



T.C.

ALANYA ALAADDİN KEYKUBAT ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER TIP ANA BİLİM DALI

LİPOLİSAKKARİTLE İNDÜKLENMİŞ MONONÜKLEER
HÜCRELERDE TİMOKİNONUN PROİNFLAMATUAR
SİTOKİN SALINIMINA ETKİSİ

Yüksek Lisans Tezi

Nurşen BEKTÖRE

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Erkan MAYTALMAN

ALANYA
2023

T.C.
ALANYA ALAADDİN KEYKUBAT ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

LİPOLİSAKKARİTLE İNDÜKLENMİŞ MONONÜKLEER HÜCRELERDE
TİMOKİNONUN PROİNFLAMATUAR SİTOKİN SALINIMINA ETKİSİ

Yüksek Lisans Tezi

Nurşen BEKTÖRE

Anabilim Dalı: Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Program Adı: Moleküler Tıp

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Erkan MAYTALMAN

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 2021-04-02-MAP14 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

ALANYA

2023

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 edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Nurşen BEKTÖRE

TEŞEKKÜR SAYFASI

Yüksek lisans eğitimim boyunca sabrı, bilimsel birikimi, samimiyeti, tüm aksilikleri olgunlukla karşılaması ve manevi desteği için değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Erkan MAYTALMAN'a ve güler yüzünü hiç eksik etmeyen, samimiyetini esirgemeyen, her ihtiyaç duyduğumda yardımcı olan, yol gösteren, değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Dilara NEMUTLU SAMUR'a, beni her zaman yapabileceğime inandıran, destekleyen ve yüksek lisans eğitimimde önemli katkıları olan değerli hocam Prof. Dr. Ayşegül GÖZALAN'a

Tez çalışmamı yapacakları katkılarından dolayı değerli sayın tez jürime,

Çalışmamıza gönüllü olarak kan vererek bilimsel çalışmaya katkıda bulunan Alanya Alaadin Keykubat Üniversitesi Laboratuvarında görevli Laboratuvar Teknikeri arkadaşlarıma

Büyük bir sabır göstererek, beni her koşulda destekleyen, verdiğim tüm kararlarda yanımda olan değerli eşim Dr. Bayhan BEKTÖRE'ye oğlum Kağan ve kızım Ela BEKTÖRE'ye teşekkür ederim.

ÖZET

LİPOLİSAKARİTLE İNDÜKLENMİŞ MONONÜKLEER HÜCRELERDE TİMOKİNONUN PROİNFLAMATUVAR SİTOKİN SALINIMINA ETKİSİ

Nurşen BEKTÖRE

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Haziran, 2023 (56 Sayfa)

Lipolisaakrit (LPS)'ler, infeksiyonlar ve farklı yollarla dolaşım sistemine karışarak septik şok tablosuna yol açıp ölüme neden olabilir. Bu çalışmada *Nigella sativa* (çörek otu) tohumlarının ana bileşeni timokinonun LPS-ile indüklenen kan mononükleer hücreleri (MNH)'nde proinflamatuvar sitokin ekspresyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Konsantrasyon-gradient santrifüj yöntemi ile 10 sağlıklı donörün kan örneklerinden MNH izole edildi. Hücreler, 4 saat boyunca LPS'ye maruz bırakıldı. 100 ng/ml LPS, 10-100 µM timokinon, 1 µM deksametazon ve bunların kombinasyonlarını içeren gruplar oluşturularak IL-1β, TNF-α, IFγ ve IL10 mRNA ekspresyonları RT-qPCR ve ELISA yöntemi kullanılarak analiz edildi.

Timokinon tüm hücre gruplarında TNFα, IFγ ve IL-1β mRNA ekspresyonlarında ciddi azalmalara neden oldu. Antiinflamatuvar sitokin olan IL-10'un mRNA ekspresyonlarında ise LPS ile indüklenen gruplarda artış görüldü. Bunun aksine kısa süreli maruziyet sonrasında protein ekspresyonlarında değişiklikler anlamlı değildi.

Bu çalışma, timokinonun proinflamatuvar sitokinlerin mRNA ekspresyonunu baskılayabileceğini ve IL-10 üzerinden antiinflamatuvar etkileri olabileceğini işaret etmektedir. Bununla beraber sitokin ekspresyonuna etkilerin uzun süreli maruziyet ya da *in vivo* modellerde teyit edilmesi gerekmektedir. Çalışmamız sepsis ve olasılıkla proinflamatuvar sitokinlerin etkin olduğu diğer inflamasyon durumlarında timokinon antiinflamatuvar ajan olma potansiyeli göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Timokinon, LPS, Sitokinler, Mononükleer Hücreler

ABSTRACT

EFFECT OF THYMOQUINONE ON PROINFLAMMATORY CYTOKINE RELEASE IN LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED MONONUCLEAR CELLS

Nurşen BEKTÖRE

Alanya Alaaddin Keykubat University, Department of Molecular Medicine

June 2023

Lipopolysaccharides (LPS) can enter the systemic circulation through various infections, causing septic shock and death. In this study, it was aimed to investigate the effects of thymoquinone, the main component of *Nigella sativa* (*Nigella sativa*) seeds, on proinflammatory cytokine expression in LPS-induced blood mononuclear cells (MNC).

MNCs were isolated from blood samples of 10 healthy donors by concentration-gradient centrifugation method. Cells were exposed to LPS for four hours. Groups containing 100 ng/ml LPS, 10-100 μ M thymoquinone, 1 μ M dexamethasone and their combinations were formed and IL-1 β , TNF- α , IF γ and IL10mRNA expressions were analyzed using RT-qPCR and ELISA method.

Thymoquinone caused remarkable reduction in TNF α , IF γ and IL-1 β mRNA expressions in all cell groups. The mRNA expressions of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, were increased in LPS-induced groups. In contrast, changes in protein expressions were not significant after short-term exposure.

This study indicates that thymoquinone can suppress mRNA expression of proinflammatory cytokines and may have anti-inflammatory effects on IL-10. However, effects on cytokine expression need to be confirmed in long-term exposure and in vivo models. Our study shows the potential for thymoquinone to be an anti-inflammatory agent in sepsis and possibly other inflammation conditions where proinflammatory cytokines are active.

Keywords: Thymoquinone, LPS, Cytokins, Mononuclear Cells

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	ii
TEŞEKKÜR SAYFASI.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR	2
2.1. İmmün Sistem	2
2.2. İmmün Sistem Hücreleri	3
2.2.2. Nötrofiller (Polimorfonükleer Lökositler).....	3
2.2.3. Monositler/Makrofajlar	3
2.2.4. Bazofiller	4
2.2.5. Eozinofiller.....	4
2.2.6. Antijen Sunan Hücreler	4
2.2.7. Lenfositler	5
2.2.8. Mast Hücreleri	6
2.3. Pseudomonas Kaynaklı Enfeksiyonlar.....	6
2.4. Sitokinler	7
2.4.1. Tümör Nekroz Faktörü (TNF).....	10
2.4.2. IL-1	12
2.4.3. IL-10	13
2.4.5. İnterferon gama	13
2.5. Lipopolisakkarit	13
2.5.1. Serum Proteinlerinin Rolü.....	16
2.5.2. LPS Kaynaklı Aktivasyon Modeli	16
2.6. Glukokortikoidler - Deksametazon	17
2.7. Timokinon	19
3. YÖNTEM	21
3.1. Periferik Kandan Mononükleer Hücrelerin Elde Edilmesi	21

3.2. Hücre Proliferasyon Analizi ve Etken Madde Dozlarının Belirlenmesi.....	22
3.3. Deney Grupları ve Çalışma Planı.....	23
3.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time qPCR) Analizleri...	23
3.4.1. RNA Ekstraksiyonu.....	23
3.4.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	24
3.4.3. RT- qPCR Analizleri	24
3.5. ELISA Analizleri	26
3.6. İstatistiksel Analiz.....	27
4. BULGULAR.....	28
4.1. MTT Bulguları	28
4.2. Hedef sitokinlerin rölatif mRNA ekspresyon bulguları	31
4.2.1. Rölatif TNF- α mRNA Ekspresyonları	31
4.2.2. Rölatif IF γ mRNA Ekspresyonları	32
4.2.3. Rölatif IL-1 β mRNA Ekspresyonları	34
4.2.4. Rölatif IL-10 mRNA Ekspresyonları	36
4.3. Hedef sitokinlerin ELISA bulguları	37
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	39
6. KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	56

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1. Sitokinler ve işlevleri (33)	9
Tablo 3. 1. Deney Grupları	23
Tablo 3. 2. Kullanılan primerler.....	25
Tablo 3. 3. Primer Mikslerinin Hazırlamak için Gereken Solüsyon ve Reaktif Miktarları	25
Tablo 3. 4. RT-qPCR Amplifikasyon Döngüsü	25
Tablo 4. 1. Timokinonun artan konsantrasyon gruplarında MNH'ler üzerine % proliferasyon/sitotoksosite ortalama, SD ve kontrole göre anlamlı farklarda p değerleri	29
Tablo 4. 2. Dekametazonun artan konsantrasyon gruplarında MNH'ler üzerine % proliferasyon/sitotoksosite ortalama, SD ve kontrole göre anlamlı farklarda p değerleri	30
Tablo 4. 3. LPS'nin artan konsantrasyon gruplarında MNH'ler üzerine % proliferasyon/sitotoksosite ortalama, SD ve kontrole göre anlamlı farklarda p değerleri	31
Tablo 4. 4. TNF- α mRNA ekspresyonunda gruplar arasında ortalama katsayı değişimi (fold change), ve Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.0001 gruplar arası anlamlı farklarda p değerleri	32
Tablo 4. 5. IF γ mRNA ekspresyonunda gruplar arasında ortalama katsayı değişimi (fold change), SD Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.0001 değerleri ve gruplar arası anlamlı farklarda p değerleri	34
Tablo 4. 6. IL1 β mRNA ekspresyonunda gruplar arasında ortalama katsayı değişimi (fold change), SD Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.0001 değerleri ve gruplar arası anlamlı farklarda p değerleri	35
Tablo 4. 7. IL10- mRNA ekspresyonunda gruplar arasında ortalama katsayı değişimi (fold change), SD Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001 değerleri ve gruplar arası anlamlı farklarda p değerleri	36
Tablo 4. 8. TNF- α için gruplar arasında ortalama konsantrasyonlar, SD değerleri	37
Tablo 4. 9. IL-1 β mRNA ekspresyonunda gruplar arasında ortalama katsayı değişimi (fold change), SD Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 **** p <0.0001 değerleri ve gruplar arası anlamlı farklarda p değerleri	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2. 1.** *E. coli* tarafından üretilen LPS'nin yapısı. (Rooks MG, Garrett WS.'den uyarlanarak Türkçeleştirilmiştir) (57)..... 15
- Şekil 2. 2.** LPS'nin Moleküler Yapısı. (Silipo A. ve ark'dan uyarlanarak Türkçeleştirilmiştir) (59). LPS: Liposakkarit, LOS: Lipooligosakkarit. 15
- Şekil 2. 3.** LPS tanıma modelleri. (a) LPS'nin serumda LBP ardından da LPS-LBP kompleksinin monosit hücre yüzeyindeki CD14'e bağlandığı kabul edilen LPS tanıma modeli. CD14'te bir transmembran bölgesi yoktur ve bir sinyal iletemez; bununla birlikte, Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) ve aksesuar protein MD-2 ile ilişkisinin ardından, sinyal iletimi tetiklenir, bu olayda (MAPK), (JNK/SAPK), p38 ve nükleer faktör kapp beta transkripsiyon faktörü (NF-KB) gibi çoklu sinyal moleküllerinin aktivasyonuna yol açar. (b) LPS'nin monosit hücre yüzeyindeki örüntü tanıma reseptörlerine bağladığı ve bir aktivasyon kümesi oluşturduğu, önerilen LPS tanıma modeli. Çoklu sinyal molekülleri aktivasyon kümesi içinde çoklu reseptörlerden tetiklenir. CD14, TLR4 ve MD-2'ye ek olarak, diğer olası etkileşim molekülleri şunlardır: CD55, kemokin reseptörü 4 (CXCR4), 15 şoku proteinleri (Hsps) ve integrin CD11/CD18. Ancak, doğal bağışık yanıtın çok çeşitli mikrobiyal patojenlere yanıt vermesine olanak sağlayacak farklı kombinasyonel reseptör ilişkilerinin meydana gelmesi beklenebilir (72). 17
- Şekil 2. 4.** Deksametazonun moleküler yapısı (75)..... 18
- Şekil 2. 5.** İnflamasyon: Timokinonun moleküler hedefleri (106). Kısaltmalar: iNOS(İndüklenebilir Nitrikoksit Sentaz), ve NF-κB, Siklooksijenaz (COX), Nükleer faktör eritroid 2 (Nrf2),Timokinon (TQ), prostaglandin E2 (PGE2), Epitelial Büyüme Faktörü (EGFR), MAPK..... 20
- Şekil 4. 1.**Timokinonun 100 µM konsantrasyonunda hücrelerin mikroskopik görünüşleri.A 4 saat maruziyet, B 24 saat maruziyet..... 29
- Şekil 4. 2.** Timokinonun artan konsantrasyonlarında hücre kültüründe MNH'ler üzerine proliferatif/sitotoksik etkileri. MTT analizlerine göre 200 ve 500 µM konsantrasyonlarda anlamlı derecede inhibisyon. Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 29
- Şekil 4. 3.** Deksametazonun artan konsantrasyonlarında hücre kültüründe MNH'ler üzerine proliferatif/sitotoksik etkileri. Mtt analizlerine göre 50 ve 500 µM arasında konsantrasyonlarda anlamlı derecede inhibisyon. Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 30
- Şekil 4. 4.** LPS'nin artan konsantrasyonlarında hücre kültüründe MNH'ler üzerine proliferatif/sitotoksik etkileri. MTT analizlerine göre 200 ve 500 µM konsantrasyonlarda anlamlı derecede inhibisyon. Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 31
- Şekil 4. 5.** TNF-α mRNA ekspresyonları. Kontrol ve LPS gruplarına karşı diğer grupların ekspresyonlarında anlamlı azalmalar. Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ 32
- Şekil 4. 6.** Rölatif IFγ mRNA ekspresyonları. Kontrol ve LPS gruplarına karşı diğer grupların ekspresyonlarında anlamlı azalmalar. Ayrıca T1'de D ve LD; LT1'de ise LD'ye göre anlamlı azalma. Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ 33

Şekil 4. 7. Rölatif IL1 β mRNA ekspresyonları. Kontrol ve LPS gruplarına karşı diğer grupların ekspresyonlarında anlamlı azalmalar. Ayrıca LD'ye göre T1 ve LT1 gruplarında anlamlı azalma. Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ 35

Şekil 4. 8. Rölatif IL-10 mRNA ekspresyonları. Kontrol grubuna karşı timokinon içeren grupların ekspresyonlarında anlamlı artış. Ayrıca LT1 grubunda LD'ye göre anlamlı artış. Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 36

Şekil 4. 9. Hücre kültüründen elde edilen lizatlarda TNF- α konsantrasyonları. Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma 37

Şekil 4. 10. Hücre kültüründen elde edilen lizatlarda IL1 β konsantrasyonları. LD grubunda LPS, T1, LT1 ve LT2 gruplarına göre anlamlı artış. Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$ 38



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

γ	IFN-gama
β	Beta
α	Alfa
ω	Omega

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devleti
ASH	Antijen Sunan Hücreler
BPI	Bakterisidal Geçirgenlik Proteini
COX	Siklooksijenaz
CTL	Sitotoksik Lenfositler
CD4	Cluster of Differentiation 4
CD8	Cluster of Differentiation 8
CpG DNA	Sitozin-fosfat diesterguanozin açısından zengin bakteri DNAsı
GM-CSF	Granülosit Makrofaj Koloni Sitümülan Faktör
GPI	Glikosilfosfatidilinositol
KF	Kistik Fibrozis
IFN γ	İnterferon γ
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
JNK/SAPK	c-Jun-N-terminal kinaz/stresle aktive olan protein kinaz
TGF- β	Transforming Growth Faktör
LOS	Lipooligosakkarit
LPS	Lipopolisakkaritler

LBP	Lipopolisakkarit Baęlayan Protein
MAPKN	Mitojen ile Aktive Olan Protein Kinazları
NK	Natürel Katil
NO	Nitrik Oksit
PMN	Polimorfonükleer Nötrofilleri
PAMP	Patojenle İlişkili Moleküler Motifler
PRR	Patern Tanıma Reseptörleri
LTA	Lipoteikoik Asit
Th	T Hücreleri
TNF	Tümör Nekrotizan Faktör
TNFR	Tümör Nekrotizan Faktör Reseptör
TNF α	Tümör Nekroz Faktörü α
IL-1 β	İnterlökin 1 beta
IL-6	İnterlökin 6
MNH	Mononükleer Hücre
RT-qPCR	Real Time kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ICAM-I	Hücreler Arası Adezyon Molekülü
NCAM-I,	Sinirsel Hücre Adezyon Molekülü
ELAM-I	E- Selektin Adezyon Molekülü

1. GİRİŞ

Sepsis, hastane enfeksiyonlarının bir komplikasyonu olarak ortaya çıkabilir (1). *Pseudomonas aeruginosa*, özellikle immünitesi zayıflamış kişileri ve yoğun bakımda yatan hastaları etkileyen akut hastane enfeksiyonunun en sık görülen ve ciddi nedenlerinden biridir (2). Özellikle hastane kaynaklı pnömoni, idrar yolu ve kan dolaşımı enfeksiyonları ile ilişkilendirilir (3). *Pseudomonas aeruginosa*'nın bu enfeksiyonları geliştirmesinde en önemli virülans faktörlerinden biri lipopolisakkarit (LPS)'lerdir. Sepsis sitokin aracılı hiperinflamatuvar bir başlangıç fazı ve bu proaktif etkiye karşı koyan antiinflamatuvar tepkilerin bir sonucu olan immunosüpresif bir fazı içerir (4).

Timokinon, Ranunculaceae familyasının bir üyesi olan *Nigella sativa L.* (Çörek otu) uçucu yağının içinde en bol bulunan biyoaktif bileşendir (5). Yapılan çalışmalarda, *Nigella sativa* yağının, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi pek çok bakteriye karşı antibakteriyel ve bunların yanı sıra patojenik maya *Candida albicans* ve fungusu karşı anti-fungal etkileri olduğu gösterilmiştir (6, 7). Timokinonun ayrıca antiinflamatuvar özellikler gösterdiği *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir (8).

Timokinonun immün sistem üzerindeki olası etkileri, *Pseudomonas*'tan elde edilen LPS maruziyeti sonrasında mononükleer hücre (MNH)'lerde erken dönemde ortaya çıkan proinflamatuvar sitokin sekresyonu profili hücre kültürü ile tasarlanan bir yöntemle incelendi. Bu çalışma ile timokinonun *in vitro* sepsis benzeri modelinde terapötik ve profilaktik potansiyeli değerlendirildi. Çalışmamızda elde edilen bulgular, *in vivo* tasarımların planlanması ve bu inflamasyon ve sepsiste yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yönelik yapılacak araştırmalar için bir temel oluşturmaktadır.

Çalışmanın ana hedefi, *Pseudomonas aeruginosa* LPS'si ile indüklenen insan MNH'lerinden salınan tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), interlökin 1-beta (IL-1 β) ve interferon-gama (IFN- γ)'nın sentez ve salınımına timokinonun etkisini incelemektir. Çalışmamızda mRNA ekspresyonlarının RT-qPCR ile protein ekspresyonunun ELISA yöntemiyle tespiti amaçlanmıştır. Sonuçlarımız bu ekspresyonlara etkisi bilinen deksametazon ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

2. LİTERATÜR

2.1. İmmün Sistem

Canlı hücrelerine karşı tehlike oluşturan hastalıklara cevap niteliği taşıyan, tümör ve patojen hücreleri tespit edip bunları ortadan kaldırmaya yarayan ve işleyişin bütünü oluşturulan mekanizmaya immün sistem denilmektedir (9). İmmün sistem, vücuda temas eden ya da vücudun içindeki tüm yabancı maddeleri tespit eder ve bunları vücuda faydalı olan, sağlıklı normal vücut hücrelerinden ayrı tutarak vücudun yapısını korumayı amaçlar (10).

