

**FARKLI MİKROBİYAL KAYNAKLI LİPOPOLİSAKKARİTLERLE STİMÜLE
EDİLMİŞ MONOSİT HÜCRELERİNDE SELONSERTİB'İN (GS4997)İMMÜN
YANITA ETKİSİ**

Yüksek Lisans Tezi

Fatma GÜNDOĞAN

Eskişehir 2018

**FARKLI MİKROBİYAL KAYNAKLI LİPOPOLİSAKKARİTLERLE STİMÜLE
EDİLMİŞ MONOSİT HÜCRELERİNDE SELONSERTİB'İN (GS4997) İMMÜN
YANITA ETKİSİ**

Fatma GÜNDOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ağustos 2018

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Yayın ve Araştırma Teşvik Projesi ile desteklenmiştir. (Proje No: 1705S182)

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Fatma GÜNDOĞAN'nın 'Farklı Mikrobiyal Kaynaklı Lipopolisakkaritlerle Stimüle Edilmiş Monosit Hücrelerinde Selonsertib'in (GS4997) İmmün Yanıt Etkisi' başlıklı tezi 08.08/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı	Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışman)	: Doç.Dr. Zerrin CANTÜRK		
Üye	: Doç.Dr. Miriş DİKMEN		
Üye	: Prof.Dr. Pınar ÖZTOPÇU VATAN		

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU-KARABURUN
Müdür

ÖZET

FARKLI MİKROBİYAL KAYNAKLI LİPOLİSAKKARİTLERLE STİMÜLE EDİLMİŞ MONOSİT HÜCRELERİNDE SELONSERTİB'İN (GS4997) İMMÜN YANITA ETKİSİ

Fatma GÜNDOĞAN

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2018

Danışman: Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK

İnflamasyon, doku veya organın kendisine zarar verebilecek etkene karşı savaşıması durumudur. İnflamasyonda önemli sitokinler; TNF- α , IL-1 β 'dir. İnflamasyonun tedavisinde; Nonsteroidal Antiinflatuvar ilaçlar kullanılır. Tez kapsamında ASK-1 inhibitörü olan Faz II çalışmaları devam eden Selonsertib'in, farklı mikrobiyal kaynaklı lipopolisakkaritlerle stimüle edilmiş THP-1 insan monosit hücrelerinde immün yanıt etkilerini WST-1 sitotoksitesite testi ile flow sitometri ve Gerçek Zamanlı PZR yöntemiyle araştırılmıştır. Diklofenak Sodyumun IC50 konsantrasyonu 32 μ M/mL; Selonsertib'in ise 120 μ M/mL olarak belirlenmiştir. Flow sitometride elde edilen IL-1 β sonuçlarına göre ise; Diklofenak Sodyum *E.coli* LPS uygulamasından sonra yaklaşık 3.1 kat, *P. aeruginosa* LPS uygulamasından sonra 6.8 kat ve *S.enteritidis* LPS uygulamasından sonra ise; 4.9 kat IL-1 β seviyesi üzerinde bir inhibisyon sağlamıştır. Selonsertib ise; *E.coli* LPS uygulamasından sonra yaklaşık 21.5 kat, *P.aeruginosa* LPS uygulandıktan sonra sonra 31.9 kat ve *S.enteritidis* LPS uygulamasından sonra ise 16.5 kat IL-1 β seviyesi üzerinde bir inhibisyon görülmüştür. mRNA seviyeleri LPS'lerin kendi aralarındaki değerlendirmeleri sonucunda TNF- α gen düzeyinde, *P. aeruginosa* LPS ve Diklofenak Sodyum uygulaması ile 12 kat azaldığı, IL-1 β gen düzeyinde, *P. aeruginosa* LPS ve Diklofenak Sodyum uygulaması ile 2,28 kat azaldığı, ASK-1 gen düzeyinde, *P. aeruginosa* LPS ve Selonsertib uygulaması ile diğer gruplara göre daha iyi inhibisyon yaptığı görülmüştür.

Çalışma sonunda ise, Selonsertib'in Diklofenak Sodyum gibi inflamasyonda kritik rol oynayabileceği araştırılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Selonsertib (GS4997), Diklofenak Sodyum, İnflamasyon, THP-1.

ABSTRACT

EFFECTS OF SELONSTIBIN (GS4997) ON MONOSITE CELLS WITH DIFFERENT MICROBIAL RESOURCES LIPOPOLISAKKARITLES

Fatma GÜNDOĞAN

Department of Pharmaceutical Microbiology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, July 2018

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK

Inflammation is a fight against an effect that can damage the tissue or organ itself. Important cytokines in inflammation; TNF- α , IL-1 β . In the treatment of inflammation; Nonsteroidal anti-inflammatory drugs are used. In the thesis, Selonsertib, an ASK-1 inhibitor, Phase II studies, was investigated with WST-1 cytotoxicity test by flow cytometry and Real Time PZR method on the immunosubstances of THP-1 human monocyte cells stimulated with different microbial lipopolysaccharides. Diclofenac Sodium IC50 concentration 32 μ M / mL; Selonsertib was determined to be 120 μ M / mL. According to the results of IL-1 β obtained from flow cytometry; Diclofenac Sodium *E. coli* Approximately 3.1 fold after LPS application, 6.8 fold after *P. aeruginosa* LPS application and after *S. enteritidis* LPS application; 4.9 fold an inhibition on IL-1 β level. Selonsertib is; after *E. coli* LPS administration, an inhibition was observed at about 21.5 fold, after *P. aeruginosa* LPS administration, then 31.9 fold and after *S. enteritidis* LPS administration at 16.5 fold IL-1 β level. As a result of evaluations of mRNA levels of LPS, TNF- α gene level decreased 12 times with *P. aeruginosa* LPS and Diclofenac Sodium application, IL-1 β gene level decreased 2.28 times with *P. aeruginosa* LPS and Diclofenac Sodium application, ASK -1 gene, *P.aeruginosa* LPS and Selonsertib showed better inhibition than the other groups. At the end of the study, it was investigated that Selonsertib could play a critical role in inflammation like Diclofenac Sodium.

Key Words: Selonsertib (GS4997), Diclofenac Sodium, Inflammation, THP-1.

TEŞEKKÜR

Bu tezi yazmamda emeği geçen ve yüksek lisans eğitimimin her aşamasında maddi manevi desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK'e,

Laboratuvar çalışmalarımda yardımda bulunan başta Doç. Dr. Miriş DİKMEN hocam olmak üzere her daim yanımda bulunan fikirleriyle, görüşleriyle bana yol gösteren başta Bio. Selin ENGR olmak üzere Arş. Gör. Elif TİLKİ KAYA'ya, Arş. Gör. Mustafa Güçlü ZARDA'ya ve akşamlara kadar benimle sonuç bekleyen arkadaşım Songül Gnel'e,

Yüksek Lisans eğitimimin her noktasında desteklerini hiç ama hiç eksiltmeyen her koşulda güvenip yanımda olan canım aileme teşekkür ederim.

Fatma GÜNDOĞAN

Ağustos, 2018

26/07/2018

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.

Fatma GÜNDOĞAN

27/07/2018

STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES

I hereby truthfully declare that this thesis is an original work prepared by me; that I have behaved in accordance with the scientific ethical principles and rules throughout the stages of preparation, data collection, analysis and presentation of my work; that I have cited the sources of all the data and information that could be obtained within the scope of this study, and included these sources in the references section; and that this study has been scanned for plagiarism with “scientific plagiarism detection program” used by Anadolu University, and that “it does not have any plagiarism” whatsoever. I also declare that, if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.

Fatma GÜNDOĞAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

KAPAK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	2
2.1. BAKTERİLER	2
2.1.1. Gram Pozitif (+) Bakteriler	2
2.1.2. Gram Negatif (-) Bakteriler	3
2.2. İMMÜN SİSTEM.....	5
2.2.1. İmmün Sistemin Başlıca Organ ve Hücreleri	6
2.3. Bakterilere Karşı İmmün Yanıt.....	11
2.3.1. Endotoksin.....	11
2.4. Proinflamatuvar Sitokinler	13
2.5. Apoptoz Sinyal Düzenleyici Kinaz 1 (ASK-1) İnhibitörleri ve Etki Mekanizmaları.....	14
2.4. İmmün Yanıtta Etki Eden İlaçlar	15
2.4.1. Diklofenak Sodyum	16
2.4.2. Selonsertib (GS4997).....	16
3. GEREÇLER.....	18

3.1. Kullanılan Hücreler	18
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler, İlaç Etkin Maddeleri ve Laboratuvar Gereçleri.....	18
3.2. Kullanılan Cihazlar	19
4.YÖNTEMLER	21
4.1. Deneylerde Kullanılan Hücreler	21
4.2. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması	21
4.2.1. Kullanılan malzemelerin steril edilmesi	21
4.2.2. Kullanılan kimyasal maddelerin hazırlanması.....	21
4.2.3. Kullanılan LPS'lerin hazırlanması	22
4.2.3.1. LPS <i>S.enteridis</i> serotype	22
4.2.3.2. LPS <i>P.aeruginosa</i> 10.....	22
4.2.3.3. LPS <i>E.coli</i> 0111:B4.....	22
4.2.4. Hücre kültürü çalışmaları.....	22
4.2.4.1. THP-1 hücresinin kültür ortamında çoğaltılması ve deneylere hazırlık	22
4.2.5. Flow Sitometride Örneklerin IL-1 β Seviyelerinin Belirlenmesi	24
4.2.6. Real Time (Gerçek Zamanlı)- PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemi	25
ile IL-1 β , TNF- α ve ASK-1 mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	25
4.2.6.2.Total RNA izolasyonu	27
4.2.6.3.cDNA sentezi	27
4.2.6.4.RT-PZR (Real time PZR) ile mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi	27
5. BULGULAR ve TARTIŞMA	29
5.1. Diklofenak Sodyum ve Selonsertib'in THP-1 Hücresinde SitotoksikEtkilerinin WST-1 Yöntemi ile Değerlendirilmesi.....	29
5.2. Diklofenak Sodyum ve Selonsertib'in Farklı Mikrobiyal Kaynaklı Lipopolisakkaritlerle Uyarılmış THP-1 Hücrelerinde İmmün Yanıtlarının Akış Sitometri Yöntemi ile Değerlendirilmesi.....	31
5.3. Real Time PZR ile mRNA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi.....	36
5.3.1. TNF- α Sonuçlarının Değerlendirilmesi	37
5.3.2. IL-1 β Sonuçlarının Değerlendirilmesi	39

5.3.3. ASK-1 Sonuçlarının Değerlendirilmesi	41
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	45
KAYNAKÇA.....	46
ÖZGEÇMİŐ	

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.2.1: İmmün sistem hücreleri	7
Tablo 5.2.1: Diklofenak Sodyum IL-1 β sonuçları.....	35
Tablo 5.2.2: Selonsertib IL-1 β sonuçları	35
Tablo 5.3.1: RT-PZR mRNA ekspresyon sonuçları.....	37

ŞEKİLLER DİZİ

Sayfa

Şekil 2.1.1: Gram pozitif, Gram negatif hücre duvar yapısı	2
Şekil 2.1.2: Gram negatif bakteriler	3
Şekil 2.2.1: İmmün sistem hücreleri	7
Şekil 2.5.1: İnflamasyonda ASK-1 yolağı	14
Şekil 2.5.2: ASK-1'in örnek bir etki mekanizması.....	15
Şekil 2.4.1.1: Diklofenak Sodyum'nun kimyasal yapısı	16
Şekil 2.4.2.1: Selonsertib (GS-4997)'in kimyasal yapısı.....	16
Şekil 4.2.4.3.1: WST-1 boyasının kimyasal yapısı	23
Şekil 4.2.6.1: DNA amplifikasyonu	26
Şekil 5.1.1: Diklofenak Sodyum konsantrasyonlarının % canlılık değerleri	30
Şekil 5.1.2: Selonsertib konsantrasyonlarının % canlılık değerleri	30
Şekil 5.2.1: Diklofenak Sodyum'un flow sitometri değerleri	33
Şekil 5.2.2: Selonsertib'in flow sitometri değerleri	34
Şekil 5.3.1: TNF- α mRNA ekspresyonu	38
Şekil 5.3.2: TNF- α genine ait hedef/referans oranları.....	38
Şekil 5.3.2.1: IL-1 β 'nın mRNA ekspresyonu	40
Şekil 5.3.2.2: IL-1 β genine ait hedef/referans Oranları	40

Şekil 5.3.3.1: ASK-1'in mRNA ekspresyonu	42
Şekil 5.3.3.2: ASK-1 genine ait hedef/referans oranları.....	42

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	: Alfa
β	: Beta
ADCC	: Antikor Bağımlı Hücre Aracılı Sitotoksite
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
ASK-1	: Apoptoz Sinyal Düzenleyici Kinaz 1
CD4	: Sitotoksik T Hücreleri
COX	: Siklooksijenaz
CP	: Eşik Değeri
CR	: Kompleman Reseptörleri
DAP	: Diaminopimelik Asit
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dT	: Deoksitimin

DTT	: Dithiothreitol
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay testi
ER	: Endoplazmik Retikulum
IC50	: İnhibisyon Konsantrasyonu
IgM	: İmmünoglobulin M
IL	: İnterlökin
IL-1 β	: İnterlökin 1 Beta
IMVIC	: İndol-Metil Kırmızısı-Voges-Proskauer-Sitrat Testleri
iNOS	: Nitrik Oksit Sentaz Enzim
JNK	: c-Jun N-terminal Kinazlar
KCN	: Potasyum Siyanid Testi
kDa	: Kilo Dalton
LGL	: Büyük Granüler Lenfosit
LPS	: Lipopolisakkarit
MALT	: Mucosa Associated Lymphoid Tissue
MAP3K5	: Mitojenle Aktive Edilmiş 3 Kinaz 5
MR	: Mannoze Reseptörleri
MSC	: Mezenkimal Kök Hücre
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
NK	: Doğal Öldürücü Hücre
NQDI	: Apoptoz Sinyal Düzenleyici Kinaz 1 İnhibitörü
NSAID	: Non Steroidal Anti İnflamatuvar İlaç

p38 MAPK	: p38 Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
PAMP	: Pathogen Associated Molecular Pattern
PG	: Prostoglandin
PRR	: Pattern Recognition Receptors
PS	: Polisakkarit
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R	: Round (Yuvarlak)
RT-PZR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S	: Smooth (Düz)
TC ASK 10	: Potansiyel ASK-1 İnhibitörü
TCR	: T Hücre Reseptörü
THP-1	: İnsan Monositik Hücre Hattı
TLR	: Toll Benzeri Reseptörler
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktörü Alfa
VP	: Voges-Proskauer Testi
WST-1	: Hücre Poliferasyon Testi

1. GİRİŞ

Prokaryotik hücre yapısına sahip bakteriler, hücre duvarı farklılıklarına göre yapılan Gram boyama sonucuna göre; Gram (+) ve Gram (-) olarak ikiye ayrılırlar. Gram (+) bakterilerde, teikoik asit bulunur. Fosfodiester bağı ile bağlanan gliserol, ribitol içeren bu tabaka suda çözünebilen karakterdedir (Johnson, 2013). Gram (-) bakterilerde ise; dış membranda lipoprotein ve lipopolisakkarit denilen yapılar bulunur. Bu katman toksik bir karakterde olup bakterilerin endotoksinini oluşturur. Antijenik özellikte olmamakla birlikte hastalarda inflamasyon bulgularından olan yangı, ateş gibi etkileri oluştururlar. İmmün sistem; canlıları oluşan hastalıklara karşı koruyan bir sistemdir. Patojenler ve çeşitli tümör hücrelerini tanıyıp onlara savaş açan bu sistem, vücuda giriş yapan her maddeyi tanır canlının sağlıklı hücrelerinden yabancı maddeyi ayırır (Chinen vd., 2006).

