaz-1, sitokinleri (IL-1β ve IL-18) aktive ederek inflamasyona aracılık eder (Faubel ve Edelstein, 2005). Makrofajların enfekte olması (LPS benzeri etki oluşarak) kaspaz-1 aktivasyonuna, prointerlökin IL-1β ile IL-18 üretimine ve de kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivasyonuna yol açtığı bildirilmiştir (Cohen, 1997).

Belloni ve arkadaşları (2010) yaptıkları çalışma ile bortezomib uygulanan endotel hücrelerinde apoptozun indüklediğini göstermişlerdir. Meiners ve arkadaşları (2008) yüksek dozda proteazom inhibitörlerinin endotel üzerinde potansiyel apoptotik yan

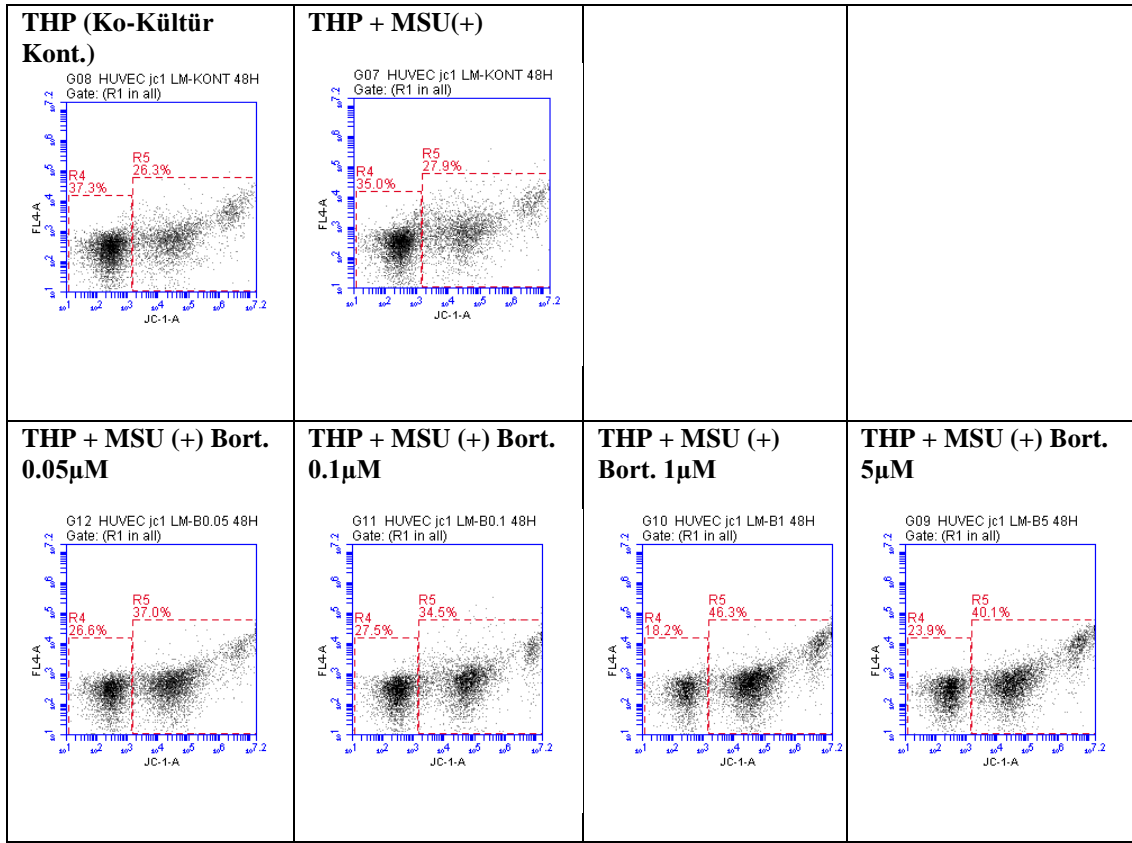
etkilere sahip olduğunu, ancak proteazomun toksik olmayan dozlarda inhibisyonunun endotel koruyucu olabileceğini aktarmışlardır. MCF7 hücrelerinde bortezomib uygulamasının, içsel yol boyunca apoptozu indüklediğini ortaya koyan bir çalışma da mevcuttur (Mehdizadeh vd., 2021).

4.8. MSU ile Oluşturulan İnflamasyon Modelinde Bortezomibin HUVEC Hücrelerinde Mitokondrial Membran Bütünlüğüne Etkisi

Bortezomib konsantrasyonları HUVEC ve ko-kültür (THP-1 ile oluşturulmuş) hücre gruplarına uygulanmış ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmışlardır. Herbir gruba ait hücreler inkübasyon süreleri sonunda kaldırılarak toplanmış ve hücrelerin mitokondriyal membran bütünlüğünün belirlenmesi amacıyla herbir gruba Mitokondriyal Membran Potansiyeli Belirleme Kit (KN:551302, BD) protokolü uygulanmıştır. Ardından örneklerin flow sitometri cihazında (Accuri C6, BD) ölçümü alınarak analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.13 ve Tablo 4.6’te verilmiştir.



Şekil 4. 13. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, farklı konsantrasyonlarda bortezomib uygulamasının mitokondriyal depolarizasyon üzerine etkileri



Şekil 4. 13. (Devam) HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, farklı konsantrasyonlarda bortezomib uygulamasının mitokondriyal depolarizasyon üzerine etkileri

Tablo 4. 6. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, akış sitometri yöntemi ile bortezomibin farklı konsantrasyonlarda belirlenen JC-1 seviyeleri

Hücre kültür ortamı	Deney grubu	% Değerleri	
		JC-1 (Negatif)	JC-1 (Pozitif)
HUVEC	HUVEC (Kont.)	36.1	25.5
	MSU (+)	42.2	20.9
	MSU + Bort. 0.05µM	18.1	44.7
	MSU + Bort. 0.1µM	20.7	41.2
	MSU + Bort. 1µM	22.6	40.5
	MSU + Bort. 5µM	19.7	43.5
HUVEC + THP-1 (Ko-Kültür)	THP (Ko-Kültür Kont.)	37.3	26.3
	THP + MSU(+)	35	27.9
	THP + MSU(+) Bort. 0.05µM	26.6	37
	THP + MSU(+) Bort. 0.1µM	27.5	34.5
	THP + MSU(+) Bort. 1µM	18.2	46.3
	THP + MSU(+) Bort. 5µM	23.9	40.1

Şekil 4.13 ve **Tablo 4.6**'da görüldüğü gibi mitokondrial depolarizasyon HUVEC hücrelerinde bortezomib konsantrasyonlarında kontrole göre artmıştır. JC-1 pozitif hücre yüzdeleri, HUVEC kontrol grubuna göre yaklaşık 1,5 kat artış göstermiştir. Hem HUVEC hücreleri tekli kültür ortamında hem de kokültür ortamında kontrol grubuna göre bortezomib uygulanan gruplarda, mitokondrial depolarizasyon seviyelerinde artış belirlenmiştir.

HUVEC (tekli) gruplarında diğer apoptoz tayinleri olan Annexin V/PI yöntemi ve Kaspaz-3 aktivasyonu sonuçlarında olduğu gibi, mitokondrial depolarizasyon seviyelerindeki artışla da bortezomib dozlarının hücre canlılığını azalttığı gözlemlenmiştir.

Yapılan araştırmalarda, apoptozun belirteçlerinden biri olarak mitokondrial membran bütünlüğünün bozulmasının artması gösterilmiştir (Yao vd., 2007; Chitambar ve Purpi, 2010; Shanker vd, 2008). Geçirgenlik değişimi olarak da bilinen mitokondriyal membran potansiyelinin düşmesi erken apoptoz sırasında oluşur ve en iyi akım sitometrisi ile analiz edilir (Cossarizza ve Salvoli, 2001). Bortezomib, M0 makrofajlarıyla birlikte kültürlenmiş hücrelerde hücre apoptozunu önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (Ozturk vd., 2021). Bortezomibin apoptoz indüksiyonu ve büyüme durdurma etkileri daha önce de bildirilmiştir (Adams, 2002). HUVEC hücrelerinde yaptığımız apoptoz tayinlerinden elde edilen bulgularımız ile bu etkiler kanıtlanmıştır.

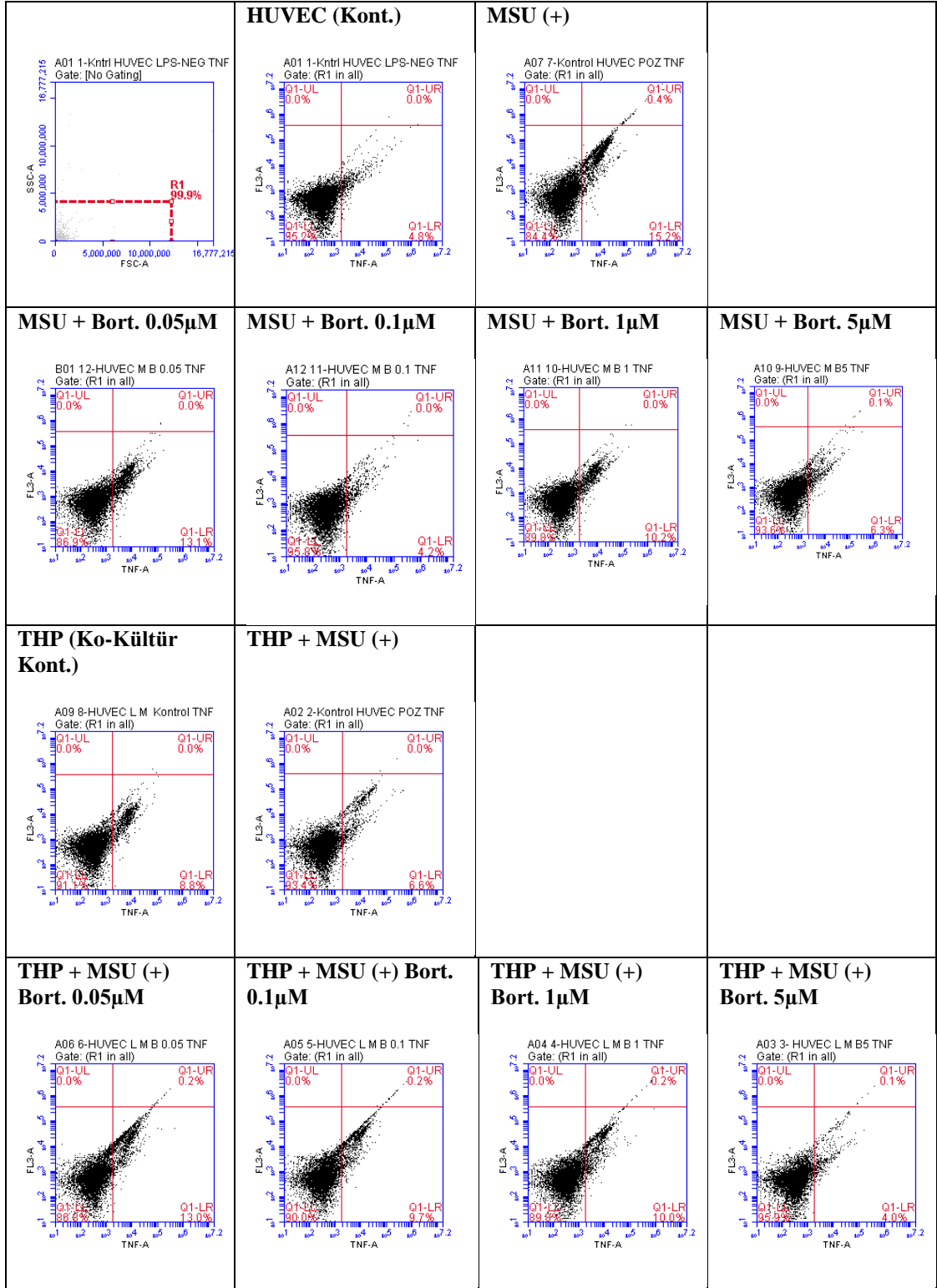
4.9. MSU İnflamasyon Ortamında HUVEC Hücrelerinde TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 ve IL-10 Düzeyleri

Antiinflamatuvar etkileri değerlendirmek için, HUVEC hücrelerinin tekli (2D kültür) ve THP-1 hücreleri ile ko-kültür oluşturulmuş gruplarından, inkübasyon süreleri sonunda toplanan hücre süpernatantları falkonlara alınıp medyumlar uzaklaştırılmıştır. İlgili sitokin için uygun antikor kullanılarak (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 ve IL-10) akış sitometri cihazında (BD Accuri C6) okutulmuş analiz edilmiştir (Engür Öztürk, 2020).

4.9.1. MSU inflamasyon ortamında bortezomibin HUVEC hücrelerinde TNF- α düzeyler

İnflamasyon belirteçlerinden TNF- α 'nın ölçümü için HUVEC hücrelerinin tekli ve ko-kültür (THP-1 hücreleri ile) gruplarında TNF- α protokolü uygulandıktan sonra akış

sitometri cihazında (BD Accuri C6) okutulularak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar **Şekil 4.14** ve **Tablo 4.7**'de verilmiştir.



Şekil 4. 14. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, farklı konsantrasyonlarda bortezomib uygulaması ile TNF-a seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi

Tablo 4.7. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, akış sitometri yöntemi ile bortezomibin farklı konsantrasyonlarda uygulaması sonucu belirlenen TNF- α seviyelerinin gösterilmesi

Hücre kültür ortamı	Deney grubu	% Değerleri	
		TNF- α Negatif (-)	TNF- α Pozitif (+)
HUVEC	HUVEC (Kont.)	95.2	8.8
	MSU(+)	84.4	15.2
	MSU + Bort. 0.05 μ M	86.9	13.1
	MSU + Bort. 0.1 μ M	95.8	4.2
	MSU + Bort. 1 μ M	89.8	10
	MSU + Bort. 5 μ M	93.6	6.3
HUVEC + THP (Ko-Kültür)	THP (Ko-Kültür Kont.)	91.2	4.8
	THP + MSU(+)	93.4	6.6
	THP + MSU(+) Bort. 0.05 μ M	86.8	13
	THP + MSU(+) Bort. 0.1 μ M	90	9.7
	THP + MSU(+) Bort. 1 μ M	89.8	10
	THP + MSU(+) Bort. 5 μ M	95.8	4

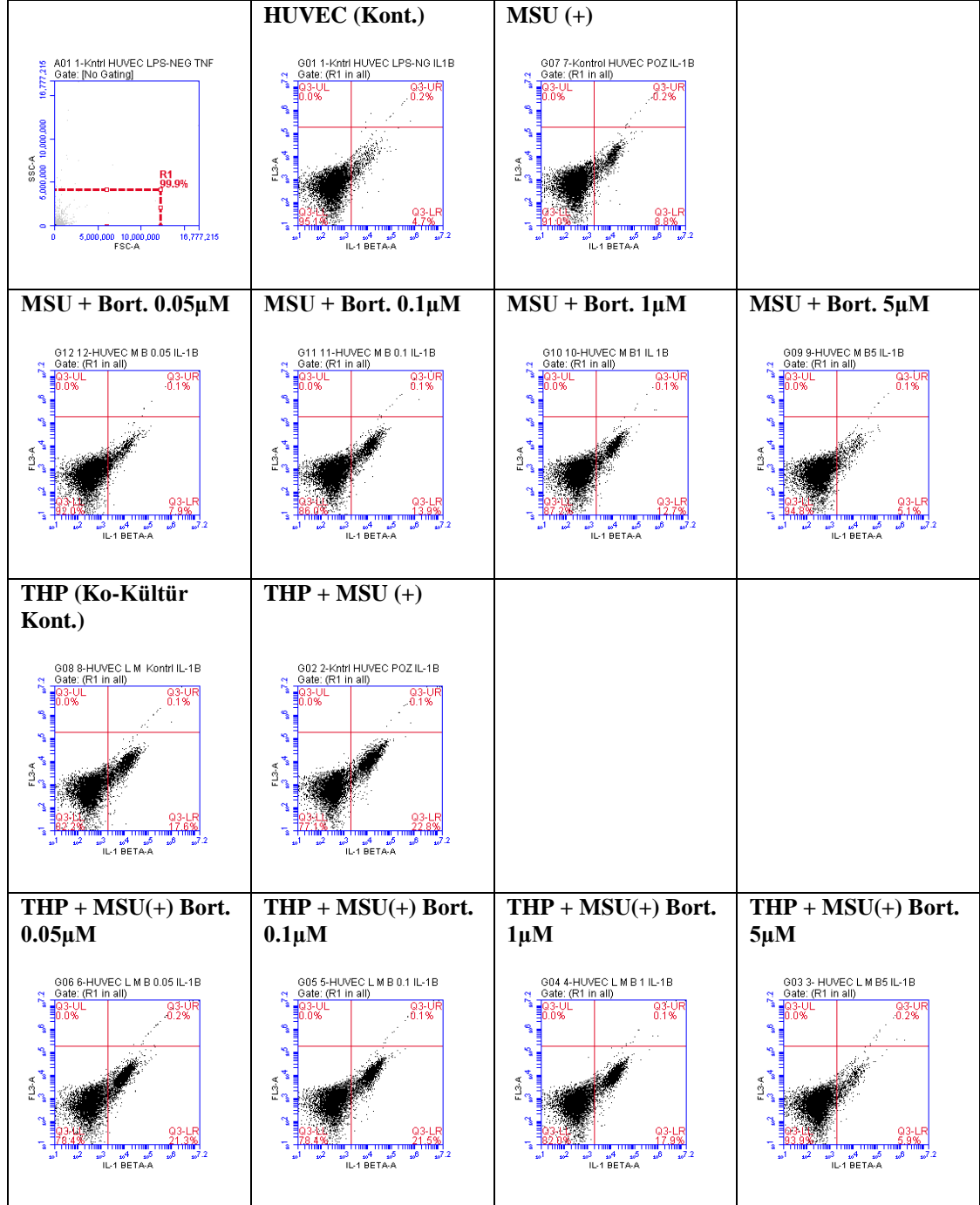
Şekil 4.14 ve Tablo 4.7’de görüldüğü gibi kontrol, MSU(+), MSU + Bort. 0.05 μ M, MSU + Bort. 0.1 μ M, MSU + Bort. 1 μ M ve MSU + Bort. 5 μ M uygulanan HUVEC hücrelerinde TNF- α seviyeleri sırasıyla; %8.8, 15.2, 13.1, 4.2, 10 ve 6.3 olarak; HUVEC ve THP-1 kokültür gruplarında ise %4.8, 6.6, 13, 9.7, 10 ve 4 olarak bulunmuştur.