İmmün sistemin önemli görevlerinden biri, hücrel ve humoral cevaplarla kontrolsüz çoğalan kanser hücrelerini belirleyerek, onları apoptoza götüren süreçleri başlatarak engellemektir (10). Diğer önemli ve temel görevi ise vücuda giren virüs, bakteri, polen, polisakkarit ve protein yapıdaki moleküllere karşı savunmanın yapılmasıdır. Böyle bir geçişte immün sistem uyarılır ve bağışıklık yanıtı verilmeye başlanır. Bu yanıt doğal ve kazanılmış bağışık yanıt olarak iki alt başlıkta incelenir (11).

Doğal bağışıklık (doğal immün sistem) mikroorganizmalara karşı hızlıca cevap oluşturan ilk savunma hattıdır. Özgül bir yanıt oluşturmaz. Doğal bağışıklıkta çeşitli hücre grupları ve bileşenler bulunur. Bunlar epitelyal bariyerler, monosit/makrofajlar, doğal öldürücü hücreler (*Natural killer*, NK), nötrofiller, kompleman sistemi, doğal bağışıklık sitokinleri, doğal bağışıklığın diğer plazma proteinleri (akut faz proteinleri)'dir. Bunu yanı sıra dokuların fizyolojik özellikleri (mide ve idrar pH'sı) gibi faktörler de bağışık yanıtın oluşumunda yardımcı olurlar (12). Kazanılmış bağışıklık ise antijenlerle ilişkilidir ve bir belleğinin bulunması önemli özelliğidir. B ve T lenfositler edinsel bağışıklık yanıtının asıl faktörleridir. Özgül nitelikteki bu immün sistemin uyarı aldıktan sonra hareketlenmesi için belirli bir sürenin geçmesi gerekmektedir (13). Kazanılmış bağışıklık yanıtının büyüklüğü, doğal bağışıklık yanıtının ne kadar kuvvetli oluşturulduğuna bağlıdır (11).

Kazanılmış yanıt ise, belirli bir antijene karşı oluşturulmuş özgül yanıttır. Bu yanıt bellek hücrelerinde saklanabilir ve gerektiğinde tekrar çağırılabilir durumdadır (14). Hücrel ve humoral olarak iki şekilde işler. Sistemin aktif olması ile özgül yanıt, yabancı molekülün (antijen) tespiti, lenfositlerin çoğalması ve ardından efektör hücrelere dönüşmesi ile oluşur. Aktive olmuş lenfositler, tespit edilen antijeni uzaklaştırır. Antijenle uyarılan B lenfositlerinin bir bölümü farklılaşarak plazma hücrelerini oluştururlar ki bu da antikor üretimini sağlayarak humoral immüniteyi oluşturur (15).

2.2. İmmün Sistem Hücreleri

Doğuştan gelen ve edinsel bağışıklık yanıtlarında önemli ve özel görevi olan hücreler, fagositler, antijene özgü lenfositler, dendritik hücreler ve antijenleri ortadan kaldırma işlevi gören farklı türdeki lökositlerdir. Bu hücrelerin çoğu kanda bulunur, ancak mikroorganizmalara verdikleri tepkiler genellikle dokularda lokalize olmuştur ve dolaşımdaki toplam lökosit sayısındaki artışa ya da azalışa yansımaz (16).

Nötrofiller ve makrofajlar gibi fagositik hücrelerin birincil işlevi, mikroorganizmaları tanımlamak, yutmak ve yok etmektir. Fagositlerin konak savunmasındaki fonksiyonları bir dizi ardışık tepkiden oluşur. Bunlar, ilk önce hücrelerin enfeksiyon bölgelerine çağırılması sonra mikroorganizmaların tanınması ve aktivasyonu, fagositoz işlemiyle yutulması ve sindirilmiş mikroorganizmaların yok edilmesi olarak sıralanabilir. Ayrıca, doğrudan temas yoluyla ve proteinler salgılayarak diğer hücrelerle bağışıklık tepkilerini teşvik eden veya düzenleyen yollarla iletişim kurarlar (17-19).

2.2.2. Nötrofiller (Polimorfonükleer Lökositler)

Nötrofiller, polimorfonükleer lökositler olarak da adlandırılan dolaşımdaki beyaz kan hücrelerinin en bol popülasyonudur ve inflamatuvar reaksiyonların en erken cevap veren hücreleridir. Fagosit yapabilen hücre grubundadır. Nötrofiller, çok sayıda zarımsı çıkıntılardan oluşan, çapları yaklaşık 12 ila 15 µm olan küresel hücrelerdir. Bir nötrofilin çekirdeği, birbirine bağlı üç ila beş parçadan oluşmuştur, bu nedenle polimorfonükleer lökosit olarak da isimlendirilirler. Nötrofiller hematopoietik kök hücreden granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) tarafından uyarılarak kemik iliğinde üretilirler. Bir yetişkin insan günde 1×10^{11} den fazla nötrofil üretir ve her biri kanda yaklaşık 6 saat dolaşır. Nötrofiller, mikroorganizmaların girişinden birkaç saat sonra enfeksiyon bölgelerine göç edebilirler. Dolaşımdaki nötrofiller, bu süre içinde bir enfeksiyon bölgesine alınmazsa, apoptoza uğrar ve genellikle karaciğer veya dalakta yerleşik makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Nötrofiller, dokulara girdikten sonra ise birkaç saat işlev görür ve sonra ölürler (17, 19).

2.2.3. Monositler/Makrofajlar

Doğuştan gelen ve edinsel bağışıklıkta merkezi roller oynayan, tek çekirdekli fagositik hücrelerin, birincil işlevi fagositozdur. Mononükleer fagosit sisteminin hücreleri kemik iliğindeki ortak bir öncüden kaynaklanır, kanda dolaşır ve çeşitli dokularda olgunlaşır ve aktive olur. Kemik iliğinden periferik kana giren bu hücre tipi tam

farklılaşmamıştır ve monosit olarak adlandırılır. Monositler 10 ila 15 µm çapındadır ve fasulye şeklinde çekirdekleri bulunur. Monositler heterojendir ve iki alt kümeden oluşur. Birinci popülasyona inflamatuvar tip denir çünkü kandan doku iltihabı bölgelerine hızla toplanır. Diğer tip ise dokulardaki yerleşik makrofajların ve bazı dendritik hücrelerin kaynağı olarak bilinir. Dokulara girdikten sonra bu monositler olgunlaşır ve makrofajlar haline gelir. Makrofajlar mikroorganizmaları sindirmeye ek olarak, enfeksiyon veya steril doku yaralanmasından sonra temizleme sürecinin bir parçası olarak ölü konakçı hücreleri de yutar. Enfeksiyon bölgelerinde hızla biriken ölü nötrofilleri fagosite ederler veya travma veya kesintiye uğramış kan akımının neden olduğu doku ölümünde ortamdaki hücreleri de yok eder. Makrofajlar ayrıca apoptotik hücreleri, içeriklerini serbest bırakmadan ve inflamatuvar yanıtları indüklemeden önce tanır ve yutarak yok eder (17-19).

2.2.4. Bazofiller

Bazofiller, mast hücrelerine birçok yapısal ve işlevsel benzerlikleri olan granülositlerdir. Diğer granülositler gibi, bazofiller de kemik iliği progenitörlerinden (mast hücrelerinininkinden farklı bir soy), kemik iliğinde olgunlaşır ve kanda dolaşırlar. Bazofiller kandaki lökositlerin %1'inden azını oluşturur (16).

2.2.5. Eozinofiller

Eozinofiller, parazitlerin hücre duvarlarına zararlı ama aynı zamanda konak dokulara da zarar verebilen enzimler içeren sitoplazmik granüllere sahip granülositlerdir. Nötrofiller ve bazofiller gibi, eozinofiller de kemik iliğinden türetilir. GM-CSF, IL-3 ve IL-5, miyeloid öncülerinden eozinofil olgunlaşmasını destekler (16).

2.2.6. Antijen Sunan Hücreler

Antijen sunan hücre (ASH)'ler, mikrobiyal ve diğer antijenleri yakalamak, lenfositlere göstermek ve lenfositlerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarıcı sinyaller sağlamak için özelleşmiş hücre gruplarıdır (19). ASH'ler genellikle antijenleri, T lenfositlerine sunan bir hücreye uyarıda bulunur. T hücresi yanıtının başlatılmasında rol oynayan başlıca ASH türü, dendritik hücredir (16, 17).

Dendritik hücreler naif T hücrelerini aktive etmek için en önemli ASH'lerdir. Enfeksiyonlara karşı doğuştan gelen tepkilerde ve adaptif bağışıklık tepkilerini bağlamada önemli roller oynarlar (17, 18). Dendritik hücelere ek olarak, makrofajlar ve B lenfositler de, CD4+ yardımcı T hücresi aracılı bağışıklık yanıtlarında önemli antijen

sunan işlevleri yerine getirir. Makrofajlar, enfeksiyon bölgelerindeki yardımcı T lenfositlerine antijen sunar, bu da yardımcı T hücresi aktivasyonuna ve makrofajları daha da aktive eden moleküllerin üretimine yol açar (16, 20).

2.2.7. Lenfositler

Lenfositler, edinsel bağışıklığın benzersiz hücreleridir vücutta klonal olarak dağılmış antijen reseptörlerini eksprese eden ve her biri farklı antijenik determinant için iyi bir özgülüğe sahip olan tek hücrelerdir. Sağlıklı bir yetişkinde toplam lenfosit sayısı yaklaşık 5×10^{11} 'dir. Bunlardan ~%2'si kanda, ~%10'u kemik iliğinde, ~%15'i mukozal lenfoidde, gastrointestinal ve solunum yollarının dokularında ve ~%65'i lenfoid organlarda (esas olarak lenf düğümlerinde ve dalakta) bulunur (16, 20).

B lenfositleri, antikor üreten hücreler, kuşlarda fabricius bursa adı verilen bir organda olgunlaştıklarından böyle adlandırılırlar. Hücresel bağışıklığın elemanı olan T lenfositleri, kemik iliğinde ortaya çıkan öncüllerinin timusa göç etmesi ve burada olgunlaşması nedeniyle bu adla adlandırılmıştır. T hücresi iki ana alt kümesi, yardımcı CD4+ T lenfositler ve CD8+ sitotoksik (CTL) lenfositlerdir (20-22).

Naif lenfositler, periferik lenfoid organlarda ve dolaşımda bulunan aynı zamanda da hiç yabancı antijenle karşılaşmamış matür T veya B hücreleridir. Naif lenfositler, antijenleri tanımazlarsa tipik olarak bir ila üç ay sonra ölürlür. Antijenik stimülasyondan önce, naif lenfositler dinlenme durumundadır veya hücre döngüsünün G0 aşamasındadır. Uyarıya yanıt olarak bölünmeye geçmeden önce hücre döngüsünün G1 aşamasına girerler. Aktive lenfositler daha büyüktür (10 ila 12 μm çapında), daha fazla sitoplazma ve organel içerir ve sitoplazmik RNA miktarları artar ve bunlara büyük lenfositler veya lenfoblastlar da denir (21, 22).

Naif hücrelerin bir kısmı yabancı antijenleri ortadan kaldırabilen moleküller üretme yeteneğine sahip olan efektör lenfositlere farklılaşır; efektör lenfositler arasında yardımcı T hücreleri (Th), CTL'ler ve antikor salgılayan plazma hücreleri bulunur. Genellikle CD4+ olan yardımcı T hücreleri, CD40 ligandı gibi yüzey moleküllerini eksprese eder ve sitokinler salgılar, makrofajlar ve B lenfositleri ile etkileşime girerek aktivasyonlarına yol açar. Sitotoksik lenfositler (CTL) proteinlerle dolu sitoplazmik granüllere sahiptir ve bunlar genellikle tümör hücrelerini veya virüsle enfekte hücreleri tanıyarak öldürürler. Hem CD4+ hem de CD8+ efektör T hücreleri genellikle CD25 (T hücresi büyüme faktörü IL-2 için reseptörün bir bileşeni) ve değiştirilmiş kalıplar dahil

olmak üzere son aktivasyonun göstergesi olan yüzey proteinlerini eksprese eder. Farklılaşmış efektör T lenfositlerin çoğu kısa ömürlüdür ve kendini yenilemez (21-23).

2.2.8. Mast Hücreleri

Mast hücreleri, deride ve mukozal epitelde bulunan ve sitokinler, histamin, ve diğer araçlarla dolu sitoplazmik granüller içeren kemik iliği kaynaklı hücrelerdir. Mast hücreleri, IgE ve IgG antikorları için plazma zarı reseptörlerini ifade eder ve genellikle bu antikorlarla kaplanır. Mast hücre yüzeyindeki bu antikorlar aynı zamanda antijene de bağlandığında, sitoplazmik granül içeriğinin hücre dışı boşluğa salınmasına yol açan sinyal olayları indüklenir. Sitokinler ve histamin dahil olmak üzere granüllerin salınan içeriği kan damarlarında iltihaplanmaya neden olan değişiklikleri teşvik eder (19).

2.3. Pseudomonas Kaynaklı Enfeksiyonlar

Hastaneye ilişkin enfeksiyon türlerinin en fazla rastlanıldığı bölüm yoğun bakım üniteleridir. Burada yatan hasta sayısı çok olduğu ve maruz kaldıkları invaziv girişimler, kronik rahatsızlığa sahip ve teşhisi konmamış hastalar sebebi ile diğer bölümlere nazaran burada enfeksiyon riski daha fazladır (24).

Pseudomonasın mikrobiyolojik özellikleri, nonfermentatif, gram negatif, polar flagellaları ile hareketli, oksidaz pozitif, aerobik basil ve sporsuz oluşuma sahiptir. Anaerob ortamda bazı izolatlar arginin ve nitrat kullanılması ile çoğalabilmektedirler. Floresan bir pigment olan pyosyanin pigmenti, klinik izolatların yarısından fazlasında görülür, müller hinton besiyerinde mavi-yeşil renkte görülür. Farklı bazı türlerinde koyu kırmızı renk ve siyah renk olarak da piyomelanin pigmenti üretebilmektedir ve nitratlardan gaz oluşturmaktadırlar (25).

Kistik fibrozlu hastalarda kronik kolonize olması nedeniyle tekrarlayan *P. aeruginosa* enfeksiyonları görülür. Kistik fibroz hastalarında başlıca morbidite ve mortalite nedeni olması ve hastane enfeksiyonu patojenlerinden biri olması ayrıca çok çeşitli antibiyotiklere intrinsik olarak dirençli olması nedeniyle özel bir öneme sahiptir. En fazla sebep olduğu enfeksiyonlar, pnömoniler, nötropenik hastalar ve HIV enfeksiyonunu da içeren bağışıklığı bozulmuş hastalardaki bakteriyemiler, yanık yarası enfeksiyonları, diyabetik ayak enfeksiyonlarında deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, yüzücülerin kulağında gelişen malign otitis externa, santral sinir sistemi enfeksiyonu, menenjit, kontakt lens kullanımı ile oluşan endoftalmit ve keratit, veya cerrahi ile ilişkili

septik artrit, ürner sistem enfeksiyonları, sıklıkla sonda ve katerizasyona bağı olarak görülür (26).

Taylor ve arkadaşlarının görüşlerine göre 2050 yılında yaklaşık 11 ile 444 milyon kişinin dirençli mikroorganizma enfeksiyonları nedeniyle kaybedileceği öne sürülmektedir (27).

2.4. Sitokinler

Sitokinler polipeptit yapıdadırlar ve çeşitli hücre tiplerinde üretilip salgılanabilirler. Görevleri arasında travma sonrası hücrenin tamiri, yenilenmesi, büyümesi, enflamasyon ve travma sonrası sistemik ve bağışık yanıtın oluşturulmasında rol alarak, enflamatuvar süreci düzenlemek yer alır. Sitokinler tam olarak hormon olmayan ancak benzeyen yapılardır (28).

İlk keşfedildiklerinde sitokinlerin sadece lenfositlerden kaynaklandığı düşünülüyüdünden lenfokin olarak adlandırılmışlardır. Sonraları monositlerden de bu mediatörlerin salınımı tespit edilince, monokin ismi kullanılmaya başlanmıştır. Son yıllarda ise bu faktörlerin sitokin şeklindeki isimlendirmesi yaygınlaşmıştır (28).

Sitokinlerin çok sayıda ve farklı türleri olmasına rağmen ortak birçok özellikleri de mevcuttur (29).

Sitokinler; doğal ve kazanılmış bağışıklığın efektör fazında üretilirler. Enflamasyon ve bağışık yanıtın oluşumunda ve regülasyonunda rol alırlar. Doğal immün yanıtta lipopolisakkarit gibi bakteriyel yapılar mononükleer fagositleri doğrudan uyarıp sitokin üretimini tetikler. T hücreleri de yabancı anijenleri tanır ve sonra sitokinlerini sentezlerler (30).

Salınımları çok kısa süreli ve kendi kendini sınırlayan bir süreçtir. Genellikle aktif molekül veya öncül molekül şeklinde hücrede depolanmazlar. Bu sebepten salınımları için yeni gen transkripsiyonu ile sentezlenmeleri gerekir. Transkripsiyonun aktivasyonu genellikle geçicidir ve bu sırada oluşan sitokinlerin kodlandığı mRNA'lar da stabil olmayan yapılardır. Bundan dolayı sitokin salınımı kısa süreli ve geçici bir olaydır ve bir kez sentezlendiklerinde depolanmaksızın süratle ortama salınırlar (29).

Farklı tipte birçok hücre tarafından üretilirler ve kendilerinden başka diğer sitokinlerin üretimini indükleyebilir (29).

Farklı çok sayıda hücre tipine etki edebilir. Buna pleiotropizm adı verilmektedir. Etkiledikleri hedef hücrede farklı etkiler gösterebilirler. Bazıları aynı anda meydana gelirken, bazı etkiler ise gün, zaman ve dakika gibi farklı zaman aralıklarında oluşabilir.

Etkileri genellikle istenilenden daha fazla olarak gerçekleşir. Birbirlerinin etkilerini modifiye ederler. İki farklı sitokin birbirini antagonize edebileceği gibi sinerjik olarak da etki gösterebilirler (29).

Sitokinlerin etkisi, polipeptid hormonlara benzer şekilde, hedef hücrelerinin yüzeyindeki membran reseptörlerine bağlanmalarıyla başlar. Söz konusu reseptörler transmembran proteinlerdir, hücre dışı (ekstrasellüler) bölgeleri (domainleri) vardır ve spesifik büyüme faktörlerini ve tanır ve bağlanırlar. Sitokini salgılayan hücre, aynı zamanda bundan etkileniyorsa; otokrin etki, komşuluğunda yer alan bir hücre olduğunda parakrin etki ya da aynı hormonlardaki gibi, dolaşıma bırakılan sitokinler uzaklarındaki bir hücreyi de etkiliyorsa endokrin etkilidir denir (16).

Sitokinlerin etkilediği hücrelerde oluşan yanıt çoğunlukla yeni bir mRNA ve protein sentezi ile sonuçlanır. Çoğu hedef hücre için büyüme faktörü gibi etki edip hücre bölünmesini düzenlerler (28, 29).

Lenfoid hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlamak, hematopoezi regüle etmek, birçok hormonun üretilmesini tetikleyip salınımını düzenlemek, immün yanıtı artırarak veya baskılayarak düzenlemek, inflamasyon esnasında görev alan immün sistem hücrelerini aktive etmek ve immün yanıtın gerçekleştiği bölgede kalmalarını sağlamak ve sıklıkla ateş oluşumu ile akut faz yanıtını oluşturmak sitokinlerin etkileriyle meydana gelir (31, 32).