İmmün yanıt, immün sistemin bileşenleriyle enfeksiyöz ajanların arasında kompleks bir dizi etkileşiminden oluşur. İmmün yanıt, aktif ve pasif immünite olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Hümorale ve hücreli immün mekanizmalarına sahiptir. Kompleman sistemi hümorale immün yanıt ile inflamatuvar yanıt ve patojenin fagositoz ve lizisini birbirine bağlar (Anuforom vd., 2015). İnflamasyonu inhibe etmek için genellikle aspirin, Diklofenak Sodyum gibi, siklooksijenaz-1 inhibitörü olan nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar kullanılmaktadır.

Selonertib (GS-4997) ASK-1 inhibitörü olarak Faz II deney aşamasında olan etkili bir antineoplastik bir maddedir. Üzerinde farklı etkilerinin araştırıldığı bu ajanın, immün sistem üzerindeki etkilerinin hücre inflamasyon modeliyle araştırılması tezin temel amacıdır. Bu amaçla öncelikle pozitif kontrol olarak kullanılan diklofenak sodyum ve selonertib'in WST-1 yöntemi ile sitotoksite deneyi, ardından flow sitometri cihazıyla IL-1 β seviyesinin ölçümü ve ardından RT-PZR ile TNF- α , IL-1 β ve ASK-1 mRNA gen ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır.

2.1.2.1. *Salmonella enteridis*

Salmonella suşları hücre içi patojenlerdir. İnsanlarda gıda zehirlenmelerine neden olan sistemik infeksiyon tipindeki *Salmonella* tavukların barsak sisteminde bulunmaktadır. Son yıllarda *Salmonella* ile ilgili hayvanlarda ve ulusal sağlık problemlerinde artış görülmekte olup *Salmonella enteritidis* dünyada yaygın bir problem olmaya başlamıştır. Tavuk eti, yumurta ve ürünlerinin tüketilmesiyle insanlarda zehirlenmelere neden olan *Salmonella enteritidis* 1–3 µm boyunda, 0.5– 0.7 µm eninde, uçları düz hafif yuvarlak, sporsuz, kapsülsüz basillerdir, anilin boyalarla kolayca boyanır ve Gram (-)'dir (Bekar vd., 1993). Sıvı besiyerlerinde homojen bulanıklık yaparak ürer, katı besiyerlerinde 24-48 saat içinde yuvarlak, düz kenarlı, kabarık, düzgün yüzeyli koloniler oluşturur (Calnek vd.,1996). Optimal üreme sıcaklığı 37°C'dir. En uygun ortam asiditesi pH 7.4'dür (Davison vd.1996) (Şekil 2.1.2).

Vahşi tip Enterobakteriyal türlerine ait O-zincirleri koloni morfolojilerinden dolayı "smooth" (S) olarak adlandırılmaktadır. Mutant *Enterobakteriler* LPS O-zinciri içermeyen *rough* görünümde koloniler oluştururlar. Bunlar "rough" (R) olarak adlandırılmaktadır ve LPS'i ise *core* bölgelerinin kısalışını ifade eden Ra, Rb, Re olarak adlandırılmaktadır. Büyümekte olan Re mutant bir gram (-) bakterinin duvarında minimal LPS yapısında lipid A bölgesine 2 Kdo (Kilo Dalton) kalıntısı ile bağlanmış bir LPS yapısı olduğu görülmüştür (Caroff vd.,2003)

2.1.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa 1,5-3 µm genişliğinde, bazen ikili bazen de kısa zincirler halinde görülen sporsuz, kapsülsüz, çubuk şeklinde aerob bakteridir. Çoğu kez bir uçlarında bir, nadiren iki-üç adet kirpiği vardır ve çok hareketlidirler. Kolay boyanırlar ve Gram (-)'tirler. Uzun süre beklemiş kültürlerinde ve antiseptik maddelerin bulunduğu ortamlarda kısa veya çok uzun deforme şekilleri, hareketsiz ve pigmentsiz olanları, R (rough) tipinde üreyenlerin bulunduğu bildirilmiştir (Sadoff, 1974) (Şekil 2.1.2)

P.aeruginosa; Kanlı agarda hemoliz yaparlar ve beta hemolitiktirler. Jelatin ve koagule plazmayı eriterek parçalarlar. Glikozu oksidatif yolla parçalayıp asite dönüştürürler. Laktoz ve sakkarozu kullanamazlar. Oksidaz pozitif olmaları ile *Enterobacteriaceae* familyası üyelerinden ayrılırlar. Asetamini deamine ederek amonyak oluştururlar. Nişastayı parçalayamazlar. Katalaz ve sitrat reksiyonları pozitifdir. L-arjinin dihidrolaz

oluşturabilirken, lizin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz oluşturmazlar. İndol ve H₂S oluşturmazlar. Metil kırmızısı ve Voges-Proskauer (VP) negatiftir (Frobisher, 1968).

P.aeruginosa'nın 17 somatik (O) ve 6 flagella (H) antijeni vardır. O antijeni ısıya dayanıklı, flagella ve fimbria antijenleri ısıya dayanıksızdır. Fosfatazlar, proteazlar ve fosfolipazlar da antijen olarak rol oynarlar (İlgaz,1999).

2.1.2.3.Escherichia coli

Echerichia coli, *Escherichae* cinsinin en önemli türüdür. Basil veya kokobasil karakterli bir tür olup, 2-6 µm boy ve 1-1.5 µm enine sahip bakterilerdir. Gram (-) bazen hareketli, fakültatif anaerob, 1-2 mm çapında S tipi koloni oluşturan bakterilerdir (Şekil 2.1.2). *Enterobacter*'lerden ayrılan en belirgin özelliği 44°C'de üreyebilmeleridir.

E.coli glikoz, laktoz, maltoz gibi şekerleri parçalayarak asit ve gazı çevirir. Nişastadan gaz oluşturmaz, İndol pozitif, Metil red teseti pozitif, VP testi negatif, Sitrathlı besiyerinde ürerler. IMVIC testleri (++--)'dir. KCN testi negatiftir. Genellikle H₂S oluşturmazlar. Ayrıca SS Agar, MacConcey Agar ve Endo Agarda laktozu kullanması sonucu kırmızı renkli koloniler oluşturur (http 5).

2.2. İMMÜN SİSTEM

İmmünite, zararlı olan her türlü maddeye (mikroorganizma, protein ve polisakkarid gibi) karşı organizmanın verdiği reaksiyonu tanımlayan bir kavramdır. İmmün yanıt, yabancı madde ile karşılaşmada immün sistem hücre ve moleküllerinin karşılıklı ve düzenli etkileşimleriyle ortaya çıkan savunmadır. İmmün yanıtı başlatan yabancı maddeler antijen veya immünojen olabilir (Abul K, 2006).

İmmünojen terimi, sadece immün yanıt oluşturma yeteneğindeki herhangi bir madde için kullanılır. Antijen ise daha ziyade bir molekülün, spesifik immünitenin ürünleri ile reaksiyona girebilme yeteneğini tanımlar, her zaman spesifik immüniteyi oluşturmaları beklenmez. Bütün immünojenlerin antijen olduğu ifade edilir, ancak bunun aksi her zaman geçerli olmayabilir. Yeryüzünde yaklaşık 10⁹ sayıda antijenin var olduğu kabul edilmektedir. Hastalık yapan mikroorganizmaların çoğu iyi bir antijen yapısındadır (Delves ve Roitt, 2000).

İmmün yanıt, normalde bireyi infeksiyonlardan ve yabancı olan maddelerden korur. İmmün sistem vücudun hemen her yerinde karşılaştığı sayısız yabancı antijene karşı savunma yapmak zorundadır. Bu nedenle immün sistem hücrelerinin kan, lenf ve

dokular arasında dolaşabilme ve gerekli bölgelerde yerleşebilme özellikleri savunmada dinamik bir ağ oluşturur (Mellman, 2013).

Antijenin vücuda giriş yeri, oluşacak immün yanıtı etkiler. Deri yoluyla alınan antijenler, bu dokudaki makrofajlar (Langerhans hücre) ile tanınır ve lenfatik yoldan bölgesel lenf düğümlerine taşınır ve immün yanıt hem antijenin giriş yerinde hemde ilişkili lenf bezinde başlar. Kan dolaşımı ile giren antijenler dalaktaki makrofajlarca tanınır. Solunum yolu, gastrointestinal kanal mukozasından girenler ise bölgedeki mukoza ilişkili lenfoid doku ile temas eder ve burada gerekli immün yanıt gelişir (Sparber, 2014).

2.2.1. İmmün Sistemin Başlıca Organ ve Hücreleri

İmmün sistemin organ ve dokuları başlıca iki grupta toplanır. Birincisi, Santral lenfoid organlardır ki bunlar; kemik iliği ve timus, lenfositlerin tüm özelliklerini kazanarak olgunlaştığı organlardır. İkincisi, Periferik lenfoid organlar olup bunlar; dalak, lenf bezi, mukozal lenfoid doku (mucosa associated lymphoid tissue, MALT), edinsel immün yanıtın başladığı organlardır. İmmün hücreler santral organlarda olgunlaşır, periferik organlarda görevlerini yaparlar (Jakab, 2015).

İmmün sistemin tüm hücreleri tek bir kök hücreden gelişir. Kemik iliğinde pluripotent hemotopoetik kök hücreden özelleşmiş iki farklı öncül hücre oluşmaktadır. Bunlar myeloid progenitör hücre ve lenfoid progenitör hücredir. Myeloid progenitor hücreden eritrosit, trombosit, granülosit, monositler ve mast hücreleri gelişmektedir. Lenfoidprogenitor hücreden lenfositler (T ve B) gelişmektedir (Tablo 2.2.1) (Şekil 2.2.1)

(opsonizasyon) nötrofil içine alınmalarını kolaylaştırmaktadır. Yaşam süreleri kısadır (birkaç saat-birkaç gün). İnflamasyon sırasında sayıları 2-3 kat artar. İnflamasyon bölgesine ilk ulaşan hücrelerdir (Dinauer, 2014).

2.2.1.2. Monosit-Makrofaj

Periferik kanda kısa ömürlü hücrelerdir. Kandan dokulara göç eden monositler, farklılaşarak makrofajları oluştururlar. Makrofajlar tüm vücut dokularına yayılmış olup, yerleştiği yerde özel isimleri ile anılmaktadır; karaciğerde ‘kupfer’, deride “Langerhans” hücreleri, alveollerde “alveolar makrofajlar”, beyinde “mikroglial hücreler”, böbrekte “mezenşimal hücreler” ve kemikte “osteoklast” olarak bilinirler. Monosit ve makrofajlar profesyonel fagositik hücreler olup doğal immünitede önemli rol oynarlar, antikor ile kaplı bakteri ve tümör hücrelerinin yıkımı ve parçalanması gibi efektör görevleri vardır (Van De Wiele vd., 2014).

Yabancı ve zararlı olan maddeler, reseptör ve ligand bağlanmasından sonra aktine bağlı motilite ile makrofaj içine alınır, fagozom oluşumu ve lizozom ile füzyon oluşumu sonucunda fagolizozom içinde parçalanır ve zararsız duruma getirilir. TNF- α ve IL-1 gibi sitokinler aracılığıyla monosit/makrofajlar antikora bağlı olmayan litik aktivite gösterirler. Makrofajların patojenleri tanınması, patojen ilişkili moleküler motifler (PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern, PRR: Pattern Recognition Receptors), Toll like reseptörler (TLR), Mannoze reseptörleri (MR) gibi bazı yüzey molekülleri ile olur. Makrofajların yabancı ajan ile temasında IgG’nin Fc parçasına karşı (CD16, CD32) reseptörler, kompleman reseptörleri (CR) surfaktan proteini, CD14(LPS reseptörü) ve sitokin reseptörleri rol oynar (Van De Wiele vd., 2014).

Monosit-makrofajlar dokularda çeşitli hidrolitik enzimler, oksidatif metabolizma ürünleri ve kemoatraktan çeşitli sitokin (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15 gibi) ve kemokinler aracılığı ile proinflamatuvar ve antiinflamatuvar görevlerde bulunurlar. Makrofajlar sitokin üretimi ile hem doğal, hemde edinsel immünitede önemli görev yaparlar. Proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1,IL-6, IL-8,TNF) üretimi ile inflamasyonda, IL-1 ve IL-6 gibi sitokinler aracılığıyla T ve B hücrelerin antijene bağlı aktivasyonunda temel rol alırlar. IL-12 ile hücreyel immün yanıtta rol oynarlar (Linton ve Thoman, 2014).

2.2.1.3. Dendritik/Langerhans hücreler

Kemik iliğinden köken alan, yüzeyinde yüksek düzeyde HLA Sınıf II ve adezyon moleküllerine sahip olan ve antijen sunumu yapan bir hücre grubudur. Antijen sunan hücreler içinde yer alırlar. Epitelde bulunan immatür dendritik hücrelerce alınan antijen afferent lenf yolu ile periferik lenfoid organlara (dalak, lenf bezi, mukozal lenfoid doku) taşınır ve buradaki T lenfositlere sunulur. Matür dendritik hücreler, antijeni zayıf T hücrelerine sunarlar ve aktive ederler. Dendritik hücreler kanda çok az miktarlarda bulunur (Linton ve Thoman, 2014).

Ciltte ve mukoza yüzeylerin altında bulunanlar Langerhans hücresi adı ile bilinirler. Bazı sitokinlerin varlığında (IL-1,IL-4,TNF- α) kültürlerde çoğalabilirler. Foliküler dendritik hücreler, B hücrelerine antijen sunumu yaparlar ve bellek B hücre oluşumunda rol oynadıkları düşünülür. Periferik lenfoid organların germinal merkezlerine veya foliküllerine ulaşan antijenleri tanırlar. Makrofajlar ve dendritik/Langerhans hücreler dışında, B lenfositleri de antijen sunumu yaparlar (Linton ve Thoman, 2014).

2.2.1.4. Mast hücresi

Solunum ve sindirim sistemlerinde ayrıca deride fazla sayıda bulunur. Anjiyogenez, doku onarımı ve vücudun mikroorganizmalara karşı savunulmasında görev alırlar (Dahlin ve Hallgren, 2015).

2.2.1.5. Eozinofil

Parazitik infestasyonlarda ve alerjik inflamasyonda görev alan hücrelerdir. Fagositöz yeteneği dışında, hasar verici granül içeriğini dış ortama salgılayarak parazitleri yok ederler (Scarлата, 2015).