HUVEC hücrelerinde hem tekli hem de kokültür gruplarında (5 μ M Bortezomib grubu hariç) TNF- α düzeyinin kontrole göre attığı görülmüştür. HUVEC kokültür gruplarında, tekli HUVEC gruplarına göre TNF- α seviyelerinin artış oranının daha az olduğu görülmektedir.

Önceki çalışmalar, proteazom inhibisyonunun, endotel hücrelerinde TNF- α kaynaklı adezyon moleküllerinin *in vitro* aktivasyonunu baskılayabildiğini göstermiştir (Ludwig vd., 2009). Akış sitometrisi analizi ile A549 akciğer kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada bortezomibin TNF- α seviyelerini artırdığı görülmüştür (Ozturk vd., 2021). Bortezomib tedavisinden sonra serum TNF- α değerleri enfeksiyon olmayan grupta anlamlı düzeyde azaldığı gösterilmiştir (Liu vd., 2021).

4.9.2. MSU inflamasyon ortamında bortezumibin HUVEC hücrelerinde IL-1 β düzeyleri

İnflamasyon belirteçlerinden IL-1 β 'nın ölçümü için HUVEC hücrelerinin tekli ve (THP-1 ile) ko-kültür gruplarında IL-1 β protokolü uygulandıktan sonra akış sitometri cihazında (BD Accuri C6) okutularak analiz edilmiştir (Şekil 4.15 ve Tablo 4.8).



Şekil 4. 15. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, farklı konsantrasyonlarda bortezumib uygulaması ile IL-1 β seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi

Tablo 4. 8. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, akış sitometri yöntemi ile bortezomibin farklı konsantrasyonlarda uygulaması sonucu belirlenen IL-1 β seviyeleri

Hücre kültür ortamı	Deney grubu	% Değerleri	
		IL-1 β Negatif (%)	IL-1 β Pozitif (%)
HUVEC	HUVEC (Kont.)	95.1	4.7
	MSU(+)	91	8.8
	MSU + Bort. 0.05 μ M	92	7.9
	MSU + Bort. 0.1 μ M	86	13.9
	MSU + Bort. 1 μ M	87.2	12.7
	MSU + Bort. 5 μ M	94.8	5.1
HUVEC + THP (Ko-Kültür)	THP (Ko-Kültür Kont.)	82.2	17.6
	THP + MSU(+)	77.1	22.8
	THP + MSU(+) Bort. 0.05 μ M	78.4	21.3
	THP + MSU(+) Bort. 0.1 μ M	78.4	21.5
	THP + MSU(+) Bort. 1 μ M	82	17.9
	THP + MSU(+) Bort. 5 μ M	93.9	5.9

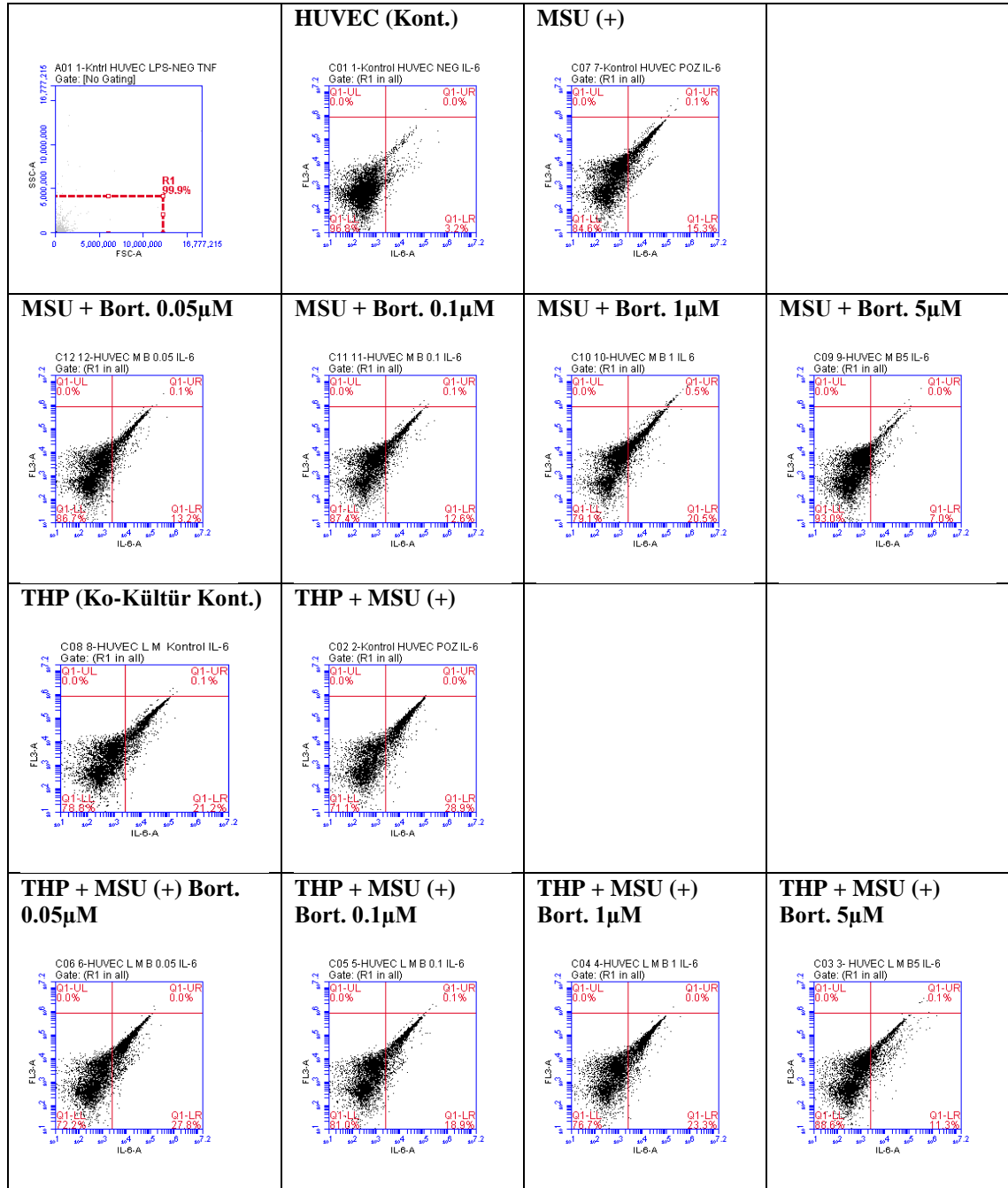
Şekil 4.15 ve **Tablo 4.8**'de görüldüğü gibi kontrol, MSU(+), MSU + Bort. 0.05 μ M, MSU + Bort. 0.1 μ M, MSU + Bort. 1 μ M ve MSU + Bort. 5 μ M gruplarındaki IL-1 β seviyeleri sırasıyla HUVEC hücrelerinde; %4.7, 8.8, 7.9, 13.9, 12.7 ve 5.1 olarak; HUVEC ve THP-1 kokültür gruplarında ise %17.6, 22.8, 21.3, 21.5, 17.9 ve 5.9 olarak analiz edilmiştir.

HUVEC kokültür modelinde bortezomib uygulanan gruplarda bortezomibin konsantrasyon artışı ile IL-1 β düzeyinde azalma göstermektedir. Bortezomib konsantrasyon artışı ile IL-1 β düzeyinde azalma paralellik göstermektedir.

Bortezomib ile yapılan bir çalışmada, J774A.1 hücrelerinde ve kemik iliğinden türetilen makrofajlarda IL-1 β salgılamasını inhibe ettiği tespit edilmiştir (Chen vd., 2022). A549 hücrelerinin makrofajla (M1, M2a ve M2c) ko-kültüründe yapılan bir araştırmada bortezomibin IL-1 β seviyelerinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Engür Öztürk, 2020. Bortezomin M0 makrofajlarıyla birlikte kültürlenmiş hücrelerde IL-1 β sitokin seviyelerini yaklaşık 20 kat arttırdığını gösteren bir çalışma da mevcuttur (Ozturk vd., 2021).

4.9.3. MSU inflamasyon ortamında bortezomibin HUVEC hücrelerinde IL-6 düzeyleri

İnflamasyon belirteçlerinden IL-6'nın ölçümü için HUVEC hücrelerinin tekli ve ko-kültür (THP-1 hücreleri ile) gruplarında IL-6 protokolü uygulandıktan sonra akış sitometri cihazında (BD Accuri C6) okutularak analiz edilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.16 ve Tablo 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4. 16. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, farklı konsantrasyonlarda bortezomib uygulaması ile IL-6 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi

Tablo 4. 9. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, farklı konsantrasyonlarda bortezomib uygulaması ile IL-6 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi

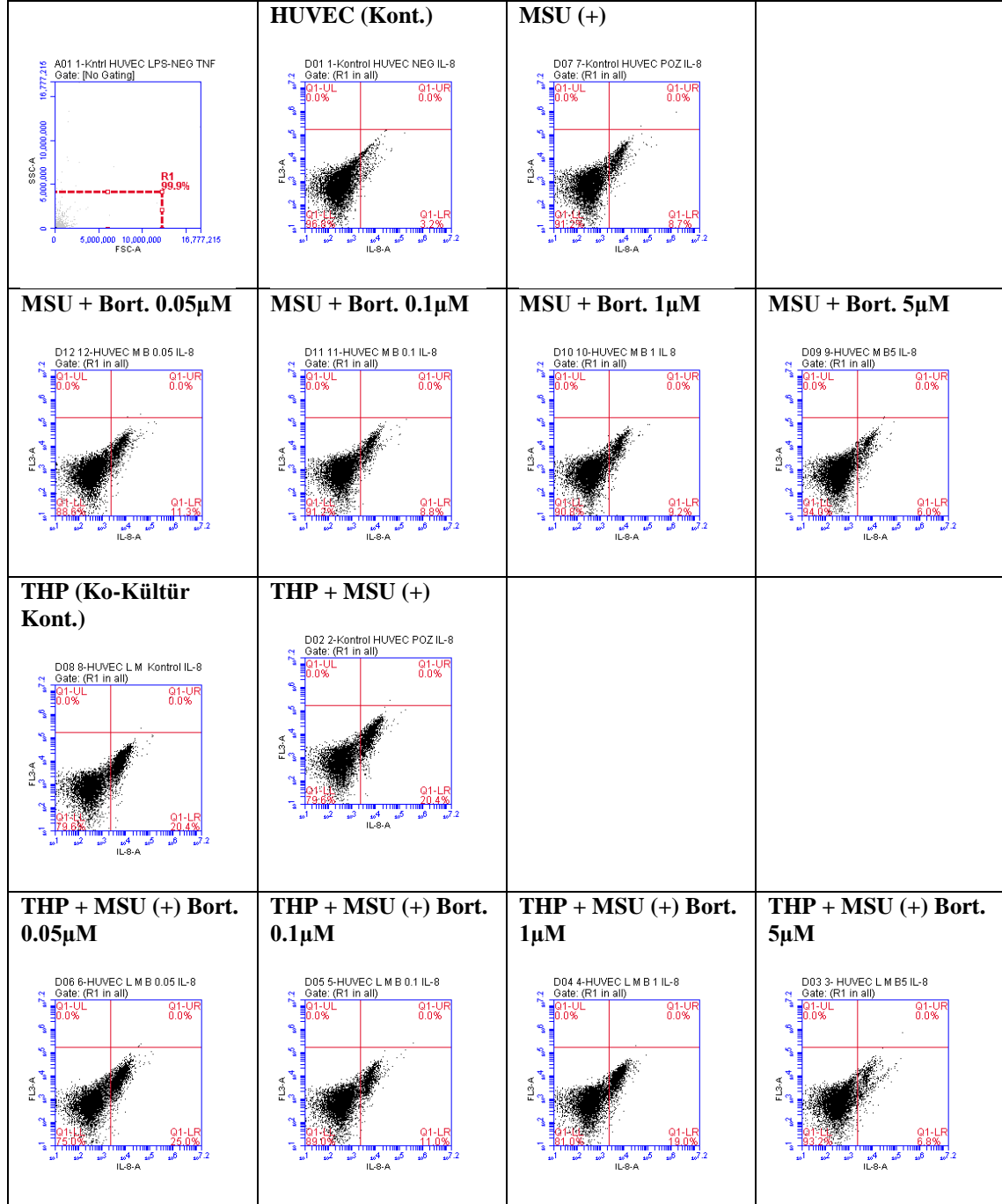
Hücre kültür ortamı	Deney grubu	% Değerleri	
		IL-6 Negatif (-)	IL-6 Pozitif (+)
HUVEC	HUVEC (Kont.)	96.8	3.2
	MSU(+)	84.6	15.3
	MSU + Bort. 0.05µM	86.7	13.2
	MSU + Bort. 0.1µM	87.4	12.6
	MSU + Bort. 1µM	79.1	20.5
	MSU + Bort. 5µM	93	7
HUVEC + THP (Ko-Kültür)	THP (Ko-Kültür Kont.)	78.8	21.2
	THP + MSU(+)	71.1	28.9
	THP + MSU(+) Bort. 0.05µM	72.2	27.8
	THP + MSU(+) Bort. 0.1µM	81	18.9
	THP + MSU(+) Bort. 1µM	76.7	23.3
	THP + MSU(+) Bort. 5µM	88.6	11.3

Şekil 4.16 ve Tablo 4.9’da görüldüğü gibi kontrol, MSU(+), MSU + Bort. 0.05µM, MSU + Bort. 0.1µM, MSU + Bort. 1µM ve MSU + Bort. 5µM gruplarındaki IL-6 seviyelerinin artış yüzdeleri sırasıyla HUVEC hücrelerinde; %3.2, 15.3, 13.2, 12.6, 20.5 ve 7 olarak; HUVEC kokültür gruplarında ise %21.2, 28.9, 27.8, 18.9, 23.3 ve 11.3 olarak analiz edilmiştir. Kontrol, MSU(+), MSU + Bort. 0.05µM, MSU + Bort. 0.1µM, MSU + Bort. 1µM ve MSU + Bort. 5µM gruplarındaki IL-6 seviyelerinin azalma yüzdeleri sırasıyla HUVEC hücrelerinde; %96.8, 84.6, 86.7, 87.4, 79.1 ve 93 olarak; HUVEC ve THP-1 kokültür gruplarında ise %78.8, 71.1, 72.2, 81, 76.7 ve 88.6 olarak analiz edilmiştir.

HUVEC tekli hücre ortamında sadece bortezomibin 1µM uygulanan grubunda IL-6 düzeyi kontrole göre artmış olup, diğer tüm bortezomib uygulanan gruplarda ise MSU kontrol gruplarına göre azalma görülmüştür. Çalışmamızı destekler nitelikteki daha önce yapılan araştırmalarda proteazom inhibitörlerinin (Hayashi vd., 2003) ve bortezomibin (Roccaro vd., 2006) MM hücrelerinde IL-6’nın yukarı regülasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. A549 hücrelerinde THP-1 kokültür modelinde yapılan bir çalışmada hem 2D hem de 3D kültürlerde IL-6 seviyelerinin yükseldiği görülmüştür (Ozturk vd., 2021).