Doğal bağışıklık yanıtlarında sitokinler, NK hücreler ve makrofajlardan, edinsel immün yanıtlarda ise T lenfositlerden salınmaktadır (30). Vücutta oluşan inflamasyon esnasında birçok sitokin ortama salınır bunlar proinflamatuvar ve antiinflamatuvar olarak gruplandırılabilir. Cevap niteliği taşıyan proinflamatuvar sitokinler arasında IL-1 α , IL-1 β , IL-6 ve TNF- α , IFN- γ , transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), IL-2, IL-8, IL-11, IL-17 ve IL-18 bulunur. Proinflamatuvar sitokinlerin verdiği aşırı yanıtı baskılamaya çalışarak enflamatuvar reaksiyonların şiddetini azaltan sitokinler de antiinflamatuvar sitokinler olarak adlandırılır. IL-4, IL-10 ve IL-13 bunların başında gelmektedir (32). İnflamasyon sırasında salınan önemli sitokinler ve işlevleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir (33).

Tablo 2. 1. Sitokinler ve işlevleri (33)

Sitokin	Ailesi	Ana kaynağı	İşlevi
IL-1 β	IL-1	Makrofajlar, monositler	Pro-inflamasyon, proliferasyon, apoptosis, farklılaşma
IL-4	IL-4	Th hücreleri	Anti-inflamasyon, T-hücreleri ve B hücreleri proliferasyon, B-hücreleri farklılaşma
IL-6	IL-6	Makrofajlar, T hücreleri, adiposit	Pro-inflamasyon, farklılaşma, sitokin üretimi
IL-8	CXC	Makrofajlar, epitel hücreleri, endotelial hücreler	Pro-inflamasyon, kemotaksis, anjiogenezis
IL-10	IL-10	Monositler, T-hücreleri, B-hücreleri	Anti-inflamasyon, proinflamatuvar sitokinlerin engellenmesi
IL-12	IL-12	Dendritik hücreler, makrofajlar, nötrofiller	Pro-inflamasyon, hücre farklılaşması, NK hücrelerinin aktivasyonu
IL-11	IL-6	Fibroblastlar, nöronlar, epitelyal hücreler	Anti-inflamasyon, farklılaşma, indüklenmiş akut faz protein
TNF- α	TNF	Makrofajlar, NK hücreler, CD4+ lenfosit, adiposit	Pro-inflamasyon, sitokin üretimi, hücreproliferasyonu, apoptosis, anti-infeksiyon
IFN- γ	IFN	T-hücreleri, NK hücreleri	Pro-inflamasyon, doğal, kazanılmış bağışıklık ve anti-viral etki
TGF- β	TGF	Makrofajlar, T-hücreleri	Anti-inflamasyon, pro-inflamatuvar sitokin üretiminde inhibisyon

Temel görevlerine göre sitokinler 4 grupta toplanabilir:

1. Doğal (native) immünyetede görev alan sitokinler: TNF, IL-6, IL-1, Tip I IFN (interferon), kemokinler

2. Lenfositlerin uyarılıp aktive edilmesi, lenfositlerin büyümesi, differansiasyon (farklılaşma) düzenleyicileri olarak T lenfositlerinin özel antijenleri tanımlarına yardımcı olan sitokinler, IL-4 (IgE sentez regülatörü), TGF- β , IL-2 (T-hücre büyüme faktörü)' dir.

3. İnflamasyon sırasında bağışıklık oluşturmak amacıyla, antijenle uyarılan CD4+ ve CD8+ T lenfositlerinden salınan sitokinler, inflamatuvar lökositleri harekete geçirirler. Aktive olan lökositlerin T hücresi regülasyonuna girmesini sağlarlar. Bu sitokinleri, IFN- γ (mononükleer fagositlerin primer aktivatörü), IL-10 (mononükleer fagositlerin negatif regülatörü), IL-5 (eozinofil aktivatörü), lenfotoksin (nötrofil aktivatörü) IL-12 (NK ve T hücre stimülatörü) 'dir.

4. İmmatür lökosit büyümesine ve farklılaşmasına aracılık eden mediatörler: IL-3 (koloni stimüle eden faktör), c-kit-ligand, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), monosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF), granulosit koloni stimülatör faktör (G-CSF), IL-9, IL-7, IL-11'dir (29).

T hücrelerinin Th1 ve Th2 olarak farklılaşması sitokinler aracılığıyla olur. Dendritik hücrelerden salınan IL-12, Th1 yönünde farklılaşmayı sağlar ve Th1'in temel sitokinleri TNF- α ve IFN- γ 'dır. IL-4, IL-10 ile birlikte Th2 hücrelerine farklılaşmayı sağlayan sitokindir. Makrofajlar tarafından üretilen IL-6 da Th2 yönünde farklılaşmayı uyarıcı sitokinlerden biridir (34).

CD8+ sitotoksik T hücreleri ve yardımcı T hücreleri Th1 hücrelerinden salınan sitokinler harekete geçirip uyararak, patojene karşı yanıtı ve enflamasyonu artırır. Sitotoksik lenfositler tarafından patojen ortadan kaldırıldığında veya azaldığında yanıt Th2 yönüne döner. Th2 sitokinleri bu hücrelerin aktivasyonunu azaltarak enflamatuvar yanıtı azaltır ve T hücrelerini istirahat hallerine döndürür (35).

Th1 ve Th2 hücrelerinin aralarında sayısal dengesizlik ortaya çıkması uygunsuz reaksiyonlara neden olabilir. Th1 hücrelerinin aşırı aktivasyonu otoimmün hastalıklara neden olabilirken, Th2 hücrelerinin aşırı aktivasyonu ise alerjik durumların artışına neden olabilmektedir (26).

2.4.1. Tümör Nekroz Faktörü (TNF)

TNF sepsis gelişim sırasında asıl görevi inflamatuvar kaskadın ana aktivatörü olmaktır. Damar içi pıhtılaşma, hipotansiyon ve organ yetmezliği gibi birçok klinik semptomun ortaya çıkışı sepsis hastalarında çoğunlukla görülmektedir (36). TNF esas olarak aktive makrofajlar ve mast hücreleri tarafından üretilir. TNF konak hücrelerinin gram negatif bakterilere karşı salgıladığı esas mediatördür. TNF; TNF- α ve TNF- β olmak üzere iki çeşittir. TNF- α (kaşektin) aktive makrofajlardan salınır, TNF- β (lenfotoksin) aktif T hücrelerinden salınır. TNF antibakteriyel bağışıklıkta rol oynar ve inflamasyonun önemli bir aracısıdır (37).

IL-1 ile endojen pirojen etki göstermesi ile ateş oluşumuna neden olmaktadır. TNF, IL-1 ve IL-6'nın dolaşıma salınmasında rol oynar. Damar endotelinde prokoagülan ve antikoagülan sistem arasındaki dengeyi bozarak pıhtılaşmaya neden olabilir. Kemik iliğini baskılayarak lenfopeni ve immünsupresyona neden olabilir. Ayrıca bazı hayvan çalışmalarında uzun süreli TNF verilmesi sonucu iştah baskılanması sonucu kaşeksi gözlenmiştir (38).

TNF, gram negatif bakterilere karşı konak hücrelerinin ana mediatörüdür. Başka enfeksiyöz ajanlara karşı yanıtta da görev alır. LPS ile aktiflenen mononükleer fagositlerden salınan TNF, T hücreleri, aktive mast ve NK hücreleri tarafından da salgılanan bir proteindir. Transmembran bir protein olan insan TNF'si glikolize olmayan, 17 kD molekül ağırlığındaki bir proteindir. (39).

TNFR (TNF reseptörü) Tip I sitotoksik aktiviteyi ve fibroblast proliferasyonunu arttıran reseptör iken, T hücre proliferasyonu ise TNFR-Tip II aracılığıyla gerçekleşmektedir. TNFR'lerin yıkımı sonucu ortaya çıkan TNF reseptörlerinin çözünebilen formları (sTNFR) da bulunmaktadır. Çözünebilen formların fonksiyonu, TNF ile yarışarak onun biyolojik etkilerini bloke etmektir (40).

Yaklaşık 10^{-9} M gibi düşük yoğunluklardaki TNF, endotel ve lökosit hücreleri için parakrin ve otokrin etki gösterir. Düşük yoğunluklarda gösterdiği özellikler şunlardır: (41, 42).

TNF, lökositler için ICAM-I, NCAM-I, ELAM-I gibi adezyon moleküllerinin aracılığıyla damar endotel hücrelerini daha yapışkan bir duruma getirerek, yeni hücre yüzey reseptörlerini ekspresse etmeleri için ortam sağlar. TNF ayrıca nötrofilleri de uyararak endotel hücrelerinin yapışma kabiliyetlerini artırır.

Nötrofilleri ve diğer inflamatuvar kökenli lökositleri, mikroorganizmaları yok edecek şekilde uyarır.

IL-6 ile sinerjik etki yaparak, mononükleer fagositleri, IL-1 ve kemokinler ile diğer hücre tiplerini uyarır.

Virüslere interferon gibi etki ederek hücreyi korur. TNF'nin bu etkileri hücreyi mikroorganizmalardan korumak için verilen inflamatuvar cevap için önemlidir (40).

TNF'nin enfeksiyonlara karşı temel sistemik etkileri aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1. Organizmada ateşin oluşumu, TNF ve IL-1 gibi sitokinlerle uyarılmış hipotalamus hücreleri tarafından artırılan araşidonik asit metabolizmasıyla sentezlenen, prostaglandin E₂' nin endojen-pirojen etkisiyle olur. COX inhibitörleri olarak bilinen aspirin gibi prostaglandin sentez inhibitörleri, TNF ya da IL-1'in etkilerini bloke ederek ateşi düşürürler.

2. Vasküler endotel hücreleri etkileyerek ve mononükleer fagositleri aktive ederek IL-6'nın ve IL-1'in dolaşıma salınımını uyarır.

3. Hepatositleri uyararak, C reaktif protein, kompleman faktör 3 haptoglobulin, serum amiloid A ve P proteini, faktör B gibi akut faz proteinlerinin üretimini artırır (41, 42).

4. TNF' nin pıhtılaşma kaskadını aktive etmesi, damar endotelinin prokoagulan ve antikoagulan aktiviteleri arasındaki dengeyi değiştirmesiyle gerçekleşir.

5. Kemik iliğini baskılayıp hücre bölünmesini engellediğinden tedavi maksatlı sürekli TNF verilmesi lenfopeni ve immün yetmezlik oluşturur.

6. IL-1 gibi TNF de iştah azalmasına yol açarak olurken kaşeksiye sebep olur (41, 42).

Gram negatif bakteri kaynaklı sepsiste, TNF çok yüksek miktarda sentezlenir ve serumdaki TNF artışı görülür. Yüksek yoğunluktaki TNF, dolaşımda kollaps ve dissemine intravasküler kanamaya (DİK) neden olur. Yüksek düzeyde infüzyonu ölümcül olan TNF, septik ve endotoksik şokun önemli bir belirteçidir ve şok benzeri bir tabloya sebebiyet verir (39).

2.4.2. IL-1

İki farklı alt üniteden meydana gelen IL-1 α ve IL-1 β 'nın sentezlenmesi iki no'lu kromozom üzerindeki iki ayrı gen tarafından kontrol edilir. Monositler her iki tip IL' yi sentezlese de daha çok IL-1 β üretirler. IL-1, öncelikle makrofajlar, dendritik hücreler, endotel hücreleri, keratinositler, düz kas hücreleri, nötrofiller ve fibroblastlar ve bunların dışında neredeyse bütün hücreler tarafından sentezlenir. Bazı hücrelerde IL-1 sürekli sentezlenir. Bununla beraber hücre, LPS, mikroorganizmalar, muramil dipeptid gibi maddelerle uyarıldıktan sonra daha fazla IL-1 sentezlemektedir. Makrofajlar tarafından IL-1 salgılanır ve CD4⁺T hücreleri, antijen sunan hücrelerde (ASH'de) bulunan ve MHC sınıf II molekülü ile sunulan antijenleri tanır.

Antijenle karşılaşan T hücreleri, TNF, koloni sitümülan faktör (CSF) ve interferon- γ gibi çeşitli sitokinler salgırlar ve bu sitokinler de makrofajları uyararak IL-1 sentezlenmesine neden olur (29).

IL-1 hipotalamusu etkiler ve kortikotropin salgılatıcı faktörün (Corticotropin Releasing Factor - CRF) salınmasına neden olur, bu adrenal korteksi uyararak kortikosteroidlerin salınımına neden olur ve sonuç olarak da steroidler IL-1 ve TNF'nin salınımını inhibe eder. Bu mekanizmalarla IL-1'in negatif geri-bildirim etkisi oluşur (43). Steroidler, B lenfositlerindeki IL-1 reseptörlerinin sayısını çoğaltırlar (44).

IL-1 α ve IL-1 β 'nın her ikisi de potent pro-enflamatuvar proteinlerdir ve immünkompetan hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve işlevlerini arttırıcı etkilere sahiptir (38, 45). IL-1 β , potent bir nötrofil kemoatraktanı olan IL-8 gibi kemokinlerin

sentezini indükler (46). Ayrıca IL-1 β , birçok otoimmün ve enflamatuvar hastalıkta enflamatuvar yanıtları başlatıp etkisini artırır.

2.4.3. IL-10

IL-10, CD4+ T hücrelerinin alt grubu olan TH2 tarafından eksprese edilir. Bununla birlikte nadiren bazı aktif B hücreleri, bir grup TH1 hücreleri, aktif makrofajlar ve bazı non-lenfositik hücre tipindeki keratinositler tarafından da sentezlenir. IL-10'un görevlerinden biri, makrofajlar tarafından sentezlenen TNF, IL-1, IL-12 gibi sitokinlerin üretimini engellemek, diğeri ise makrofajların görevlerini bloke etmektir. Konak hücrelerine zarar vermemek adına artan proinflamatuvar yanıtı dengelemek için makrofajların T hücrelerini uyarırken kullandığı MHC sınıf II moleküllerini ve bazı ko-stimulatörlerin ekspresyonunu azaltarak yapar. Böylece, T hücresi ile olan bağlantı kesilir, bağışık yanıt gerçekleşmez. Makrofajlar üzerine inhibitör etkisinin dışında, IL-1 β lenfositlerini uyarıp insanlarda IgG üretimi için aracı faktör olabileceği düşünülmektedir (47).

2.4.5. İnterferon gama

İnterferon gama (IF- γ) immünomodülatör ve antiproliferatif etkilerinin yanı sıra metabolik aktivitesi yüksek olarak belirtilebilir. İnterferonunun biyolojik çeşitliliğinin yanı sıra moleküler yapı bakımından da birçok türünün tespiti yapılmıştır. IFN-alfa (α), beta (β) ve omega (ω), Tip I'de yer almaktadır ve antiviral etkinlikleri fazladır. Tip II'de ise immün interferon olarak da adlandırılan IFN- γ yer alır (48, 49).

Tümör vakalarında, viral hastalıklarda hücre içi bakteriler de IFN- γ kritik sitokinler sınıflandırılmasına girmektedir. Çeşitli otoimmün ve otoinflamatuvar hastalıklarda IFN- γ ekspresyonu anormal şekilde artış gösterir. Güçlü bir immünstimülatör ve immünomodülatör olarak bilinen IFN- γ viral replikasyonu direk olarak inhibe eder. Doğal immün yanıtta, T lenfosit ve natürel killer (NK) hücreleri tarafından üretilir. Ayrıca antijen spesifik immün yanıtta, CD4 ve CD8 sitotoksik T lenfositlerden üretilmektedir (50).

2.5. Lipopolisakkarit

Gram negatif bakterilerin hücre duvarından elde edilen, bakteriyel endotoksin lipopolisakkarit (LPS), hayvanlarda deneysel septik şok modellerinde kullanılan, glikolipid yapıdaki maddelerdir (51, 52).

"Endotoksin" terimi, bakteriler tarafından üretilen bir toksini ifade etse de, başka bir biyokimyasal adı, "lipopolisakkarittir". Her iki terim de immünolojik aktivitelerini uygun şekilde kapsar ve bakteri hücrelerini sert bir dış ortamdan koruyan çoğu gram negatif bakterinin hücre yüzeyi bileşeni olarak işlev görür (51). LPS ve endotoksin literatürde aynı anlamı verecek şekilde kullanılsalar da birtakım farkları vardır. LPS saflaştırılmış glikolipid yapıda iken endotoksin küçük miktarlarda da olsa farklı olarak, lipitler, lipoproteinler, hücre duvarı proteinleri ve polisakkarit içerir (52).

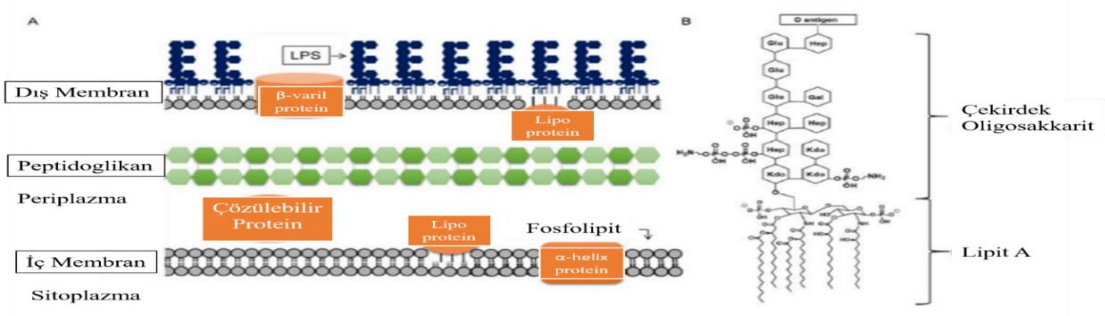
Gram negatif bakterilerin hücre yüzeyindeki amfifilik özellikteki makromoleküller endotoksinleri oluşturur. Endotoksinler, yüksek organizasyonlu canlılarda fizyolojik ve aynı zamanda güçlü patofizyolojik etkiler göstermesi sebebiyle gram negatif bakteriler için ciddi öneme sahip virülans faktörlerini oluştururlar (53).

LPS, *Pseudomonas aeruginosa* için önemli bir virülans faktörü olup gram-negatif bakterilerde dış zarın dış yaprağının ana bileşeni olan kompleks bir glikolipittir. Bu yapı, bakteriyi konak savunmasından koruyan fiziksel bir bariyer oluşturur, konakçı hücre reseptörleri ve antibiyotiklerle doğrudan etkileşimlere girer ve aracılık eder. Endotoksin olarak, konak doku hasarına yol açan bazı olayları ve bununla ilişkili patolojinin çoğunu başlatan güçlü bir sinyal molekülüdür (54).

Önemli bir virülans faktörü olan LPS, *Pseudomonas aeruginosa*'nın hücre yüzeyinde bulunmaktadır. LPS; Lipit A, kor polisakkarit ve O-özgül polisakkarit olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Lipit-A endotoksik özellikten sorumludur (55). O-özgül polisakkarit *Pseudomonas aeruginosa*'nın serotiplerinin tanımlanmasında önemlidir. Kistik fibroz hastalarında *Pseudomonas aeruginosa*'nın çeşitli lipid-A mutantları bulunur ve bakterinin konağa karşı direncinin artmasını sağlar (56).