2.2.1.6. Trombosit

IgG için Fc reseptörüne sahiptirler. İmmün komplekslere bağlandıklarında vazoaktif aminleri ve diğer mediatörleri salgırlar (Jenne ve Kubes, 2015).

2.2.1.7. Doğal öldürücü hücre (NK, Natural Killer)

Doğal immün sistemde görev alan hücre grubudur, kesin olmamakla birlikte lenfoid kök hücresinden geliştiğini bildiren kaynaklar vardır. Periferik kandaki lenfositlerin %10-15 kadarını oluşturur, lenfositlere benzerdir, onlara göre daha büyük ve granüllüdür, büyük granüler lenfosit (LGL) olarak da anılırlar. Granüllerde bulunan granzim ve perforin ile hedef hücreleri öldürülür. T ve B hücrelerde bulunan antijen spesifik reseptörler, NK

hücrelerinde bulunmaz. NK hücrelerinin çoğu, CD16, CD56 ve CD57 yüzey molekülleri taşırlar. Yüzey molekülleri ile hedef hücreyi (virus ile enfekte hücre ve tümör hücresi gibi) tanır ve öldürücü aktivite(sitotoksiste) göstererek onları yok ederler. Ayrıca antikor ile kaplanmış hücreleri de öldürme özelliği vardır. NK hücre yüzeyindeki Fc reseptör ile ‘antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksiste’de (ADCC) önemli rol oynar (Orange, 2013).

2.2.1.8. Endotel hücreler

İmmün yanıtı doğrudan katılmazlar, ancak inflamatuvar reaksiyonlarda rol oynarlar. Endotel hücreleri, intersellüler, vasküler ve mukozal adezyon moleküllerini eksprese ederler. Lökositlerin dolaşımdan dokulara geçişini, damar endoteli üzerinde bulunan adezyon molekülleri ile birlikte sağlarlar. Çeşitli sitokinlerle aktive olduklarında, MHC Sınıf II moleküllerini eksprese ederek antijen sunan hücre gibi davranabilirler (Glynn ve Hinds, 2014).

2.2.1.9. Lenfositler

Morfolojik olarak tüm lenfositler birbirine benzerdir, ayırt edilemez, ancak fonksiyonları ve fenotipik karakteristikleri ile birbirlerinden ayrılan üç büyük lenfosit popülasyonu vardır: T lenfosit (hücresel immünite), B lenfosit (humoral immünite) ve doğal öldürücü hücre (NK) (doğal immünite). Lenfositler (T ve B), kemik iliğinde hematopoetik kök hücrenin bir alt kolu olan lenfoid progenitör hücrelerden köken alırlar ve santral lenfoid organ olan kemik iliğinde; B lenfosit, timusta ise T lenfosit, lenfositlerin tüm özelliklerini kazanırlar(Sakaguchi vd. 2001).

2.2.1.10. T lenfosit

Kemik iliğinden timusa gelen timositler gelişme sürecinde; antijen reseptörünü (T hücre reseptörü=TCR), kazanır. Pozitif ve negatif seleksiyon (self antijenleri yabancı olandan ayırt etme yeteneği) safhalarını geçirdikten sonra olgun T hücreler ($CD4^+$ T lenfosit ve $CD8^+$ T lenfosit) olarak periferik dolaşıma geçerler. Periferik kanda total kan lenfositlerinin yaklaşık %70 kadarı $CD4^+$ T yardımcı (Th, T Helper), %25 kadarı ise $CD8^+$ T sitotoksik (Tc) bulunmaktadır. Tüm T lenfositler yüzeylerinde CD3 molekülü taşırlar. T lenfositler hücresel immün yanıtta anahtar rol oynarlar (Sakaguchi vd. 2001).

2.2.1.11. T hücre reseptörü (TCR)

T hücrelerin immün yanıt verebilmeleri için uygun şekilde sunulan antijeni tanıması gereklidir. T lenfositler antijeni TCR ile tanırırlar. Bu reseptörler belli bir antijene özgü yanıt gelişmesini sağlar. Antijen tanımayı sağlayan TCR'ler polipeptid zincirlerine göre iki tiptir. Periferik kandaki T hücrelerinin %90-95'i TCR- $\alpha\beta$ taşır ve antijen ile etkileşimi, MHC molekülüne bağımlıdır. TCR- $\alpha\beta$ hücreler CD4⁺ ve CD8⁺ hücrelerdir ve immün yanıtta doğrudan sorumludurlar (Ataca ve Arslan, 2015).

2.3. Bakterilere Karşı İmmün Yanıt

Bakterilere karşı immün cevapta hem hücresel hem de humoral bağışıklık sistemleri rol alır. Bakteriler immün cevabı tetikleyebilecek hem çok çeşitli yüzey antijenleri, hem detoksinlere sahiptirler. Hümorale immünite, ekstrasellüler bakterilere karşı koruyucu spesifik immün cevaptır. Bu bakterilerin hücre duvarı ve kapsüllerindeki immünojenik yapılar, timusa bağımlı olmayan antijenler olarak bilinen polisakkaridlerdir. Bu antijenler B lenfositlerini doğrudan uyarak güçlü bir spesifik IgM cevabına yol açarlar (Mills vd., 1994).

Ekstrasellüler bakterilere karşı olan hücresel immün yanıtta HLA Sınıf II molekülü ve CD4⁺ T hücreleri yardımıyla immün cevap oluşur. Ekstrasellüler bakteriler antijen sunan hücreler tarafından fagosite edilirler. Bu antijenlere hücre içinde bir işlem uygulandıktan sonra bu antijen sunan hücrelerin yüzeyinde bulunan antijen, HLA Sınıf II molekülü ile birlikte belirginleşir. CD4⁺ T hücreleri yardımcı T lenfositleri olup, B lenfositlerini antikor sentezlemek için uyarırlar. Bazı bakteriyel toksinlerin çok sayıda CD4⁺ T lenfositleri uyardıkları bilinmektedir. Bu toksinler süper antijenler olarak bilinir. Bu antijenlerin önemi, T hücrelerinin aktive olması ile fazla miktarda sitokin yapılmasına ve endotoksik şoka benzeyen klinik tablolara yol açabilmeleridir (de Vries, 1989).

2.3.1. Endotoksin

Bakteri hücre duvarı bileşenleridir. Gram (-) bakterilerde endotoksine lipopolisakkarit adı verilir. LPS makrofajlardan sitokin salınımını uyarır ve iyi bir adjuvandır. Organizma LPS' lere fazla miktarda veya sistematik maruz kaldığında sistemik bir yangısal reaksiyon meydana gelebilir ve bu da endotoksin şoku, doku hasarı ve ölüm gibi çoklu fizyopatolojik etkilere sebep olabilir (Anspach, 2001; Ogikuba vd., 2004).

Bununla birlikte, endotoksinler hücre ve organlara direkt etki etmezler (Heilman, 1965; Heilman, 1968), bunun yerine immün sistemin aktivasyonu, özellikle de monosit ve makrofajlar başta olmak üzere immün sistem hücrelerinin aktive edilmesi ve dolayısıyla immün yanıtın artırılması ile etki gösterirler (Forehand vd., 1989). Bu hücrelerin sentezledikleri maddeler özellikle tümör nekroz faktörü (TNF), birçok interlökinler, prostoglandinler, koloni sitümüle edici faktörler, trombosit aktive edici faktör ve serbest radikaller gibi mediyatörlerdir (Rietschel vd., 1994).

Westphal ve Jann (1965), endotoksinleri saflaştıran ilk araştırmacılar olmuştur. Bu araştırmacılar değişik Gram (-) bakterilerden sıcak fenol-su ekstraksiyon yöntemini kullanarak yüksek oranda saf, biyolojik olarak aktif endotoksin elde etmişlerdir. Elde ettikleri ürün, proteinden yoksun olup, sadece karbonhidrat, yağ asiti ve fosfor içermekte idi. Bu araştırmacılar aynı zamanda endotoksinleri tanımlamak için "lipopolisakkarit" (LPS) terimini ilk kullananlardır.

Lipopolisakkaritler olarak da adlandırılan endotoksinler, Gram (-) bakterilerin dış membranının ana bileşenidir (Kirikae vd., 1998). Bakterilerin sitoplazmik membranında lipopolisakkarit veya lipoprotein yapısında bulunurlar (Raetz vd., 1991). Bu bileşikler, bakterileri dış ortama karşı korumak ve yarı geçirgen bir membran oluşturmak için tasarlanmışlardır (Hirayama vd., 2002). Bunlar hidrofobik bir lipid parçasına kovalent olarak bağlanan bir hidrofilik polisakkarit parçasından oluşmuştur (Ogikuba vd., 2004).

2.3.1.1. Endotoksinlerin etki mekanizması

Endotoksinlerin oluşturduğu doku hasarı, şok ve ölüm gibi fizyopatolojik etkileri oldukça çeşitlilik gösterir (Ogikubo vd., 2004). Endotoksinler hücre ve organlar üzerine direkt etki etmezler (Rietschel vd., 1994). Fakat bunun yerine, monosit ve makrofajlar başta olmak üzere immün sistemin aktive edilmesiyle ve dolayısıyla immün yanıtın artırılması ile etki gösterirler (Forehand vd., 1989). Bu durum, aktive edilen immün sistem hücrelerinden özellikle TNF, interlökinler, prostoglandinler, koloni sitümüle edici faktörler, trombosit aktivite edici faktörler ve serbest radikaller gibi mediyatörlerin salınmasına sebep olur (Magalhaes vd., 2007).

LPS'lerin moleküler aktiviteleri, LPS molekülünün kendisinden kaynaklanmaz. Bunun yerine endotoksinin, LPS'lere duyarlı hücrelerle etkileşimi sonucu üretilen medyatörler tarafından indirekt olarak indüklenir (Galanos vd., 1993). Makrofajların, LPS molekülünün Lipid A bölümü tarafından indüklenen aktivasyonu, biyoaktif lipidlerin,

reaktif oksijen türlerinin ve özellikle de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 ve IL-10 gibi peptit mediyatörlerinin üretilmesine yol açar (Galanos ve Freudenberg, 1993).

Enfeksiyona karşı vücut ısısında artma, bakteriyal, viral enfeksiyonlar, tümör nekrozuna karşı savaşma gibi yararlı etkiler görülür (Bui, 2012). Bu yararlı etkiler yüksek ateşin tedavisinde, tümörlerin yok edilmesinde ve non-spesifik olarak immün yanıtın geliştirilmesinde kullanılmaktadır (Golenbock vd., 1991; Pugin vd., 1995).

2.4. Proinflatuar Sitokinler

Sitokinler; immünolojik ve inflamatuvar travmaya karşı doku cevabında ortaya çıkan, makrofajların aktive edilmesi, yangılı dokuda fibroblastların gelişmesi, kemik iliğindeki lökosit prokürsörlerinin aktivasyonu, kas yıkılanması ve beden ısısının artışından sorumlu maddelerdir (Miert, 1995; Özcan vd., 1996; Tsiotou vd., 2005). Proinflatuar özellikte olan sitokinler (TNF- α/β , IL-1- α/β , IL-6, IFN- α/β ve makrofaj inhibitör protein-1) (Miert, 1995). İnflamasyon olgularında ilk TNF- α uyarılmaktadır (Van der Poll ve van Deventer, 1999; Van der Poll, 2001; Otto, 2007).

Sağlıklı bireylerdeki serum TNF- α seviyesi genellikle tespit edilemeyecek seviyede iken sepsis ve kritik hastalık durumlarında, endojen ve ekzojen uyarıcı faktörlerle düzeyi artmaktadır. Yapılan çalışmalarda TNF- α , IL-1 β ve IL-6'nın plazma düzeylerinin yüksek olması ile mortalite arasında doğru orantı olduğu gösterilmiştir (Murdaca vd., 2013).

TNF- α 'nin varlığı ilk kez kendiliğinden gelişen tümör vakalarında belirlenmiş ve farelerin deneysel subkutan tümörlerinde hemorajik nekroz oluşturduğu için bu isim verilmiştir (Diker, 2005).

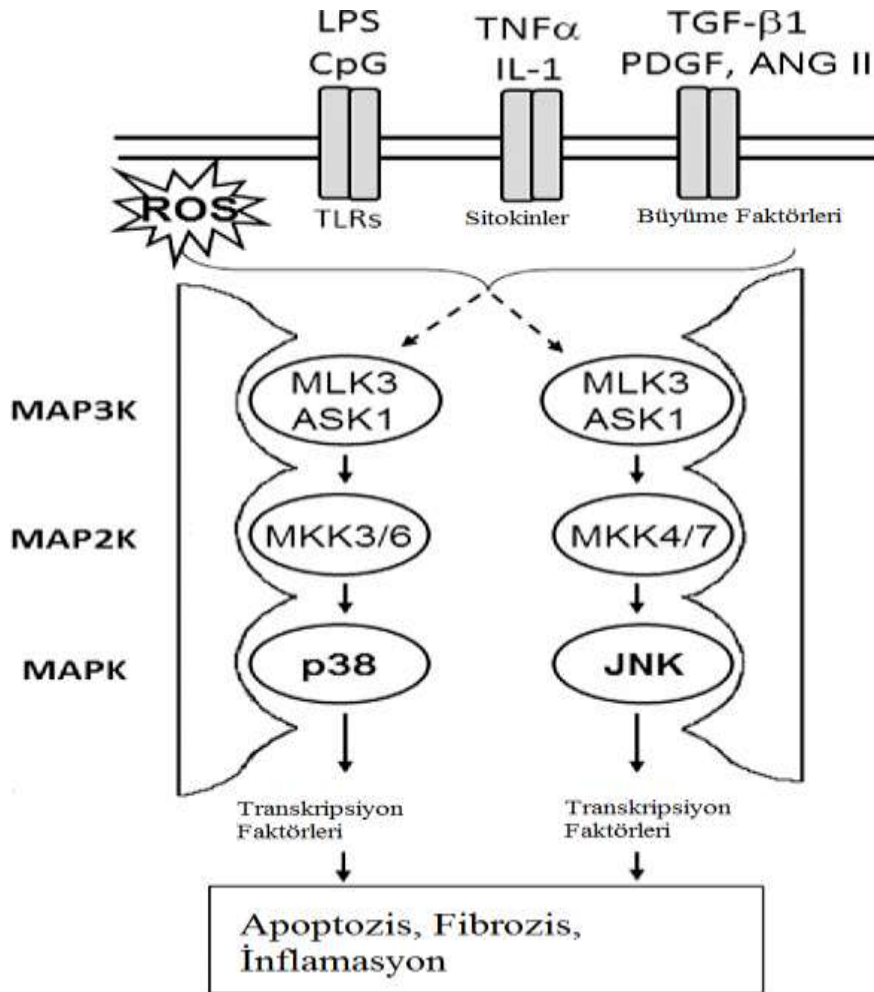
Sepsis/endotoksemi olgusunun en önemli belirteçleri, serumda yüksek düzeyde belirlenen TNF- α ve IL-1 β 'dir. İki sitokin sinerjistik etkiyle, inflamasyonu artırarak klinik bulguların büyük kısmının ortaya çıkmasına neden olurlar (Bochud vd, 2003; Hopkins, 2003; Ahmetvd., 2009). TNF- α 'nın sepsis ve gelişebilecek septik şokta ortaya çıkan ateş, ishal, metabolik asidoz, pıhtılaşmanın uyarılması, böbrek ve kan hücreleri ile ilgili bozukluklara neden olduğu belirlenmiştir (Okajima, 2001; Ahmetvd., 2009).