4.9.4. MSU inflamasyon ortamında bortezomibin HUVEC hücrelerinde IL-8 düzeyleri

İnflamasyon belirteçlerinden IL-8'in ölçümü için HUVEC hücrelerinin tekli ve ko-kültür (THP-1 hücreleri ile) gruplarında IL-8 protokolü uygulandıktan sonra akış sitometri cihazında (BD Accuri C6) okutulularak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.17. ve Tablo 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4. 17. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, farklı konsantrasyonlarda bortezomib uygulaması ile IL-8 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi

Tablo 4. 10. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, akış sitometri yöntemi ile bortezomibin farklı konsantrasyonlarda uygulaması sonucu belirlenen IL-8 seviyelerinin gösterilmesi

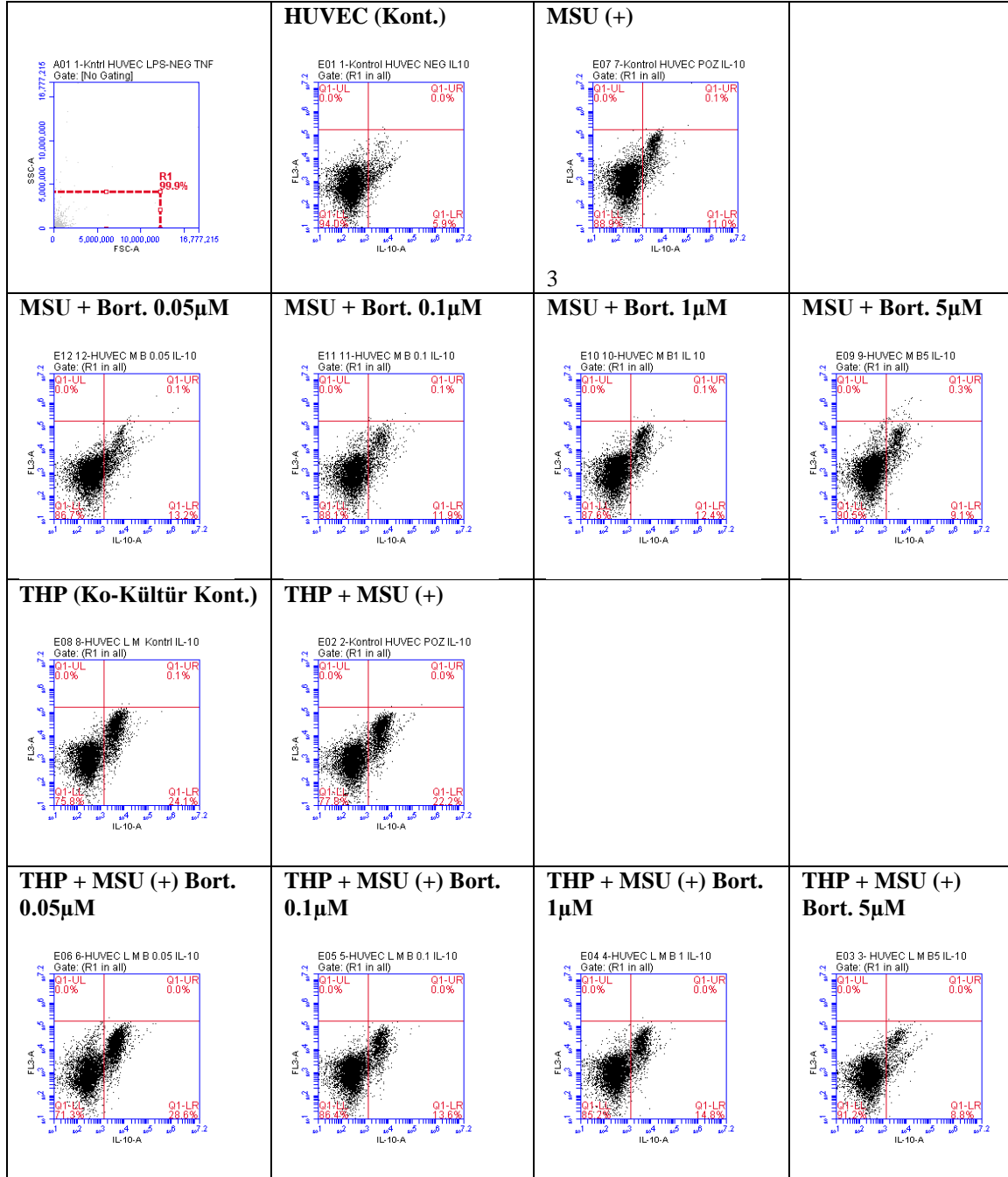
Hücre kültür ortamı	Deney grubu	% Değerleri	
		IL-8 Negatif (-)	IL-8 Pozitif (+)
HUVEC	HUVEC (Kont.)	96.8	3.2
	MSU(+)	91.2	8.7
	MSU + Bort. 0.05µM	88.6	11.3
	MSU + Bort. 0.1µM	91.2	8.8
	MSU + Bort. 1µM	90.8	9.2
	MSU + Bort. 5µM	94	6
HUVEC + THP (Ko-Kültür)	THP (Ko-Kültür Kont.)	79.6	20.4
	THP + MSU(+)	79.6	20.4
	THP + MSU(+) Bort. 0.05µM	75	25
	THP + MSU(+) Bort. 0.1µM	89	11
	THP + MSU(+) Bort. 1µM	81	19
	THP + MSU(+) Bort. 5µM	93.2	6.8

Şekil 4.17 ve Tablo 4.10'da görüldüğü gibi kontrol, MSU(+), MSU + Bort. 0.05µM, MSU + Bort. 0.1µM, MSU + Bort. 1µM ve MSU + Bort. 5µM gruplarındaki IL-8 seviyeleri sırasıyla HUVEC hücrelerinde; %3.2, 8.7, 11.3, 8.8, 9.2 ve 6 olarak; HUVEC ve THP-1 kokültür gruplarında ise %20.4, 20.4, 25, 11, 19 ve 6.8 olarak belirlenmiştir. Özellikle HUVEC 2D ve kokültür ortamında 5µM bortezomib uygulanan gruplarda, IL-8 düzeylerinde kontrol gruplarına göre oldukça azalma meydana getirmiştir.

Sonuçlarımızla uyumlu bir şekilde Ozturk ve arkadaşlarının (2021) yaptığı bir çalışmada bortezomib, kokültür gruplarında hem 2D hem de 3D kültürlerde IL-8 seviyesini 1.5 kat azaltmıştır.

4.9.5. MSU inflamasyon ortamında bortezomibin HUVEC hücrelerinde IL-10 düzeyleri

Antiinflamatuvar bir sitokin olan IL-10'un ölçümü için HUVEC hücrelerinin tekli ve ko-kültür (THP-1 hücreleri ile) gruplarında IL-10 protokolü uygulandıktan sonra akış sitometri cihazında (BD Accuri C6) okutulularak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.18 ve Tablo 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4. 18. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, farklı konsantrasyonlarda bortezomib uygulaması ile IL-10 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi

Tablo 4. 11. HUVEC tekli ve ko-kültür (HUVEC ile THP-1) ortamında, akış sitometri yöntemi ile bortezomibin farklı konsantrasyonlarda uygulaması sonucu belirlenen IL-10 seviyelerinin gösterilmesi

Hücre kültür ortamı	Deney grubu	% Değerleri	
		IL-10 Negatif (-)	IL-10 Pozitif (+)
HUVEC	HUVEC (Kont.)	94	4.9
	MSU(+)	88.9	11
	MSU + Bort. 0.05µM	86.7	13.2
	MSU + Bort. 0.1µM	88.1	11.9
	MSU + Bort. 1µM	87.6	12.4
	MSU + Bort. 5µM	90.5	9.1
HUVEC + THP (Ko-Kültür)	THP (Ko-Kültür Kont.)	75.8	24.1
	THP + MSU(+)	77.8	22.2
	THP + MSU(+) Bort. 0.05µM	71.3	28.6
	THP + MSU(+) Bort. 0.1µM	86.4	13.6
	THP + MSU(+) Bort. 1µM	85.2	14.8
	THP + MSU(+) Bort. 5µM	91.2	8.8

Şekil 4.18 ve Tablo 4.11’de görüldüğü gibi kontrol, MSU(+), MSU + Bort. 0.05µM, MSU + Bort. 0.1µM, MSU + Bort. 1µM ve MSU + Bort. 5µM gruplarındaki IL-10 seviyeleri sırasıyla HUVEC hücrelerinde; %5.9, 11, 13.2, 11.9, 12.4 ve 9.1 olarak; HUVEC ve THP-1 kokültür gruplarında ise % 24.1, 22.2, 28.6, 13.6, 14.8 ve 8.8 olarak analiz edilmiştir. Özellikle hem HUVEC tekli ortamda hem de kokültür ortamında, kontrol gruplarına göre en yüksek IL-10 seviyesi 0,05 µM bortezomib uygulanan gruplarda görülmüştür.

Liu ve arkadaşlarının (2021) bortezomibin inflamasyon ve immün lenfositler üzerindeki etkisini incelediği bir araştırmada, bortezomib tedavisinden sonra sağlıklı gruplarda serum IL-10 düzeylerinin önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. Çalışmamızda benzer şekilde IL-10 seviyesinde artış görülmüştür.

5. TARTIŞMA

Gut hastalığı metabolik bir hastalık olup toplumun yaşlanması ve hareketsiz yaşam tarzının artması ile birlikte sıklığı artmaktadır. Gut, şiddetli eklem iltihabı ile karakterize, artropatiye ve ciddi ağrıya neden olan otoinflamatuvar bir hastalıktır. Yüksek kan ürik asit düzeylerine (hiperürisemi) ve MSU kristallerinin eklemlerde birikmesine yol açan metabolik bozukluklarla güçlü bir şekilde ilişkilidir (Limon, 2022; Talbott, 1940).

Klinik olarak gut ve psödogut, eklemlerde ödem ve eritem ve de buna bağlı olarak şiddetli ağrı, intraartiküler ve periartiküler boşluklarda güçlü nötrofil infiltrasyonu ile ilişkili durumlar ile alakalıdır (Choy vd., 2015, Martinon vd., 2006). MSU, *in vitro* NLRP3 inflamatuvarının güçlü bir aktivatörüdür (Martinon vd., 2006) ve MSU'ya bağımlı nötrofil alımı, *in vivo* ASC adaptörüne, kaspaz-1 ve IL-1R'ye bağlıdır (Martinon vd., 2006; Liu vd., 2019). Patojenik kristal aracılı IL-1 β olgunlaşmasının inflamazom bileşenleri olan NLRP3, ASC ve kaspaz-1 gerektirdiğine dair bulgularına dayanarak, hem gut hem de psödogut etiyolojik ajanlarının (yani MSU ve CPPD) inflamazoma bağımlı bir şekilde inflamasyona aracılık ettiği öne sürülmektedir (Choy vd., 2015, Martinon vd., 2006). Son çalışmalar MSU'ya bağlı eklem iltihabının altında yatan mekanizmaları aydınlatmaktadır. NLRP3 inflamazomunun *in vitro* aşamalarındaki ve inflamazom bileşenlerindeki etkisinden dolayı, çalışmamızda kristal (MSU) kaynaklı inflamasyon oluşturarak gut modellemesi yapılmıştır.

Damar duvarlarının metabolik dengesini (homeostasis) ve normal dolaşım işlevini korumak için endotel hücrelerin yapısal ve işlevsel bütünlüğü çok büyük önem taşımaktadır (Kumar vd., 2005). Endotel ve inflamasyon arasındaki ilişki literatürde iyi bilinmektedir (Sun vd., 2020). Endotelyum kanda bulunan makro moleküllere karşı seçici bir bariyer oluşturur ve bu bariyerin hasara uğraması inflamasyon patogenezi ve arterioskleroz türü hastalıklar ile birlikte görülür (Ulus, 2006). Bir dizi NLRP3'ün hastalık ilişkileri, inflamatuvar hastalıklarda gelecekteki araştırmalar için önemli rolleri ortaya koymaktadır (Liu vd., 2019; Schett vd., 2016). Vasküler endotel hücrelerinde NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu endotel disfonksiyonuna yol açar ve kardiyovasküler hastalıkların gelişimine katkıda bulunur (Yin vd., 2019). Son çalışmalarda, THP-1 hücre hattının, hücrelerin hem aktif hem de dinlenme koşullarında bileşiklerin immün modüle edici etkilerini araştırmak/tahmin etmek için bir model olarak benzersiz özelliklere sahip olduğu sonucuna varmaktadır (Chanput vd., 2014). THP-1 hücrelerinin, ilaçların aracılık ettiği inflamatuvar yanıtları incelemek için yararlı olduğu ileri sürülmüştür (Mizuno vd., –

-2011). THP-1 hücre hattının, monosit ve makrofaj fonksiyonlarını/yanıtlarını, makrofaj farklılaşmasını ve çevredeki ortamdaki dış uyaranların olası etkilerini incelemek için basitleştirilmiş, uygun ve güvenilir bir modeli temsil ettiği bilinmektedir (Chanput vd., 2014). Yapılan literatür taramaları değerlendirilerek tez çalışmamızda NLRP3 inflamasyonuna bağlı monosit ve endotelde bortezomibin etkilerinin araştırılması; inflamatuvar hastalıkların önlenmesi veya tedavisi için farklı açılardan katkı sağlayacaktır.

NLRP3 inflamazom aktivasyonu doku inflamatuvar yanıtını tetikler ve böylece çeşitli inflamatuvar hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynar (Chen, vd., 2019; Yang vd., 2019). İnflamazom aktivasyonu ve ardından inflamatuvar sitokin salgılanması, çoklu uyaranlara karşı doğuştan gelen bağışıklık savunması için gereklidir ve adaptif bağışıklık yanıtlarının bir bağlantısı olarak kabul edilir (Yang vd., 2019). Son yıllarda, özellikle NLRP3 inflamazomunun metabolik yeniden programlama altındaki aktivitesiyle ilgili olarak, inflamazom aktivasyonunun metabolik düzenlenmesine ilişkin birçok çalışma ortaya çıkmıştır (Yang vd., 2019). Bu çerçevede çalışmamızda NLRP3 inflamazom aktivasyonu ile ilişkili parametreleri *in vitro* olarak incelemek amacıyla hücre kültürü modelini kullandık.

Epidemiyolojik çalışmalar hiperürisemi ile aterosklerotik vasküler hastalıklar arasındaki güçlü ilişkiye değinmiştir (Liang vd., 2015). Önceki çalışmalar, yüksek bir UA konsantrasyonunun, insan vasküler düz kas hücrelerinde ve HUVEC'lerde C-reaktif protein (CRP) üretimini indüklediğini ve CRP'nin artması plak oluşumunda ve kardiyovasküler morbiditede aktif olarak yer alabileceğinden bahsetmişlerdir (Kang vd., 2005). Başka bir *in vitro* çalışma, UA'nın NF- κ B ve mitojenle aktive olan protein kinaz sinyal moleküllerini aktive ederek vasküler düz kas hücrelerinde MCP-1 artışını uyardığını öne sürmüştür (Kanellis vd., 2005). Sitokinlerin, kemokinlerin ve büyüme faktörlerinin salınması ile karakterize edilen endotel disfonksiyonu, kan damarlarındaki inflamasyonun desteklenmesinde önemli bir rol oynar (Sun vd., 2020). Liang ve arkadaşları (2015) UA, NF- κ B'nin aktivasyonu yoluyla kısmen monosit-endotel hücre etkileşimlerini desteklediğini ve bu nedenle vasküler endotel yaralanmalarına ve ateroskleroz gelişimine aracılık edebileceğini bildirmişlerdir. Yüksek bir UA konsantrasyonunun doğrudan vasküler endotel üzerinde olumsuz etkiler yarattığını bildirmişlerdir. Bu araştırmalarda da olduğu gibi tez çalışmamızda MSU aracılığıyla HUVEC hücrelerinde inflamasyon oluşturmuştur. THP-1 hücrelerinde MSU kristalleri aracılı inflamatuvar etkiyi araştırmak için 6 kuyucuklu plakada inflamasyon deneyleri

gerçekleştirilmiş ve LPS (100 ng/ml) sonuçları ile karşılaştırılarak MSU'nun inflamasyon etkili konsantrasyonu, deneylerde kullanılmak üzere belirlenmiştir. İlerleyen deneylerde *in vitro* Gut modeli oluşturmak için 200 µg/ml MSU konsantrasyonunun THP-1 monosit hücrelerine uygulanmasının uygun olduğu görülmüştür.