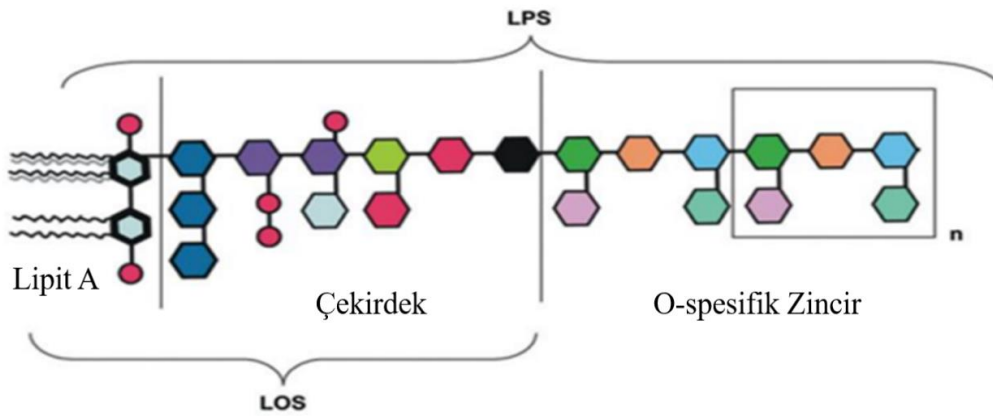
Gram negatif bakteriler, sitoplazmik bileşenleri çevreleyen bir iç zar ve hücreyi çevresinden ayıran dış zardan oluşan çift zarlı bir zarf ile beraber oluşmaktadır. İç ve dış zar peptidoglikan hücre duvarını barındıran, periplazma adı verilen hücresel bölme çevrelemektedirler (57).

Çevrenin oluşturacağı farklı tehditlere karşı birinci savunma mekanizması olarak gram negatif bakterilerde dış zar bu görevi üstlenir. Birçok biyolojik zarın dış zarı fosfolipid çift tabakasından oluşurken gram negatif bakterilerin dış zarı bu şekilde bir oluşuma sahip değildir. Dış kısmını LPS molekülleri oluşturmaktayken iç zarını fosfolipid molekülleri içeren asimetrik çift tabaka oluşturmaktadır (58). Şekil 2.1'de gram negatif bir bakteriye ait hücre duvarı yapısı şematize edilmiştir.



Şekil 2. 1. *E. coli* tarafından üretilen LPS'nin yapısı. (Rooks MG, Garrett WS.'den uyarlanarak Türkçeleştirilmiştir) (57).

LPS üç yapısal kısımdan oluşur; Lipid A, çekirdek oligosakkarit ve O-antijenden oluşan büyük bir glikolipiddir (57, 58). Tür ve suş seviyesinde meydana gelebilecek birçok varyasyon olmasına rağmen, LPS genel itibari ile yapısını korumaktadır. Dış etkenlerden gelen mesajlara yanıt niteliği taşıyan Lipid A'nın yapısı bu şekilde modifikasyona maruz kalır. Çekirdek oligosakkaritler, türler arasında ve hatta bir türün bazı suşları arasında farklılık göstermektedir. O-antijen, bileşenler arasında en çok çeşitlilik meydana getiren LPS bölümüdür. Bazı Gram negatif bakteriler bu kısmı sentezleyemezler. Lipid A ve oligosakkaritten oluşan yapı lipooligosakkarit (LOS) olarak adlandırılır (58). Şekil 2.2.'de LPS'nin moleküler yapısının bölümleri gösterilmiştir.



Şekil 2. 2. LPS'nin Moleküler Yapısı. (Silipo A. ve ark'dan uyarlanarak Türkçeleştirilmiştir) (59). LPS: Liposakkarit, LOS: Lipooligosakkarit.

Bakteriler arasında LPS çeşitlilik göstermektedir, fakat her şartta bu glikolipid hücre yüzeyinin büyük bölümünü kaplar ve hücreyi antibiyotik ve safra tuzları gibi toksik moleküllerin girişinden koruyan bir bariyer oluşturur. Konakçı bağışıklık sistemi tarafından karşılaşılan birincil bakteriyel bileşen olduğundan, LPS genellikle bakteriyel patojenitede önemli bir rol oynar. Lipid A, LPS'nin toksik özelliğinden sorumlu olan kısımdır (60).

Konakta mikrobiyal patojenlere karşı oluşan aşırı reaksiyonun, spesifik olmayan doğuştan gelen doğal bağışıklık sisteminin verdiği reaksiyon sonucu oluştuğu artık yaygın olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, konakçı yanıtı, adaptif (edinilmiş) bağışıklık sistemindeki gibi, antijen işleme ve sunumuyla veya belirli patojene karşı spesifik olarak hedeflenen hücrelerin klonal çoğalmasıyla olmamaktadır. Buna karşılık, konakçı tarafından değil de yalnızca mikrobiyal patojenler tarafından kodlanan; patojenle ilişkili moleküler motifleri veya kalıpları (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP'ler) tanıyan patern tanıma reseptörleri olarak bilinen germ hattı kodlu reseptörler kullanılır. PAMP'lar, gram-negatif bakterilerdeki LPS, gram-pozitif bakterilerdeki lipoteikoik asit ve peptidoglikan gibi bakteri hücre duvarının bileşenlerini ve ayrıca CpG DNA'sını (sitozin-fosfat diesterguanozin açısından zengin bakteri DNA'sı), bakteriyel flagellini ve virüslerdeki çift sarmallı RNA'yı içerir (61).

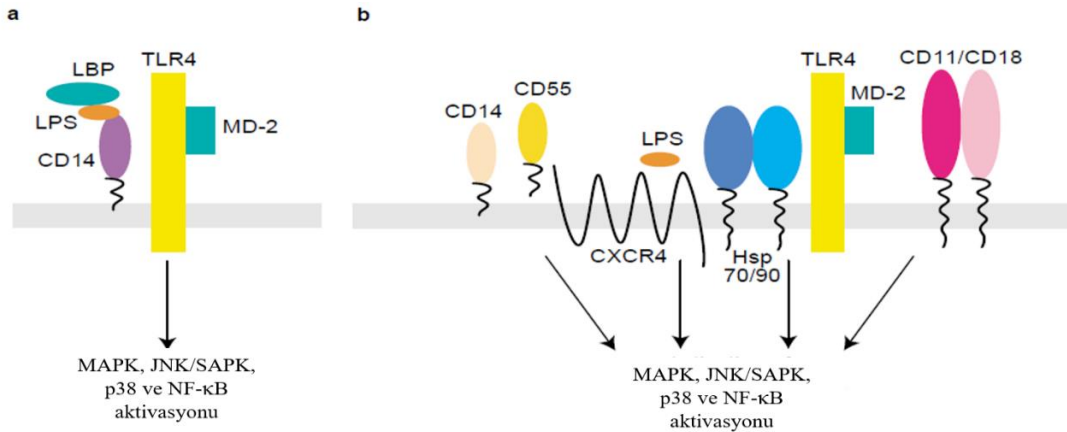
2.5.1. Serum Proteinlerinin Rolü

Bakterisidal geçirgenlik proteini (BPI) ve LPS bağlayıcı protein (LBP) gibi serum proteinleri, LPS ile ilk karşılaşan ve bağlananlardır. Bu proteinlerin ikisi de LPS ile etkileşime girer ancak, bu etkileşimlerin sonucu tamamen farklıdır. BPI, LPS'yi hücrel hedeflerine asla ulaşmayacak şekilde bağlar ve nötralize eder. Aksine, LBP, LPS'ye bağlanır ve daha sonra doğuştan gelen bağışıklık sistemini aktive etmek için onu hücre yüzeyi molekülü olan CD14'e iletir (62). Başka serum proteinlerinin de LPS yanıtına katıldığı gösterilmiştir. Apolipoprotein, LPS'ye bağlanır ve proinflamatuvar sitokin TNF- α 'nın üretimini azaltır (63). LPS aktivitesini nötralize eden başka bir serum proteini laktoferrindir; laktoferrin, LBP ile rekabet ederek CD14 ile LPS etkileşimini inhibe eder (64).

2.5.2. LPS Kaynaklı Aktivasyon Modeli

Şu anda, kabul edilen LPS tanıma modeli, LPS'nin serumda LBP'yi ve LPS-LBP komplekslerinin de hücre yüzeyinde CD14'e bağlandığını gösteren ufuk açıcı keşfe dayanmaktadır (65). CD14, monositler ve makrofajlar gibi miyeloid soyundan gelen hücrelerde eksprese edilen bir reseptördür. CD14 hücre yüzeyine bir transmembran alanı yerine glikosilfosfatidilinositol (GPI) çapası ile bağlandığından, hücre aktivasyonuna yol açan bir sinyali iletmek için Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) ve yardımcı protein MD-2 ile bir trimoleküler reseptör kümesini oluşturur (66, 67) .

Hücre aktivasyonuna, p38 MAPK, c-Jun-N-terminal kinaz/stresle aktive olan protein kinaz (JNK/SAPK) ve transkripsiyon faktörü NF- κ B dahil olmak üzere mitojen ile aktive olan protein kinazları (MAPK'ler) içeren yollar aracılık eder (68-70). Bu yollar, bakteriye karşı koyan IL-1 α , IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin indüklenmesi gibi bir inflamatuvar yanıtla sonuçlanır (71). LPS ile karşılaşan hücrede LPS tanıma modeli Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2. 3. LPS tanıma modelleri. (a) LPS'nin serumda LBP ardından da LPS-LBP kompleksinin monosit hücre yüzeyindeki CD14'e bağlandığı kabul edilen LPS tanıma modeli. CD14'te bir transmembran bölgesi yoktur ve bir sinyal iletmez; bununla birlikte, Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) ve aksesuar protein MD-2 ile ilişkisinin ardından, sinyal iletimi tetiklenir, bu olayda (MAPK), (JNK/SAPK), p38 ve nükleer faktör kapa beta transkripsiyon faktörü (NF-KB) gibi çoklu sinyal moleküllerinin aktivasyonuna yol açar. (b) LPS'nin monosit hücre yüzeyindeki örüntü tanıma reseptörlerine bağlandığı ve bir aktivasyon kümesi oluşturduğu, önerilen LPS tanıma modeli. Çoklu sinyal molekülleri aktivasyon kümesi içinde çoklu reseptörlerden tetiklenir. CD14, TLR4 ve MD-2'ye ek olarak, diğer olası etkileşim molekülleri şunlardır: CD55, kemokin reseptörü 4 (CXCR4), ısı şoku proteinleri (Hsps) ve integrin CD11/CD18. Ancak, doğal bağışık yanıtın çok çeşitli mikrobiyal patojenlere yanıt vermesine olanak sağlayacak farklı kombinasyonel reseptör ilişkilerinin meydana gelmesi beklenebilir (72).

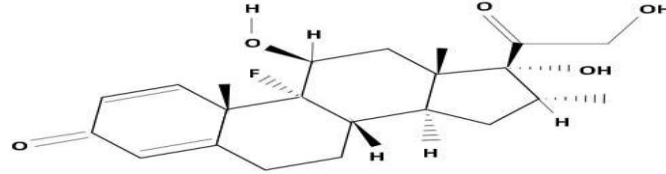
2.6. Glukokortikoidler - Deksametazon

Gösterdikleri yan etkilerden dolayı “İki ucu keskin bıçak” olarak bilinen bu ilaçların yan etkileri moleküler, hücresel ve organ bazında oluşan doğal fizyolojik etkiler olarak kendini gösterir (73). Doğal olarak sentezlenen glukokortikoidlerin (GK) yarı ömrü 60-90 dakika kadar olup karaciğerde metabolize edilerek böbreklerden atılmaktadır. Çeşitli sebeplerle oluşan enflamasyon varlığında vücutta üretilip sistemik dolaşıma geçen interlökin-1(IL-1), IL-6 ve interferon gibi sitokinler hipotalamo-pituiter-adrenal aksı uyarırlar. Sonrasında adrenokortikotropik hormona (ACTH) duyarlı diüurnal ritm kaybolmakta ve 48 saat içinde sonlanan fizyolojik adaptasyon ile sentez kapasitesi onlarca kat artmaktadır (74).

Klinikte en sık kullanılan formlar prednison, prednizolon, metilprednizolon ve deksametazondur. Deksametazonun kan-beyin bariyerini hızlı geçme özelliğinin yanı sıra

metabolik yan etkilerinin daha fazla olmasına rağmen hızlıca kuvvetli etki istenilen durumlarda kısa süreli tercih edilmektedir.

Deksametazon sentetik yapıda bir glukokortikosteroid olup kimyasal yapısı ise adrenal kortikosteroidlerin genel yapısına benzer. Deksametazonun moleküler yapısı Şekil 2.4' te gösterilmiştir. Molekül ağırlığı 392,461063 gram/mol olan deksametazonun kimyasal formülü ise $C_{22}H_{29}FO_5$ şeklindedir (75).



Şekil 2. 4. Deksametazonun moleküler yapısı (75).

Glukokortikoidler; immünosupresif, antiinflamatuvar, ve antiallerjik etkileri sebebiyle tedavilerde sıklıkla kullanılan ilaçlardır (76). Glukokortikoidler; protein katabolizması ve lipolizi arttırırlar, glikoneogenezi uyarırlar, enflamatuvar yanıtı ve immüniteyi güçlü olarak baskılayabilirler (77).

Deksametazon uzun bir antiinflamatuvar etkiye sahip ve potansi hidrokortizonun otuz katı kadardır. Ayrıca antiemetik etkili bir steroiddir. Glukokortikoidler, suprafizyolojik konsantrasyonlarda herhangi bir etkene bağlı akut ve kronik inflamasyonu inhibe ederek antiinflamatuvar etki gösterirler. Antijen tarafından duyarlı lenfositlerin aktivasyonu ya da antijen antikor birleşmesiyle oluşan allerjik inflamasyon, glukokortikoidlerce inhibe edilir (78). Prostaglandin sentezinin inhibisyonu ile oluşan antiinflamatuvar etki dolayısıyla inflamasyon kaynaklı belirtilerin ve uyarıların azaltılmasına; bağırsaklardan serotonin salınımının inhibe olmasına sebebiyet verir. Merkezi sinir sistemindeki permeabilite değişikliklerine bağlı olarak antiemetik etki de göstermektedir (79, 80).

Hücrel tepkileri indükleyen hücre dışı sinyal proteinleri olan sitokinler, protein üretimini, antijen ekspresyonunu ve proliferasyonunu etkiler. Glukokortikoidler, proinflamatuvar sitokinleri, örneğin IL-1 β , IFN α 'yı baskılar (81, 82).

GK'lerin immün sistemde farklı hücre tiplerine olan etkileri özeldir. B hücrelerinde B hücre reseptör ve Toll-benzeri reseptör (TLR) 7 sinyallerini yayan genleri baskılarken, antiinflamatuvar sitokin reseptörlerini, örneğin TGF β R, IL-10R'yi indükleyerek IL-10 salınımını arttırırlar(83). T hücrelerinde ise T hücre reseptör bağlanmasını ve sitokin ekspresyonunu azaltırlar (84). Anti-inflamatuvar açıdan en

önemli görevi ise damar yapısında vazodilatasyon ve lökosit toplanmasına sebep olan pro-inflamatuvar sitokinleri (IL-1, TNF, IL-6), kemokinleri ve araşidonik asit metabolitlerini (prostaglandin E2, lökotrien, histamin) inhibe etmeleridir. (84, 85).

2.7. Timokinon

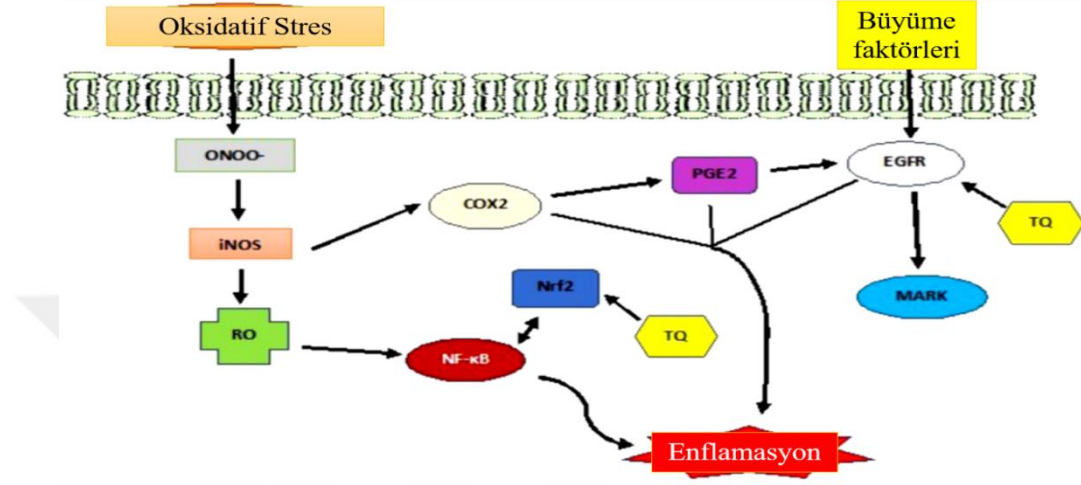
Timokinon, Ranunculaceae familyasına ait olan *Nigella sativa L.*'nin uçucu yağında bulunur (86). Çörek otu olarak bilinen *N. sativa* tohumları, Orta Doğuda insanlar arasında popülerdir. *N. Sativa* tohumlarının biyolojik etkinliğinin çoğunluğu, tohumların %30-48'ini oluşturan yağ bileşenine dayanmaktadır. FDA, çörek otu yağını "Genel Anlamda Güvenli Olarak Tanınan" olarak etiketlemiştir (87). Timokinonun anti-konvülzan, anti-mikrobiyal, kanser önleyici, anti-histaminik, anti-diyabetik, antiinflamatuvar, ve anti-oksidan etkilerini belirten sonuçlar gösterilmiştir (88).

Timokinonun anti-inflamatuvar etkinliğine birkaç moleküler mekanizma ve sinyal yolu aracılık eder (8, 89). Timokinon bu etkinliği ağırlıklı olarak siklooksijenaz (COX) modülasyonu yoluyla uygular (90). Prostaglandin-endoperoksit sentaz olarak da bilinen COX, prostaglandinler ve tromboksan gibi prostanoidlerin oluşumunu katalize eder (91). İzoenzimleri COX-1 ve COX-2'yi içerir. COX-1, iltihaplanma sırasında aşırı eksprese edilir ve büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından modüle edilir. Öte yandan, COX-2 aşırı ekspresyonu meme, pankreas, mide ve akciğer kanserlerinde gözlenmektedir (92-96). Aşırı ifade edildiğinde, COX-2 anjiyogenezi yukarı regüle eder ve apoptozu azaltır (97, 98). Alerjik hava yolu iltihabı olan farelerde, Timokinonun COX-2 ekspresyonunu ve ardından gelen prostaglandin üretimini baskıladığı gösterilmiştir (99).

Timokinon ayrıca hem *in vivo* hem de *in vitro* polimorfonükleer nötrofilleri (PMN) aktive eder (100). PMN'ler, NADPH oksidaz tarafından süperoksit anyon oluşumuna ikincil patojenlere karşı koruyucu bir role sahiptir (101).