TNF- α 'nın etkileri IL-1 β ile desteklenmektedir. Ayrıca TNF- α ve IL-1 β 'nin tek başlarına septik şok belirtilerine neden olabildiği de bildirilmektedir. TNF- α ve IL-1 β sinerjik etkileşim ile doğrudan veya dolaylı yollarla hemodinamik ve inflamatuvar

değişikliklerin birçoğuna aracılık etmektedir (Doherty vd., 1992; Remick, 2007; Ahmetvd., 2009).

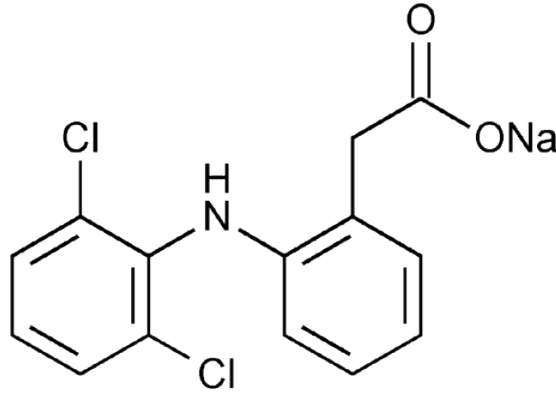
2.5. Apoptoz Sinyal Düzenleyici Kinaz 1 (ASK-1) İnhibitörleri ve Etki Mekanizmaları

Apoptoz Sinyal Düzenleyici Kinaz 1 (ASK-1) ilk olarak Ichjo vdadaşları tarafından, mitojenle aktive olmuş protein olan (MAPK) kinazlardan biri olarak tanımlanmıştır (Ichjo vd. 1997). ASK-1 Sınıfk MAPK ailesi içerisinde yer alır. Sitoplazmadabulunan bu proteinler hücre zarından çekirdeğe bilgi aktarılmasında önem taşımaktadır. Bu sitoplazmik proteinler hücre içindeki diğer proteinlerin, serin (Ser)/treonin (Thr) amino asitlerine fosfat gruplarını aktararak etkinliklerini düzenleyebilirler. MAPK ailesi; gen ekspresyonu, hücre bölünmesi, apoptoz, metabolizma, farklılaşma ile ilişkili süreçlerin kontrolündeki sinyal iletimi yollarını oluştururlar (Obara vd. 2010) (Şekil 2.5.1) (Şekil 2.5.2)



tümörlerle ve büyüme faktörleri ile indüklenebilen bir enzimdir (Khan vd., 2007; Queiroga vd., 2007). NSAID'lar NF-KB'nin etkinliğini engelleyerek, proinflatuar sitokinler, iNOS ve COX oluşumunu engeller (Meduri, 1999; Ahmetvd., 2009).

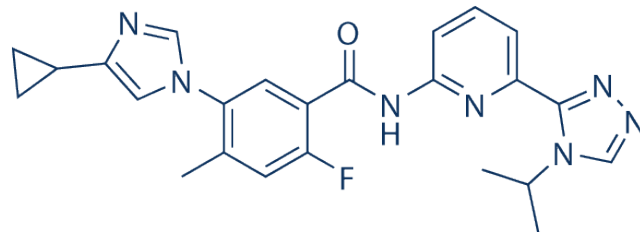
2.4.1. Diklofenak Sodyum



Şekil 2.4.1.1:Diklofenak Sodyum'nun Kimyasal Yapısı(<http> 9)

Bir fenil asetik asit türevi nonsteroid antiinflatuarilaç olan diklofenak, yapısal ve farmakolojik olarak mefenamik asit ve meklofenamat sodyuma benzer (Şekil 2.4.1.1). Diklofenak'ın analjezik potensi indometazin, sulindak veya kodein kadarken, aspirin ve naproksenden 5-15 kat fazladır. Diklofenağın ürikozürük aktivitesi yoktur (Hannah vd., 2015)

2.4.2. Selonsertib (GS4997)



Şekil 2.4.2.1:Selonsertib (GS-4997)'in Kimyasal Yapısı(<http> 10)

Selonsertib (GS-4997) ($C_{24}H_{24}FN_7O$), ASK-1 inhibitörü olan potansiyel bir anti inflamatuvar, antineoplastik ve antifibrotik aktiviteleri olan bir inhibitördür. Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1'in (ASK-1) oral biyoyararlanımı inhibitörüdür (Şekil 2.4.2.1). ASK-1'in katalitik kinaz alanına hedefler bağlanır, böylece fosforilasyonunu ve aktivasyonunu önler. Bu, c-Jun N-terminal kinazlar (JNK'ler) ve p38 mitojenle aktive olan protein kinaz (p38 MAPK) gibi aşağı akım kinazların fosforilasyonunu önler. ASK-1 bağımlı sinyal transdüksiyon yollarının aktivasyonunu önleyerek, Selonsertib inflamatuvar sitokinlerin üretimini önler, fibroziste yer alan genlerin ekspresyonunu aşağı regüle eder, aşırı apoptozu bastırır ve hücrel proliferasyonu inhibe eder (http 8). Ayrıca mitojen ile aktive olan protein kinaz 5 (MAP3K5) olarak da adlandırılan ASK-1, oksidatif ve endoplazmik retikulum (ER) stresi, kalsiyum akışı ve enfeksiyona yanıt olarak aktive edilir. Belli bazı kanser türlerinin yanı sıra bazı kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıkların, diyabetin gelişiminde önemli bir rol oynar (http 8).

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Hücreler

İnsan Monosit Hücre Hattı (THP-1) ATCC (American Tissue Culture Collection) (ATCC kodu: TIB-202).

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler, İlaç Etkin Maddeleri ve Laboratuvar Gereçleri

Lipopolysaccarides from *S.enteridis* serotype enteritidis (L4774 10MG-Sigma, Almanya).

Lipopolysaccarides from *P.aeruginosa*10 (L9143 10MG-Sigma, Almanya).

Lipopolysaccarides from *E.coli* 0111:B4 (L4391 1MG-Sigma, Almanya).

Diklofenak Sodyum (MA=318.129 g/mol, DFS/16090267-Anti Drugs Ltd., Hindistan).

Selonsertib (GS-4997) (MA= 445.49 g/mol, Catalog No.S8292-Sellechem, ABD).

Penisilin/Streptomisin (Biological Industries, İsrail).

Tripan mavisi (Roche, Almanya).

Tripsin-EDTA 10X (Pan, Biotch, Almanya).

WST-1 sitotoksosite kiti (25 ml) Cat no:11644807001 (Roche, Almanya).

cDNASentez Kiti (Katolog no:05091284001, Roche, Almanya)

Phosphate Buffer Salina (PBS) (İnvitrogen, ABD).

RPMI-1640 medyum (1X) (HyClone, Thermo Scientific, ABD).

Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Almanya).

İnterlökin 1- β Antibody (Biolegend, ABD).

Amfoterisin B (Biological Industries, İsrail).

Dimetilsülfoksit (DMSO) (Roth, Almanya).

0,2 ml'lik PZR tüpü (Greiner bio-one, ABD).

10, 100, 1000 ve 5000 µl'lik otomatik pipetör (Nichipet EX, Japan).

10, 200, 1000 µl'lik mikropipet ucu (İsolab, Almanya).

12 kanallı otomatik pipet (Eppendorf, Kanada).

15 ve 50 ml'lik santrifüj tüpleri (Isolab, Almanya).

25 cm²-75 cm²'lik hücre kültür flaskı (Nest, China).

2ml'lik Ependorf tüp (Greiner bio-one, ABD).

5-10 ve 25 ml'lik serolojik pipet (Nest, China).

6 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakası (SPL, Korean).

Cedex smart Slide (Roche, Almanya).

Kryotüp (2ml) (Cryo.s, Türkiye)

Lamel (Isolab, Almanya),

Parafilm (Pechiney, Fransa),

Şarjlı pipetör (Starlab, Almanya),

3.2. Kullanılan Cihazlar

Cedex (Innovatis, ABD),

Derin dondurucu buzdolabı (Liebherr, Almanya),

DNA-RNA çalışma kabini HEPA/UV PZR (UVP, Türkiye),

Akış sitometri cihazı (BD Accuri C6, ABD),

Hassas terazi (Sartorius, Almanya),

İnverted mikroskop (Leica, Almanya),

Laminar Flow kabin (Scanlaf, Danimarka),

Light Cycler 480® (Roche, İsviçre),

Masaüstü soğutmalı santrifüj (Hettich, Almanya),
Mikro santrifüj (Hettich, Almanya),
Mikroplaka okuyucu (ELISA) (BioTek, Belçika),
NanoDrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD),
Otoklav (Alp, Türkiye),
Otomatik pipetler (Nichipet EX, Japonya),
PZR Thermal Cyclers (Gradient PZR) (Takara, Japonya),
Steril CO₂ inkübatörü (Thermo Scientific, ABD),
Su banyosu (Lab Companion, Kore),

4.YÖNTEMLER

4.1. Deneylerde Kullanılan Hücreler

Çalışmamızda kullanılan hücre hattı: İnsan Monosit Hücre Hattı olan THP-1 hücre hattıdır.

4.2. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması

4.2.1. Kullanılan malzemelerin steril edilmesi

Çalışmalarda kullanılan cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılıolarak sterilizatörde 180°C’de 2 saat, sıvı solüsyonlar ise otoklavda 121°C, 1.5atm/Hg’de 20 dakika steril edilmiştir. Kullanılan tüm sıvı kimyasallar selüloznitrat filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

4.2.2. Kullanılan kimyasal maddelerin hazırlanması

4.2.2.1. *Diklofenak sodyum*

Toz halindeki Diklofenak Sodyum, 3.18 mg tartılarak 100 µl steril distile su içinde çözülerek 100 mM konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Bu stok solüsyondan, kültür medyumunda çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak, 1.56,3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 µM konsantrasyonları hazırlanmıştır. Diklofenak Sodyum’dan hazırlanan ana stok, alikotlanarak -20°C’de saklanmıştır. Deneyde kullanılan Diklofenak Sodyum konsantrasyonları da her deney tekrarında taze hazırlanarak kullanılmıştır.

4.2.2.2. *Selonsertib (GS-4997)*

Toz halindeki Selonsertib (GS-4997), 4.45 mg tartılarak 100 µl dimetilsülfoksit (DMSO; Roth) içinde çözülerek 100 mM konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Bu stok solüsyondan, kültür medyumunda çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak, 1.56,3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 µM konsantrasyonları hazırlanmıştır. En yüksek Selonsertib konsantrasyonunda DMSO oranı %0.1 oranında olduğu için kontrol grubuna da medyum içinde %0.1 oranında DMSO uygulanmıştır. Selonsertib’ten hazırlanan ana stok, alikotlanarak -20°C’de saklanmıştır. Deneyde kullanılan Selonsertib konsantrasyonları da her deney tekrarında taze hazırlanarak kullanılmıştır.

4.2.3. Kullanılan LPS'lerin hazırlanması

4.2.3.1. LPS *S.enteridis* serotype

10 mg LPS *S.enteridis* şişesi ve 1 ml steril distile suda çözündürülüp, 0,22 µl'lik milipor filtreden geçirilerek 10 tane vial 100'er µl alikotlanarak deneye hazır hale getirilmiştir.

4.2.3.2. LPS *P.aeruginosa* 10

10 mg LPS *P.aeruginosa* şişesi 0,22 µl'lik filtreden geçirilerek 1 ml steril distile suda çözöldü ve 10 tane PZR tüpüne 100'er µl alikotlanarak deneye hazır hale getirilmiştir.

4.2.3.3. LPS *E.coli* 0111:B4

1 mg LPS *E.coli* şişesi 2000 µl steril distile suda çözöldü. Ve 100'er µl'lik PZR tüplerine alikotlandı.

4.2.4. Hücre kültürü çalışmaları

4.2.4.1. THP-1 hücresinin kültür ortamında çoğaltılması ve deneylere hazırlık

THP-1 hücresi %1 Amfoterisin B, %10 fetal bovine serum, %1 Penisillin-Streptomisin (10000 ünite/ml-10 mg/ml), içeren RPMI-1640 besiyerinde, %5 CO₂'li inkübatörde, %95 bağıl nem'de 37 °C'de süspansiyon kültür ortamında çoğaltıldı. Kültür kabı %70 oranında hücre yoğunluğuna sahip olduğı zaman (yaklaşık 2-3 gün) alt kültürlerle ayrılarak büyümesi sağlanmıştır. Çoğaltılan hücrelerin bir kısmı -80 °C'de dondurularak çalışmanın sonraki deneyleri için stoklanmıştır.

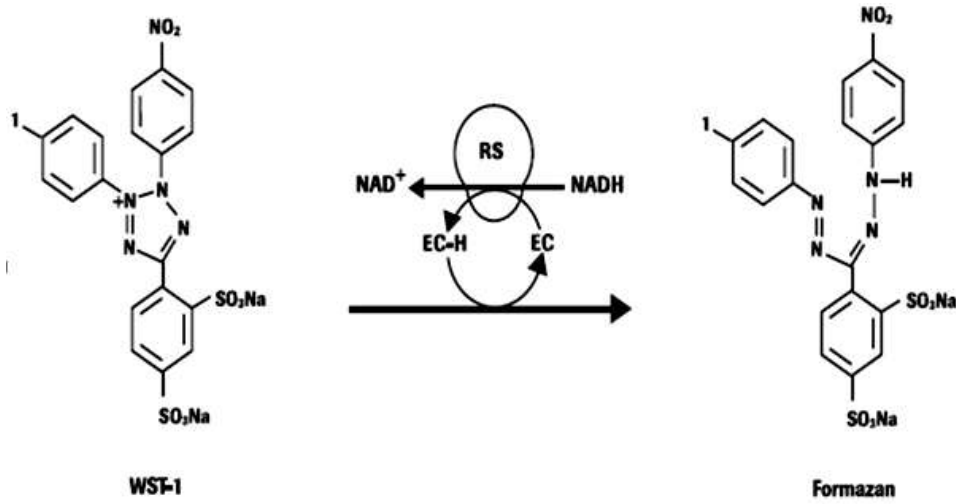
4.2.4.2. Hücre sayımları

Flasklarda bulunan THP-1 hücreleri santrifüj tüpüne aktararak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökölüp üzerine 1 ml yeni besiyeri eklenmiştir ve pipetaj işlemi yapılmıştır. Pipetaj ile hücrelerin besiyerine homojen olarak dağılımı sağlanmıştır. Hücreler Cedex-Roche cihazında Tripan Blue boyası ile boyanarak sayımı gerçekleştirilmiş ve bu aşamadan sonraki deneylere hazır duruma getirilmiştir.