Gut artriti tedavisi için hedefe yönelik ajanların kullanımı, güvenilir terapötik hedeflerin bulunmaması nedeniyle gecikmiş ve zorlayıcı olmuştur (Liu vd., 2023). MSU kristalleri tarafından aktive edilen NLRP3 inflamazomu, gut artritinin başlatılması ve ilerlemesi ile özellikle ilgilidir ve bu nedenle ileriye dönük bir teşhis biyobelirteci ve terapötik hedefi temsil edebilir. NLRP3 inflamatuvarının aktivasyonunun farmakolojik inhibisyonu da gut artriti tedavisi için umut verici bir yol olabilir (Liu vd., 2023). Bu açıdan çalışmamızda gut artritinin tedavisine yönelik inceleme yapılması tezimize özgünlük katmaktadır.

MSU kristallerinin, *in vitro* olarak THP-1 hücresinde ve insan monositlerinde NLRP3 inflamatuvarını aktive ettiği bulunmuştur (Chu vd., 2017). THP-1 hücrelerinin monosit veya makrofaj durumundaki yanıtlarının tek bir hücre tipi olarak incelenmesinin yanı sıra, bu hücre modeli, adipositler, T-lenfositler, vasküler düz kas hücreleri vb. gibi diğer hücrelerle ortak kültür sisteminde kullanılmıştır (Chanput vd., 2014). MSU kristalinin neden olduğu patolojik olaylar, öncelikle insan monositlerinde veya aktive edilmiş THP-1 makrofajlarda incelenmiştir. Çalışmaların çoğu, pro-IL-1β üretmek için PMA ile farklılaştırılmış THP-1 hücrelerini kullanmıştır (Chung vd., 2016; Zhang vd., 2014; Singh vd., 2019). Literatürde THP-1 hücrelerinin MSU kaynaklı inflamasyon ile ilişkisini inceleyen bazı araştırmalar olmasına rağmen çalışmamız MSU kaynaklı inflamasyon üzerinden HUVEC hücreleri ve THP-1 monosit hücrelerinin ko-kültürlerinin kullanıldığı ilk çalışmadır.

Yüksek UA seviyelerinin arteriyoskleroz, ateroskleroz veya hipertansif organ hasarının gelişimini ve ilerlemesini buna bağlı olarak endotel fonksiyonu üzerinde zararlı bir etki oluşturacağı öne sürülmüştür. Son zamanlarda, hiperürisemik deneklerde UA'in arter duvarı üzerinde olumsuz etkisi olduğu gösterilmiştir (Mercurio vd., 2004). Aynı zamanda MSU kristallerinin, THP-1 hücresinde ve insan monositlerinde NLRP3 inflamatuvarını aktive ettiği birkaç *in vitro* çalışma (Martinon vd., 2006) bulunmasına rağmen monositlerde MSU kristallerinin neden olduğu inflamasyon modeli nadiren rapor edilmiş olup gut inflamasyonunun THP-1 ile damar endotelindeki etkisinin değerlendirildiği literatür bilgisinin oldukça kısıtlı sayıda olduğu gözlenmiştir. Gut

inflamasyonunda THP-1 ve HUVEC hücreleri ile kokültür ortamı oluşturularak gerçekleştirilmesi çalışmamızı değerli kılmaktadır.

Eklemlerde ve yumuşak dokularda monosodyum urat (MSU) kristallerinin birikmesi, gut hastalarında gözlenen akut semptomların çoğunu ortaya çıkaran inflamatuvar bir yanıtı tetikler. Bu mikrokristaller, başlı başına bir inflamatuvar reaksiyonu başlatabilen bir yol olan NLRP3 inflamazomu gibi doğuştan gelen bağışıklık yollarının aktivasyonunu teşvik eder. İnflamatuvar aktivasyon üzerine, makrofajlar ve muhtemelen nötrofiller dahil olmak üzere bağışıklık hücreleri, gutta inflamasyonun anahtar aracısı olduğu gösterilen pleiotropik bir sitokin olan IL-1 β 'nin salınmasını tetikler (Akdoğan ve Yöntem, 2018). MSU kristallerinin inflamatuvar toplanmayı teşvik ettiği mekanizmalarda bazı belirsizlikler hala mevcuttur. Bu nedenle, MSU kristallerinin inflamasyonu tetiklemek için inflamasyon aktivasyonunu nasıl teşvik ettiğini anlamak, akut gut alevlenmelerinin tedavisi için spesifik terapötik stratejilerin yolunu açabilir. Araştırmamız inflamasyon oluşturulmuş gut modelinde, kemoterapötik bir ajan olan bortezumibin antiinflamatuvar etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

Brook ve arkadaşları (2011) araştırmaları sonucunda çeşitli KV risk faktörleri, inflamasyon ve UA'daki artışa rağmen, gut hastaları normal endotel fonksiyonu gösterdiği bildirilmiştir. Ancak ilerleyen çalışmalarda ürik asidin vasküler endotel hücrelerine hasar verebileceği bildirilmiştir. Zhang ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışma ile kan lipid profili değişiklikleri, lipid metabolizması bozukluğu ve damar hastalıkları olan gut hastalarında, hiperüriseminin endotel hücre hasarına yol açtığı sonucuna varmışlardır. Yine bir başka çalışmada Liang ve arkadaşları (2015) ürik asitin oksidatif stres ve inflamasyon (NF- κ B'nin aktivasyonu) yoluyla vasküler endotel hücrelerine zarar verebileceği sonucuna ulaşılmıştır. Biz de çalışmamızda gut modeli oluşturarak hiperüriseminin endotel üzerindeki inflamasyonunda bortezumibin olası immünoşüpressif etkisi ile endotel hücrelerindeki etkilerini araştırmayı hedefledik.

Bortezumib ile NLRP3 inflamatuvar yol arasında potansiyel bir ilişki olduğunu gösteren kanıtlar da vardır. Bortezumib uygulaması yapılan bir çalışmada (Liu vd., 2018), NLRP3 ve fosforile edilmiş sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü-3 (STAT-3) içeren NOD benzeri reseptör ailesi pirin alanının ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir. Liu ve arkadaşlarının (2018) yaptığı bu çalışma ile bortezumibin NLRP3 promotöründe histon asetilasyonunu desteklediğini ve bunun da NLRP3 ifadesinin yukarı regülasyonuna yol açtığı bulunmuştur (Poli vd., 2020). Bu mekanizma, bortezumibin

neden olduğu ağrılı nöropati bağlamında gözlemlenmiş olup bu bağlamda bortezomibin belirli durumlarda NLRP3 inflamatuvar aktivasyonuna da katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Başka bir çalışma, bortezomib tedavisinin bir yan etkisi olarak ağrılı nöropatisi olan kanser hastalarında NLRP3'ün aşırı eksprese edildiğini bildirmiştir (Gritsenko vd., 2020). Bu aşırı ekspresyon, NLRP3 promotör bölgesindeki histon H3 ve H4'ün asetilasyonuna atfedilmiş ve bu da bortezomib ile NLRP3 düzenlemesi arasındaki bağlantıyı daha da desteklemiştir. Bortezomibin öncelikle protein degradasyonu ve hücresel homeostazda önemli bir rol oynayan proteazoma karşı önleyici bilinmektedir (Fennell vd., 2007). Bununla birlikte bortezomibin, inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde rol oynayan bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'ye karşı da inhibitör aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Cull ve Rauh, 2017). Bortezomib ve diğer proteazom inhibitörlerinin NLRP3 inflamatuvar aktivasyonunu inhibe ederek antiinflamatuvar etkilere sahip olduğunu Chen ve arkadaşları (2022) bildirmiştir. Bortezomib öncelikli olarak bir proteazom inhibitörü olarak tanınırken, bortezomib ile NLRP3 inflamasyonu arasında potansiyel bir ilişki olduğunu gösteren yeni kanıtlar ortaya çıkmasına rağmen mekanizmaların tam olarak aydınlatılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu ilişkinin altında yatan kesin mekanizmaları aydınlatmak ve bortezomib tedavisi bağlamında NLRP3 inflamatuvarını hedeflemenin terapötik sonuçlarını araştırmak adına çalışmamız literatüre ışık tutacaktır.

Taşkonak (2021) kanser hücrelerinde yaptığı çalışmada MTT ile hücre canlılık analizlerini kullanmıştır. (Krętownski ve arkadaşları (2014) sağlıklı insan deri fibroblast hücre hattının (CRL1474) canlılığı üzerinde bortezomibin etkilerini araştırmıştır. Artan bortezomib dozları (25 nmol/l ile 1000 nmol/l arasında) ile 12, 24 ve 48. saatlerde bortezomibin hücre proliferasyonuna olan etkileri MTT yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Hücrelerin canlılığında zamana ve bortezomibin dozuna bağlı olarak bir azalmaya neden olduğu görülmüştür. Bortezomibin 1000 nmol/l dozunda hücre canlılığını önemli miktarda azalttığı görülmüştür. Benzer şekilde araştırmamızda HUVEC ve THP-1 hücrelerinde MTT testi uygulanarak bortezomibin farklı konsantrasyonları (0,01 μ M; 0,1 μ M; 1 μ M ve 10 μ M) 24 ve 48 saatlik inhibisyonlar sonunda hücre proliferasyonu ve canlılığı üzerinde zamana ve konsantrasyona bağlı bir azalma görülmüştür.

Yapılan bir çalışmada, THP-1 hücrelerinde bortezomibin 0-1000 nM doz aralığında uygulanması ile kontrole göre hücre canlılığının %80'in altına düşmediği bildirilmiştir

(Choy vd., 2015). Yapılan başka bir hücre canlılığını belirleme çalışmasında ise 50 nM bortezomib konsantrasyonunun hücre canlılığını %50'nin altına indirmediği bildirilmiştir (Chu vd., 2017). Ayrıca bir başka çalışmada, hücre canlılığı MTT yöntemi ile belirlenmiş ve bortezomibin 400 nM (0.4 µM) dozu uygulanan (4 saatlik inkübasyon) primer monosit hücrelerinde canlılığın kontrole göre yaklaşık yüzde 50'nin altına düştüğü ve IC₅₀ değerinin 274.0 ± 3.6 nM olduğu aktarılmıştır (Liu vd., 2019). Tez çalışmamızda HUVEC ve THP-1 hücrelerinde MTT testi uygulayarak bortezomibin farklı konsantrasyonlarının (0,01 µM; 0,1 µM; 1 µM ve 10 µM) 24 ve 48 saatlik periyotlardaki hücre canlılığı üzerine etkisini inceledik. THP-1 hücrelerinde hem 24 hem de 48 saat inkübasyon sürelerinde bortezomibin hücre canlılığını %50'nin altına düşürmediği tespit edilmiştir. Benzer şekilde HUVEC hücrelerinde de hem 24 hem de 48 saat inkübasyon sürelerinde bortezomibin hücre canlılığını %50'nin altına düşürmediği görülmüştür. Ancak hem THP-1 hem de HUVEC hücrelerinde bortezomibin sitotoksik etkilerinin konsantrasyon ve inkübasyon süresinin artışına bağlı olarak artmış olduğu belirlenmiştir. HUVEC ve THP-1 kökültüründe bortezomibin 24. saatte IC₅₀ konsantrasyonu 127nM olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde bizim MTT sonuçlarımız bu sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

MSU kristalleri tarafından uyarılan makrofajlar, sonuçta lizozomal zarın yırtılmasına yol açan zar hasarına neden olur ve bu da proteinleri, glikozaminoglikanları, nükleik asitleri ve lipidleri parçalayabilen lizozomal enzimlerin salınmasına neden olur. İnflamasyon sırasında, çeşitli hücre tiplerinin, özellikle makrofajların ve nötrofillerin, doğrudan serbest radikaller üretebildiği, bunun da nihai olarak lipid peroksidasyonuna yol açtığı ve oksidatif stres ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu yoluyla antioksidan statüsünü bozduğu iyi bilinmektedir. Serbest radikaller, proinflamatuvar sitokinlerin indüksiyonuna yol açan sinyal mekanizmasını düzenleyen kritik bir belirleyicidir (Dhanasekar vd., 2015). MSU kristallerinin bağışıklık sistemi için bir tehlike sinyali olarak hareket ettiği ve inflamazom aktivasyonunu uyardığı gösterilmiştir (Martinon vd., 2006).

Çalışmamızda HUVEC hücrelerinin THP-1 hücreleri ile ko-kültürde kullanılan E-plate insert plaka ile aynı kültür ortamında bulunması ve proliferasyonunun gerçek zamanlı olarak ölçümleri ile sonuçlarımız oldukça hassas olarak belirlenmiştir. Gerçek zamanlı analiz sisteminde Xcelligence cihazında HUVEC ve THP-1 hücre ko-kültürlerinde bortezomibin antiproliferatif etkileri ilk defa bu tez çalışmasında incelenmiş

ve inflamasyon ortamında bortezomibin hücre proliferasyonunu konsantrasyona ve zamana bağlı olarak azalttığı belirlenmiştir. Önceki araştırmalar da (Podar vd., 2004; Tamura vd., 2010) bortezomibin antianjiyogenik aktivitesinde önemli rolü olan vasküler endotel hücreleri üzerinde doğrudan negatif proliferatif etkilerinden bahsedilmiştir. Yapılan bir araştırmada Colo320HSR, HT 29 ve DLD1 kolon kanseri hücre hatlarında bortezomibin 5, 10, 20 nM dozları uygulanmış ve 24 saatlik inkübasyonu sonunda, hücre proliferasyonlarının bortezomib ile anlamlı düzeyde azaldığı bildirilmiştir. Bu etkinin bortezomibin proteazom inhibisyonundan kaynaklanan hücre içi ROS üretiminin artmasıyla ilişkili olarak hücre döngüsünü durdurarak antikanser aktivite gösterdiğini açıklanmıştır (Hong vd., 2012). Tüm bu veriler tezimizde ulaşılan bortezomibin antiptoliferatif etkinliğini kanıtlamaktadır.

Farklı doku ve organlardan köken alan hücrelerin metabolizma hızları, detoksifikasyon yetenekleri, oksidatif strese dayanıklılıkları ve yaşam süreleri birbirinden farklıdır (Kısmalı ve Sel, 2012). Endotel hücrelerinin apoptozu ve iltihabı, oksidatif stres, hipoksi, anjiyotensin II, oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL'ler) ve yüksek glikoz dahil olmak üzere çeşitli uyarılar tarafından indüklenebilen endotelial disfonksiyonun ana biyokimyasal özellikleridir (Chen vd., 2021). Çalışmamızda RTCA DP yöntemi kullanılarak 16 kuyucuklu plakalarda (CIM-plate) migrasyon deneyi ve Oris hücre migrasyon deneyi ile HUVEC hücrelerinin hücre göçü (migrasyonu) incelenmiştir. Oris ve RTCA DP sistemi CIM-plate migrasyon deneyi sonuçlarımız birbirine paralellik göstermiş olup bortezomib konsantrasyonlarında HUVEC hücrelerinin migrasyonunu azalmıştır. Bortezomib HUVEC hücrelerinde anti-migrasyon etki göstermiştir.

Bortezomibin hücre göçüne ve hücre-hücre etkileşimine etkisini incelemek için ayrıca çizik (yara iyileşme) deneyi ile HUVEC hücrelerinin migrasyon değişimleri değerlendirilmiştir. Bortezomib konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak HUVEC hücrelerinin migrasyon yeteneklerinin azalarak yara oluşturulan alanlarının kapanmadığı ve inflamasyonlu ortamda da HUVEC hücrelerinde migrasyonu azalttığı izlenmiştir. Literatürde çizik yara tahlilinin kullanıldığı bir çalışmada (Mehdizadeh vd., 2021) bortezomibin hücre göçünü azalttığı bildirilmiştir. Bortezomibin vasküler endotel hücrelerinin vasküler geçirgenliğini artırdığı böylece hücre büyümesini güçlü bir şekilde inhibe ettiği de aktarılmıştır (Tamura vd., 2010).

K562 hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri araştıran Engür ve arkadaşları (2016) 24 ve 48 saat sonra 1 µm bortezomibin etkilerinin başladığını

gözlemlemiştir. Engür ve Dikmen'in (2017) yaptığı bir araştırmada MLN2238 ve bortezomibin insan kolon adenokarsinom Caco-2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkileri karşılaştırılmalı olarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre bortezomib ve MLN2238, Caco-2 hücrelerinde konsantrasyona ve zaman bağlı önemli apoptotik ve antiproliferatif etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Engür ve Dikmen, 2017). THP-1 ile oluşturulmuş kültür modelinde A549 hücrelerinde Annexin V-PI yöntemi kullanılan bir çalışmada (Ozturk vd., 2021) akış sitometrisi analizi sonuçlarına göre bortezomibin apoptotik etkisi %41 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda Annexin V-PI yöntemi ile bortezomibin toplam apoptotik etkisi (erken apoptoz + geç apoptoz) hem tekli hemde ko-kültür gruplarında kontrol grubuna göre artış göstermiş olup diğer çalışmalarda da olduğu gibi apoptotik etkinliği görülmektedir.