Timokinon Nrf2 yoluyla inflamasyonu azaltır. Heme-oksijenaz 1'in (HO-1), Nrf2-ARE'nin (antioksidan yanıt elemanı) aktivasyonuna sekonder olarak timokinon tarafından uyarıldığı gösterilmiştir (102). Bu mekanizma, reaktif oksijen türleri (ROS) ile uyarılan PKB/Akt ve siklik AMP ile modüle edilmiş protein kinaz-alfa (AMPK alpha) tarafından indüklenir (102). Ek olarak, sıçan oral timokinon tedavisi, interlökin 1 beta (IL-1 β), interlökin 6 (IL-6), tümör nekroz faktörü (TNF α) interferon y (IFN γ) ve prostaglandin E2 PGE(2), gibi birkaç proinflamatuvar düzenleyicide azalmaya neden olur (103). Ayrıca, sıçanlarda intraperitoneal timokinon enjeksiyonu, kan lökosit sayısındaki artışı ve plazma IL-6 konsantrasyonunu baskılar (103). Alerjik astımı olan farelerde,

timokinon Th2, sitokinlerin düzeylerini azaltmıştır (104). Ayrıca, timokinon, indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve dönüştürücü büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1) mRNA'larının ekspresyonunu baskılayarak astımla ilişkili inflamatuvar değişiklikleri önler (105). İnflamasyon sırasında timokinonun hücre içindeki moleküler hedefleri Şekil 2.5'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 5. İnflamasyon: Timokinonun moleküler hedefleri (106). Kısaltmalar: iNOS(İndüklenbilir Nitrikoksit Sentaz), ve NF-κB, Siklooksijenaz (COX), Nükleer faktör eritroid 2 (Nrf2),Timokinon (TQ), prostaglandin E2 (PGE2), Epitelial Büyüme Faktörü (EGFR), MAPK

Bu çalışmada LPS'nin neden olduğu septik şokta meydana gelen kontrolsüz inflamatuvar cevaba karşı timokinonun profilaktik etkilerinin analiz edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla timokinonun, LPS ile uyarılmış mononükleer hücrelerde sitokin düzeyleri üzerindeki etkileri incelendi. Timokinonun olası antiinflamatuvar etkileri, sentetik bir glukokortikoid olan ve proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını inhibe ettiği bilinen (107) deksametazon ile de karşılaştırıldı.

3. YÖNTEM

Çalışmalarımızın tamamı Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Tıp Fakültesi Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca çalışmamız Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Kordinatörlüğünce 2021-04-02-MAP14 numaralı proje olarak desteklenmiştir. Çalışmada kan örneklerinin alındığı gönüllülere bilgilendirme yapılmış ve Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 30/11/2022 tarih ve 13-02 numaralı kararıyla onay alınmıştır.

3.1. Periferik Kandan Mononükleer Hücrelerin Elde Edilmesi

LPS ile indüklenen periferik kan mononükleer hücrelerinde olası proinflamatuvar sitokin değişiklikleri üzerine timokinonun etkisini analiz etmek için kullanılan kanlar, herhangi bir kronik hastalık hikayesi olmayan ve son 3 ayda bulaşıcı bir hastalık geçirmeyen sağlıklı ve yetişkin kadın ve erkek gönüllülerden temin edildi. Kanlar dahil edilme kriterlerini taşıyan sağlıklı 5 kadın ve 5 erkekten K2EDTA antikoagülant tüplere 20 ml alınarak bekletilmeden mononükleer hücrelerine ayrıldı.

Mononükleer hücreler (MNH), yoğunluk-kademeli santrifügasyon yöntemi ile izole edildi. Alınan kan örnekleri 1:1 oranında DPBS (kalsiyum veya magnezyum içermeyen Dulbecco's PBS) ile dilüe edildi ve daha sonra 1:3 oranında Ficoll/Histopaq solüsyonu (Sigma, İngiltere) üzerine yayıldı. Hazırlanan örnek 400 g'de 23°C de 30 dakika santrifüj edildi. Plazmanın hemen altındaki ara fazda (bulutsu tabaka) biriken mononükleer hücreler pipet yardımı ile alınarak taze besiyeri ile yıkama işlemine maruz bırakıldı. Yıkama işlemi için mononükleer hücrelerin hacminin yaklaşık 5 katı kadar besiyeri eklendi ve 400 g hızda 18 °C 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak hücreler %10 fetal bovine serum (FBS) (Sigma, Almanya), 2 mM glutamin (Sigma, Almanya) ve 100 unit/mL penisilin-streptomisin içeren RPMI1640 (Sigma, Almanya) besiyeri kullanılarak resüspanse edildi. Tripan mavisi kullanılarak otomatik hücre sayım cihazında (Bio-Rad TC20, ABD) hücre sayımı yapıldı ve kuyucuk başına 1×10^6 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plaklara dağıtıldı. Hücreler, 37 °C sıcaklık, %5 CO₂ ve %95 nemli ortam sağlayan inkübatörde (Thermo Scientific, ABD) inkübe edildi.

3.2. Hücre Proliferasyon Analizi ve Etken Madde Dozlarının Belirlenmesi

Hücre proliferasyon analizi dimetil tiazol difenil tetrazolyum (3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide - MTT) ile yapıldı. MTT yöntemi mitokondriyal aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantitatif saptanmasında kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir (108). Canlı hücrenin mitokondrisindeki enzimatik reaksiyonlar sonucu tetrazolyum halkası kırılarak renk değişimi meydana gelir. Aktif olmayan hücrenin mitokondrisi bu reaksiyonu gerçekleştirmediğinden herhangi bir renk değişimine sebep olmaz (109). Yöntemin temel prensibi, MTT boyasındaki açık renkli tetrazolyum tuzunun, spektrofotometrik olarak ölçülebilen yoğun mor-mavi renkli formazon kristallerine enzimatik indirgenmesine dayanır (108). Buna bağlı olarak oluşan mor formazon kristallerinin yoğunluğu, ortamda bulunan hücrelerin canlılığı ve hücresel aktivitesi hakkında bilgi verir. Bu yöntemle kullanılacak olan herhangi bir terapötik ajanın hücre üzerindeki sitotoksik ya da proliferatif etkileri belirlenebilmektedir.

Çalışmada kullanılan LPS, timokinon ve deksametazon dozlarının belirlenmesi amacıyla üç ayrı donörden alınan kan örneklerinden elde edilen MNH'ler ile artan dozlarda etken madde kullanılarak kültür yapıldı. LPS için 0,1-0.5-1-5-10-25-50-100-200-500 ng/ml konsantrasyonlar, timokinon ve deksametazon için 0,1-0,5-1-5-10-25-50-100-200-500 µM konsantrasyonlar uygulandı. MTT yöntemini uygulamak için hücre sayısı ve canlılık oranları, tripan mavisi, (Sigma-Aldrich, T6146) boyaması kullanılarak hücre sayımı ile belirlendi. Çalışmada kültür kabı olarak 96 kuyucuklu plak kullanıldı ve her kuyuda 1×10^4 sayıda canlı hücre ile çalışıldı. Ekimi yapılan hücrelere etken madde uygulamaları yapıldıktan sonra hücreler 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) solüsyonundan (0,5 mg/mL) 10 µl ilave edilerek 37°C ve %5 CO₂ içeren ortamda 4 saat daha inkübe edildi. Bunun ardından plaklar santrifüj edildi ve besiyeri bir pipet ile dikkatli bir şekilde alınarak çözücü olarak 100 µl DMSO ilave edildi. Formazan kristallerinin çözünmesi için 20 dk daha inkübatörde bekletildi. İnkübasyonu yapılan hücrelerin, mikropalak okuyucu spektrofotometre (Synergy H1, Biotek, Vermont, ABD) ile 570-630 nm absorbans değerinde ölçümleri yapıldı. Bu çalışma sonucunda doz etkileri saptandı ve proliferasyonu negatif etkilemeyen bir doz ile çalışma organize edildi.

3.3. Deney Grupları ve Çalışma Planı

MTT testi ile saptanan uygun dozlar literatürde yer alan çalışmalarla karşılaştırılarak etkin timokinon ve deksametazon konsantrasyonu seçilerek aşağıdaki Tablo 3.1.'de yer alan çalışma grupları oluşturuldu. 1×10^6 hücre/ml/kuyucuk olacak şekilde 2,5 mL içinde 6 kuyucuklu plaklara dağıtılan hücreler, 4 saat ve 24 saat olmak üzere iki farklı inkübasyon süresi boyunca ilaç etkisine maruz bırakıldı. İnkübasyon tamamlandıktan sonra deney gruplarından bir kazıyıcı (scraper) yardımı ile toplanan hücreler 1200g de 4-8 °C aralığında 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernant uzaklaştırılarak RT-qPCR çalışmaları için pelletler -80 °C de saklandı. ELISA analizleri için ise yine aynı protokolün sonunda hücreler, sıvı ortamda çözünebilir formda bulunan sitokinleri tespit edebilmek amacıyla kültür sıvısı ile birlikte toplanarak -20 °C de muhafaza edildi.

Tablo 3. 1. Deney Grupları

I	KONTROL	Besiyeri herhangi bir madde içermiyor.
II	LPS	Besiyeri sadece 100 ng/mL LPS içeriyor.
III	TİMOKİNON 1.DOZ (T1)	Besiyeri yüksek konsantrasyonda, 100 µM timokinon içeriyor.
IV	TİMOKİNON 2.DOZ (T2)	Besiyeri düşük konsantrasyonda, 10 µM timokinon içeriyor.
V	DEKSAMETAZON (D)	Besiyeri sadece 1 µM deksametazon içeriyor.
VI	LPS + TİMOKİNON 1. DOZ (LT1)	Besiyeri LPS ve yüksek konsantrasyonda timokinon içeriyor.
VII	LPS + TİMOKİNON 2. DOZ (LT2)	Besiyeri LPS ve düşük konsantrasyonda timokinon içeriyor.
VIII	LPS + DEKSAMETAZON (LD)	Besiyeri LPS ve deksametazon içeriyor.

3.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time qPCR) Analizleri

3.4.1. RNA Ekstraksiyonu

PCR çalışması için -80 °C de saklanan pellet numunelerinden, RNA ekstraksiyon kiti (Roche, Almanya) kullanılarak, RNA elde edildi. Öncelikle kit içeriği kullanım kılavuzuna göre hazır hale getirildi. Pelletlerin üstüne 200 µL PBS ve 400 µL lizis/bağlama tamponu (Lysis/Binding buffer) eklendi ve 15 saniye vorteks yapıldı. Falkon tüp içerisinde bulunan bu karışım, içinde filtre bulunan toplama tüpüne aktarıldı. Daha sonra 8000 g' de 15 sn santrifüj edildi ve santrifüj sonrası filtre kaldırılarak tüpte biriken süpernatant atıldı ve filtre tekrar tüpe yerleştirildi. DNA'nın uzaklaştırılması amacıyla her bir örnek için 90 µL DNAaz inkübasyon tamponu, 10 µL DNAaz ile karıştırılıp DNAaz karışımı oluşturuldu ve tüplere pipetaj ile eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında bekletilen örneklerin üzerine üzerine 500 µL yıkama tamponu I eklendi ve

(Wash Buffer I) ve 8000 g' de 15 sn santrifüj edildi. Filtre kaldırılarak yine tüpteki süpernatant döküldü ve tekrar filtre yerleştirildikten sonra üzerine 500 µL yıkama tamponu II (Wash Buffer II) eklendi. Tekrar 8000 g hıza 15 sn santrifüj edildi ve filtrenin altında kalan süpernatant döküldü. Daha sonra üzerine 200 µL yıkama tamponu II tekrar eklendi ve 13000 g hızda 2 dk santrifüj edildi. Her basamakta olduğu gibi, filtrenin alt kısmında kalan süpernatant döküldü. Filtreler, bu aşamalarda kullanılan tüplerden alınarak etiketlenmiş steril yeni 1,5 mL eppendorflara yerleştirildi ve üzerlerine 50 µL ayırıştırma tamponu (Elution Buffer) eklendi ve son olarak 8000 g hızda 1 dk santrifüj edildi. Örneklerdeki toplam RNA konsantrasyonlarının saptanması için 2 µL örnek kullanılarak multimod okuyucu ile ölçümler yapıldı. Elde edilen RNA örnekleri, cDNA eldesi için -80 °C dondurucuda saklandı.

3.4.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezlemek için hazır kit (ABM, ABD) kullanıldı. Her bir örnek için hazırlanan sentez tüplerine, RNA ekstraksiyonlarından toplam 1 µg RNA içerecek hacimde örnek miktarı aktarıldı. Tüplere daha sonra kit içeriğinde bulunan RT buffer 4 µL ve Reverse Transcriptase, dNTP, oligo primer ve random primerlerden 1µL eklendi. Her bir tüpte toplam hacim 20 µL olacak şekilde kalan miktar nukleaz free su ile tamamlandı. Tüpler termal döngü cihazına (Applied Biosystems, SimpliAmp, Singapur) yerleştirilerek aşağıda verilen döngü ile cDNA sentezi gerçekleştirildi.

- Reverse transcription1	25°C, 10 dk
- Reverse transcription 2	50°C, 60 dk
- İnaktivasyon	85°C, 5 dk
- Soğutma	4°C, süresiz

3.4.3. RT- qPCR Analizleri

RT-qPCR ile gruplar arasında TNF α , IF γ , IL1 β , IL-10 mRNA ekspresyonlarında oluşabilecek değişikliklerin saptanması hedeflenmiştir. Bu işlem için özgül primerler (Macrogen, Almanya) kullanılmış olup baz dizileri Tablo 3.2'de verilmiştir. Bu özgül primerlerin her biri ile elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak analiz gerçekleştirildi. Bu analizin gerçekleştirilmesinde her bir örnekte kullanılan solüsyonların ve reaktiflerin miktarları Tablo 3.1'de verilmiştir. Buna göre tüplerde hazırlanan örnekler Light cycler

96 cihazında 40 döngüde amplifiye edildi. Amplifikasyon döngüsü Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3. 2. Kullanılan primerler

Primerler ve baz dizileri			
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör alfa	F	5'-CTCTTCTGCCTGCACTTTG-3'
		R	5'-ATGGGCTACAGGCTTGTCACTC-3'
IF- γ	Interferon gama	F	5'-GAGTGTGGAGACCATCAAGGAAG-3'
		R	5'-TGCTTTGCGTTGGACATTCAAGTC-3'
IL-1 β	Interlökin 1 beta	F	5'-CCACAGACCTTCCAGGAGAATG-3'
		R	5'-GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG-3'
IL-10	Interlökin 10	F	5'-GCCTAACATGCTTCGAGATC-3'
		R	5'-TGATGTCTGGGTCTTGGTTC-3'
β -Actin (Housekeeping)	Actin, beta	F	5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3'
		R	5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'

Tablo 3. 3. Primer Mikslerinin Hazırlamak için Gereken Solüsyon ve Reaktif Miktarları

Solüsyon / Materyal	Miktar
Syber Green master mix	12,5 μ l
Özgül Primer	1 μ l
cDNA	1 μ l
Su	10,5 μ l
Toplam	25 μ l

Tablo 3. 4. RT-qPCR Amplifikasyon Döngüsü

Döngü sayısı	Süre	Sıcaklık	Döngü Nedeni
1	15 dakika	95 °C	Taq polimerazın sıcaklıkla aktivasyonu
40	15 saniye	95 °C	Saptanan florokrom prob Sybr Green verilerinin toplanması
	20 saniye	60 °C	
	20 saniye	72 °C	
Melting	10 saniye	95 °C	Spesifik bağlanmanın teyidi için erime eğrisi analizi
	60 saniye	60 °C	
	süresiz	97 °C	

MNH'lerde proinflatuvar TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ sitokinlerinin mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri LightCycler 96 Probes Master qPCR Sistemi (Roche Applied Science) kullanılarak değerlendirildi. Boya olarak, çift iplikli DNA'ya

bağlanabilen SYBR Green kullanıldı. Reaksiyon final konsantrasyonu, üretici firmanın belirttiği protokole uygun olarak hazırlandı ve reaksiyon, steril 8'li PCR stripleri içinde gerçekleştirildi.

qPCR'da optik analiz sonucu elde edilen veriler (Ct) olarak kaydedildi ve hedef proteinlerin ekspresyon seviyeleri house keeping gen olarak belirlenen β -actin (ACTB) ile normalize edildi. Gen ekspresyonu;

$\Delta\Delta Ct = (C_{\text{hedef gen}} - C_{\text{beta actin}})_{\text{tedavi grubu}} - (C_{\text{hedef gen}} - C_{\text{beta actin}})_{\text{kontrol grubu}}$

Formülü kullanılarak 2- $\Delta\Delta Ct$ metodu ile mRNA ekspresyon düzeyi misli olarak azalma ya da artış şeklinde hesaplandı (110).

3.5. ELISA Analizleri

TNF- α , IL-1 β ve IF- γ seviyeleri katı faz sandviç ELISA testi (Elabscience) kitleri kullanılarak yapıldı. Yöntem Sandviç-ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kit içinde bulunan 96 kuyucuklu plaklar TNF- α , IL-1 β ve IF- γ 'ya özgü bir monoklonal antikorlarla kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler mikro ELISA plaka kuyucuklarına eklenir ve spesifik antikor ile birleştirilir. Daha sonra TNF- α , IL-1 β , IF- γ ve avidin-yaban turpu peroksidaz (HRP) konjugatına özgü biyotinlenmiş bir tespit antikoru, her mikro plaka kuyusuna art arda ilave edilir ve inkübe edilir. Serbest bileşenler yıkanarak uzaklaştırılır. Her kuyucuğa substrat çözeltisi ilave edilir. Sadece TNF- α , IL-1 β veya IF- γ , biyotinli tespit antikoru ve avidin-HRP konjugatı içeren kuyucuklar mavi renkte görünecektir. Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma çözeltisi ilave edilerek sona erdirilir ve renk sararır. Optik yoğunluk 450 nm \pm 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Optik yoğunluk değeri, TNF- α , IL-1 β , IF- γ konsantrasyonları ile orantılıdır. Numunelerin optik yoğunluğu standart eğri ile karşılaştırarak numunelerdeki TNF- α , IL-1 β veya IF- γ konsantrasyonları hesaplanır.

Dondurucuda saklanan örnekler, 3 kez dondurma-çözme döngüsüne maruz bırakarak hücrelerin tamamen parçalanması sağlandı. Bu işlem oda ısısına maruz bırakmadan buza gömülü bir ortamda ivedi bir şekilde yapıldı. 2-8°C'de 1500×g'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant toplandı. Elde edilen süpernatantlar yeni bir ependorfa alınarak analizler yapılana kadar -20°C'de saklandı. Her bir örneğe ait ölçümler 3 kere tekrarlandı.

1. Standart çalışma çözeltisi ilk iki kolona eklendi: Çözeltinin her konsantrasyonu, her bir kuyucuğa, yan yana (her kuyucuk için 100 uL) çift olarak eklendi. Örnekler diğer

kuyucuklara eklendi (her kuyucuk için 100 uL). Plaka, kitte verilen sızdırmazlık filmi ile kapatıldı. 37 ° C'de 90 dakika inkübe edildi.

2. Sıvılar kuyucuklardan yıkama yapmadan uzaklaştırıldı. 100 µL Biotinli tespit antikoru çalışma solüsyonu eklendi. Plaka sızdırmazlık filmi ile kapatıldı. Yavaşça karıştırıldı. 37 ° C'de 1 saat inkübe edildi.

3. Sıvılar kuyucuklardan aspire edildi, 350 uL yıkama tamponu eklendi. 1 ~ 2 dakika bekletildi ve her kuyudan solüsyon aspire edildi ve temiz emici kağıda hafifçe vurarak kurulandı. Bu yıkama adımı 3 kez tekrarlandı.

4. Her kuyucuğa 100 µL HRP Konjugat çalışma solüsyonu eklendi. Plaka sızdırmazlık filmi ile kapatıldı. 37 ° C'de 30 dakika inkübe edildi.

5. Sıvılar kuyucuklardan aspire edildi, yıkama işlemi adım 3'te gösterildiği gibi beş kez tekrarlandı.

6. Her kuyucuğa 90 µL substrat reaktifi eklendi. Yeni bir plaka sızdırmazlık filmi ile kaplandı. 37 ° C'de yaklaşık 15 dakika inkübe edildi. Plaka ışıktan korundu. Reaksiyon süresi gerçek renk değişikliğine göre kısaltıldı veya uzatıldı, ancak 30 dakikadan fazla beklenmedi.

7. Her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu eklendi. Durdurma çözeltisinin eklenmesi, substrat çözeltisindeki aynı sırayla yapıldı.