4.2.4.3. WST-1 yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi

THP-1 hücresi süspanse bir hücre olması nedeniyle sitotoksite testinde WST-1 boyası kullanılmıştır. WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzenedisulfonate), bir tetrazolyum tuzu olup, canlı hücrelerin mitokondrilerinde süksinat-dehidrogenaz enzimine spesifik olarak bağlanır ve suda çözünmeyen formazan tuzlarına dönüşür (Şekil 4.2.4.3.1). Bu dönüşüm canlı hücrelerde nikotinamid

adeninin nükleotit fosfatın glikolitik üretimine bağlıdır. Bu nedenle oluşan formazan miktarı direkt olarak kültürde metabolik olarak aktif hücreleri (canlı hücreleri) göstermektedir. WST-1 yönteminde spektrofotometrik olarak ölçülen absorptans değeri, kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerini gösterir ve bu değer de yaşayan hücre sayısı ile ilişkilidir. Proliferasyon arttıkça, formazan tuzu oluşumuna bağlı olarak absorptans değeri de artış gösterir (Koyanagi vd., 2016).



Şekil 4.2.4.3.1: WST-1 boyasının Kimyasal Yapısı (http 11)

4.2.4.3.1. Metodun uygulanması

THP-1 hücreleri %10'luk Fetal Bovine Serum ve %1 Penisilin-Streptomisin (10000 ünite/ml-10 mg/ml) içeren RPMI-1640 ortamında, 37 °C' de %5 CO₂ inkübatöründe kültüre edilmiştir. Hücreler yeterince çoğaldıktan sonra hücre sayımı yapılarak, 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta $5 \cdot 10^3$ hücre olacak şekilde besiyeri ortamında ekilmiştir. THP-1 hücreleri süspansiyon oldukları için konsantrasyonların verilmesi için 3-4 saat beklenmiştir.

DMSO'da çözülerek hazırlanmış olan Selonsertib (GS-4997) ve steril distile suda çözülerek hazırlanan Diklofenak Sodyum stok solüsyonundan hücre kültür besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılarak uygun Selonsertib ve Diklofenak Sodyum konsantrasyonları (1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 µM) hazırlanmıştır. 11. kuyucuğa taze olarak kültür besiyerinde hazırlanan Diklofenak Sodyum ve GS-4997 konsantrasyonları kimyasal kontrol grubu olarak

uygulanmıştır. Kontrol grubundaki hücelere de %0.1 oranında DMSO içeren besiyeri uygulanmıştır (Selonsertib için). Daha sonra plakalar 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda her bir 96'lık kuyucuktaki hüceler üzerine, WST-1 kit (Katalog no: ab155902) prosedürü talimatlarına göre 20 µL WST-1 reaktifi ilave edilerek, hüceler 3 saat inkübatörde inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda absorbanlar 420 nm dalga boyunda ELİSA okuyucu cihazında, her bir grupta 8 kuyucuk olacak şekilde okunarak IC50 değerleri Excel Programı ile hesaplanmıştır. Deneyler bir birinden bağımsız 3 tekrar olarak çalışılmıştır.

4.2.5. Flow Sitometride Örneklerin IL-1β Seviyelerinin Belirlenmesi

Flow sitometri, hücre veya partiküllerin akmakta olan bir akışkanın içindeyken karakteristiklerinin ölçülmesidir. Akış sitometrisi ile bir süspansiyon halindeki hücreye da partiküller, lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli fluorokromlar da olabilir. Böylece hücre ya da partikülün immün fenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir (Dunpy vd, 2004).

Flow sitometrilerin fluorosen olmayanları tam kan hücresi sayımları için klinik laboratuvarlarda kullanılır. Daha çok yönlü araştırmalar için fluorosen olanları kullanılır. Bunlara sitofluorometre denir. Flow sitometreler birçok biyolojik araştırma enstitüsünde ve tıp merkezlerinde bulunur. Bunlardan dünyada yaklaşık 7 bin tane vardır. Tıp merkezlerinde araştırmanın yanında tanı için de kullanılır. Ayrıca kanserli hücre tanısında ve AIDS hastalarının kanında CD4 lenfosit seviyesinin izlenmesinde de kullanılır (Laane vd. 2005).

4.2.5.1. Metodun uygulanması

THP-1 hüceleri %10'luk Fetal Bovine Serum ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren RPMI-1640 ortamında, 37 °C' de %5 CO₂ inkübatöründe kültüre edilmiştir. Hücelerin yeterince çoğalması beklendikten sonra hücre sayımı yapılarak hüceler 6 kuyucuklu plakalara her bir 1x10⁵ hücre olacak şekilde besiyeri ortamında ekilmiştir. Kuyucuklara taze olarak kültür besiyerinde hazırlanan Selonsertib ve Diklofenak Sodyum stoksolüsyonundan hücre kültür besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılarak WST-1 sonuçlarına göre belirlenen konsantrasyonlarda (Selonsertib için 120 µM, Diklofenak

Sodyum için 32 μ M) verilip, inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubu kuyucukta ise sadece taze besiyeri bulunan THP-1 hücreleri bulunmaktadır. Daha sonra plakalardan ilk dört kuyucuğu LPS stimülasyon analizi için 4 saatlik inkübasyona diğer kuyucuklar ise 24 saatlik analiz için inkübatöre bırakılmıştır.

Bırakılan süreler sonunda önce 4 saatlik inkübasyonda olan sadece LPS (bir kuyucuğa 100 ng *E.coli* LPS, bir kuyucuğa 10 ng *S.enteridis* LPS ve başka bir kuyucuğa ise 10 ng *P. aureoginosa* LPS verilmiştir) verilen hücrelerin analizi yapılmak üzere toplanıp iyice PBS yardımıyla yıkanmıştır. Hücreler 1200 rpm’da 5 dakika santrifüj edilmiştir. 2 kez soğuk PBS ile (ilk yıkamada 2000 μ L, ikinci yıkamada 1000 μ L) yıkanmıştır. 500 μ L cytofix/cytoperm ile 20 dakika boyunca buzda bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 1200 rpm de 5 dk santrifüje dilmiş vepellet 2 kez 500 μ L “perm wash” ile yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra hücre pelleti 50 μ l perm wash ile resüspanse edilerek üzerine 10 μ l IL-1 β antibody eklenmiş ve 30 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresisonunda her bir tüpe 1000 μ l perm wash ilave edilerek santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda pellet 350 μ l perm wash ile eppendorf tüpüne aktarılarak flowsitometri cihazında analiz edilmiştir.

4.2.6. Real Time (Gerçek Zamanlı)- PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemi

ile IL-1 β , TNF- α ve ASK-1 mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Polimeraz zincir reaksiyonu, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA’daki özgül bölgelerin çoğaltılması için kullanılan bir yöntemdir ve bunun için sadece DNA örnekleri kullanılmaktadır. Ancak, hücrelerden elde edilen RNA’lar, polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılamadıklarından, önce revers transkriptaz ile komplementer DNA’ya (cDNA) çevrilirler. Bu olaya “reverstranskripsiyon” denir (Bustin, 2000).

TaqMan sisteminde 5’ ve 3’ uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Prob’un 5’ ucunda raportör florokrom, 3’ ucunda ise “quencher (baskılayan)” florokrom bulunmaktadır. Şekil 4.2.6.1’de de belirtildiği gibi prob, tek zincir haldeki hedef moleküle, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanmaktadır. Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom molekülünün sinyal oluşturması, 3’ uçtaki quencher florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasından sonra başlatılan primer uzaması prob’un bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam

4.2.6.2.Total RNA izolasyonu

WST-1 deney sonuçları göze alınarak, IC50 değerleri konsantrasyonlarına paralel olarak LPS verilen THP-1 hücrelerinin total RNA izolasyonu Roche mRNA sentez kiti yardımıyla yapılmıştır. RNA verimi 260 nm ve 280 nm optik dansitede, nanodrop spektrofotometrik ölçüm yapılarak belirlenmiştir. Daha sonra cDNA sentezi için her bir örnekten eşit miktarda RNA (100 ng/örnek) taşınmıştır.

4.2.6.3.cDNA sentezi

cDNA sentezi için Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit prosedürü uygulanmıştır. PZR tüplerine örnek başına 100 ng total RNA, 1 µl Oligo (dT) 18 primeri (2.5 µM) koyularak toplam hacim 11.4 µl'ye distile su ile tamamlanmıştır. Tüpler PZR Thermal Cycler'da 10 dakika 65°C'de denature edilmiştir. Tüplerin içeriğine, 4 µl Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer (1X ve 8 mM MgCl₂ içerir), 0.5 µl RNase inhibitörü (20 U), 2 µl dNTP karışımı (her biri 10mM), 1 µl DTT (5mM), 1.1 µl Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase (10U) ilave edilerek toplam hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır. Daha sonra tüpler PZR Thermal Cycler'da 55°C'de 30 dk, 85 °C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Elde edilen cDNA'lar, Light Cycler 480 PZR cihazında amplifikasyon için kullanılmıştır.

4.2.6.4.RT-PZR (Real time PZR) ile mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi

RT-PZR ile THP-1 hücre hattı üzerine IC50 konsantrasyonu düzeyinde Diklofenak Sodyum ve Selonsertib konsantrasyonları verilip, IL-1β, TNF-α ve ASK-1 genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerine olan etkileri araştırılmıştır. RT-PZR yöntemi, cihaza uygun kit ve primerler kullanılarak uygulanmıştır. Elde edilen cDNA'lar, LightCycler 480 RT-PZR cihazında, IL-1β, TNF-α ve ASK-1 genine spesifik TaqMan'lı primerler ve PZR kit kullanılarak kit protokolüne göre, cihazda optimize edilerek çoğaltılmıştır. House keeping gen olarak Aktin-β geni kullanılmıştır.

Kullanılan primerler sırasıyla;

1. IL-1β Primeri
2. TNF-α Primeri
3. ASK-1 Primeri
4. Aktin-β Primeri

Light Cycler PZR 480 uyumlu 96'lık well plate'lere sırasıyla;

1. H₂O = 5 µl
2. Prob Master = 10 µl
3. Primer Forward = 0,5 µl
4. Primer Reverse = 0,5 µl kimyasalları yüklendi.

Hazırlanan bu karışım 96'lık plakaya IL-1 β , TNF- α , ASK-1 ve Actin- β genleri için ayrı ayrı yüklenmiştir. Yükleme işleminden sonra 96'lık plaka Light Cyclers 480 RT-PZR cihazına yerleştirilip örneklerin niceliksel ölçüm miktarları belirlenmiştir. Sonuçlar 'Advanced Relative Quantification' programı (Software Release 1.5.0 SP4 version 1.5.0.39) kullanılarak, üç farklı LPS verilen THP-1 hücrelerinde Diklofenak Sodyum ve Selonsertib'in belirlenen genler üzerindeki ekspresyon etkileri karşılaştırılmıştır.

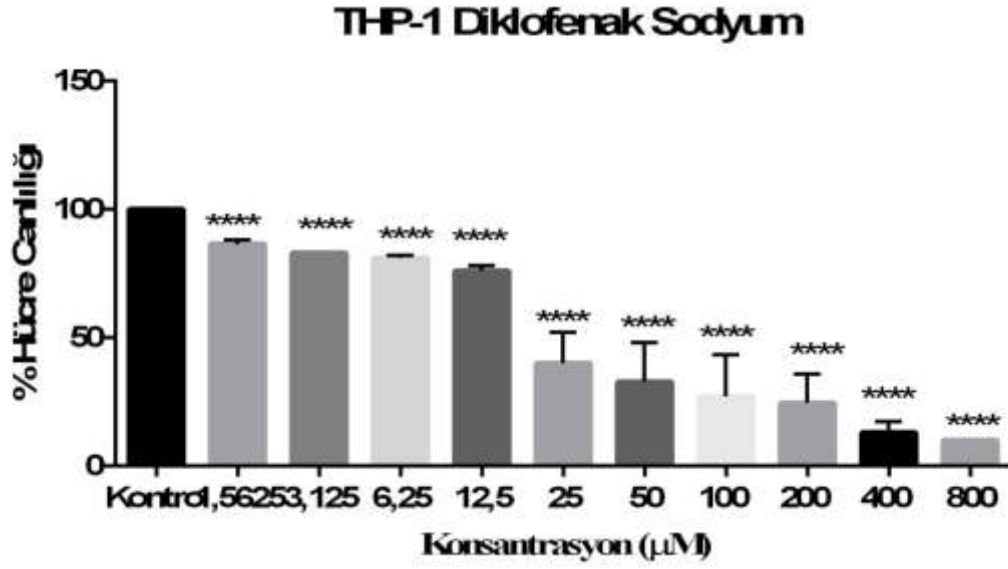
5. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1. Diklofenak Sodyum ve Selonsertib'in THP-1 Hücresinde SitotoksikEtkilerinin WST-1 Yöntemi ile Değerlendirilmesi

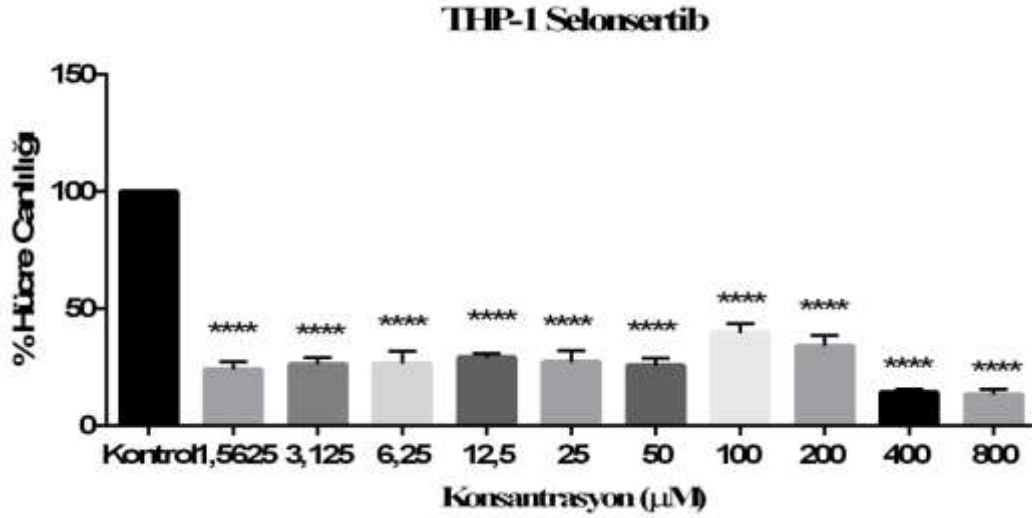
Diklofenak Sodyum ve Selonsertib'in IC50 konsantrasyonunu belirleyebilmek için öncelikle THP-1 hücrelerinin 96'lık kültür plakalarına her kuyucukta 5×10^3 hücre olacak şekilde ekimi yapılmıştır. THP-1 hücresi süspanse hücre hattı olduğundan dolayı ilaçlar aynı gün içinde verilmiştir. Ekim sonunda Diklofenak Sodyum ve Selonsertib için belirlenen konsantrasyonlar, 1,56-800 μM arasındadır. Verilen bu konsantrasyonlar sonunda plakalar 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda Diklofenak Sodyum ve Selonsertib'in THP-1 hücrelerinde IC50 konsantrasyonunu belirleyebilmek için WST-1 boyası verilerek (20 μl) 3 saatlik inkübasyona bırakıldı. 1,56-800 μM ve kontrol, DMSO konsantrasyonları 420 nm dalga boyunda ELISA cihazında okunmuştur. Çıkan değerler Microsoft Office Excel programına aktarılıp ilaçların en etkili olduğu konsantrasyonları bulabilmek için GraphPad Software programı yardımıyla ihtiyaç duyulacak IC50 düzeyi hesaplanmıştır.