NLRP3'ün aktivasyonuna yol açan kesin moleküler olaylar belirsizliğini korumaktadır. ATP, bakteriyel ve fungal toksinler, mitokondriyal disfonksiyon, ROS oluşumu ve lizozomal hasar da dahil olmak üzere, çoklu moleküler veya hücresele uyaranların NLRP3 inflamazomunu aktive ettiği gösterilmiştir. NLRP3 uyaranları çoğu hücrelerde ROS üretimini indükleyebilmektedir. Lizozomal NADPH oksidazın ROS üretiminin kaynağı olduğu düşünüldüğünden; ROS, NLRP3 inflamazom aktivasyonu için ortak bir sinyal olarak önerilmektedir. Kimyasal inhibitörlerle yapılan çalışmalarda NADPH oksidaz tarafından üretilen sitozolik ROS'un, NLRP3 inflamazom aktivasyonundan sorumlu ortak sinyal olarak düşünülmektedir (Şaker ve Polat, 2022). NLRP3 inflamasyonunun tam aktivasyonu hem bir hazırlama sinyali (LPS) hem de bir aktivasyon sinyali (ATP) gerektirir (Hua vd., 2019). Çok sayıda NLRP3 inflamatuvar aktivatörünün çeşitli hücrelerde mitokondriyal ROS üretimini tetiklediği bilinmektedir (Jo vd., 2016). Akut yüksek UA konsantrasyonlarının HUVEC'de mitokondriyal kalsiyum aşırı yüklenmesine neden olduğu ve bunun da aşırı ROS üretimine yol açabilecek mitokondriyal membran potansiyelinde önemli bir artışa yol açtığı gösterilmiştir (Arima, 2003). Aşırı hücre içi ROS seviyeleri de apoptoza veya nekroza neden olmaktadır (Kelley vd., 2019). JC-1 boyası kullandığımız yöntemimizde hem HUVEC hücrelerinde hem de THP-1 ile kokültür ortamında bortezomib deney gruplarında, mitokondriyal depolarizasyon seviyelerinde artış belirlenmiştir.

Belloni ve arkadaşları (2010) yaptıkları çalışma ile bortezomib uygulanan endotel hücrelerinde apoptozun indüklediğini göstermişlerdir. Apoptozun en önemli göstergesi olan Kaspaz-3 aktivasyon ölçümümüzde de HUVEC gruplarında bortezomib dozlarında

kontrole göre daha yüksek kaspaz-3 aktivasyon artışı analiz edilmiştir. Yaptığımız tüm apoptoz deneyleri birbirlerine uyumlu olmakla beraber bortezomibin apoptotik etkisi ortaya konmuştur. Bortezomib, HUVEC hücrelerinde, hücre apoptozunu önemli ölçüde arttırdı.

Yin ve arkadaşları (2019) yaptıkları bir çalışmada ürik asitin NLRP3 / IL-1 β 'yi aktive ettiği ve *in vitro* ROS aktivasyonu ve K⁺ akışı yoluyla vasküler endotel hücre hasarını indüklediği mekanizmaları araştırmak için insan umbilikal ven endotel hücrelerini kullanmışlardır ve bunları *in vivo* olarak doğrulamışlardır. Bu çalışmada, ürik asitin HUVEC'lerde NLRP3 inflamazomunu aktive ettiğini, IL-1 β ve ICAM-1 dahil olmak üzere bazı inflamasyon faktörlerinin seviyesini önemli ölçüde artırabildiğini bulmuşlar. Ürik asit tarafından indüklenen IL-1 β ve ICAM-1 artışı, muhtemelen vasküler endotel hasarından sorumludur. Farklı konsantrasyonları ve farklı inkübasyon süreleri ile muamele edilen ürik asidin HUVEC'lerde IL-1 β ekspresyonunu indüklediğini belirlemişlerdir (Yin vd., 2019).

Deneysel bir artrit kronik fazı aynı zamanda IL-1, IL-6 ve nitrik oksit metabolitleri gibi NF- κ B'ye bağımlı proinflamatuvar faktörlerin serum seviyelerindeki artışla da ilişkilendirilmiştir. Bu faktörlerin önemli ölçüde daha düşük seviyeleri bulunmuştur. Bortezomibin derin antiinflamatuvar etkilerinin kısmen NF- κ B aktivitesinin inhibisyonundan kaynaklandığı kavramını desteklemektedir (Elliott vd., 2003).

İnflamatuvar faktörlerin neden olduğu endotel hücre hasarının vasküler hastalıkların patogenezinde anahtar rol oynadığı bildirilmiştir. Önceki çalışmalar, NLRP3 inflamatuvar aktivitesinin, lizozomal bozukluk dahil olmak üzere çeşitli stresler aracılığıyla düzenlendiğini ileri sürmektedir. Bir multiprotein kompleksi olan NLRP3 inflamazom, kaspaz-1'i aktive edebilir ve IL-1 β salgılanmasına yol açabilir. NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu endotel disfonksiyonunun gelişmesine yol açabilir ve vasküler yaralanmayı daha da hızlandırır (Kısmalı ve Sel, 2012). Son araştırmalar, NLRP3 inflamatuvar ilişkili otoinflamatuvar hastalıktaki hücre stresinin artışı, kan monositlerinde IL-1 β ve IL-18 seviyelerinin arttığını göstermiştir (Jo vd., 2016; Carta vd., 2015). MSU kristalinin neden olduğu NLRP3 inflamatuvar aktivasyonu tutarlı olarak çalışmalar, çeşitli dokularda gutta yüksek IL-18 seviyelerini bildirmektedir (Klück vd., 2021). Ürik asit ile yapılan bir çalışmada HUVEC'lerde IL-1 β ve ICAM-1 dahil olmak üzere bazı inflamasyon faktörlerinin seviyesini önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, ürik asitin HUVEC'lerde NLRP3 inflamazomunu aktive

ettiğini ve IL-1 β , kaspaz-1 ve ICAM-1 ekspresyonunu arttırdığını göstermişlerdir. Farklı konsantrasyonları ve farklı inkübasyon süreleri ile muamele edilen ürik asidin HUVEC'lerde IL-1 β ekspresyonunu indüklemiştir (Yin vd., 2019). IL-1 β , IL-18 ve NO, çok sayıda çalışma tarafından inflamasyonun temel araçları olarak vurgulanmıştır ve otoimmün hastalıklar ve diğer inflamatuvar durumlarla ilişkilendirilmiştir (Kelley vd., 2019). Bir hayvan çalışmasında Hu ve arkadaşları (2008) ürik asit nefropatisi olan bir sıçan modelinde inflamatuvar sitokinler IL-1 β ve IL-18 düzeylerinde artış ve böbrek hasarında ağırlaşma gözlemlenmiştir. Yapılan bir klinik çalışmada IL-1 β ve IL-18'in yüksek oranda eksprese edildiği bulunmuştur (Hu vd., 2018). Bu sonuçlar, hiperüriseminin neden olduğu böbrek hasarının ortaya çıkmasında ve gelişmesinde inflamatuvar faktörlerin rol oynadığını ve hiperürisemik nefropatinin önlenmesi ve tedavisine yönelik çalışmalar için yeni bir teorik temel sağladığını göstermektedir. IL-1 β 'nin gutta bilinen kritik bir rolü olmasına rağmen, artan kanıtlar diğer IL-1 ailesi üyelerinin de hiperürisemi ve gut alevlenmelerinin patogenezinde rol oynadığını göstermektedir (Klück vd., 2021). Cavalcanti ve arkadaşları (2016), gutta sitokin düzeyleri üzerine yaptıkları çalışmada IL-18 in gutun inflamatuvar sürecine katıldığını ve tofus ile deformitelerin varlığı ile anlamlı bir ilişkisi olduğunu göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada; gut deformiteleri olan tofuslu hastalarda IL-8 seviyesinin daha yüksek olduğunu ve buna bağlı olarak hastalığın şiddeti ile bir miktar ilişkisi olabileceğini belirtmişlerdir. PMA ile HUVEC uyarılmasından sonra süpernatantlarda endotel hücrelerinden salınan IL-8 miktarlarını inceleyen Çakiris (2012), PMA ile stimülasyonun 1. saatinde IL-8 seviyesinde bir artış gözlemlenirken 2. saatte yaklaşık 4 katına çıkan bir IL-8 artışı görmüştür. Literatür bilgileri ile benzer şekilde çalışmamızda HUVEC kokültüründe bortezomib uygulanan gruplarda bortezomib konsantrasyon artışı ile IL-1 β düzeyinde azalma görülmüştür. IL-8 düzeylerinde de kontrol gruplarına göre oldukça azalma meydana getirmiştir.

Cavalcanti ve arkadaşları (2016), gutta sitokin düzeyleri üzerine yaptıkları çalışmada IL-6'nın serum düzeyinin arttığını ve tofus ile deformitelerin varlığı ile anlamlı bir ilişkisi olduğunu göstermişlerdir. Barbaro ve arkadaşları (2015) hipertansif hastalarda arteriyel sertlik ile IL-6, IL-1 β ve CRP (ayrıca IL-10 ve TNF) seviyeleri arasında ilişki olduğunu açıklamışlardır. Jiang ve arkadaşları (2014) gut hastalarında kontrollere kıyasla CRP, IL-6 arasında pozitif bir korelasyon tespit etmiştir. Shang ve arkadaşlarının (2019) çalışmasında; MSU kristalinin neden olduğu peritonit modelinde IL-33'ün ekzojen

uygulanması sonucunda IL-1 β ile IL-6'da bir azalmaya ve nötrofillerin toplanmasına yol açarken, antiinflamatuvar sitokin IL-10 arttığı sonucuna ulaşılmıştır. (Shang vd., 2019). Çalışmamızda benzer şekilde HUVEC tekli ortamda kontrole göre IL-10 seviyesinde artış, borteomib uygulanan gruplarda ise IL-6 seviyelerinde azalma görülmüştür. Daha önce yapılan araştırmalarda proteazom inhibitörlerinin (Hayashi vd., 2003) ve borteomibin (Roccaro vd., 2006) MM hücrelerinde IL-6'nın yukarı regülasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir.

TNF, tümör nekroz faktör geni, TNF süper familyasına ait makrofajlar tarafından salgılan çok işlevli bir proinflamatuvar sitokini kodlamaktadır. Bu sitokin; apoptoz, hücre çoğalması, lipid metabolizması, pıhtılaşma ve hücre farklılaşması dahil oldukça geniş bir biyolojik süresin düzenlenmesinde rol alır (Zer vd., 2007). Romatoid artrit, obezite, neoplazmlar gibi birçok hastalıkta ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. Hücre olarak Deoksiribo nükleik asit (DNA) hasar cevabı, akut inflamatuvar cevap, kalsiyum aracılı sinyal, hücre aktivasyonu-çoğalması-ekstravazasyon, sirkadiyen ritim, apoptotik süreç, kortikal aktin hücre iskelet organizasyonu, hücre dışı matris organizasyonu, bağışıklık cevabı, ölüm indükleyen sinyal kompleksi, savunma cevabı, MAPK kaskadı, endotel hücre apoptotik süreci, C-Jun N-terminal kinaz (JNK) kaskadı, transkripsiyonun negatif regülasyonu, mitotik hücre döngüsünün negatif düzenlenmesi, sitokin regülasyonu gibi birçok önemli fizyolojik süreçte rol oynamaktadır (Banno vd., 2004; Görgülü, 2019). A549 akciğer kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada borteomibin TNF- α seviyelerini artırdığı görülmüştür (Ozturk vd., 2021). TNF- α , anti-proliferasyon ve apoptoz yollarında önemli işlevleri olduğundan, TNF- α seviyeleri ölçüldü. Akış sitometrisi verilerimize göre HUVEC hücrelerinde hem tekli hem de kokültür gruplarında TNF- α düzeyinin kontrole göre attığı gözlenmiştir.

Çalışmamızda HUVEC hücrelerindeki tekli ve THP-1 kokültür ortamlarında sitokin ölçümleri (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α) yapılması suretiyle borteomibin antiinflamatuvar etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar çerçevesinde literatürle uyumlu olarak borteomibin antiinflamatuvar etkinliği yorumlanmıştır. İnflamatuvar sitokin seviyelerinde artışlar gözlemlendi. Proinflamatuvar sitokinlerin (özellikle IL-1 β ve IL-18), inflamatuvar bir bağışıklık yanıtının ilk adımlarına aracılık ettiği bilinmektedir. Bu nedenle inflamasyonun bu yukarı yönlü aracılarını hedeflemek, inflamasyonla ilişkili hastalıkların tedavisinde umut verici bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır.

Bortezomib protein degradasyonunda önemli rol oynayan 26S proteazomunu geri dönüşümlü olarak inhibe eder. Bu kompleksin inaktivasyonu, transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'nin inaktivasyonuna yol açar. NF- κ B anahtar bir transkripsiyonel faktördür ve inflamatuvar sinyalin düzenlenmesinden sorumludur, hücresel çoğalma ve farklılaşmada rol oynar (Chen vd., 1999). Uyarılmamış hücrelerde düzenleyici protein I κ B, çekirdeğe bağlanır ve böylece NF- κ B aktivasyonunu ve çekirdeğe translokasyonu inhibe eder. Bortezomib aktivitesi, MAP kinaz sinyal yolağını, MM hücre proliferasyonunu inhibe eder, kaspaz bağımlı apoptozu indükler ve NF- κ B'yi inhibe edip, adezyon molekül ekspresyonunu ve MM hücrelerinin BMSC'ye bağlanmasının azalmasına yol açarak ortadan kaldırır (Bladé vd., 2005; Chen vd., 1999; Zadeoğluları, 2010). Genel olarak bortezomib, sitokinlerin (IL-6 gibi), büyüme faktörlerinin (insülin benzeri büyüme faktörü gibi), hücre adezyon moleküllerinin (hücre içi adezyon molekülü, vasküler hücresel adezyon molekülünün gibi) artan ekspresyonunu inhibe eder (Zadeoğluları, 2010; Adams, 2004). Deneysel bir artrit modelinde günlük oral bortezomib tedavisi yapılan bir çalışmada (Elliott ve arkadaşları, 2003), artrit erken ve geç evrelerinin çok daha zayıf olmasıyla sonuçlanmıştır. Tedavi edilen artritik sıçanlarda yoğun inflamatuvar sızıntıda önemli bir azalma olduğu; eklem kıkırdağında yalnızca minimal bir bozulma olduğu ve kemik erozyonunun da proteazom inhibitörü tarafından belirgin şekilde hafifletildiği bildirilmiştir.

Gut artritinde ağrı genellikle dayanılmazdır. Monosodyum ürat kristalleri, gut patofizyolojisinde önemli bir rol oynar. IL-1 β , MSU kristallerinin tetiklediği akut gut inflamasyonunda anahtar rol oynar. Bu kristaller, NLRP3 inflamazomunun aktivasyonunu tetikler ve IL-1 β salınımına neden olur. Ürat düşürücü tedaviler ağrılı ataklarda küçük bir rol oynar. Akut gut aritri olan hastalarda IL-1 inhibitörleri (riloncept veya anakinra) bir seçenek olmakla beraber nispeten yüksek tıbbi bakım maliyetleri, bu ilaçların gelişmekte olan ülkelerde uygulanmasını kısıtlamaktadır. Bu nedenle gut artritinin akut fazında sitokin salınımının engellenmesi gerekmektedir. Ayak bileği eklemi ürat aritri, antiinflamatuvar ve antigut ajanların değerlendirilmesi için yararlı bir araç sağlamıştır (Limon, 2022; Salman vd., 2020; Şaker ve Polat, 2022; Balkarlı, 2017; Liu vd., 2016).

In vivo çalışmalar bortezomibin, patogenezi NLRP3 inflamatuvar aktivasyonu ile yakından ilişkili olan romatoid artrit (Yannaki vd., 2010), retina iskemii-reperfüzyon hasarı (Chen vd., 2013), fare kolitinde (Schmidt vd., 2010) ve sepsiste (Han vd., 2015)

antiinflamatuvar etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Tez çalışması kapsamında inflamatuvar bir hastalık olan gut modeli oluşturularak borteomibin antiinflamatuvar, antiproliferatif ve apoptotik etkileri incelenmiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak endotel ile inflamasyon arasındaki ilişki çok yönlü olup, başta kardiyovasküler hastalıklar olmak üzere çeşitli hastalıklarda kritik rol oynamaktadır. Endotel disfonksiyonu ve inflamatuvar mediatörlerin salınımı bu hastalıkların ilerlemesine katkıda bulunur. Endotel hücre inflamasyonunun altında yatan mekanizmaları ve bunun trombositler, sitokinler ve diğer faktörlerle olan etkileşimlerini anlamak, vasküler bozukluklara yönelik terapötik stratejilerin geliştirilmesine ışık tutabilir.