8. Her bir kuyucuğun optik yoğunluğu, dalga boyu 450 nm'ye ayarlanmış bir mikro plaka okuyucu ile bir kerede belirlendi.

Her standart ve numune için yinelenen okumaların ortalamasını alındı, ardından ortalama sıfır standart optik yoğunluğu çıkarıldı. Microsoft Excel'de bulunan log-log algoritması kullanılarak standart eğri elde edildi. Sonuçlar pg/ml olarak ifade edildi.

3.6. İstatistiksel Analiz

MTT analizleri sonucunda gruplarda tüm örneklerden elde edilen absorbans değerleri kontrol grubu 100 olacak şekilde % değerlere çevrildi. RT-qPCR ile elde edilen Threshold cycle (CT) değerlerinin ise referans gen (housekeeping gen, HKG) β -Actine göre normalizasyonu ve fold change (katlı değişim) için $2^{-\Delta\Delta CT}$ hesaplamaları yapıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro Wilk testi ile analiz edildi. MTT analizleri ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve RT-qPCR ile elde edilen rölatif mRNA ekspresyonlarının kat değişim değerleri ve ELISA sonuçları Kruskal-Wallis ile Dunn's çoklu karşılaştırma kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Analizler için GraphPad Prism versiyon 9.0.0 programı kullanıldı.

4. BULGULAR

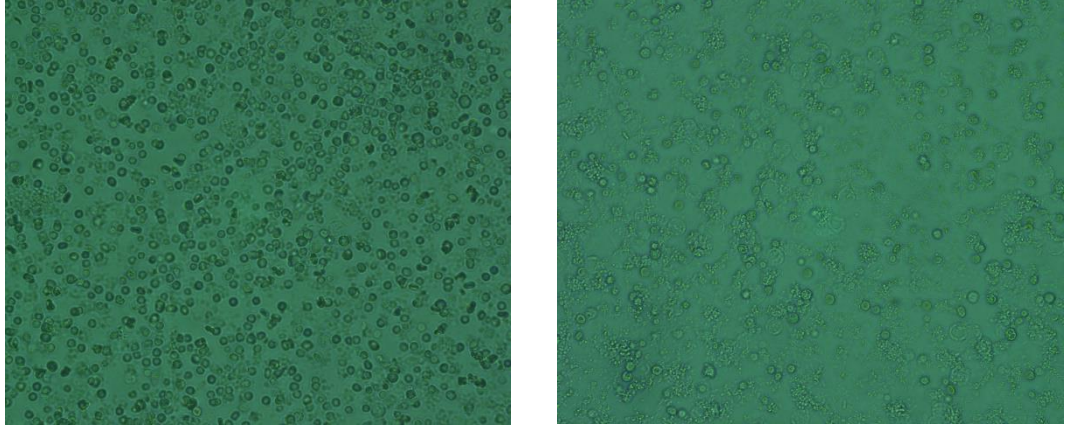
4.1. MTT Bulguları

Timokinon, LPS ve deksametazonun hücrelerin proliferasyonu ve canlılığı üzerine etkilerini analiz etmek amacıyla MTT testi yapıldı. Analizler 24 saat ve 4 saatlik maruziyette etkiler olarak değerlendirildi. Ayrıca mikroskopik analizlerde de hücrelerin proliferasyonuna etkisi değerlendirildi. İnkübatörde 24 saatlik analizlerde özellikle yüksek konsantrasyonlarda etken maddelerin olumsuz etkileri görüldü. Kültür sonrası, tripan blue ile hücrelerin canlılığı ve sayısı kontrol edildi. mRNA sitokin ekspresyon düzeyleri analiz edildi, RNA konsantrasyonlarını düşük saptandı. Özellikle timokinon bulunan gruplarda 40 döngü içerisinde ekspresyon değerleri elde edilemedi. Bununla beraber kontrol amaçlı ELISA da bakıldı. Süre uzadıkça timokinonun hücre aktivitelerinin baskılandığı gösterildi.

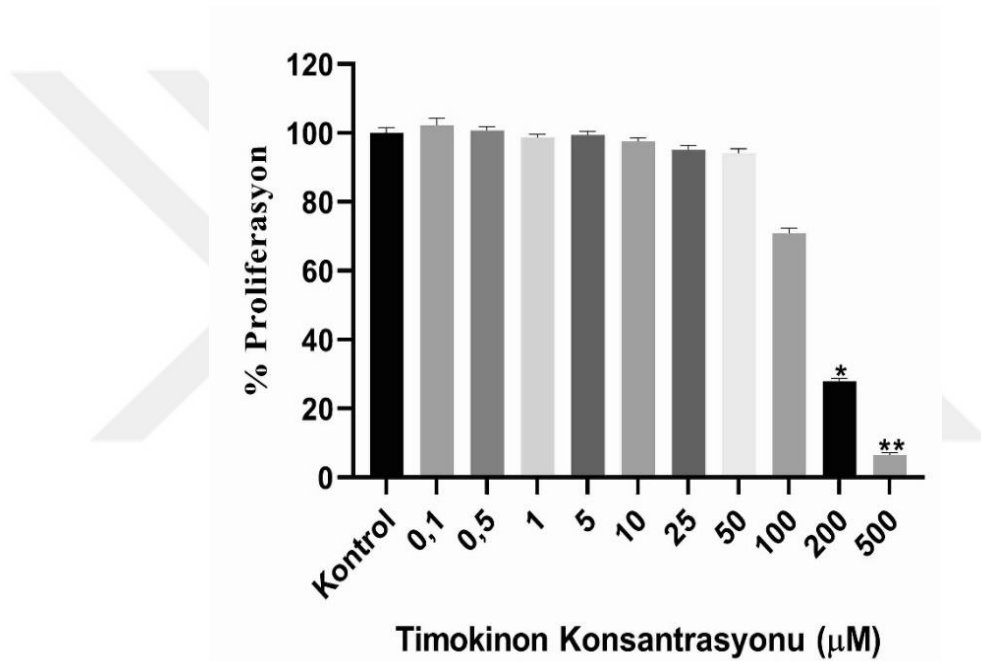
Bu nedenle 24 saatlik çalışma protokolü yerine 4 saatlik inkübasyona maruz bırakılan gruplarda mRNA ekspresyon ve ELISA sonuçları değerlendirildi. Çalışmada 4 saatlik maruziyette kör dışında tüm kuyucuklarda formazon kristallerinin oluştuğu gözlemlendi. Bu konsantrasyonlar arasında literatür desteği ile de timokinon için 10 μ M ve 100 μ M, deksametazon için 1 μ M konsantrasyonları kullanılarak ekspresyon analizleri için gruplar oluşturuldu. LPS etkisi için ise 100 ng/mL konsantrasyon kullanıldı.

Timokinon oldukça yüksek konsantrasyonlara kadar sitotoksik etki göstermedi. Bununla beraber 200 μ M konsantrasyonda proliferasyonda anlamlı azalma tespit edildi. Ek olarak konsantrasyonların hiçbirinde 4 saatlik maruziyette mikroskopik olarak morfolojik değişiklikler saptanmadı fakat 24 saatlik maruziyette hücrelerde morfolojik olarak değişiklik gözlemlendi. Hücrelerin mikroskopik görüntüleri Şekil 4.1’de verilmiştir.

200 μ M konsantrasyon ve sonrasında kontrole göre hücreler üzerinde anlamlı sitotoksik etkilere neden olarak proliferasyonun durduğu tespit edildi. Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Timokinon MTT sonucu elde edilen edilen % proliferasyon ve ortalama standart hata (SEM) sonuçları Tablo 4.1. de verilmiştir.



Şekil 4. 1. Timokininun 100 µM konsantrasyonunda hücrelerin mikroskobik görünüşleri. A 4 saat maruziyet, B 24 saat maruziyet



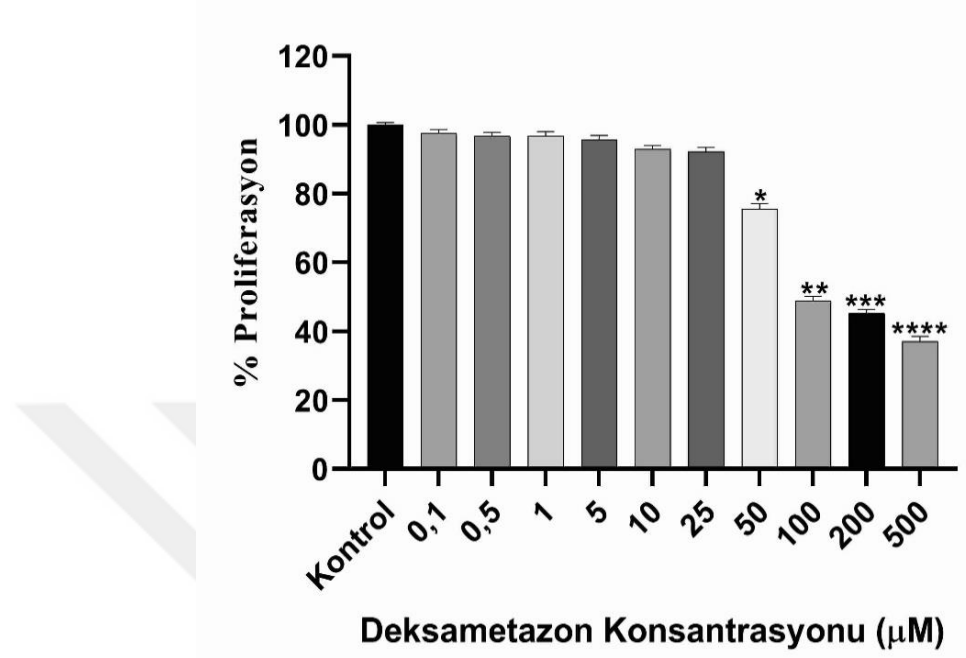
Şekil 4. 2. Timokininun artan konsantrasyonlarında hücre kültüründe MNH'ler üzerine proliferatif/sitotoksik etkileri. MTT analizlerine göre 200 ve 500 µM konsantrasyonlarda anlamlı derecede inhibisyon. Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Tablo 4. 1. Timokininun artan konsantrasyon gruplarında MNH'ler üzerine % proliferasyon/sitotoksisite ortalama, SD ve kontrole göre anlamlı farklarda p değerleri

Timokinin Konsantrasyonu (µM)	Kont	0,1	0,5	1	5	10	25	50	100	200	500
Ortalama % Proliferasyon	100,0	102,2	100,7	98,76	99,42	97,66	95,13	94,16	70,91	27,99	6,600
Std. Error of Mean	1,563	2,003	1,118	0,940	1,013	0,928	1,281	1,319	1,481	0,890	0,695
Timokinin proliferasyon/sitotoksisite – Kontrol grubuna göre anlamlı farklar											
Konsantrasyon										p değeri	
200 µM										0,0252	
500 µM										0,0029	

Kont: Kontrol

Deksametazon 50 μM konsantrasyondan itibaren hücreler üzerinde sitotoksik/antiproliferatif etkilere neden oldu. Deksametazonun MTT sonucu elde edilen % proliferasyon ve ortalama standart hata (SEM) sonuçları Tablo 4.2. ve Şekil 4.3’de verilmiştir.

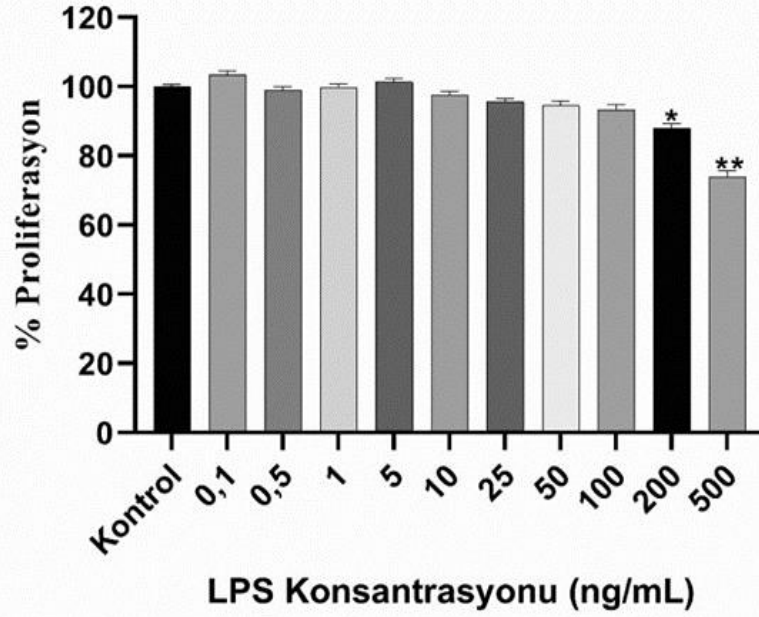


Şekil 4. 3. Deksametazonun artan konsantrasyonlarında hücre kültüründe MNH’ler üzerine proliferatif/sitotoksik etkileri. Mtt analizlerine göre 50 ve 500 μM arasında konsantrasyonlarda anlamlı derecede inhibisyon. Kruskal Wallis ve Dunn’s çoklu karşılaştırma. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$

Tablo 4. 2. Deksametazonun artan konsantrasyon gruplarında MNH’ler üzerine % proliferasyon/sitotoksiste ortalama, SD ve kontrole göre anlamlı farklarda p değerleri

Deksametazon Konsantrasyonu (μM)	Kontr	0,1	0,5	1	5	10	25	50	100	200	500
Ortalama % Proliferasyon	100,0	97,60	96,84	96,89	95,74	93,08	92,31	75,66	48,91	45,31	37,06
Std. Error of Mean	0,636	1,101	0,951	1,088	1,142	0,892	1,203	1,483	1,225	1,082	1,566
Deksametazon proliferasyon/sitotoksiste – Kontrol grubuna göre anlamlı farklar											
Konsantrasyon		p değeri									
50 μM		0,0282									
100 μM		0,0021									
200 μM		0,0004									
500 μM		<0,0001									

LPS’nin yüksek konsantrasyonlarda etkisi timokinon ve deksametazona göre sayısal olarak daha az değerlerde kaldı. Bununla beraber 200 ve 500 μM konsantrasyonlar anlamlı bir sitotoksik etki gösterdi. LPS’nin MTT sonucu elde edilen % proliferasyon ve ortalama standart hata (SEM) sonuçları Tablo 4.3. ve Şekil 4.4’te verilmiştir.



Şekil 4. 4. LPS'nin artan konsantrasyonlarında hücre kültüründe MNH'ler üzerine proliferatif/sitotoksik etkileri. MTT analizlerine göre 200 ve 500 μ M konsantrasyonlarda anlamlı derecede inhibisyon. Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * p <0.05, ** p <0.01

Tablo 4. 3. LPS'nin artan konsantrasyon gruplarında MNH'ler üzerine % proliferasyon/sitotoksiste ortalama, SD ve kontrole göre anlamlı farklarda p değerleri

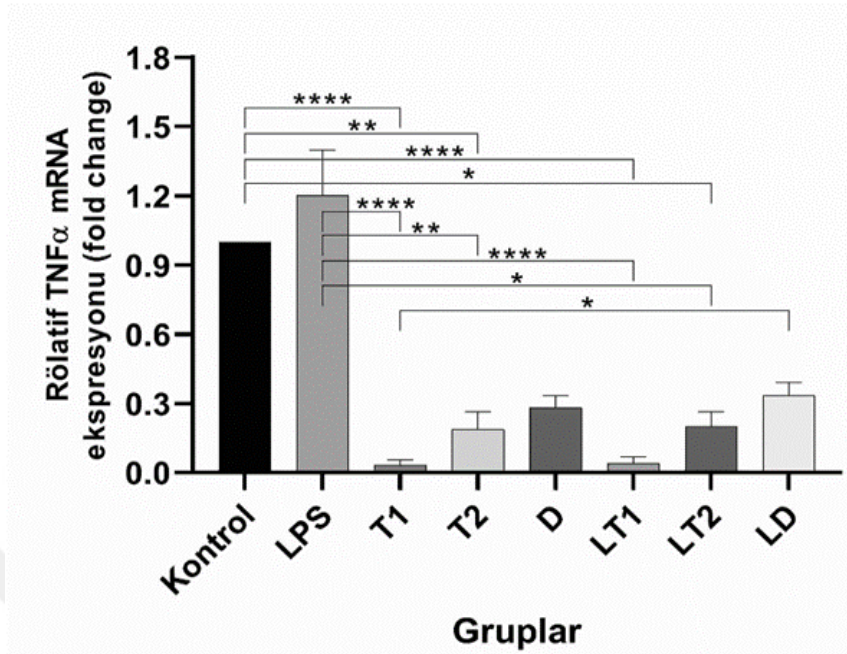
LPS Konsantrasyonu (ng/mL)	Kontr	0,1	0,5	1	5	10	25	50	100	200	500
Ortalama % Proliferasyon	100,0	103,4	99,06	99,75	101,4	97,58	95,69	94,53	93,37	87,92	73,97
Std. Error of Mean	0,624	1,264	1,015	0,952	1,083	0,940	0,895	1,402	1,462	1,423	1,698
LPS proliferasyon/sitotoksiste – Kontrol grubuna göre anlamlı farklar											
Konsantrasyon		p değeri									
200 ng/mL		0,0439									
500 ng/mL		0,0037									

4.2. Hedef sitokinlerin rölatif mRNA ekspresyon bulguları

4.2.1. Rölatif TNF- α mRNA Ekspresyonları

Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre timokinon artan konsantrasyonlarının bulunduğu tüm gruplarda TNF- α mRNA ekspresyonunu oldukça şiddetli bir şekilde azaltmıştır. Bu azalmalar, kontrol grubuna ve LPS gruplarına göre anlamlıdır. Ek olarak dexametazon da ekspresyonu baskılamıştır. LPS tek başına TNF- α ekspresyonu üzerine anlamlı bir değişiklik yapmadı fakat kontrole göre biraz artış göstermiştir. Yalnız timokinonun ve dexametazonun baskılayıcı etkisi LPS'den bağımsız görülmektedir. Çünkü sadece timokinonun ve dexametazonun kullanıldığı gruplar ile beraberinde bu etken maddelerin aynı

konsantrasyonlarını içeren LPS grupları arasında da (LT1, LT2, LD) fark tespit edilmedi. Rölatif TNF- α mRNA ekspresyonları Şekil 4.1'te gösterilmiştir.



Şekil 4. 5. TNF- α mRNA ekspresyonları. Kontrol ve LPS gruplarına karşı diğer grupların ekspresyonlarında anlamlı azalmalar. Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$

TNF- α mRNA ekspresyonunda gruplarda elde edilen ortalama katsayı değişimi (fold change), SD değerleri Tablo 4. 4'te verilmiştir.