Diklofenak Sodyum ve Selonsertib'in WST-1 yöntemiyle belirlenen toksik olmayan inhibitör konsantrasyonları yani IC50 değerleri 3 ayrı zamanda 3'er tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır (Şekil 5.1.1) (Şekil 5.1.2).

Deney sonucunda IC50 konsantrasyonları belirlenen Diklofenak Sodyum'un inhibisyon konsantrasyonu 32 $\mu\text{M}/\text{ml}$; Selonsertib'in inhibisyon konsantrasyonu 120 $\mu\text{M}/\text{ml}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.1.1: Diklofenak Sodyum Konsantrasyonlarının, THP-1 Hücre Hattında WST-1 Yöntemine Göre Hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ($p \leq 0,0001$, $n=8$)



Şekil 5.1.2: Selonsertib Konsantrasyonlarının, THP-1 Hücre Hattında WST-1 Yöntemine Göre Hesaplanan 24. Saatteki % Canlılık Değerleri ($p \leq 0,0001$, $n=8$)

Diklofenak Sodyum'un pozitif kontrol olarak kullanıldığı, Sima ve arkadaşlar tarafından yapılan bir çalışmada inhibisyon konsantrasyonu 47,04 µM/mL olarak hesaplanmıştır (Sima vd.2014).

THP-1 hücrelerinin ko-kültür olarak kullanıldığı bir çalışmada Diklofenak Sodyum ve çeşitli ilaçlar verilerek oluşturulan bir deney modelinde WST-1 yöntemi ile sitotoksisite deneyi uygulanmıştır. Bu deney sonucunda Diklofenak Sodyum için belirlenen konsantrasyon 125 µM olarak belirlenmiştir (Anne vd., 2017).

İnsan baş ve boyun skuamöz karsinoma hücre hatları kullanılan bir başka deneyde Diklofenak Sodyum'un çeşitli konsantrasyonlar verilerek WST-1 yöntemi ile canlılık düzeyleri belirlenmiştir. Diklofenak Sodyum için belirlenen konsantrasyonlar, 0.87–224 µg/ arasındadır. 38 µg/mL konsantrasyonu belirlenen IC50 düzeyini oluşturmakla birlikte en düşük doz olan 2.7 µM Diklofenak Sodyum, kullanılan hücre hattının çoğalmasına da sebep olmuştur (Olga vd., 2016).

Diklofenak Sodyum'un prostat kanseri üzerine anti-kanser etkisinin araştırılması için yapılan bir çalışmada sitotoksikite deneyleri yapılmıştır. Diklofenak Sodyum için belirlenen konsantrasyonlar, 0-1000 µM arasında belirlenen aralıktadır. Diklofenak Sodyum'un IC50 dozları, iki farklı inhibitör kullanılarak (LNCaP-Neo ve LNCaP-COX-2) sırasıyla 42.2 µM ve 91.6 µM olarak hesaplanmıştır (Satoshi vd., 2013).

Diklofenak Sodyum'un tendon hücreleri üzerinde poliferasyonunun araştırıldığı bir çalışmada ise Diklofenak Sodyum IC50 konsantrasyonu 6.7 µM dolaylarında kullanılmıştır (Maritha vd., 2013).

ASK-1 inhibitörü olan Selonsertib'in literatür taraması sonucu WST-1 yöntemi ile sitotoksikite deneyi bulgularına rastlanmamakla birlikte Selonsertib'in daha çok nan-alkolik etkisi üzerine durulmuştur.

5.2. Diklofenak Sodyum ve Selonsertib'in Farklı Mikrobiyal Kaynaklı Lipopolisakkaritlerle Uyarılmış THP-1 Hücrelerinde İmmün Yanıtlarının Akış Sitometri Yöntemi ile Değerlendirilmesi

3 farklı deney grubu kurulmuştur. 6 kuyucuklu plakalara 1×10^5 THP-1 hücresi ekilmiştir.

1. grup; Kontrol grubu, yalnızca *E.coli* LPS (100 ng/mL), *P.aeruginosa* LPS (10ng/mL) ve *S.enteridis* LPS (10ng/mL) verilmiştir. 4 saat etüvde inkübe edilmiştir. IL-1β seviyeleri flow sitometride ölçülmüştür (Şekil 5.2.1).

2. grup; 6'lı plakada bulunan THP-1 hücreleri ise; öncelikle *E.coli* LPS, *P.aeruginosa* LPS ve *S.enteridis* LPS 4 saat stimüle edilmiştir. Daha sonra Diklofenak Sodyum IC50 konsantrasyonunda (32 µM) uygulanmış ve IL-1β seviyeleri flow sitometride ölçülmüştür (Şekil 5.2.1) (Tablo 5.2.1).

3. grup; 6'lı plakada bulunan THP-1 hücreleri ise; öncelikle *E.coli* LPS, *P.aeruginosa* LPS ve *S.enteridis* LPS 4 saat stimüle edilmiştir. Daha sonra Selonsertib IC50 konsantrasyonunda (120 µM) uygulanmış ve IL-1β seviyeleri flow sitometride ölçülmüştür (Şekil 5.2.2) (Tablo 5.2.2).

Tablo 5.2.1: Diklofenak Sodyum IL-1 β Sonuçları

	IL-1 β (-) %	IL-1 β (+) %
<i>E.coli</i> LPS	59,5	36,7
<i>E.coli</i> Diklofenak Sodyum	73,6	12,1
<i>P.aeruginosa</i> LPS	57,4	38,3
<i>P.aeruginosa</i> Diklofenak Sodyum	88,0	5,6
<i>S. enteridis</i> LPS	61,8	34,8
<i>S. enteridis</i> Diklofenak Sodyum	83,2	7,1

THP-1 hücreleri 100 ng/mL *E.coli* LPS ile uyarıldıktan sonra IL-1 β %36.7 olarak bulunmuş, Diklofenak Sodyum uygulanmasından sonra ise bu değerin %12.1'e düştüğü görülmüştür. 10 ng/mL *P.aeruginosa* LPS ile uyarılan THP-1 hücrelerinde IL-1 β %38,3 iken, Diklofenak Sodyum uygulanmasından sonra %5.6 bulunmuştur. Yine aynı metodla 10 ng/mL *S.enteridis* LPS ile stimüle edilen THP-1 hücrelerinde IL-1 β %34.8 iken, Diklofenak Sodyum uygulamasından sonra ise; %7.1'e gerilediği flow sitometride tespit edilmiştir. Oransal bir değerlendirme yapıldığında; Diklofenak Sodyum *E.coli* LPS uygulamasından sonra yaklaşık 3.1 kat, *P. aeruginosa* LPS uygulamasından sonra 6.8 kat ve *S.enteridis* LPS uygulamasından sonra ise; 4.9 kat IL-1 β seviyesi üzerinde bir inhibisyon sağlamıştır. Elde edilen bulgulara göre; *P.aeruginosa* kaynaklı stimülasyonda Diklofenak Sodyumun daha etkili olduğu bulunmuştur.

Tablo 5.2.2: Selonsertib IL-1 β Sonuçları

	IL-1 β (-) %	IL-1 β (+) %
<i>E.coli</i> LPS	59,5	36,7
<i>E.coli</i> Selonsertib	73,0	1,7
<i>P.aeruginosa</i> LPS	57,4	38,3
<i>P.aeruginosa</i> Selonsertib	68,0	1,2
<i>S. enteridis</i> LPS	61,8	34,8
<i>S. enteridis</i> Selonsertib	65,1	2,0

THP-1 hücreleri 100 ng/mL *E.coli* LPS uyarıldıktan sonra IL-1 β %36,7 olarak bulunmuş, Selonsertib uygulamasından sonra ise bu değer 1.7'e düştüğü görülmüştür. 10 ng/mL *P.aeruginosa* LPS le uyarılan THP-1 hücrelerinde IL-1 β %38,3 iken, Selonsertib uygulamasından sonra 1.2 bulunmuştur. Yine aynı metodla 10 ng/mL *S.enteridis* LPS ile stimüle edilen THP-1 hücrelerinde IL-1 β %34,8 iken, Selonsertib uygulamasından sonra ise; %2,0 olarak flow sitometride tespit edilmiştir. Oransal olarak değerlendirildiğinde; Selonsertib *E.coli* LPS uygulamasından sonra yaklaşık 21.5 kat, *P.aeruginosa* LPS uygulandıktan sonra sonra 31.9 kat ve *S.enteridis* LPS

uygulamasından sonra ise 16.5 kat IL-1 β seviyesi üzerinde bir inhibisyon sağlanmıştır. Ve bu bulgulara göre; *P.aeruginosa* kaynaklı stimülasyonda Selonsertib'in daha etkili olduğu bulunmuştur. Ancak Diklofenak Sodyum'a göre; Selonsertib IL-1 β üzerinde daha önemli bir inhibisyon sağlamıştır.

E.coli LPS kullanılarak stimülasyon sağlanan dentritik hücrelerde Diklofenak Sodyum'un kullanıldığı flow sitometri analizi sonrası IL-1 β ve TNF- α düzeylerinde oldukça önemli bir azalma gözlenmiştir (Suzhao vd. 2015)

Bir başka çalışmada ise, LPS ile stimüle edilip başka bir anti inflamatuvar ajana maruz bırakılan yetişkin monosit hücrelerin flow sitometri analizi sonrasında, TNF- α ifadesinde azalmalar meydana gelirken, IL-1 β seviyesi hiçbir anlamlı değişme olmamıştır (Kirsten vd. 2016).

Amy vd.'nin yaptığı bir çalışmada serviks kanseri üzerine ve farklı inflamatuvar ilaçlar kullanılarak sitokinlerin seviyeleri flow sitometride ölçülmüştür. Ve IL-1 β seviyesinde azalma meydana gelmiştir (Amy vd. 2015).

LPS enjekte edilerek endotoksemi oluşturulmuş ratlarda Diklofenak Sodyum'un antiinflamatuvar etkinliği ile ilgili bir çalışmada, Diklofenak Sodyum'un gastrointestinal toksisiteyi, günlük dozlarda uygulanarak 3 gün boyunca engellediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada, Diklofenak Sodyum'un LPS uygulaması sonrası TNF- α artışını engellediği, serum IL-10 konsantrasyonunu potansiyalize ettiği, iNOS enzim aktivitesini ve plazma IL-1 β düzeyini azalttığı bildirilmiştir (Li vd., 2007).

Doğan vd.'nin yaptığı çalışmada nimesulid ve Diklofenak Sodyum'un ratlarda TNF- α artışını engellediği belirtilmiştir (Doğan vd., 2002).

Bu ve bunun gibi makaleler çalışmamızı desteklemiştir ve IL-1 β 'nin azalmasını açıklamıştır.

5.3. Real Time PZR ile mRNA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

mRNA izolasyonu için, Diklofenak Sodyum ve Selonsertib'in inhibisyon konsantrasyonları verilen LPS'ler sonrası THP-1 hücrelerine uygulanmıştır. Ve hücreler sadece LPS verilen THP-1 hücreleri dışında 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. 4 saatlik stimülasyon sonrası THP-1 hücrelerine verilen 3 farklı LPS'nin RNA izolasyonu yapılmıştır. Her bir RNA örneğinin saflığı ve miktarı nanodrop cihazında belirlenmiş ve

cDNA sentezi için 100 ngRNA kullanılmıştır. Elde edilen cDNA'ların Light Cycler 480 de PZR analizleriyapılmıştır.

Tablo 5.3.1: RT-PZR mRNA Ekspresyon Sonuçları

	TNF-α	IL-1β	ASK-1	AKTİN-β
THP-1 Kontrol	1,000	1,000	1,000	Referans Gen
<i>E.coli</i> LPS	4,916	71,26	3,496	Referans Gen
<i>P.aeruginosa</i> LPS	2,220	5,492	0,835	Referans Gen
<i>S.enteridis</i> LPS	3,398	26,60	0,557	Referans Gen
<i>E.coli</i> LPS+Diklofenak Sodyum	1,600	148,3	-7,47	Referans Gen
<i>P.aeruginosa</i> LPS+Diklofenak Sodyum	0,175	2,402	0,260	Referans Gen
<i>S.enteridis</i>LPS+Diklofenak Sodyum	0,652	90,97	0,264	Referans Gen
<i>E.coli</i> LPS+Selonsertib	4,364	257,1	0,493	Referans Gen
<i>P.aeruginosa</i> LPS+Selonsertib	1,605	38,94	0,111	Referans Gen
<i>S.enteridis</i> LPS+Selonsertib	2,061	195,7	1,985	Referans Gen

5.3.1. TNF- α Sonuçlarının Değerlendirilmesi

RT-PZR sonuçlarına göre; 4 saatlik LPS uyarısı sonucu kontrole göre sırasıyla; *E.coli* LPS verilen THP-1 hücrelerinde TNF- α 'nın gen ekspresyon seviyesinde 4.9 kat, *P.aeruginosa* LPS' de 2.2 kat ve *S.enteridis* LPS uyarımında sonra ise; 3.3 kat artış görülmüştür. (Tablo 5.3.1) (Şekil 5.3.1).

24 saatlik Diklofenak Sodyum ile inkübasyondan sonra ise TNF- α ; *E.coli* LPS verilen THP-1 hücrelerinde TNF- α 'nın gen ekspresyon seviyesi *E.coli* LPS kontrole göre 3 kat, *P. aeruginosa* LPS kontrole göre 12.9 kat ve *S.enteridis* LPS kontrolüne göre 5.5 kat azalmıştır (Tablo 5.3.1) (Şekil 5.3.1).

24 saatlik Selonsertib ile inkübasyondan sonra ise TNF- α ; *E.coli* LPS verilen THP-1 hücrelerinde TNF- α 'nın gen ekspresyon seviyesi *E.coli* LPS kontrole göre 1.1 kat, *P. aeruginosa* LPS kontrole göre 1.3 kat ve *S.enteridis* LPS kontrolüne göre 1.6 kat azalmıştır (Tablo 5.3.1) (Şekil 5.3.1).

mRNA seviyeleri açısından değerlendirildiğinde; Diklofenak Sodyum'un, Selonsertib'e göre TNF- α gen ekspresyonu açısından daha iyi inhibisyon yaptığı bulunmuştur (Şekil 5.3.2).

mRNA seviyeleri LPS'lerin kendi aralarındaki değerlendirmeleri sonucunda TNF- α gen düzeyinde, *P. aeruginosa* LPS ve Diklofenak Sodyum uygulaması ile 12 kat azaldığı, ve diğer gruplara göre daha iyi bir inhibisyon yaptığı görülmüştür.