Nihayetinde borteomib öncelikli olarak bir proteazom inhibitörü olarak tanınırken, borteomib ile NLRP3 inflamazomu arasında potansiyel bir ilişki olduğunu gösteren yeni kanıtlar ortaya çıkmaktadır. Bu ilişkinin altında yatan kesin mekanizmaları aydınlatmak ve borteomib tedavisi bağlamında NLRP3 inflamazomunu hedeflemenin terapötik sonuçlarını araştırmak literatüre katkı sağlayacaktır. Bunun için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Son zamanlarda inflamatuvar hastalıklarda kritik rol oynayan inflamatuvar durumlarda bu proteazom inhibitör stratejisinin terapötik beklentilerine odaklanılmaktadır. Proteazomun inhibisyonunun, başta iskemi-reperfüzyon hasarı, astım, artrit, sedef hastalığı ve egzama olmak üzere farklı inflamatuvar hastalık durumlarındaki çeşitli hayvan modellerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Literatür bilgilerine bakıldığında MSU ile oluşturulan NLRP3 inflamazomunda farklı terapötiklerin kullanımının yararlı olabileceği belirtilmesine rağmen borteomib konusunda yapılan yeni çalışmalara hala ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak proteazom inhibisyonu, kanser ve inflamatuvar durumlar için potansiyel bir tedavi seçeneğidir. Şimdiye kadar, kanser, reperfüzyon hasarı ve romatoid artrit, astım, multipl skleroz ve sedef hastalığı gibi inflamatuvar durumlar dahil olmak üzere Alzheimer hastalığı, amiyotropik lateral skleroz, otoimmün tiroid hastalığı, kaşeksi, greft reddi, hepatit B, inflamatuvar barsak hastalığı, sepsis ve sistemik lupus eritematozus gibi çeşitli insan hastalıkları için çok sayıda hayvan modelinde yapılan çalışmalardan umut verici sonuçlar bildirilmiştir (Elliott vd., 2003).

IL-1 β , MSU kristallerinin tetiklediği akut gut iltihabında önemli bir rol oynamaktadır. Proteazom inhibitörlerinden olan borteomib anti-inflamatuvar ve antiproliferatif etkiler gösterdiğinden, inflamatuvar bir hastalık olan gutta da etkinlik gösterebileceğini düşünmekteyiz. Farklı hastalıklarda araştırmalar yapılmasına rağmen

gut modelinde herhangi bir çalışma bulunmaması çalışmamızın özgünlüğüne değer katmaktadır.

Buradan yola çıkarak tez kapsamında yaptığımız çalışmalar ile inflamazom için bilinen alternatif terapötik yaklaşımlara borteomib kullanımının olası katkılarını literatüre dahil etmiş olduk. Gut gibi inflamatuvar hastalıkların tedavisinde borteomibin terapötik bir madde olarak potansiyel kullanımının literatüre ön veriler kazandıracağını ve klinik ilaç tedavisinde alternatif bir bakış açısı sağlayacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKÇA

- Adams, J. (2002).Development of the Proteasome Inhibitor PS-341, *The Oncologist*, 7(1), 9–16.
- Adams, J. (2004). The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell*, 5(5), 417-421.
- Adams, J. (2004). The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*, 4(5), 349-60.
- Afonina, I.S., Müller, C., Martin, S.J., Beyaert, R. (2015). Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity*. 42(6),991-1004.
- Akdoğan, M., Yöntem, M. (2018). Sitokinler. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(1), 36-45.
- Alkaya, E. (2022). Farklı tuzlardan elde edilen hipokloröz asitin keratinosit ve fibroblast hücrelerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, 1-41.
- Amaral, F. A., Costa, V. V., Tavares, L. D., Sachs, D., Coelho, F. M., Fagundes, C. T., Soriani, F. M., Silveira, T. N., Cunha, L. D., Zamboni, D. S., Quesniaux, V., Peres, R. S., Cunha, T. M., Cunha, F. Q., Ryffel, B., Souza, D. G., Teixeira, M. M. (2012). NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B(4) in a murine model of gout. *Arthritis and rheumatism*, 64(2), 474–484.
- Anderson, K.C. (2009). Proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Semin Oncol.*, 36(2), 20-6.
- Arima, S. (2003). Role of angiotensin II and endogenous vasodilators in the control of glomerular hemodynamics. *Clin Exp Nephrol*. 7, 172–178.
- Artun, F.T. (2018). Bazı bitki ekstraktlarının *in vitro* antikanser ve apoptotik aktivitelerinin değerlendirilmesi. Doktora Tezi, 1-90.
- Aslantürk, Ö. S. (2018). In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *InTech.*,1-17.
- Azevedo, V. F., Lopes, M. P., Catholino, N. M., Paiva, E. D. S., Araújo, V. A., Pinheiro, G. D. R. C. (2017). Critical revision of the medical treatment of gout in Brazil. *Revista brasileira de reumatologia*, 57(4), 346–355.

- Bai, B., Yang, Y., Wang, Q., Li, M., Tian, C. Liu, Y., Aung, L.H.H., Li, P. Yu, T., Chu, X. (2020). NLRP3 inflammasome in endothelial dysfunction. *Cell Death Dis.* 11, 776.
- Balkarlı, A., Doğru, A., Ugan, Y., Doğan, G., Şahin, M. (2017). Nötrofil: Gut Hastalarında Lenfosit Oranı Ve Ortalama Trombosit Hacmi. *Klinik Ve Analitik Tıp Dergisi*, 8(2), 138-141.
- Banno, T., Gazel, A., Blumenberg, M. (2004). Effects of TNF α in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *J. Biol. Chem.*, 279(31), 32633-42.
- Barbaro, N. R., Fontana, V., Modolo, R., De Faria, A. P., Sabbatini, A. R., Fonseca, F. H., Anhô, G. F., Moreno, H. (2015). Increased arterial stiffness in resistant hypertension is associated with inflammatory biomarkers. *Blood pressure*, 24(1), 7–13.
- Barros, C. H., Matosinhos, R. C., Bernardes, A. C. F. P. F., Araújo, M. C. P. M., Bezerra, J. P., Sachs, D., Soares, R. D. O. A., Saúde-Guimarães, D. A. (2021). Lychnophora pinaster's effects on inflammation and pain in acute gout. *Journal of ethnopharmacology*, 280, 114460.
- Bartak, M., Chodkowski, M., Słońska, A., Grodzik, M., Szczepaniak, J., Bańbura, M. W., Cymerys, J. (2022). Equid Alphaherpesvirus 1 Modulates Actin Cytoskeleton and Inhibits Migration of Glioblastoma Multiforme Cell Line A172. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(4), 400.
- Belloni, D., Veschini, L., Foglieni, C., Dell'Antonio, G., Caligaris-Cappio, F., Ferrarini, M., Ferrero, E. (2010). Bortezomib induces autophagic death in proliferating human endothelial cells. *Experimental cell research*, 316(6), 1010–1018.
- Bird C, Kirstein S (2009) Real-time, label-free monitoring of cellular invasion and migration with the xCELLigence system. *Nat Methods* 6:v–vi.
- Bird, C., Kirstein, S. (2009). Real-time, label-free monitoring of cellular invasion and migration with the xCELLigence system. *Nat Methods* 6, v–vi.
- Bladé, J., Cibeira, M. T., Rosiñol, L. (2005). Bortezomib: A valuable new antineoplastic strategy in multiple myeloma. *Acta Oncologica*, 44(5), 440-448.
- Bodakçı, E., Vasi, İ. (2020). Gut Ve Paget Hastalığı Birlikteliği; Bir Tesadüf Mü?. Coexistence of Gout and Paget's Disease; Is It a Coincidence? *Eskişehir Tıp Dergisi*, 1(1), 18-21.

- Brook, R.D., Yalavarthi, S., Myles, J.D., Khalatbari, S., Hench, R., Lustig, S., Marder, W., Neidert, A., Kaplan, M.J. (2011). Determinants of vascular function in patients with chronic gout. *J Clin Hypertens (Greenwich, Conn.)*, 13(3), 178-188.
- Brüning, A., Vogel, M., Mylonas, I., Friese, K., Burges, A. (2011). Bortezomib targets the caspase-like proteasome activity in cervical cancer cells, triggering apoptosis that can be enhanced by Nelfinavir, *Curr. Cancer Drug Targets*. 11(7), 799-809.
- Burns, K., Martinon, F., & Tschopp, J. (2003). New insights into the mechanism of IL-1beta maturation. *Current opinion in immunology*, 15(1), 26–30.
- Cadena, S.G., Massieu, L. (2016). Caspases and their role in inflammation and ischemic neuronal death. Focus on caspase-12. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 21(7), 763-777.
- Carta, S, Penco F, Lavieri R, Martini A, Dinarello CA, Gattorno M et al. (2015). Cell stress increases ATP release in NLRP3 inflammasome-mediated autoinflammatory diseases, resulting in cytokine imbalance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(9), 2835–2840.
- Catley, L., Tai, Y. T., Chauhan, D., Anderson, K. C. (2005). Perspectives for combination therapy to overcome drug-resistant multiple myeloma. Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy, 8(4), 205–218.
- Cavalcanti, N. G., Marques, C. D., Lins E Lins, T. U., Pereira, M. C., Rêgo, M. J., Duarte, A. L., Pitta, I.daR., Pitta, M. G. (2016). Cytokine Profile in Gout: Inflammation Driven by IL-6 and IL-18? *Immunological investigations*, 45(5), 383–395.
- Chanput, W., Mes, J. J., Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: An *in vitro* cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, 23, 37-45.
- Chen, F. T., Yang, C. M., Yang, C. H. (2013). The protective effects of the proteasome inhibitor bortezomib (velcade) on ischemia-reperfusion injury in the rat retina. *PLoS one*, 8(5), e64262.
- Chen, X., Chen, Y., Ou, Y., Min, W., Liang, S., Hua, L., Zhou, Y., Zhang, C., Chen, P., Yang, Z., Hu, W., Sun, P. (2022). Bortezomib inhibits NLRP3 inflammasome activation and NF-κB pathway to reduce psoriatic inflammation. *Biochemical pharmacology*, 206, 115326.
- Chen, Y., Chen, Y., Tang, C., Zhao, Q., Xu, T., Kang, Q., Jiang, B., & Zhang, L. (2021). RPS4Y1 Promotes High Glucose-Induced Endothelial Cell Apoptosis and

- Inflammation by Activation of the p38 MAPK Signaling. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, 14, 4523–4534.
- Chen, Y., Kidd, J., Bhat, O. M., Yuan, X., Hong, J., He, X., & Li, P. L. (2019). Suppression of Glucagon-Like Peptide-1 Release by Inhibition of Intestinal NLRP3 Inflammasome Activation in Asc^{-/-} and Nlrp3^{-/-} Mice. *Frontiers in physiology*, 10, 1213.
- Chhana, A., Pool, B., Wei, Y., Choi, A., Gao, R., Munro, J., Cornish, J., & Dalbeth, N. (2019). Human Cartilage Homogenates Influence the Crystallization of Monosodium Urate and Inflammatory Response to Monosodium Urate Crystals: A Potential Link Between Osteoarthritis and Gout. *Arthritis & rheumatology* (Hoboken, N.J.), 71(12), 2090–2099.
- Chitambar, C. R., and Purpi, D. P. (2010). A novel gallium compound synergistically enhances bortezomib-induced apoptosis in mantle cell lymphoma cells. *Leukemia Research*, 34(7), 950–953.
- Choe, J. Y., Lee, G. H., & Kim, S. K. (2011). Radiographic bone damage in chronic gout is negatively associated with the inflammatory cytokines soluble interleukin 6 receptor and osteoprotegerin. *The Journal of rheumatology*, 38(3), 485–491.
- Choy, M. M., Zhang, S. L., Costa, V. V., Tan, H. C., Horrevorts, S., & Ooi, E. E. (2015). Proteasome Inhibition Suppresses Dengue Virus Egress in Antibody Dependent Infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(11), e0004058.
- Chu, Y. Y., Ko, C. Y., Wang, S. M., Lin, P. I., Wang, H. Y., Lin, W. C., Wu, D. Y., Wang, L. H., & Wang, J. M. (2017). Bortezomib-induced miRNAs direct epigenetic silencing of locus genes and trigger apoptosis in leukemia. *Cell death & disease*, 8(11), e3167.
- Chung, Y.H., Kim, D.H., Lee, W.W. (2016). Monosodium urate crystal-induced pro-interleukin-1 β production is post-transcriptionally regulated via the p38 signaling pathway in human monocytes, *Scientific Reports.*, 6(3), 4533.
- Ciechanover, A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 79, 13- 21.
- Cohen G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical Journal*, 326 (Pt 1), 1–16.
- Conforti-Andreoni, C., Spreafico, R., Qian, H. L., Riteau, N., Ryffel, B., Ricciardi-Castagnoli, P., & Mortellaro, A. (2011). Uric acid-driven Th17 differentiation

- requires inflammasome-derived IL-1 and IL-18. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(11), 5842–5850.
- Cossarizza, A. ve Salvoli, S. (2001). Analysis of mitochondria during cell death. *Methods Cell Biol.*, 63, 467-486.
- Cull, A. H., Rauh, M. J. (2017). Success in bone marrow failure? Novel therapeutic directions based on the immune environment of myelodysplastic syndromes. *Journal of leukocyte biology*, 102(2), 209–219.
- Çakiris, A. (2012). Kompleksin 1 ve Behçet Hastalığı patogenezindeki olası rolünün araştırılması. Doktora Tezi, 1-36.
- Dhanasekar, C., Kalaiselvan, S., Rasool, M. (2015). Morin, a Bioflavonoid Suppresses Monosodium Urate Crystal-Induced Inflammatory Immune Response in RAW 264.7 Macrophages through the Inhibition of Inflammatory Mediators, Intracellular ROS Levels and NF-κB Activation, *Plos One.*,28, 10(12), e0145093.
- Di Giovine, F. S., Malawista, S. E., Thornton, E., & Duff, G. W. (1991). Urate crystals stimulate production of tumor necrosis factor alpha from human blood monocytes and synovial cells. Cytokine mRNA and protein kinetics and cellular distribution. *The Journal of clinical investigation*, 87(4), 1375–1381.
- Dikmen, M. (2017). Aprepitant on Human Glioblastoma U87MG Cells Antiproliferative and Apoptotic Effects. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21, 156-164.
- Dikmen, M., Kaya Tilki, E., Engür Öztürk, S., Ozturk, Y. (2017). Neuritogenic activity of epigallocatechin gallate and curcumin combination on rat adrenal pheochromocytoma cells. *Fresenius Environmental Bulletin*. 26(7), 4726-4733.
- Dilber, M. (2020). Bortezomib İle Ellajik Asit, Ferulik Asit, Kafeik Asit Kombinasyonlarının Caco-2, A549 Ve 3t3 Hücrelerinde Sinerjistik Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, 1-55.
- Doherty, M. (2009). New insights into the epidemiology of gout. *Rheumatology ((Oxford, England)*. 48 Suppl 2:ii2-ii8.
- Dos Santos, F. D. (2016). Gota: Uma Revisão Gout: A Review. *Rev. Med. UFPR*, 3(1), 25-31.
- Dou, Q.P., Li, B. (1999). Proteasome inhibitors as potential novel anticancer agents. *Drug Resistance Updates*, 2, 215–223.
- Duan, L.,Huang, Y.,Su, Q.,Lin, Q., Liu, W., Luo, J., Yu, B., He, Y. Qian, H., Liu, Y., Chen, J., Shi, G. (2016). Potential of IL-33 for Preventing the Kidney Injury via

- Regulating the Lipid Metabolism in Gout Patients. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 1028401.
- Elliott, P. J., Zollner, T. M., & Boehncke, W. H. (2003). Proteasome inhibition: a new anti-inflammatory strategy. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 81(4), 235–245.
- Engür Öztürk, S. (2020). THP-1 kökenli makrofaj ve A549 akciğer kanseri ko-kültür modelinde epitelyal-mezenkimal değişim yolağına immünoterapötik yaklaşımlar. Doktora Tezi, 1-41.
- Engür, S., Dikmen, M. (2015). The importance of proteasome inhibitors in cancer treatment. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 31(4), 182-187.
- Engür, S., Dikmen, M. (2017). The evaluation of the anti-cancer activity of ixazomib on Caco2 colon solid tumor cells, comparison with bortezomib. *Acta Clinica Belgica*, 72(6), 391-398.
- Engür, S., Dikmen, M., Öztürk, Y. (2015). Comparison of the cytotoxic effects of rg108 a DNA methyltransferase inhibitor alone and combination with nerve growth factor on Pc 12 Adh Cells. 3rd International Work-Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, Granada, Nicaragua: IWBBIO 2015, 87: 1-11.
- Engür, S., Dikmen, M., Öztürk, Y. (2016). Comparison of antiproliferative and apoptotic effects of a novel proteasome inhibitor MLN2238 with bortezomib on K562 chronic myeloid leukemia cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 38(2), 87-97.
- Erkekoğlu, P., Baydar, T. (2021). Güncel *in vitro* sitotoksikite testleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 41 (1) , 45-63.
- Faubel, S. and Edelstein, C. L. (2005). Caspases as drug targets in ischemic organ injury. Current drug targets. *Immune, Endocrine and Metabolic Disorders*, 5(3), 269–287.
- Fennell, D. A., Chacko, A., Mutti, L. (2008). BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib. *Oncogene*, 27(9), 1189–1197.
- Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nature protocols*, 1(5), 2315–2319.
- Gatti, R., Belletti, S., Orlandini, G., Bussolati, O., Dall'Asta, V., & Gazzola, G. C. (1998). Comparison of annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 46(8), 895–900.