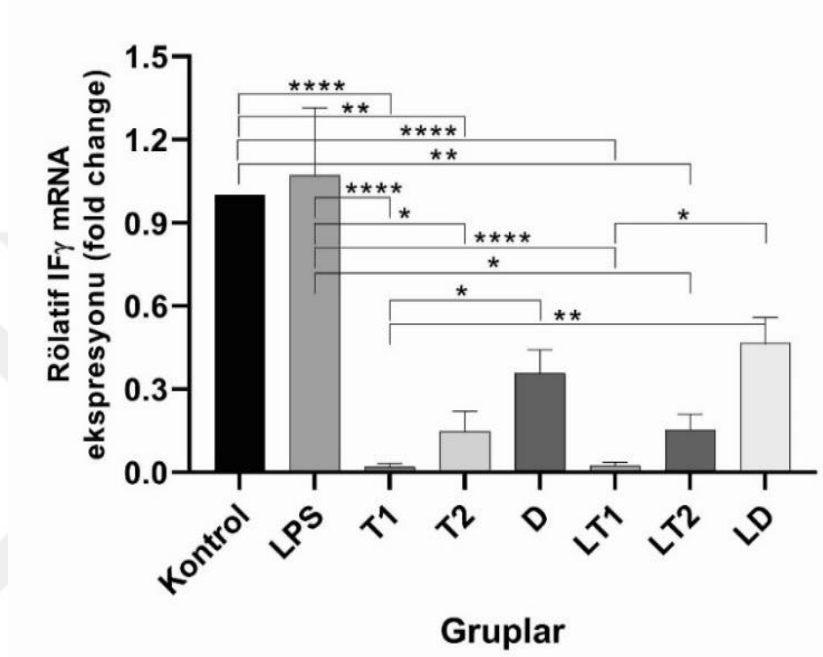
Tablo 4. 4. TNF- α mRNA ekspresyonunda gruplar arasında ortalama katsayı değişimi (fold change), ve Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ gruplar arası anlamlı farklarda p değerleri

TNF- α - Gruplar	Kontr	LPS	T1	T2	D	LT1	LT2	LD
Ortalama Fold Change	1,000	1,204	0,03335	0,1890	0,2828	0,04031	0,1995	0,3373
Ortalama Standart Hata	0,000	0,1949	0,02138	0,07413	0,05268	0,02792	0,06415	0,055
TNF- α mRNA ekspresyonunda gruplar arası anlamlı farklar								
Gruplar arası karşılaştırma					p değeri			
T1 vs. Kontrol					<0,0001			
T2 vs. Kontrol					0,0069			
LT1 vs. Kontrol					<0,0001			
LT2 vs. Kontrol					0,0272			
T1 vs. LPS					<0,0001			
T2 vs. LPS					0,0054			
LT1 vs. LPS					<0,0001			
LT2 vs. LPS					0,0217			
LD vs. T1					0,0394			

4.2.2. Rölatif IF γ mRNA Ekspresyonları

LPS burada da anlamlı bir ekspresyon artışına neden olmadı. Bununla beraber timokinon ve deksametazonun etkileri TNF- α 'da olduğu gibi IF γ mRNA ekspresyonlarını

baskılamıştır. IF γ 'da da LPS etkisinden bağımsız bir azalma görülmektedir. Gruplardaki ekspresyon düşüşleri yine TNF- α 'da olduğu gibi LPS grubuna göre de anlamlıdır. Ek olarak özellikle timokinonun yüksek ve düşük konsantrasyonu deksametazondan daha şiddetli ve anlamlı etki göstermiştir. Rölatif IF γ mRNA ekspresyonları Şekil 4.6.'da gösterilmiştir. IF γ mRNA ekspresyonunda gruplarda elde edilen ortalama katsayı değişimi (fold change), SD değerleri Tablo 4.5.'te verilmiştir.



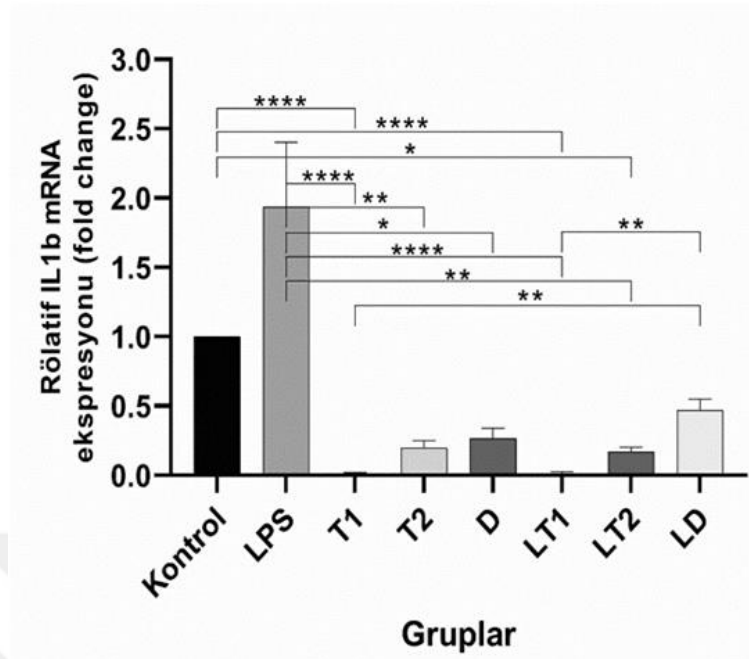
Şekil 4. 6. Rölatif IF γ mRNA ekspresyonları. Kontrol ve LPS gruplarına karşı diğer grupların ekspresyonlarında anlamlı azalmalar. Ayrıca T1'de D ve LD; LT1'de ise LD'ye göre anlamlı azalma. Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$

Tablo 4. 5. IF γ mRNA ekspresyonunda gruplar arasında ortalama katsayı değişimi (fold change), SD Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ değerleri ve gruplar arası anlamlı farklarda p değerleri

IF γ - Gruplar	Kontr	LPS	T1	T2	D	LT1	LT2	LD
Ortalama Fold Change	1,000	1,072	0,01973	0,1479	0,3570	0,02251	0,1538	0,4687
Std. Error of Mean	0,000	0,2434	0,01261	0,07190	0,08474	0,01418	0,05719	0,09109
IF γ mRNA ekspresyonunda gruplar arası anlamlı farklar								
Gruplar arası karşılaştırma				p değeri				
T1 vs. Kontrol				<0,0001				
T2 vs. Kontrol				0,0024				
LT1 vs. Kontrol				<0,0001				
LT2 vs. Kontrol				0,0068				
T1 vs. LPS				<0,0001				
T2 vs. LPS				0,0137				
LT1 vs. LPS				<0,0001				
LT2 vs. LPS				0,0350				
D vs. T1				0,0369				
LD vs. T1				0,0065				
LD vs. LT1				0,0108				

4.2.3. Rölafif IL-1 β mRNA Ekspresyonları

LPS etkisi ile en yüksek ekspresyon artışı IL1 β 'de elde edildi. Bununla beraber kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildi fakat 2 kata yakın bu artış fizyolojik olarak anlamlı kabul edilebilir. Bununla beraber etken maddeler ile maruziyette mRNA ekspresyonlarında diğer analiz edilen sitokinlere benzer sonuçlar elde edildi. Burada da timokinonun yüksek konsantrasyonlardaki etkisi deksametazonun etkisine göre anlamlı bazı sonuçlara sahipti. Rölafif IL-1 β mRNA ekspresyonları Şekil 4.7'de gösterilmiştir. IL-1 β mRNA ekspresyonunda gruplarda elde edilen ortalama katsayı değişimi (fold change), SD değerleri Tablo 4.6.'da verilmiştir.

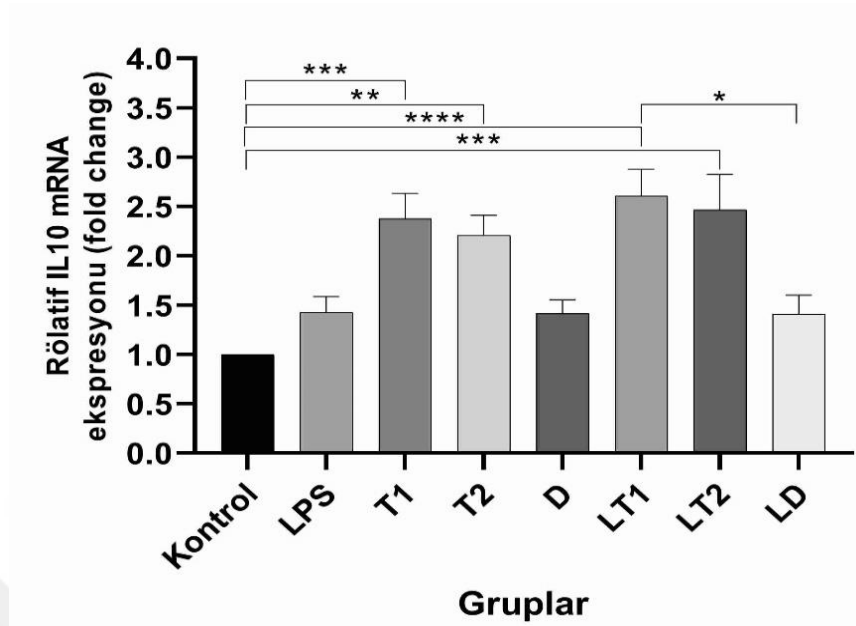


Şekil 4. 7. Rölatif IL1 β mRNA ekspresyonları. Kontrol ve LPS gruplarına karşı diğer grupların ekspresyonlarında anlamlı azalmalar. Ayrıca LD'ye göre T1 ve LT1 gruplarında anlamlı azalma. Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$

Tablo 4. 6. IL1 β mRNA ekspresyonunda gruplar arasında ortalama katsayı değişimi (fold change), SD Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ değerleri ve gruplar arası anlamlı farklarda p değerleri

IL1b - Gruplar	Kontr	LPS	T1	T2	D	LT1	LT2	LD
Ortalama Fold Change	1,000	1,938	0,01157	0,1989	0,2685	0,01245	0,1678	0,4696
Ortalama Standart Hata	0,000	0,467	0,008911	0,05187	0,07171	0,01026	0,03574	0,08136
IL1b mRNA ekspresyonunda gruplar arası anlamlı farklar								
Gruplar arası karşılaştırma					p değeri			
T1 vs. Kontrol					<0,0001			
LT1 vs. Kontrol					<0,0001			
LT2 vs. Kontrol					0,0401			
T1 vs. LPS					<0,0001			
T2 vs. LPS					0,0092			
D vs. LPS					0,0317			
LT1 vs. LPS					<0,0001			
LT2 vs. LPS					0,0048			
LD vs. T1					0,0049			
LD vs. LT1					0,0031			

4.2.4. Rölatif IL-10 mRNA Ekspresyonları



Şekil 4. 8. Rölatif IL-10 mRNA ekspresyonları. Kontrol grubuna karşı timokinin içeren grupların ekspresyonlarında anlamlı artış. Ayrıca LT1 grubunda LD'ye göre anlamlı artış. Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

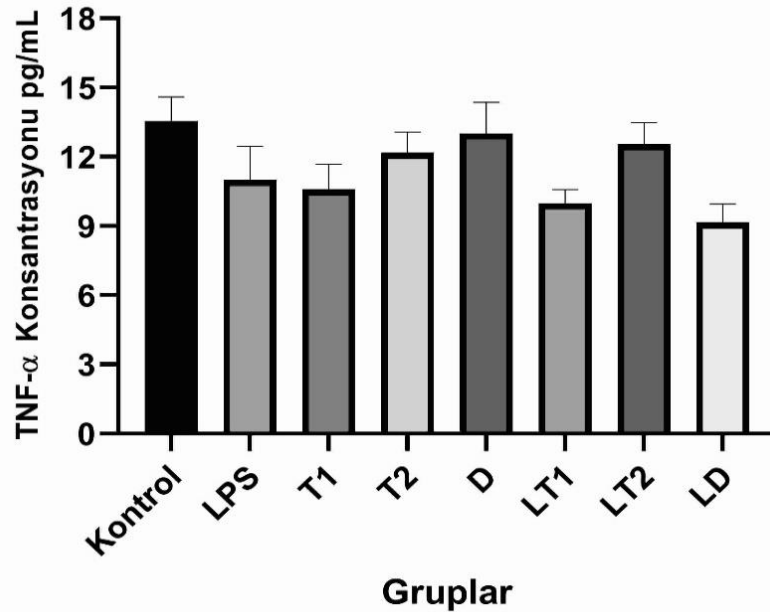
IL10 proinflatuvar sitokinleri inhibe eden önemli bir sitokin olması nedeniyle çalışmamızda mRNA ekspresyonu ile değerlendirildi. Sonuçlarımıza göre deksametazonda da ekspresyon indüklenmiş olsa da farklı olarak timokinin içeren tüm gruplarda artışlar anlamlı derecedeydi. Ayrıca LT1 grubunda meydana gelen artış LD grubuna göre de anlamlı sonuçlandı. Buna göre timokinin IL10 mRNA ekspresyonunu artırmaktadır. Rölatif IL-10 mRNA ekspresyonları Şekil 4.8'de gösterilmiştir. IL-10 mRNA ekspresyonunda gruplarda elde edilen ortalama katsayı değişimi (fold change), SD değerleri Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4. 7. IL10- mRNA ekspresyonunda gruplar arasında ortalama katsayı değişimi (fold change), SD Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ değerleri ve gruplar arası anlamlı farklarda p değerleri

IL10 - Gruplar	Kontr	LPS	T1	T2	D	LT1	LT2	LD
Ortalama Fold Change	1,000	1,428	2,377	2,210	1,416	2,606	2,466	1,414
Ortalama Standart Hata	0,000	0,1569	0,2539	0,2006	0,1406	0,2735	0,3593	0,1896
IL10 mRNA ekspresyonunda gruplar arası anlamlı farklar								
Gruplar arası karşılaştırma		p değeri						
T1 vs. Kontrol		0,0003						
T2 vs. Kontrol		0,0011						
LT1 vs. Kontrol		<0,0001						
LT2 vs. Kontrol		0,0007						
LD vs. LT1		0,0363						

4.3. Hedef sitokinlerin ELISA bulguları

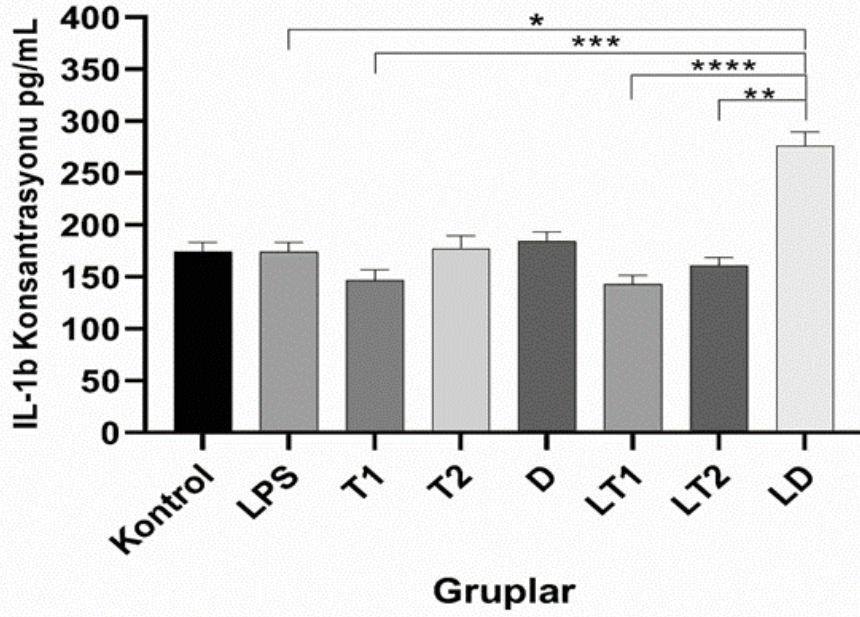
Çalışmamızda IF γ da ELISA ile analiz edilmiş fakat sonuç elde edilememiştir. Olasılıkla lizat içerisinde çalışılan kit için yeterli miktarda protein bulunamadı. Bununla beraber gruplardan elde edilen lizatlarda bulunan TNF- α ve IL-1 β konsantrasyonları ELISA ile analiz edildi. Sonuçlarımızda TNF- α için kontrol grubumuzda 13,55 \pm 3,32 pg/mL konsantrasyon elde edildi. Gruplar arasında bu konsantrasyona göre anlamlı bir fark bulunmadı. TNF- α mRNA ELISA bulguları Şekil 4.9 ve Tablo 4.8’de gösterilmiştir. IL-1 β ’de ise kontrol grubunda 174,1 \pm 29,94 pg/mL konsantrasyon elde edildi. IL-1 β konsantrasyonları Şekil 4.10. ve Tablo 4.9’da gösterilmiştir. Ayrıca IL-1 β için mRNA ekspresyonundaki artış da ELISA sonuçlarına yansımada. Çalışmada etken madde maruziyeti 4 saat ile sınırlıydı bu nedenle protein ekspresyonu gerçekleşmemiş olabilir. Son olarak her iki sitokin için timokinonun yüksek konsantrasyonlarında anlamlı olmasa da azalmalar saptandı.



Şekil 4. 9. Hücre kültüründen elde edilen lizatlarda TNF- α konsantrasyonları. Kruskal Wallis ve Dunn’s çoklu karşılaştırma

Tablo 4. 8. TNF- α için gruplar arasında ortalama konsantrasyonlar, SD değerleri

TNF- α - Gruplar ELISA	Kontr	LPS	T1	T2	D	LT1	LT2	LD
Ortalama Konsantrasyon pg/ML	13,55	11,00	10,58	12,18	13,02	9,985	12,54	9,158
Std. Deviation	3,320	4,598	3,438	2,853	4,236	1,897	2,948	2,534
Ortalama Standart Hata	1,050	1,454	1,087	0,9023	1,340	0,6000	0,9321	0,8013



Şekil 4. 10. Hücre kültüründen elde edilen lizatlarda IL1 β konsantrasyonları. LD grubunda LPS, T1, LT1 ve LT2 gruplarına göre anlamlı artış. Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 **** p <0.0001

Tablo 4. 9. IL-1 β mRNA ekspresyonunda gruplar arasında ortalama katsayı değişimi (fold change), SD Kruskal Wallis ve Dunn's çoklu karşılaştırma. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 **** p <0.0001 değerleri ve gruplar arası anlamlı farklarda p değerleri

IL-1 β - Gruplar ELISA	Kontr	LPS	T1	T2	D	LT1	LT2	LD
Ortalama Konsantrasyon pg/ML	174,1	174,1	146,9	177,7	184,6	143,1	160,8	276,1
Ortalama Standart Hata	9,467	9,049	9,741	12,14	8,982	8,527	7,754	13,57
IL-1 β -konsantrasyonunda gruplar arası anlamlı farklar								
Gruplar arası karşılaştırma								p değeri
LD vs. LPS								0,0470
LD vs. T1								<0,0001
LD vs. LT1								<0,0001
LD vs. LT2								0,0028

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Timokinon üzerine yapılan çalışmalarda antikanserojenik (95), antihiperlipidemik (111) antitümoral (112) antimikrobiyal (113) etkileri yanında çeşitli mekanizmalarla antiinflamatuvar (114) etkileri de tespit edilmiştir. Eski çağlardan beri timokinon kaynağı *Nigella Sativa* en çok antiinflamatuvar özelliğinden dolayı kullanılmıştır (106). Çalışmamızda gündemde olan timokinonun LPS ile indüklenen ve indüklenmeyen mononükleer hücrelerde proinflamatuvar sitokinlerin sentez ve salınımına etkileri değerlendirildi ve inhibe ettiği bulundu. Çalışmamızın başlangıcında öncelikle timokinon, deksam etazon ve LPS'nin hücreler üzerine etkisi üç ayrı örnekte tekrarlı analiz edildi ve ekspresyonların analiz edileceği gruplarda kullanılacak konsantrasyonlara karar verildi. Mezenkimal kök hücre, pankreatik kanser hücre hattı ve MNH'ler ile 0,1-100 µM arasında artan konsantrasyonları ile yapılan bir çalışmada timokinonun sitotoksik etkileri analiz edilmiştir. Timokinonun mezenkimal kök hücre ve kanser hücreleri ile 100 µM konsantrasyonda 24 saatlik maruziyette sitotoksik olduğu bildirilmiştir. . Bunun aksine hiçbir konsantrasyonun 24 saatten daha uzun süreler için dahi MNH'ler için sitotoksik bir etki göstermediği hatta düşük konsantrasyonlarda proliferasyona katkı sağladığı gösterilmiştir (115). Ek olarak farklı bir çalışmada 10 µM konsantrasyonun rat mikroglia hücrelerinin, 25 µM'ın ise bazı hücre hatları ve peritonel makrofajların canlılığını olumsuz etkilemediği saptanmıştır (116). Sistemik skleroz ve romatoid artritte MNH'ler ve lenfositlerde sitokinlerin ekspresyonunun deksametazon ile nasıl etkilendiğini tespit etmek amacıyla etken maddenin 1 µM konsantrasyonu kullanılmıştır (107, 117). Çeşitli hücre grupları ile yapılan araştırmalarda LPS farklı konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Bununla beraber genellikle 100 ng/ml konsantrasyonun etkileri sonrası sitokin tespitine gidilmiştir (118-121). LPS'nin artan konsantrasyonları ile yaptığımız çalışmalara göre 100 ng/ml konsantrasyonun üstünde bu hücreler üzerine olumsuz etkilerini tespit ettik. Bu nedenle diğer birçok çalışmada olduğu gibi çalışmamızda da stimülasyon için 100 ng/ml LPS kullanılmıştır.