5.3.2. IL-1 β Sonuçlarının Değerlendirilmesi

RT-PZR sonuçlarına göre; 4 saatlik LPS stimölasyonu sonucu kontrole göre sırasıyla; *E.coli* LPS verilen THP-1 hücrelerinde IL-1 β 'nın gen ekspresyon seviyesinde 71.2 kat, *P.aeroginosa* LPS'de 5.4 kat ve *S.enteridis* LPS stimölasyonu sonrasında ise; 26.6 kat artış görölmüştür (Tablo 5.3.1) (Şekil 5.3.2.1).

24 saatlik Diklofenak Sodyum ile inkübasyondan sonra ise IL-1 β ; *E.coli* LPS verilen THP-1 hücrelerinde IL-1 β 'nın gen ekspresyon seviyesi 2.08 kat artmıştır. *P.aeroginosa* LPS kontrole göre 2.28 kat azalmış ve *S.enteridis* LPS kontrole göre 3.41 kat artmıştır.

24 saatlik Selonsertib ile inkübasyondan sonra ise IL-1 β ; *E.coli* LPS verilen THP-1 hücrelerinde IL-1 β 'nın gen ekspresyon seviyesi 3.6 kat artmıştır. *P.aeroginosa* LPS kontrole göre 7 kat ve *S.enteridis* LPS kontrole göre 7.3 kat artmıştır (Tablo 5.3.1) (Şekil 5.3.2.1).

mRNA seviyeleri açısından değerlendirildiğinde; Diklofenak Sodyum'un, Selonsertib'e göre IL-1 β gen ekspresyonu açısından daha iyi inhibisyon yaptığı bulunmuştur. Selonsertib'in ise Diklofenak Sodyum gibi antiinflamatuvar bir etki yerine, proinflamatuvar bir etki yaptığı gözlenmiştir.

mRNA seviyeleri LPS'lerin kendi aralarındaki değerlendirmeleri sonucunda IL-1 β gen düzeyinde, *P. aeroginosa* LPS ve Diklofenak Sodyum uygulaması ile 2,28 kat azaldığı, ve diğer gruplara göre daha iyi bir inhibisyon yaptığı görölmüştür (Şekil 5.3.2.2).

5.3.3. ASK-1 Sonuçlarının Değerlendirilmesi

RT-PZR sonuçlarına göre; 4 saatlik LPS stimülasyonu sonucu kontrole göre sırasıyla; *E.coli* LPS verilen THP-1 hücrelerinde ASK-1'in gen ekspresyon seviyesinde 3.4 kat, *P.aeruginosa* LPS'de 0.8 kat ve *S.enteridis* LPS stimülasyonu sonrasında ise; 0.5 kat artış görülmüştür (Tablo 5.3.1) (Şekil 5.3.3.1).

24 saatlik Diklofenak Sodyum ile inkübasyondan sonra ise ASK-1; *E.coli* LPS verilen THP-1 hücrelerinde ASK-1'in gen ekspresyon seviyesi 3.98 kat, *P.aeruginosa* LPS kontrole göre 3.21 kat ve *S.enteridis* LPS kontrole göre 2.14 kat azalmıştır.

24 saatlik Selonsertib ile inkübasyondan sonra ise ASK-1; *E.coli* LPS verilen THP-1 hücrelerinde ASK-1'in gen ekspresyon seviyesi 7.12 kat, *P.aeruginosa* LPS kontrole göre 7.5 kat azalmıştır. Ve *S.enteridis* LPS kontrole göre 0.28 kat artmıştır (Tablo 5.3.1) (Şekil 5.3.3.1).

mRNA seviyeleri LPS'lerin kendi aralarındaki değerlendirmeleri sonucunda ASK-1 gen düzeyinde, *P.aeruginosa* ve Selonsertib uygulaması ile diğer gruplara göre daha iyi bir inhibisyon yaptığı görülmüştür.

mRNA seviyeleri açısından değerlendirildiğinde; Selonsertib'in Diklofenak Sodyum'a göre ASK-1 gen ekspresyonu açısından daha iyi inhibisyon yaptığı bulunmuştur. Faz II ilaç araştırmalarında ASK-1 inhibitörü olarak kullanıldığı bildirilen Selonsertib'in, bizim deney bulgularımız tarafından da desteklendiği ortaya konmuştur (Şekil 5.3.3.2).

Jay vd. tarafından yapılan bir çalışmada Selonsertib yerine MEAI (Methanolic Extract of *Azadirachta indica*) kullanılan ve pozitif kontrol olarak Diklofenak Sodyum kullanılan çalışmada proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- α 'nın kullanılan diğer proinflamatuvar ajanlara göre gen düzeyinde daha fazla etkisi olduğu görülmüştür (Jayvd. 2017).

Ila ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise; farklı LPS'lerle uyarılmış THP-1 hücrelerinde IL-1 β ve TNF- α sitokin düzeylerinin arttırılmasında non-steroid ajanlar yerine saflaştırılmış peptit dizileri kullanılarak bu sitokinlerin arttığı bulunmuştur (Ilavd. 2016).

Bonattera ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada LPS ile uyarılmış THP-1 hücrelerinde STW (Proaktiv[®]) ajanının antiinflamatuvar etkilerin araştırılmış ve Diklofenak Sodyum'un da deneylerde kullanıldığı bu çalışmada STW'nin IL-1 ve TNF- α gibi sitokinleri uyardığı araştırılmıştır (Bonattera vd. 2010).

Kirsten vd.'nin yaptığı bir çalışmada farklı bir hücre hattının 100 ng *E.coli* LPS ile stimülasyonu sonucunda IL-1 β , TNF- α ve IL-8 mRNA ekspresyonu anlamlı bir düzeyde artmıştır (Kirsten vd., 2015).

Jozsef vd.'nin yaptığı bir çalışmada fibroblast hücreleri üzerinde yapılan çeşitli genlerin ifadesinin ölçüldüğü ko-kültür deneyinde IL-1 β , IL-6, COX-2 gibi genler kullanılmıştır. COX-2 ve IL-6 anlamlı bir ifade oluştururken IL-1 β upregüle olmuştur (Jozsefvd., 2011).

Bu tez kapsamında Diklofenak Sodyum'un önemli bir ASK-1 inhibitörü olarak görev aldığı ortaya konulmakta olup çalışmada anlaşılağı gibi IL-1 β bazı çalışmalarda upregüle olarak vücutta stimülasyona karşı sitokin üreterek mRNA düzeyinin artmasını sağlamıştır. Farklı mikrobiyal kaynaklı LPS uyarısına karşı, özellikle flow sitometride hücre içi sitokin olarak ölçülen IL-1 β seviyesinde Selonsertib'in önemli bir inhibisyon yaptığı görülmüştür. Ancak bu etki mRNA düzeyinde gen ekspresyon çalışmasında hedef gene göre bir oranlama yapıldığında görülmemiştir. Bunun nedeninin, hücre içi sitokinlerin gen düzeyinde yeterince fosforillenmemesinden kaynaklanan bir sonuç olduğu düşünülmektedir. ASK-1'in katalitik kinaz alanına hedefler bağlanır, böylece fosforilasyonunu ve aktivasyonunu önler. Bu, c-Jun N-terminal kinazlar (JNK'ler) ve

p38 mitojenle aktive olan protein kinaz (p38 MAPK) gibi aşağı akım kinazların fosforilasyonunu önler. ASK-1 inhibitörü olarak Faz II alışmaları sürdürülen Selonsertib'in, THP-1 hücreleriyle oluşturulan inflamasyon hücre kültürü modelinde proinflamatuvar/antiinflamatuvar etkilerinin araştırıldığı bu tez, literatüre farklı bir bakış açısı getirmiş ve önemli bir katkı sağlamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Selonsertib (GS-4997), faz II deney çalışmaları devam eden güçlü bir antiinflamatuvar, antinoplastik ve anti-fibrotik aktivitesi olan apoptoz sinyal düzenleyici kinaz olan ASK-1 inhibitörüdür. Bu çalışmada Selonsertib'in fenilasetik asit türevi, non steroid anti inflamatuvar bir ilaç olan Diklofenak Sodyum ile antiinflamatuvar etkilerinin insan monosit hücresi olan THP-1 hücre hattı üzerine etkileri karşılaştırılmıştır. Bu çalışma Selonsertib'in THP-1 hücrelerinde kullanılan çeşitli LPS'ler etkisiyle önce bir stimülasyon oluşturup daha sonra Selonsertib'in anti inflamatuvar etkisinin araştırılması açısından özgün bir değer taşımaktadır. Selonsertib'in özellikle NSAİD ilaçlarla kombin kullanımlarda önemli etkilerinin olabileceği, sadece ASK-1 inhibitörü olarak kullanımı yanısıra, farklı biyolojik aktiviteler açısından değerlendirilmesi gereken önemli bir ajan olduğunu bu tez çalışması kapsamında ortaya koyulmuştur. Selonsertib'in literatürdeki bilinen ve çalışılan etkilerine önemli bir katkı sağlayan bu tez, amacı ve bulguları doğrultusunda önemli sonuçlar elde etmiştir. *In vitro* deneylerle immün sistem üzerinde etkileri araştırılan Selonsertib'in *in vivo* deneylerle desteklenmesi önerilebilir.

KAYNAKÇA

- Anai S., Inoue T., Onishi S., Miyake M., Tanaka M., Hirayama A., Fujimoto K., Hirao Y. (2013). Inhibition of COX-2 expression by topical diclofenac enhanced radiation sensitivity via enhancement of TRAIL in human prostate adenocarcinoma xenograft model. *Inoue et al. BMC Urology*, 13:1.
- Anne G., Jan K., Meike M., Armin B., Pablo S., Clemens D., Tanja H. (2017). Evaluation of a human in vitro hepatocyte-NPC co-culture model for the prediction of idiosyncratic drug-induced liver injury: A pilot study. *Toxicology Reports*.89-103.
- Anuforom O., Wallace G.R., Piddock L.V. (2015). The immune response and antibacterial therapy. *Med. Microbiol Immunol*. 204(2):151-9.
- Anspach, F.B. (2001). Endotoxin removal by affinity sorbents. *J. Biochem. and Biophys. Met.*, 49:665-681.
- Ataca P., Arslan Ö. (2015). Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy in Hematology. *Turk J Haematol*. 32(4):285-94.
- Auer G.K. ve Weibel D.B. (2017). Bacterial Cell Mechanics. *Biochemistry*.3710-3724.
- Bağlan H.P. (2003). Bakteri ve Yapısı. *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*. 7/3.227-228.
- Bekar, M. ve Doğrul, F. (1988). *Salmonella*'ların B, C (C1,C2) ve d grubu bakterilerine özgün O Faktör hiperimmün serumlarının elde edilmesi ve bu serumlar yardımı ile ülkemiz hayvanlarında serogrup insidansının tesbiti üzerinde çalışma. *Etlik Vet. Mikrob. Derg.* 6 (3):79-86.
- Bekar, M., Ayaz, Y., Akman.,A., Yazıcıoğlu,N., Uyal, Y. Tekin, C., Ergün, A., İldeş, Z., Korkut, N., Miroğlu, M., Aslan, A. (1993). Tavuk mezbahalarının *Salmonella* yönünden taranması, *Etlik Vet. Mikrobiy. Derg.*,7 (4) : 1-23.
- Beveridge T.J., (2001). Use of the gram stain in microbiology. *Biotech Histochem*.76(3):111-8.

Bochud P.Y., Calandra T. (2003). Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *Brit Med J*, 326, 262-266.

Bonaterra G.A., Heinrich E.U., Kelber O., Weiser D., Metz J., Kinscherf R. (2010). Anti-inflammatory effects of the willow bark extract STW 33-I (Proaktiv®) in LPS-activated human monocytes and differentiated macrophages. *Phytomedicine*.1106–1113.

Blair H.A., Plosker G.L. (2015). Diclofenac Sodium Injection (Akis®, Dicloin®): A Review of Its Use in the Management of Pain. *Clinical Drug Investigation*.397-404.

Buer J.K. (2014). Origins and impact of the term 'NSAID'. *Inflammopharmacolog*. 22:263-7.

Bui, A. (2012). Structural characteristics of bacterial endotoxins. University of PECS. Doctoral School of Chemistry PECS / Denmark. Bustin, S.A., Absolute quantification of mRNA using real-time reverse. *Nova Biomedical*.13-14.

Brown L., Wolf J.M., Prados-Rosales R., Casadevall A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat. Rev. Microbiol*.13(10):620-30.

Broun V. (2014). Bacterial cell wall research in Tübingen: a brief historical account. *International Journal Medicine Microbiology*.305(2):178-82.

Calnek, B.W., John Barnes, H., Beard, C.W., Reid, W.M., Yoder, H.W. (1996). Diseases of Poultry, ninth Ed., third printed. *Iowa State University Press*, 72-137.

Caroff, M. Karibian, D. (2003). Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research*, 338: 2431-2447.

Chinen J, Finkelman F, Shearer WT. (2006). Advances in basic and clinical immunology. *J Allergy Clin Immunol*;118:489-95.

- Dahlin J.S., Hallgren J. (2015). Mast cell progenitors: origin, development and migration to tissues. *Mol Immunol.* 63(1):9-17.
- Davis, D.B., Dulbecco, R., Eisen, H., Ginsberg, H.S. and Wood, W.B. (1968). Microbiology. *Hober Medical Division*, 756-774.
- Davison, T.F., Morris, T.R., Payne, L.N. (1996). Poultry Immunology. detecting PZR product and nucleic acid hybridization. PZR methods and Diagnostic Hematopathology. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 128:9, 1004-1022.
- Delves P.J., Roitt I.M. (2000). The immune system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 343(1):37-49.
- de Vries R.R. (1989). Regulation of T cell responsiveness against mycobacterial antigens by HLA class 2 immune response genes. *Rev Infect Dis.* 2:S400-3.
- Diker S. (2005). İmmunoloji. *Medisan*, 191-193, Ankara.
- Dinauer M.C. (2014). Disorders of neutrophil function: an overview. *Methods Mol Biol.* 1124:501-15.
- Doğan M.D., Ataoglu H., Akarsu E.S. (2002). Nimesulide and diclofenac inhibit lipopolysaccharide-induced hypothermia and tumor necrosis factor- α elevation in rats. *Fund Clin Pharmacol*, 16, 303-309.
- Doherty G.M., Lange J.R., Langstein H.N., Alexander H.R., Buresh C.M., Norton J.A. (1992). Evidence for IFN gamma as a mediator of the lethality of endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*, 149, 1666-1670.
- Dudas J., Fullar A., Bitsche M., Schartinger V., Kovalszky I., Sprinzl G.M., Riechelmann H. (2011). Tumor-produced, active Interleukin-1 β regulates gene expression in carcinoma-associated fibroblasts. *Experimental Cell Research*. 317.2222-2229.

Dunphy, C.H., (2004). Applications of Flow Cytometry and immuno histochemistry to Diagnostic Hematopathology. *Arc. Path. Lab. Med.*1004-1022.