- Gerçekler, E., Cerrah, S., Baykan, A. (2021). İnflamatuvar bağırsak hastalığında non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı sıklığı. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi*, 20(1), 27-31.
- Goldberg, E. L., Asher, J. L., Molony, R. D., Shaw, A. C., Zeiss, C. J., Wang, C., Morozova-Roche, L. A., Herzog, R. I., Iwasaki, A., Dixit, V. D. (2017). β -Hydroxybutyrate Deactivates Neutrophil NLRP3 İnflamasome to Relieve Gout Flares. *Cell reports*, 18(9), 2077–2087.
- Gottlieb, M., Rabah, W., Long, B. (2022). Colchicine for acute gout. *Academic emergency medicine: official journal of the Society for Academic Emergency Medicine*, 29(3), 387–388.
- Gökhaner G. (2018). Yeni sigma-1 reseptör antagonisti S1RA (e-52862)'nın ve rimkazol'ün U87MG glioblastoma hücrelerinde sfingosin kinaz sinyal yolağı üzerinden antikanser etkisinin araştırılması. Yüksek lisans tezi, 1-92.
- Görgülü Ş. (2019). N-(4-asetilfenil)-2-(ariltiyo) asetamit ve N'-(3-hidroksi-4-metoksibenziliden)-2-(4-tosilpiperazin-1-il) asetohidrazit türevlerinin pankreas kanserinde antikanser etkilerinin PARP inhibitörleri ile karşılaştırılması. Doktora tezi, 1-41.
- Gritsenko, A., Green, J. P., Brough, D., & Lopez-Castejon, G. (2020). Mechanisms of NLRP3 priming in inflammaging and age related diseases. *Cytokine & growth factor reviews*, 55, 15–25.
- Gu, H., Yu, H., Qin, L., Yu, H., Song, Y., Chen, G., Zhao, D., Wang, S., Xue, W., Wang, L., Ai, Z., Xu, B., & Peng, A. (2023). MSU crystal deposition contributes to inflammation and immune responses in gout remission. *Cell reports*, 42(10), 113139.
- Güleş Ö., Eren Ü. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler, Y.Y.Ü. *Van Veterinary Journal*, 19(2), 73-78.
- Han, S. H., Kim, J. S., Woo, J. H., Jeong, S. J., Shin, J. S., Ahn, Y. S., & Kim, J. M. (2015). The effect of bortezomib on expression of inflammatory cytokines and survival in a murine sepsis model induced by cecal ligation and puncture. *Yonsei medical journal*, 56(1), 112–123.
- Hayashi, T., Hideshima, T., & Anderson, K. C. (2003). Novel therapies for multiple myeloma. *British journal of haematology*, 120(1), 10–17.

- Hazıcı, H. (2003). Romatizmal Hastalıkların Önemi ve Sıklığı. İç Hastalıkları. İliçin-Biberoğlu- Süleymanlar-Ünal. İkinci baskı. Cilt: 2, Ankara: Güneş Kitabevi. 1-4300.
- He, W., Dong, H., Wu, C., Zhong, Y., & Li, J. (2023). The role of NLRP3 inflammasome in sepsis: A potential therapeutic target. *International immunopharmacology*, 115, 109697.
- Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V. J., Elliott, P. J., Adams, J., & Anderson, K. C. (2001). The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer research*, 61(7), 3071–3076.
- Hochstrasser, M. (1995). Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Current Opinion in Cell Biology*, 7, 215–223.
- Hong, Y. S., Hong, S. W., Kim, S. M., Jin, D. H., Shin, J. S., Yoon, D. H., Kim, K. P., Lee, J. L., Heo, D. S., Lee, J. S., & Kim, T. W. (2012). Bortezomib induces G2-M arrest in human colon cancer cells through ROS-inducible phosphorylation of ATM-CHK1. *International journal of oncology*, 41(1), 76–82.
- Hu, J., Wu, H., Wang, D., Yang, Z., Zhuang, L., Yang, N., & Dong, J. (2018). Weicao capsule ameliorates renal injury through increasing autophagy and NLRP3 degradation in UAN rats. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 96, 1-8.
- Hua, K. F., Chou, J. C., Lam, Y., Tasi, Y. L., Chen, A., Ka, S. M., Fang, Z., Liu, M. L., Yang, F. L., Yang, Y. L., Chiu, Y. C., Wu, S. H. (2013). Polyenylpyrrole derivatives inhibit NLRP3 inflammasome activation and inflammatory mediator expression by reducing reactive oxygen species production and mitogen-activated protein kinase activation. *PloS one*, 8(10), e76754.
- Iijima T. (2006). Mitochondrial membrane potential and ischemic neuronal death. *Neuroscience Research*, 55(3), 234–243.
- Inokuchi, T., Moriwaki, Y., Tsutsui, H., Yamamoto, A., Takahashi, S., Tsutsumi, Z., Ka, T., Nakanishi, K., & Yamamoto, T. (2006). Plasma interleukin (IL)-18 (interferon-gamma-inducing factor) and other inflammatory cytokines in patients with gouty arthritis and monosodium urate monohydrate crystal-induced secretion of IL-18. *Cytokine*, 33(1), 21–27.

- Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., & Minick, C. R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *The Journal of clinical investigation*, 52(11), 2745–2756.
- Jiang, X., Li, M., Yang, Q., Du, L., Du, J., & Zhou, J. (2014). Oxidized low density lipoprotein and inflammation in gout patients. *Cell biochemistry and biophysics*, 69(1), 65–69.
- Jo, E. K., Kim, J. K., Shin, D. M., & Sasakawa, C. (2016). Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cellular & molecular immunology*, 13(2), 148–159.
- Johnson, R. J., Rideout, B. A. (2004). Uric acid and diet--insights into the epidemic of cardiovascular disease. *The New England journal of medicine*, 350(11), 1071–1073.
- Joosten, L. A., Netea, M. G., Mylona, E., Koenders, M. I., Malireddi, R. K., Oosting, M., Stienstra, R., van de Veerdonk, F. L., Stalenhoef, A. F., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Kanneganti, T. D., & van der Meer, J. W. (2010). Engagement of fatty acids with Toll-like receptor 2 drives interleukin-1 β production via the ASC/caspase 1 pathway in monosodium urate monohydrate crystal-induced gouty arthritis. *Arthritis Rheum.* 62, 3237–3248.
- Kalkan, R. (2016). Sitotoksisite Analizleri, Uygulamalı Hücre Kültürü Kursu.
- Kanellis, J., Watanabe, S., Li, J. H., Kang, D. H., Li, P., Nakagawa, T., Wamsley, A., Sheikh-Hamad, D., Lan, H. Y., Feng, L., Johnson, R. J. (2003). Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 41(6), 1287–1293.
- Kang, D. H., Park, S. K., Lee, I. K., & Johnson, R. J. (2005). Uric acid-induced C-reactive protein expression: implication on cell proliferation and nitric oxide production of human vascular cells. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 16(12), 3553–3562.
- Karabay, Ö. (2012). Ischemic peripheral arterial disease: a screening survey. *Turkish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 20(3), 450-457.
- Karakuş, E. (2016). Hücre kültürü teknikleri. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 133-178.

- Kaufmann, S. H., Hengartner, M. O. (2001). Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends in cell biology*, 11(12), 526–534.
- Kaya, E. (2014). DNA Metiltransferaz İnhibitörü Rg108 Ve Histon Deasetilaz İnhibitörü Trikostatin A'nın nörit gelişiminde epigenetik etkilerinin karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, 1-82.
- Kaya-Tilki, E. (2020). Epigenetik mekanizmalar üzerine etkili ilaçların nöroinflamasyon hücre modelinde nöroprotektif rollerinin araştırılması. Doktora Tezi, 1-156.
- Kaya-Tilki, E., Dikmen, M. (2021). Neuroprotective effects of some epigenetic modifying drugs' on Chlamydia pneumoniae-induced neuroinflammation: A novel model. *PloS one*, 16(11), e0260633.
- Ke, N., Wang, X., Xu, X., & Abassi, Y. A. (2011). The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 740, 33–43.
- Kebapçı, A. (2018). Huvec hücre hatlarında etanerseptin hücre çoğalması üzerindeki etkileri. Yüksek Lisans Tezi, 15-74.
- Kelley, N., Jeltama, D., Duan, Y., & He, Y. (2019). The NLRP3 İnflamasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *International journal of molecular sciences*, 20(13), 3328.
- Kısmalı, G., Sel, T. (2012). Paraquat ile oluşturulmuş oksidatif stresin HEPG2 hücrelerinde apoptozis üzerine etkisinin araştırılması. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 26 (2), 79-85.
- Kim, N. H., Kim, H. K., Lee, J. H., Jo, S. I., Won, H. M., Lee, G. S., Lee, H. S., Nam, K. W., Kim, W. J., Han, M. D. (2020). Juglone Suppresses LPS-induced Inflammatory Responses and NLRP3 Activation in Macrophages. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(13), 3104.
- Kim, S. K., Choe, J. Y., Park, K. Y. (2016). Rebamipide Suppresses Monosodium Urate Crystal-Induced Interleukin-1 β Production Through Regulation of Oxidative Stress and Caspase-1 in THP-1 Cells. *Inflammation*, 39(1), 473–482.
- Klück, V., Liu, R., Joosten, L. A. B. (2021). The role of interleukin-1 family members in hyperuricemia and gout. *Joint bone spine*, 88(2), 105092.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., & van Oers, M. H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84(5), 1415–1420.

- Kösem, K. (2018). Fucoidan'ın baş boyun kanseri üzerindeki etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, 12-68.
- Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschläger, M., & Dolznig, H. (2013). In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation research*, 752(1), 10–24.
- Krętownski, R., Borzym-Kluczyk, M., & Cechowska-Pasko, M. (2014). Efficient induction of apoptosis by proteasome inhibitor: bortezomib in the human breast cancer cell line MDA-MB-231. *Molecular and cellular biochemistry*, 389(1-2), 177–185.
- Kumar, P., Nagarajan, A. (2018). Uchil PD: Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. Cold Spring Harbor Protocols, 6.
- Kumar, V., Abbas, A.K. ve Fausto, N., (2005), Robbins And Cotran, Pathologic Basis of Disease, 7 th edition, 513.
- Kupperman, E., Lee, E. C., Cao, Y., Bannerman, B., Fitzgerald, M., Berger, A., Yu, J., Yang, Y., Hales, P., Bruzzese, F., Liu, J., Blank, J., Garcia, K., Tsu, C., Dick, L., Fleming, P., Yu, L., Manfredi, M., Rolfe, M., & Bolen, J. (2010). Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer. *Cancer research*, 70(5), 1970–1980.
- Kuo, C. F., Grainge, M. J., Zhang, W., & Doherty, M. (2015). Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors. *Nature reviews. Rheumatology*, 11(11), 649–662.
- Landis, R. C., Haskard, D. O. (2001). Pathogenesis of crystal-induced inflammation. *Current rheumatology reports*, 3(1), 36–41.
- Lee, J. H., Yang, J. A., Shin, K., Lee, G. H., Lee, W. W., Lee, E. Y., Song, Y. W., Lee, E. B., & Park, J. K. (2017). Elderly Patients Exhibit Stronger Inflammatory Responses during Gout Attacks. *Journal of Korean medical science*, 32(12), 1967–1973.
- Ley, K. (2008). Chapter 9: The Microcirculation in Inflammation. *Microcirculation (Second Edition)*. 387-448.
- Liang, W. Y., Zhu, X. Y., Zhang, J. W., Feng, X. R., Wang, Y. C., & Liu, M. L. (2015). Uric acid promotes chemokine and adhesion molecule production in vascular endothelium via nuclear factor-kappa B signaling. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*, 25(2), 187–194.

- Limame, R., Wouters, A., Pauwels, B., Fransen, E., Peeters, M., Lardon, F., De Wever, O., & Pauwels, P. (2012). Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PloS one*, 7(10), e46536.
- Limon, M. (2022). Gut Hastalarında biyokimyasal parametrelerin ve komorbiditelerin önemi. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 19(3), 462-5.
- Lin, S. C., Chuang, Y. H., Yang, Y. H., & Chiang, B. L. (2011). Decrease in interleukin-21 in children suffering with severe atopic dermatitis. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 22(8), 869–875.
- Lin, S. C., Kuo, C. C., Tsao, J. T., & Lin, L. J. (2012). Profiling the expression of interleukin (IL)-28 and IL-28 receptor α in systemic lupus erythematosus patients. *European journal of clinical investigation*, 42(1), 61–69.
- Liu, C. C., Huang, Z. X., Li, X., Shen, K. F., Liu, M., Ouyang, H. D., Zhang, S. B., Ruan, Y. T., Zhang, X. L., Wu, S. L., Xin, W. J., & Ma, C. (2018). Upregulation of NLRP3 via STAT3-dependent histone acetylation contributes to painful neuropathy induced by bortezomib. *Experimental neurology*, 302, 104–111.
- Liu, M., Tang, X., Ding, J., Liu, M., Zhao, B., Deng, Y., & Song, Y. (2019). A Sialylated-Bortezomib Prodrug Strategy Based on a Highly Expressed Selectin Target for the Treatment of Leukemia or Solid Tumors. *Pharmaceutical research*, 36(12), 176.
- Liu, Y. F., Wen, C. Y., Chen, Z., Wang, Y., Huang, Y., & Tu, S. H. (2016). Effects of Berberine on NLRP3 and IL-1 β Expressions in Monocytic THP-1 Cells with Monosodium Urate Crystals-Induced Inflammation. *BioMed research international*, 2503703.
- Liu, Y. R., Wang, J. Q., & Li, J. (2023). Role of NLRP3 in the pathogenesis and treatment of gout arthritis. *Frontiers in immunology*, 14, 1137822.
- Liu-Bryan, R., Pritzker, K., Firestein, G. S., & Terkeltaub, R. (2005). TLR2 signaling in chondrocytes drives calcium pyrophosphate dihydrate and monosodium urate crystal-induced nitric oxide generation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(8), 5016–5023.
- Ludwig, A., Fechner, M., Wilck, N., Meiners, S., Grimbo, N., Baumann, G., Stangl, V., Stangl, K. (2009). Potent anti-inflammatory effects of low-dose proteasome

- inhibition in the vascular system. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 87(8), 793–802.
- Luo, C., Lian, X., Hong, L., Zou, J., Li, Z., Zhu, Y., Huang, T., Zhang, Y., Hu, Y., Yuan, H., Wen, T., Zhuang, W., Cai, B., Zhang, X., Hisatome, I., Yamamoto, T., Huang, J., Cheng, J. (2016). High Uric Acid Activates the ROS-AMPK Pathway, Impairs CD68 Expression and Inhibits OxLDL-Induced Foam-Cell Formation in a Human Monocytic Cell Line, THP-1. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 40(3-4), 538–548.
- Mani, A., Gelmann EP. (2005). The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J Clin Oncol.*, 23(21), 4776-4789.
- Martin, W. J., Grainger, R., Harrison, A., & Harper, J. L. (2010). Differences in MSU-induced superoxide responses by neutrophils from gout subjects compared to healthy controls and a role for environmental inflammatory cytokines and hyperuricemia in neutrophil function and survival. *The Journal of rheumatology*, 37(6), 1228–1235.
- Martin, W. J., Shaw, O., Liu, X., Steiger, S., & Harper, J. L. (2011). Monosodium urate monohydrate crystal-recruited noninflammatory monocytes differentiate into M1-like proinflammatory macrophages in a peritoneal murine model of gout. *Arthritis and rheumatism*, 63(5), 1322–1332.
- Martin, W. J., Walton, M., & Harper, J. (2009). Resident macrophages initiating and driving inflammation in a monosodium urate monohydrate crystal-induced murine peritoneal model of acute gout. *Arthritis and rheumatism*, 60(1), 281–289.
- Martinon, F., Burns, K., & Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell*, 10(2), 417–426.
- Martinon, F., Burns, K., & Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell*, 10(2), 417–426.
- Martinon, F., Pétrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., & Tschopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, 440(7081), 237–241.

- Mehdizadeh, K., Ataei, F., Hosseinkhani, S. (2021). Treating MCF7 breast cancer cell with proteasome inhibitor Bortezomib restores apoptotic factors and sensitizes cell to Docetaxel. *Med Oncol*, 38, 64.
- Meiners S, Ludwig A, Stangl V, Stangl K (2008) Proteazom inhibitörleri: zehirler ve ilaçlar. *Med Res Rev* 28, 309–327.
- Mercuro, G., Vitale, C., Cerquetani, E., Zoncu, S., Deidda, M., Fini, M., & Rosano, G. M. (2004). Effect of hyperuricemia upon endothelial function in patients at increased cardiovascular risk. *The American journal of cardiology*, 94(7), 932–935.
- Miguel, C., Mediavilla, M. J. (2011). Abordagem actual da gota. *Acta Médica Portuguesa*, 24(5), 791-798.
- Mizuno, K., Toyoda, Y., Fukami, T., Nakajima, M., & Yokoi, T. (2011). Stimulation of pro-inflammatory responses by mebendazole in human monocytic THP-1 cells through an ERK signaling pathway. *Archives of toxicology*, 85(3), 199–207.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Mylona, E. E., Mouktaroudi, M., Crisan, T. O., Makri, S., Pistiki, A., Georgitsi, M., Savva, A., Netea, M. G., van der Meer, J. W., Giamarellos-Bourboulis, E. J., & Joosten, L. A. (2012). Enhanced interleukin-1 β production of PBMCs from patients with gout after stimulation with Toll-like receptor-2 ligands and urate crystals. *Arthritis research & therapy*, 14(4), R158.
- Ndrepepa G. (2018). Uric acid and cardiovascular disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 484, 150–163.
- Norton, K. A., & Popel, A. S. (2016). Effects of endothelial cell proliferation and migration rates in a computational model of sprouting angiogenesis. *Scientific reports*, 6, 36992.
- Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C., & Haanen, C. (1998). Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 3(2), 115–121.
- Ozturk, S. E., Kaya Tilki, E., Dikmen, M., Cantürk, Z. (2021). Comparison of the apoptotic effects of bortezomib using 2D and 3D co-culture models of THP-1

- derived macrophage and A549 lung cancer. *Journal of research in pharmacy*, 25 (4) ,490-499.
- Özdemir, A., Ark, M. (2014). xCELLigence real time cell analysis system: a new method for cell proliferation and cytotoxicity. *Niche Journal*, 2(2), 15-17.
- Özkay, Y., Yurttaş, L., Dikmen, M., Engür, S. (2016). Synthesis and antiproliferative activity evaluation of new thiazole–benzimidazole derivatives using real-time cell analysis (RTCA DP). *Medicinal Chemistry Research*, 25(3), 482-493.
- Peng, X., Li, X., Xie, B., Lai, Y., Sosnik, A., Boucetta, H., Chen, Z., & He, W. (2023). Gout therapeutics and drug delivery. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 362, 728–754.
- Pérez-Ruiz, F. (2011). Gota: pasado, presente y futuro. *Reumatol. Clínica*, 7(4), 217-219.
- Podar, K., Shringarpure, R., Tai, Y. T., Simoncini, M., Sattler, M., Ishitsuka, K., Richardson, P. G., Hideshima, T., Chauhan, D., & Anderson, K. C. (2004). Caveolin-1 is required for vascular endothelial growth factor-triggered multiple myeloma cell migration and is targeted by bortezomib. *Cancer research*, 64(20), 7500–7506.
- Poli, G., Fabi, C., Bellet, M. M., Costantini, C., Nunziangeli, L., Romani, L., & Brancorsini, S. (2020). Epigenetic Mechanisms of Inflammasome Regulation. *International journal of molecular sciences*, 21(16), 5758.
- Pope, R. M., & Tschopp, J. (2007). The role of interleukin-1 and the inflammasome in gout: implications for therapy. *Arthritis and rheumatism*, 56(10), 3183–3188.
- Protocol Guide: MTT Assay for Cell Viability and Proliferation. Merck. 2020. Available from:<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-i-mtt.html>.
- Puren, A. J., Fantuzzi, G., Dinarello, C. A. (1999). Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(5), 2256–2261.
- Ravi, S., Caves, J. M., Martinez, A. W., Haller, C. A., & Chaikof, E. L. (2013). Incorporation of fibronectin to enhance cytocompatibility in multilayer elastin-like protein scaffolds for tissue engineering. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 101(7), 1915–1925.

- Ri M. (2016). Endoplasmic-reticulum stress pathway-associated mechanisms of action of proteasome inhibitors in multiple myeloma. *International journal of hematology*, 104(3), 273–280.
- Richette, P., & Bardin, T. (2010). Gout. *Lancet* (London, England), 375(9711), 318–328.
- Roccaro, A. M., Hideshima, T., Raje, N., Kumar, S., Ishitsuka, K., Yasui, H., Shiraishi, N., Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Dammacco, F., Richardson, P. G., Anderson, K. C. (2006). Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. *Cancer research*, 66(1), 184–191.
- Rodriguez, L. G., Wu, X., Guan, J. L. (2005). Wound-healing assay. *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols*, 23-29.
- Rose-John S. (2012). IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *International journal of biological sciences*, 8(9), 1237–1247.
- Ruggiero, C., Cherubini, A., Ble, A., Bos, A. J., Maggio, M., Dixit, V. D., Lauretani, F., Bandinelli, S., Senin, U., & Ferrucci, L. (2006). Uric acid and inflammatory markers. *European heart journal*, 27(10), 1174–1181.
- Salman, B. (2018). DHRS2 geninin meme kanserindeki hücre bölünmesi, apoptozu ve migrasyonu üzerine etkisi, Yüksek lisans tezi, 44-60.
- Salman, E., Bilici-Salman, R., Tufan, A. (2020). İnflamasyonun önemli bir düzenleyicisi olarak s100 proteinleri. *Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*. 53(Ek Sayı 1), 41-45.
- Schett, G., Dayer, J. M., & Manger, B. (2016). Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. *Nature reviews. Rheumatology*, 12(1), 14–24.
- Schiltz, C., Lioté, F., Prudhommeaux, F., Meunier, A., Champy, R., Callebort, J., & Bardin, T. (2002). Monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation *in vivo*: quantitative histomorphometric analysis of cellular events. *Arthritis and rheumatism*, 46(6), 1643–1650.
- Schmidt, N., Gonzalez, E., Visekruna, A., Köhl, A. A., Loddenkemper, C., Mollenkopf, H., Kaufmann, S. H., Steinhoff, U., Joeris, T. (2010). Targeting the proteasome: partial inhibition of the proteasome by bortezomib or deletion of the immunosubunit LMP7 attenuates experimental colitis. *Gut*, 59(7), 896–906.
- Schorn, C., Frey, B., Lauber, K., Janko, C., Stryio, M., Keppeler, H., Gaipl, U. S., Voll, R. E., Springer, E., Munoz, L. E., Schett, G., Herrmann, M. (2011). Sodium

- overload and water influx activate the NALP3 inflammasome. *The Journal of biological chemistry*, 286(1), 35–41.
- Shang, K., Wei, Y., Su, Q., Yu, B., Tao, Y., He, Y., Wang, Y., Shi, G., & Duan, L. (2019). IL-33 Ameliorates the Development of MSU-Induced Inflammation Through Expanding MDSCs-Like Cells. *Frontiers in endocrinology*, 10, 36.
- Shanker, A., Brooks, A. D., Tristan, C. A., Wine, J. W., Elliott, P. J., Yagita, H., Takeda, K., Smyth, M. J., Murphy, W. J., Sayers, T. J. (2008). Treating metastatic solid tumors with bortezomib and a tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor agonist antibody. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(9), 649–662.
- Singh, A. K., Haque, M., O'Sullivan, K., Chourasia, M., Ouseph, M. M., & Ahmed, S. (2021). Suppression of monosodium urate crystal-induced inflammation by inhibiting TGF- β -activated kinase 1-dependent signaling: role of the ubiquitin proteasome system. *Cellular & molecular immunology*, 18(1), 162–170.
- Slee, E. A., Adrain, C., & Martin, S. J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 276(10), 7320–7326.
- Steiger, S., & Harper, J. L. (2014). Mechanisms of spontaneous resolution of acute gouty inflammation. *Current rheumatology reports*, 16(1), 392.
- Sun, H. J., Wu, Z. Y., Nie, X. W., & Bian, J. S. (2020). Role of Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Link Between Inflammation and Hydrogen Sulfide. *Frontiers in pharmacology*, 10, 1568.
- Şaker, D., Polat, S. (2022). NLRP3 İnflamazom Aktivasyon ve Düzenleme Mekanizmalarına Genel Bir Bakış, *Archives Medical Review Journal.*, 31(1), 52-59.
- Talbott, J.H. (1940). Serum urate in relatives of gouty patients. *J. Clin. Invest.*, 19, 645-648.
- Tamura, D., Arao, T., Tanaka, K., Kaneda, H., Matsumoto, K., Kudo, K., Aomatsu, K., Fujita, Y., Watanabe, T., Saijo, N., Kotani, Y., Nishimura, Y., Nishio, K. (2010). Bortezomib potentially inhibits cellular growth of vascular endothelial cells through suppression of G2/M transition. *Cancer science*, 101(6), 1403–1408.
- Tang, A. C., Rahavi, S. M., Fung, S. Y., Lu, H. Y., Yang, H., Lim, C. J., Reid, G. S., & Turvey, S. E. (2018). Combination therapy with proteasome inhibitors and TLR

- agonists enhances tumour cell death and IL-1 β production. *Cell death & disease*, 9(2), 162.
- Taşkonak B., (2021). Hiperisin yüklü kitosan nanopartiküllerin A549 akciğer kanser hücrelerinde etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans tezi, 1-83.
- Tekin, S., Demirtürk, N. (2021). COVID-19: Risk factors increasing disease and scoring. *Klimik Derg.*, 34(3),150-5.
- Terkeltaub, R. (2010). Update on gout: new therapeutic strategies and options. *Nature reviews. Rheumatology*, 6(1), 30–38.
- Terkeltaub, R., Zachariae, C., Santoro, D., Martin, J., Peveri, P., & Matsushima, K. (1991). Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8 is a potential mediator of crystal-induced inflammation. *Arthritis and rheumatism*, 34(7), 894–903.
- Tokur, O., Aksoy, A. (2017). In vitro sitotoksosite testleri. *Harran Üniv Vet Fak Derg.*, 6 (1), 112-118.
- Torres, R., Macdonald, L., Croll, S. D., Reinhardt, J., Dore, A., Stevens, S., Hylton, D. M., Rudge, J. S., Liu-Bryan, R., Terkeltaub, R. A., Yancopoulos, G. D., & Murphy, A. J. (2009). Hyperalgesia, synovitis and multiple biomarkers of inflammation are suppressed by interleukin 1 inhibition in a novel animal model of gouty arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 68(10), 1602–1608.
- Ulus, G. (2006). Bazı Bitki Ekstrelerinin Sıçan Endotel Hücreleri Üzerine Olan Etkilerinin In Vitro Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir. 1-79.
- Urano, W., Yamanaka, H., Tsutani, H., Nakajima, H., Matsuda, Y., Taniguchi, A., Hara, M., Kamatani, N. (2002). The inflammatory process in the mechanism of decreased serum uric acid concentrations during acute gouty arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 29(9), 1950–1953.
- Vanlallie, T.B. (2010). Gout: epitome of painful arthritis. *Metabolism: clinical and experimental*, 59 (1), 32–36.
- Varol, M. (2017). Küçük molekül yapılı doğal bileşiklerin tümör gelişimi ve yayılımında yeni damar oluşumu hedefli tedavi potansiyellerinin epigenetik yaklaşım ve moleküler mekanizmalarla incelenmesi. Doktora tezi. 44-94.
- Wang, S., Zhang, L., Hao, D., Wang, L., Liu, J., Niu, Q., Mi, L., Peng, X., & Gao, J. (2022). Research progress of risk factors and early diagnostic biomarkers of gout-induced renal injury. *Frontiers in immunology*, 13, 908517.

- Wang, X., Zhang, Z., & Yao, C. (2012). Bortezomib inhibits the angiogenesis mediated by mesenchymal stem cells. *Cancer investigation*, 30(9), 657–662.
- Wang, Z., Zhao, Y., Phipps-Green, A., Liu-Bryan, R., Ceponis, A., Boyle, D. L., Wang, J., Merriman, T. R., Wang, W., Terkeltaub, R. (2020). Differential DNA Methylation of Networked Signaling, Transcriptional, Innate and Adaptive Immunity, and Osteoclastogenesis Genes and Pathways in Gout. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 72(5), 802–814.
- Yang, L., Zhou, R., Tong, Y., Chen, P., Shen, Y., Miao, S., Liu, X. (2020). Neuroprotection by dihydrotestosterone in LPS-induced neuroinflammation. *Neurobiology of disease*, 140, 104814.
- Yang, Q., Liu, R., Yu, Q., Bi, Y., & Liu, G. (2019). Metabolic regulation of inflammasomes in inflammation. *Immunology*, 157(2), 95–109.
- Yannaki, E., Papadopoulou, A., Athanasiou, E., Kaloyannidis, P., Paraskeva, A., Bougiouklis, D., Palladas, P., Yiangou, M., & Anagnostopoulos, A. (2010). The proteasome inhibitor bortezomib drastically affects inflammation and bone disease in adjuvant-induced arthritis in rats. *Arthritis and rheumatism*, 62(11), 3277–3288.
- Yao, G., Ling, L., Luan, J., Ye, D., Zhu, P. (2007). Nonylphenol induces apoptosis of Jurkat cells by a caspase-8 dependent mechanism. *International Immunopharmacology*, 7(4), 444–453.
- Yazır, Y., Dalçık, H. (2012). An Important Method in the Investigation of Vascular Pathologies: Endothelial Cell Culture. *Koşuyolu Kalp Dergisi*, 15(3), 137-142.
- Yin, W., Zhou, Q.L., OuYang, S.X., Chen, Y., Gong, Y.T., Liang, Y.M. (2019). Uric acid regulates NLRP3/IL-1 β signaling pathway and further induces vascular endothelial cells injury in early CKD through ROS activation and K⁺ efflux. *BMC Nephrology*, 20 (1), 319.
- Zadeoğluları, Z.F. (2010). 13q Delesyonlu Multipl Miyelomlu Hastalarda Bortezomib Etki Mekanizmasının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. İzmir. 5-52.
- Zahid, A., Li, B., Kombe, A.J.K., Jin, T., Tao, J. (2019). Pharmacological inhibitors of the NLRP3 İnflammasome. *Frontiers in Immunology.*, 10, 2538.
- Zer, C., Sachs, G., Shin, J.M. (2007). Identification of genomic targets downstream of p38 mitogen-activated protein kinase pathway mediating tumor necrosis factor- α signaling. *Physiol. Genomics.*, 31(2), 343-351.

- Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S. R., Yan, G. (1997). Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *BioTechniques*, 23(3), 525–531.
- Zhang, Q. B., Zhu, D., Wen, Z., Yi, T., Li, Q., Qing, Y. F., & Zhou, J. G. (2019). High Levels of Serum Uric Acid, Cystain C and Lipids Concentration and their Clinical Significance in Primary Gouty Arthritis Patients. *Current rheumatology reviews*, 15(2), 141–145.
- Zhang, X., Wang, G., Gurley, E.C., Zhou, H. (2014). Flavonoid Apigenin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response through Multiple Mechanisms in Macrophages. *PloS one*, 9(9), e107072.
- Zhang, Y. Z., Sui, X. L., Xu, Y. P., Gu, F. J., Zhang, A. S., & Chen, J. H. (2019). NLRP3 inflammasome and lipid metabolism analysis based on UPLC-Q-TOF-MS in gouty nephropathy. *International journal of molecular medicine*, 44(1), 172–184.
- Zhang, Y. Z., Sui, X. L., Xu, Y. P., Gu, F. J., Zhang, A. S., & Chen, J. H. (2020). Association between Nod-like receptor protein 3 inflammasome and gouty nephropathy. *Experimental and therapeutic medicine*, 20(1), 195–204.
- Zhao, L. J., Wang, H., Gao, H. Y., Wang, J., Gao, C., & Li, X. F. (2023). Increase in different peripheral effector T subsets in acute and chronic gout. *Transplant immunology*, 76, 101763.
- http 1: <https://www.agilent.com/en/product/cell-analysis/real-time-cell-analysis/rtca-microplates/rtca-cim-plates-741221#howitworks>.