Forehand, J.R., Pabst, M.J., Phillips, W.A., Johnston, J. R. B. (1989). Lipopolysaccharide priming of human neutrophils for an enhanced respiratory burst. Role of intracellular free calcium. *J. Clin. Invest.*,83:74-83.

Fışgın N.T. (2004). Sepsis. *OMÜ Tıp Dergisi*, 21, 2, 100-109.

Fredrikssın M., Li Y., Stalman A., Haldosen L., Tsai L.F. (2013). Diclofenac and triamcinolone acetone impair tenocytic differentiation and promote adipocytic differentiation of mesenchymal stem cells.*Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 8:30.

Frobisher, M. (1968). Fundamentals of Microbiology. W.B. Saunders Company, USA.457.

Furcron A.E., Romero R. M. D, Plazyo O., Unkel R., BSc, Xu Y., Hassan S.S., Chaemsaitong P., Mahajan A.,Lopez N.G. (2015). Vaginal progesterone, but not 17 α -hydroxyprogesterone caproate, has antiinflammatory effects at the murine maternal-fetal interface. *HHS Public Access*.213(6):846

Galanos,C., Freudenberg, M.A. (1993). Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity. *Review.İmmünobiol.*,187(3-5):346-56.

Goldsmith Z.G., Dhanasekaran D.N. (2007). G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene*; 26(22):3122-42.

Golenbock, D.T., Hampton, R.Y., Qureshi, N., Takayama, K., Raetz, C.R.H. (1991). Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes. *J. Biol. Chem.*, 266:19490-19498.

Güner, İ., Özmen, D., Bayındır, O. (1996). Sitokinler. *T Klln J Med Sci*. 17,68,69.

Glaser K., Fehrholz M., Curstedt T., Kunzmann S., Speer C.P. (2016). Effects of the New Generation Synthetic Reconstituted Surfactant CHF5633 on ProandAnti-

Inflammatory Cytokine Expression in Native and LPS-Stimulated Adult CD14⁺ Monocytes. *Plos One* 11(1):e0146898.

Glynn J.J., Hinds M.T. (2014). Endothelial outgrowth cells: function and performance in vascular graft. *Tissue Eng Part B Rev.* 20(4):294-303.

Granitzny A., Knebel J., Müller M., Braun A., Steinberg P., Dasenbrock C., Hensen T. (2017). Evaluation of a human *in vitro* hepatocyte-NPC co-culture model for the prediction of idiosyncratic drug-induced liver injury: A pilot study. *Toxicology Reports*. 89-103.

Heilman, D.H. (1965). *In vitro* studies on changes in the reticuloendothelial system of rabbits after an injection of endotoxin. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 2(2):89-104.

Heilman, D.H. (1968). *In vitro* toxicity of endotoxin for macrophages of young guinea pigs and rabbits. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 33(5):501-10.

Hirayama, C., Sakata, M. (2002). Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles. *J. Chrom. B.*, 781:419-432.

Ichijo H., Nishida E., Irie K., Dijke P., Saitoh M., Moriguchi T. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*; 275: 90-4.

Ilgaz, A., (1999). *Özel Mikrobiyoloji Medison Yayınları* 91-96. Ankara.

Jakab L. (2015). The liver and the immune system. *Orv. Hetil.* 156(30):1203-13.

Jay H.S., Anand I.S., Shah G.B., Shah K.K. (2017). Inhibition of Pro-Inflammatory Cytokine TNF- α by *Azadirachta indica* in LPS Stimulated Human THP-1 Cells and Evaluation of its Effect on Experimental Model of Asthma in Mice. *J of Immun. Clin. Res.* 2333-6714.

- Jensen P.E. (2007). Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat Immunol*; 8(10):1041-8.
- Jenne C.N., Kubes P. (2015). Platelets in inflammation and infection. *Platelets*. 26(4):286-92.
- Johnson J.W., Fisher J.F., Mobashery S. (2013). Bacteria cell-wall recycling. *Ann NY Acad. Sci.* 1277:54-75.
- Joshi I., Sudhakar S., Nazeer R.A. (2016). Anti-inflammatory Properties of Bioactive Peptide Derived from Gastropod Influenced by Enzymatic Hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol*. 180:1128–1140.
- Kabalitz D., Medzhitov R. (2007). Innate immunity cross talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokins. *Current Opinion in Immunology*.1-3.
- Kayaalp S.O. (2005). Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Hacettepe-Taş, Ankara.
- Khan A.A., Iadarola M., Yang H.Y.T, Dionne R.A. (2007). Expression of COX-1 and COX-2 in a Clinical Model of Acute Inflammation. *J.Pain*, 8(4) 349-354.
- Kırıkae, T., Kırıkae, F., Saito, S., Tominaga, K., Tanura, H., Uemura, Y., Yokochi, T., Nakano, M. (1998). Biological characterization of endotoxins released from antibiotic-treated *P.aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*,42(5):1015.
- Koyanagi M., Kawakabe S., Arimura Y. (2016). A comparative study of colorimetric cell proliferation assay in immune cells. *Cytotechnology*. 68(4):1489-98.
- Laane, E., Tani, E., Bjorklund, E., Elmberger, G., Everaus, H., Skoog, L., Porwit-Li L, Rossoni G., Sparatore A, Lee L.C., Soldato P.D., Moore P.K. (2007). Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative. *Free Radical Bio Med*, 42, 706-719.

Li S., Neff P., Barber K., Hong J., Luo Y., Azam T., Palmer B.E., Fujita M., Garlanda C., Mantovani A., Kim S., Dinarello C.A. (2015). Extracellular forms of IL-37 inhibit innate inflammation *in vitro* and *in vivo* but require the IL-1 family decoy receptor IL-1R8. *PNAS*.112.2497-2502.

Linton P.J., Thoman M.L. (2014). Immunosensescence in monocytes, macrophages, and dendritic cells: lessons learned from the lung and heart. *Immunol Lett*. 162(1):290-7.

Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K., (2016). Oligonucleotides lymphoma. *Cytometry Part B Clinical Cytometry*.64B1, 34-42.

MacDonald. A.,(2005). Flow cytometric immuno phenotyping including Bcl-2 detection on fine needle aspirates in the diagnosis of reactive lymphadenopathy and non-Hodgkin's lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom*.(1):34-42.

Madigan M.T., Martinko J.M, Dunlap P.V., Clark D.P., Pearson B. C., (2012). *Brock Biology of Microorganisms*, 13th Edition 1301 Sansome Street, San Francisco, CA 94111.

Magalhaes, P.O., Lopes, A.M., Mazzola, P.G., Rangel-Yagui, C., Penna, T.C., Pessoa, A.JR. (2007). Methods of endotoxin removal from biological preparations: a Review. *J.Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 10(3):388-404.

Meduri G.U. (1999). An historical review of glucocorticoid treatment in sepsis. Disease pathophysiology and the design of treatment investigation. *Sepsis*, 3, 21-38.

Mellman I. (2013). Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunol Res*. 1(3):145-9.

Miert A.S. (1995). Pro-inflammatory cytokines in a ruminant model: pathophysiological, pharmacological, and therapeutic aspects. *Vet Quart*,17(2), 41-50.

Mills J, Drutz D.J. Mechanisms of Immunity to Infection. In: Stiter D.P., Terr A.I., Parslaw T.G. (1994). *Basic and Clinical Immunology*. 8 th edition, Beirut, Lebanon: Appleton-Lange:622-6.

Murdaca G., Spano F., Puppo F. (2013). Selective TNF- α inhibitor-induced injection site reactions. *Expert Opin Drug Saf*.12(2):187-93.

Nordmark, E.L. (2004). Structural and interaction studies of bacterial polysaccharides by NMR spectroscopy. Doctoral dissertation. Department of Organic Chemistry Stockholm University Printed in Sweden by Akademityck AB, *Valdemarsvik*. 91-7265-971-8.

Nororiha I.L., Niemir Z. Stein H, Waldher R. (1995). Cytokines and growth factors in renal disease: *Nephrol Dial Transplant*,10: 775-786.

Obara Y, Nakahata N. (2010). The signaling pathway leading to extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) activation via G-proteins ERK5-dependent neurotrophic effects. *Mol Pharmacol*;77(1):10-6.

Ogikubo, Y., Norimatsu, M., Noda, K., Takashi, J., Inotsume, M., Tsuchiya, M., Tamura,Y. (2004). Evaluation of the bacterial endotoxin test for quantification of endotoxin contamination of porcine vaccines. *Biologicals*. 32:88-93.

Okajima K. (2001). Regulation of inflammatory responses by natural anticoagulants, *Immunol Rev*, 184, 258-274.

Orange J.S. (2013). Natural killer cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 132(3):515-525.

Otto CM (2007). Sepsis in veterinary patients: what do we know and where can we go. *J Vet Emerg Crit Care*, 17(4), 329-332.

Öner A.C.(2012). Sistemik Endotoksemi Şekillendirilmiş Ratlarda Marbofloksasin, Diklofenak Sodyum ve Metil prednizolonun Serum Sitokin Seviyeleri ve Biyokimyasal

Değerler Üzerine Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Özcan C., Hasanoğlu A., Gülcüler M. (1996). Sepsis ve inflamasyon mediatörleri. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 3(4).

Özkorkmaz E.G. (2008). Mast Hücreleri. *AKÜ Fen Bilimleri Dergisi*.02.87-101.

Pugin, J., Ulevitch, R.J., Tobias, P.S. (1995). Mechanism of cellular activation by endotoxin. *Prog. Surg.* 20, 8-17.

Queiroga F.L., Alves A., Pires I., Lopes C. (2007). Expression of Cox-1 and Cox-2 in Canine Mammary Tumours. *J. Comp. Path.* 136,177-185.

Raetz, C.R., Ulevitch, R.J., Wright, S.D., Sibley, C.H., Ding, A., Nathan, C.F. (1991). Gram negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *The FASEB J.*, 5(12):2652-2660.

Remick D.G. (2007). Biological perspectives pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol*, 170(5), 1435-1444.

Rietschel, E.T., Kiriakos, T., Schade, F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A.J., Zähringer, U., Seydel, U., Döpado, F., Schreier, M., Brade, H. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *Review. FASEB J.*, 8(2):217-25.

Roitt I., Brostoff J. (2001). Antibodies. In *Immunology* 6th edition, *Spain Mosby*, 65-85.

Sadoff J.C. (1974). Cell-wall structures of *Pseudomonas aeruginosa* with immunologic significance: a brief review. *J Infect Dis.*130(0):S61-4.

Sakaguchi S., Sakaguchi N., Shimizu J., Yamazaki S., Sakihama T., Itoh M., Kuniyasu Y., Nomura T., Toda M., Takahashi T. (2001). Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumorimmunity and transplantation tolerance. *Immunological Review*;182: 18-32.

Sakaguchi S., Furusawa S. (2006). Oxidative stress and septic shock: metabolic aspects of oxygen-derived free radicals generated in the liver during endotoxemia. *Immunol Med Microbiol*, 47, 167-177.

Scarlata F. (2015). Eosinophils and eosinophilia. *Infez Med*. 23(4):307-12.

Sima S., Uma L. (2014). Evaluation of *in-vitro* antiinflammatory activity of chebulinic acid from terminalia chebula linn against the denaturation of protein. MDPI AG. ESSOC. 10.3390/ecsoc-18-b030. İsviçre.

Shah J.H., Anand I.S., Shah GB, Shah K.K. (2017). Inhibition of Pro-Inflammatory Cytokine TNF- α by Azadirachta indica in LPS Stimulated Human THP-1 Cells and Evaluation of its Effect on Experimental Model of Asthma in Mice. *J Immunol Clin Res* 4(2): 1042.

Sparber F. (2014). Langerhans cell: an update. *J Dtsch Dermatol Ges*. 12(12):1107-11

Songu M., Katılmış, H. (2012). Enfeksiyondan korunma ve immün sistem. *Journal of Medical Updates*,39.

Tsiotou A.G., Sakorafas G.H., Anagnostopoulos G., Bramis J. (2005). Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit*, 11(3), 76-85.

Van De Wiele C., Sathekge M., Maes A. (2014). Targeting monocytes and macrophages by means of SPECT and PET. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 58(3):269-75

Van der Poll T. (2001). Immunotherapy of sepsis. *Lancet Infect Dis*,1,165-174.

Van der Poll T., Jansen J., Levi M., Cate H., Cate J.W., van Deventer S.J. (1994). Regulation of interleukin-10 release by tumor necrosis factor in humans and chimpanzees. *J Exp Med*, 180,1985-1988.

Westpal,O., Jann, K. (1965). Bacterial lipopolysaccharide. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr. Chem.*,5:83-91.

Will O.M., Purcz N., Chalaris A., Heneweer C., Boretius S., Purcz Larissa., Nikkola L., Ashammakhi N., Kalthoff H., Glüer C., Wiltfang J., Açıl Y., Tiwari S. (2016).

Increased survival rate by local release of diclofenac in a murine model of recurrent oral carcinoma. *International Journal of Nanomedicine*.11.,5311–5321

http1: <https://pt.slideshare.net/cindrachatami/bakteri-gram-negatif-dan-bakteri-gram-positif/5>. (Erişim Tarihi: 11.07.2018)

http2: https://www.google.com.tr/search?q=pseudomonas+aeruginosa+lps&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUzbAhUGByYQ_AUICigB&biw=1366&bih=613#imgsrc=QRIGA5wmLbD3hM: (Erişim Tarihi: 09.06.2018)

http3: https://www.google.com.tr/search?q=escherichia+coli&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjJwMbctezbAhXBWiwKHU3jAaYQ_AUIDCgD&biw=1366&bih=613#imgsrc=CVKUTM4UaOA66M: (Erişim Tarihi: 07.06.2018)

http4: https://www.google.com.tr/search?q=salmonella+enteridis&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwikwpSYwZLcAhWEDuwKHQ2DM0Q_AUICigB&biw=1366&bih=662#imgsrc=38gPXXPA1Rx3SM. (Erişim Tarihi: 12.06.2018)

http 5: <http://www.mikrobiyoloji.org/dokgoster.asd?dosya=9316822206>. (Erişim Tarihi: 11.06.2018)

http6: <https://www.medikaynak.com/t/onkoloji/kanserimmunolojisi/icerikler/bagisiklik-sistem-hucreleri>. (Erişim Tarihi: 14.06.2018)

http 7: <https://goo.gl/images/dKJKs4>. (Erişim Tarihi: 22.06.2018)

http8: <http://www.omicsonline.org/open-access/a-novel-ask-inhibitor-agi-inhibits-tlrmediated-activation-of-ask-by-prevention-of-thioredoxin-from-ask-2329-6607.1000132.php?aid=40946>. (Erişim Tarihi: 02.06.2018)

http9: <https://www.sodyum.gen.tr/diklofenak-sodyum.html>. (Erişim Tarihi: 12.06.2018)

http10: <http://www.selleckchem.com/products/selonsertib-gs-4997.html>. (Erişim Tarihi: 12.06.2018)

http 11: <https://www.gbiosciences.com/Bioassays/CytoScan-WST-1-Cell-Proliferation-Assay>. (Erişim Tarihi: 13.06.2018)

http https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_reverse_transcription. (Erişim Tarihi: 14.06.2018)