LPS özellikle proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu teşvik etmekte ve bunun sonucu olarak sepsisin gelişmesine katkı sağlamaktadır (122, 123). Bununla beraber deksametazonun da içinde bulunduğu steroid grubu ilaçlar proinflamatuvar yanıtın söndürülmesi amacıyla deneysel olarak da kullanılmaktadır (107, 117). Çalışmamızda LPS ile uyarılan ve uyarılmayan MNH hücrelerinin timokinona karşı verdiği yanıtlar, deksametazona karşı verdiği yanıtlarla karşılaştırılmıştır. Bu konuda

yapılan kültür temelli çalışmalar genellikle bu şekilde karşılaştırılmamıştır. Bu durum timokinonun sepsiste erken dönemde immün yanıtı modüle edebilmesinin önemini göstermektedir.

Timokinon, LPS ve deksametazonun sitotoksik etkilerinin analizi, 24 saatlik LPS maruziyeti ile hücrelerin zarar gördüğünü gösterdi ve hücre canlılığında dramatik bir düşüşe yol açtı. Buna rağmen kontrol amaçlı bu hücrelerdeki mRNA sitokin ekspresyon düzeyleri analiz edildi, bununla beraber ELISA testi de çalışıldı. Ancak yeterli sonuçlar elde edilemedi. Yapılan çalışmalarda en başta elde edilen RNA konsantrasyonları da oldukça düşüktü. Özellikle timokinon bulunan gruplarda 40 döngü içerisinde ekspresyon değerleri elde edilemedi. Bu nedenle 24 saatlik çalışma protokolü yerine 4 saatlik inkübasyona maruz bırakılan gruplarda mRNA ekspresyon ve ELISA sonuçları değerlendirildi.

Timokinonun, inflamasyon yolağında bulunan siklooksijenaz, prostaglandin ve lökotrienlerin yanında proinflamatuvar sitokinlerin biyosentezini önlediği immünomodülatör ve antiinflamatuvar etkileri üzerine çalışmalar bulunmaktadır (124). Çalışmamızda LPS ile uyarılan hücelere aynı zamanda timokinon uygulanmış ve profilaktik etkiler analiz edilmiştir.

Timokinonun immünomodülatuar ve antiinflamatuvar etkilerinin analiz edildiği araştırmaların derlendiği bir çalışmada birkaç deney hayvanı ve hücre hatları ile yapılan çalışmaların özeti sunulmuştur. Bu çalışmalara göre otoimmün hastalıklar ve astımda timokinonun olumlu etkileri saptanmıştır. Ek olarak hücrel ve humoral bağışıklık yanıtlarında sitokin ve hücre tipleri üzerine etkileri olduğu aktarılmıştır (124). Araştırmaların bir kısmı hastalık modelleri üzerine tasarlanmıştır. Bununla beraber çalışmalar arasında insan bağışıklık sistemine ait bir çalışma bulunmaktadır ve timokinonun lipooksijenaz yolağını ve dolayısıyla lökotrienlerin sentezini bloke ettiğini bildirmektedir (125). Çalışmamızda farklı olarak sağlıklı gönüllülerden alınan kan örneklerinden elde edilen, lenfosit ve monosit gruplarını içeren mononükleer hücreler kullanılmıştır.

Uçan S.U. ve ark.(126) yaptığı çalışmada 0,02 µg/mL, 0,1 µg/mL, 2.5 µg/mL, 12.5 µg/mL, 50 µg/mL, 72.5 µg/mL ve 1087.5 µg/mL son konsantrasyonlarında kullanılan timokinon yoğunluklarının hiç biri MTT testi ile sığır MNH kültürlerinde 24 ve 38 saatlik inkübasyon sonrası sitotoksik bulunmamıştır. Ek olarak timokinon yalnız (50 µg/mL) veya mitojen ile beraber bulunduğu tüm kültürlerde kontrole göre anlamlı ölçüde mitojenik bulunmuş ve proliferasyonu, kontrole göre anlamlı derecede artmış

olarak saptamışlardır. Sığır periferik mononükleer hücreleri uzun süreli inkübasyonda ve yüksek konsantrasyonda timokinona toleranslı iken bizim yaptığımız çalışmada insan MNH lerinde ise 200 µM konsantrasyondan itibaren kontrole göre anlamlı derecede sitotoksik etki gösterdi. Sığır kanı hücreleri ile insan kan hücrelerinin dayanıklılığının farklı olması sitotoksik profillerinin farklı olabileceğini düşündürmüştür. MTT sonuçlarına ve literatüre göre timokinonun 10 µM düşük doz ve 100 µM yüksek doz olmak üzere 2 farklı dozu çalışmaya dahil edildi. Sonuçlarımız kontrole göre hücre canlılığının timokinonun 100 µM olarak uygulanan konsantrasyonunda % 30 kadar azaldığını göstermektedir. Olasılıkla bu konsantrasyon hücrenin canlılığı ile birlikte metabolizmasını da olumsuz etkilemekte ve ek olarak ekspresyonu dramatik şekilde baskılamaktadır. Bununla birlikte yukarıdaki çalışma gibi çeşitli hücre gruplarında oldukça yüksek konsantrasyonlar da kullanılmıştır. Bunun aksine 10 µM timokinon herhangi bir sitotoksitite göstermemiştir, ayrıca 100 µM kadar kuvvetli olmasa da ekspresyonu da baskılamıştır.

De Almeida A R. ve ark. sistemik sklerosisli hastaların MNH'lerinde deksametazonun sitokinlerin inhibisyonu üzerindeki etkisine baktıkları çalışmada, deksametazonun konsantrasyonunu 1 µM olarak kullanmışlardır (107). Petersen A. ve ark. insan lens epitel hücre kültürü üzerinde deksametazonun etkisini inceledikleri çalışmada 0.1 µM, 1 µM, 10 µM, and 100 µM konsantrasyonlarına bakmış ve 100 µM da peroksit üretiminde artış sonucu sitotoksik etki tespit etmişlerdir (127). Bizim çalışmamızda ise deksametazon literatür bilgileri ve MTT sonuçlarına göre 1 µM dozda kullanılmış ve 4 saat sonra değerlendirilmiştir. Deksametazonun 100 µM konsantrasyonu MTT analizine göre ve kontrole göre sitotoksik etki gösterdi. Deksametazonun 50 ve 500 µM arasındaki konsantrasyonları proliferasyonu anlamlı derecede inhibe ettiği görülürken, timokinonda bu sınır 200-500 µM düzeyindedir. Dolayısıyla immünsüpresif etkisi olduğu da bilinen timokinonun bu açıdan deksametazonla karşılaştırıldığında yüksek konsantrasyonlarının hücreye daha az zarar veriyor oluşu da onu değerli kılan faktörlerden biridir.

Xu, J ve ark.nın yaptığı çalışmada (128) LPS ile uyarılan RAW264.7 makrofajlarda, nar çiçeği ekstraktının antiinflamatuvar etkisine bakmak için yapılan MTT testi sonrası 1 µg/mL LPS kullanmışlardır. Grebovska A. ve ark. yaptığı *Helicobacter pylori* LPS'sinin anti-fagositik aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada *H. pylori* LPS'sinden 10-100 ng/ml kullanmışlardır (129). LPS'nin literatürdeki genel

kullanımına ve MTT sonuçlarına dayanarak biz de çalışmamızda 100 ng/mL olarak kullandık.

Çalışmalarda hematopoietik sisteme ait çoğunlukla monosit ve monosit kaynaklı olmak üzere tek tip hücre analiz edilmiştir (8, 130). Çalışmamız farklı olarak kandan elde edilen ve kültüre alınan mononükleer hücrelerin bütünü ile tasarlanmış ayrıca LPS ve timokinon eş zamanlı uygulanmıştır. LPS'nin neden olduğu septik şokta meydana gelen sitokin artışına karşı timokinonun profilaktik etkilerinin sitokinler üzerinden analiz edilmesi hedeflenmiştir. Benzer şekilde profilaktik etki ile ilgili deney hayvanlarıyla yapılan bir çalışmada timokinon uygulamasından birkaç saat sonra LPS ve *E. coli* kullanılarak sepsis modeli oluşturulmuştur. Tedavi edilen gruplarda biyokimyasal, böbrek ve karaciğer fonksiyonları ile ilişkili değerleri korumasının yanında özellikle 0,75 mg/kg timokinon uygulaması IL1- α ve IL10 serum seviyelerinde azalmaya neden olmuştur. Ek olarak TNF- α ve IL2 seviyesi azalma eğilimi göstermiştir (131). Tüm bu sonuçlar ile karşılaştırıldığında çalışmamızda timokinon uygulaması ile elde edilen pro-inflamatuvar sitokin seviyeleri diğer çalışmalarla uyumludur. Bunun aksine anti-inflamatuvar sitokin olan IL10 artış yönünde eğilim göstermiştir (131). LPS ile oluşturduğumuz inflamasyon modelinde gönüllü donörlerden alınan kanlardan ayırdığımız MNH'ler bulunmaktadır. Ancak *in vivo* ortamda LPS ye karşı oluşan inflamasyonda, bizim modelimizde bulunmayan immün sistemin makrofaj, nötrofil gibi pek çok hücresi ile immün sistem dışındaki epitelyal hücreler de etkin rol almaktadır. Bizim deneyimizde bu hücrelerin bulunmaması, LPS'nin şiddetli bir inflamasyon oluşturamamasını, buna bağlı olarak da mRNA artışını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulamamızın bir nedeni olabilir.

Timokinonun birçok inflamatuvar mediatörü inhibe ederek antiinflamatuvar özellikler gösterdiği *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir (8). Örneğin; sıçanlarla yapılan bir çalışmada, timokinonun TNF- α ve IL-6 seviyelerini azaltarak ve çeşitli genlerin regülasyonu aracılığıyla, T lenfositlerini gama-ışınlamasına bağlı apoptozdan koruduğu gösterilmiştir (132).

Hossen J.M. ve ark. *in vivo* ve *in vitro* ortamda sitokin mRNA ekspresyon seviyelerini belirlemek için RAW264.7 (fare makrofaj hücre hattı) hücreleri, (12,5–25 μ M) 30 dakika ve U937(insan monosit hücre hattı) 3 saat süreyle timokinon ile ön işleme tabi tutup, ardından LPS RAW264.7 hücreleri için 1 μ g/mL eklenip 6 saat inkübe ederken U937 hücrelerine 10 μ g/mL eklenip 12 saat tekrar inkübe etmişler. Ayrıca *in vivo* olarak da hepatit ve gastrit fare modelleri üzerinde yaptıkları çalışmada, mRNA ekspresyon

düzeyleri, IRAK1 enziminin lusiferaz doğrulama deneyleri ve western blotla nitrik oksit üretimini, inhibe edilmiş NO sentaz (iNOS), tümör nekroz faktörü (TNF)- α , interlökin (IL)-6 ve IL-1 β ifadesini siklooksijenaz (COX)-2 sinyal yolağını, güçlü bir şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir (8). Çalışmamızda insan monosit ve lenfositleri kısa süreli (4 saat) inkübasyonda timokinonun düşük ve yüksek dozunun bulunduğu tüm gruplarda TNF- α mRNA ekspresyonunu oldukça şiddetli bir şekilde azalttığı görülmektedir. Ek olarak deksametazon da ekspresyonu baskılamıştır. Bununla beraber bu azalmalar, kontrol grubuna ve LPS gruplarına göre anlamlıdır. LPS tek başına ekspresyon üzerine anlamlı bir değişiklik yapmadı fakat kontrole göre biraz artış gösterdi. Bunun sebebinin, deneyimizde LPS yi 0,1 μ g/mL (100ng /mL) kullanıp daha kısa süre inkübe etmiş olmamız olabileceğini düşündürmektedir. Bununla beraber timokinon nun LPS deki artıştan bağımsız olarak, LPS ile etkileşime girmeden 'TNF- α ' yı oldukça anlamlı bir şekilde baskıladığı görülmüştür.

IF γ THP-1 hücreleri tarafından salınarak makrofajları fagositoz için uyaran proinflamatuvar sitokinlerden biridir (133). Makini K. Cobourne ve ark. LPS/IFN γ ile aktive olan BV-2 mikroglial hücrelerinin timokinon tedavisinin, nöroprotektif proteinlerin ekspresyonunda önemli bir artışa, inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunda önemli bir azalmaya ve NF κ B yolağının hedef genlerinin ekspresyonunda bir azalmaya neden olduğunu ELISA ve RT-qPCR ile göstermişlerdir (118). Huwait E.ve ark. timokinon tedavisinin hücre canlılığı üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını ve IFN- γ 'ya yanıt olarak monosit kemoatraktan protein (MCP-1) ve hücreler arası adezyon molekülünün (ICAM-1) ekspresyonunu azalttığını göstermiş ek olarak, THP-1 hücre göçünün, MCP-1'in yokluğunda veya varlığında timokinon tarafından inhibe edildiğini de belirlemişlerdir (134). İnsan monosit hücrelerinde yaptığımız çalışmada da TNF- α 'da olduğu gibi IF γ mRNA ekspresyonlarını baskılamıştır. IF γ 'da da LPS etkisinden bağımsız bir azalma görülmektedir. Gruplardaki ekspresyon düşüşleri yine TNF- α 'da olduğu gibi LPS grubuna göre de anlamlıdır. Timokinonun düşük ve yüksek konsantrasyonlarının deksametazona göre daha şiddetli ve anlamlı etki göstermiştir.

IL-1 β doğuştan gelen bağışıklık sisteminin hücreleri tarafından üretilen güçlü bir proinflamatuvar sitokindir (135). Bir sinyal sekansı olmadan üretilir ve geleneksel diye tabir ettiğimiz ER- golgi protein salgılama yolunu izlemez, bunun yerine enflamasyonun şiddetine uzaklığına ve inflamatuvar etkenin şiddetine bağlı olarak farklı salgılanma yollarını kullanır. Salınan IL-1 β , lizozomlarla birleşerek hücre dışına gönderilebilir veya muhtemelen uzaktaki bir yangısal bölgeye göndermek için minik veziküllerle

ekzozozomlar oluşturarak gönderilir ya da kaspaz-1 e bağlı oluşan plazma porlarından direk hücre dışına çıkabilir (136). Burada kullanılan salgılama yolları, enflamatuvar uyarının gücü ve IL-1 β 'nin çoğunun doğrudan elde edilebilir gibi görünmesi ve IL-1 β 'nin plazmada çok kısa bir yarı ömre sahip olması, gerekli olan IL-1 β seviyelerini saptamayı zorlaştırabilir. IL-1 β 'yi düşük konsantrasyon timokinon çok ciddi baskılamıştır. Ayrıca deksametazon da TNF α ve IF γ 'dan çok daha şiddetli bir şekilde IL-1 β 'yi baskılamıştır. Diğerlerinden farklı olarak LPS IL-1 β 'nin kontrole göre yaklaşık 2 kat daha fazla artışına neden olmuş, yalnız yine de kontrole LPS arasında istatistiksel anlamda artış gözlenmemiştir.

IL-10' da LPS tek başına da bir artışa neden olmuştur. İnflamatuvar uyarana bağlı olarak immün sistem koruyucu olarak IL-10 sentezini artırmış olabilir. Bununla birlikte timokinon baskılanmamış bir miktar artışa neden olmuş görünüyor.

ELISA bulgularına baktığımızda TNF- α değerlerinde kontrole göre, biraz azalma mevcuttur. Aynı zamanda mRNA sonuçlarında LPS etkisiyle TNF'de yükselme saptanmışken bu olağan durum ELISA sonuçlarında saptanmamıştır. Timokinon kullanılan gruplarda bir miktar azalma mevcut ancak, en fazla azalma yüksek doz timokinon kullanılan grupta mevcut ancak bu da yüksek dozun hücre proliferasyonu üzerine % 30 azalma yapmasından kaynaklanıyor olabilir. İnkübasyon süremizin 4 saatle sınırlandırılmış olmasından dolayı, bu süre zarfında hücre içinde bu proteinlerin korunup korunmadığını, yıkımının gerçekleşip gerçekleşmediğini bilemiyoruz. Mevcut durumda daha uzun inkübasyon zamanlarında (24 saat) testin tekrarlanması durumunda kültür negatif yönde etkilendi. 4 saatlik inkübasyonda, LPS nin daha düşük dozunda, daha yüksek konsantrasyonlarda timokinon ile veya timokinonun daha düşük konsantrasyonlarında inkübasyon süresini daha da uzatarak denemek de mümkün görünmektedir.

Tek başına LPS nin olduğu grupta ve deksametazonun olduğu grupta herhangi bir artış görülmezken LD grubunda, deksametazonun etkisiyle IL- 1 β 'nin artışı saptanmıştır. Bu sonuç mRNA ekspresyonlarında görülen azalmanın aksine bir durum oluşturmaktadır. Retrospektif olarak çalışmamız manipülasyon hatası açısından analiz edildi fakat herhangi bir neden tespit edilemedi. Bununla beraber ELISA sonuçlarımızda gönüllülerden alınan tüm örneklerde bu gruba ait değerler diğerlerine göre yüksek saptandı. Protein üretiminin mekanizması çok yönlü ve karmaşık olduğu düşünüldüğünde bu sonuçların elde edilmesi bir çok nedene bağlı olabilir. IF γ ELISA ile analiz edilmiş

fakat sonuç elde edilememiştir. Olasılıkla lizat içerisinde çalışılan kit için yeterli miktarda protein bulunamadı.

COVID-19'un sebep olduğu sitokin fırtınası ile oluşan inflamatuvar yanıt, konağın bağışıklık tepkisinin ve bunun sonucunda oluşan tahribatın önemini ve büyüklüğünü bir kez daha göstermiştir (137). Ortoloni C.ve ark.tüm dünyadan katılan 60 hastanenin verileriyle yaptığı randomize kontrollü çalışmada; sitokin fırtınasını kontrol altına almak için uygulanan hidrosiklorokin tedavisinin COVID-19 ile hastaneye yatırılan hastalarda, hiçbir fayda sağlamadığını, deksametazon tedavisinin ise mekanik ventilasyon uygulanan COVID-19 hastaların ölümlerini ancak üçte bir oranında azalttığını göstermiştir (138). NF-κB, proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin (TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 ve MCP-1) ekspresyonunu regüle ettiği için sitokin fırtınasına neden olması bakımından çok önemlidir (137, 139, 140). Hossen J.M. ve ark. timokinonun hücre içi hedefinin COX-2 sinyal yolağı üzerinden NF-κB'yi inhibe ettiğini göstermişlerdir (8). Bu bağlamda NF-κB'nin inhibisyonuna yönelik bir terapötik müdahale "sitokin fırtınasını" kontrol edebilmesi açısından timokinonu bir potansiyel olarak düşündürmektedir.

Yapılan daha önceki çalışmalarla birlikte, çalışmamızda LPS ile indüklenen inflamasyonda proinflamatuvar sitokin seviyelerinin timokinon ile azaltılabileceği görülmektedir. Buna karşın antiinflamatuvar yanıtın desteklenebileceğine dair kanıtlar elde edilmiştir. Bununla beraber LPS dışında hastalık kaynaklı inflamatuvar yanıtların tedavisinde de faydalı olabileceğine dair kanıtlar da bulunmaktadır (106). Ayrıca etkileri nedeniyle koronavirüs ile meydana gelen aşırı immün cevabın dindirilmesinde potansiyeli olduğuna dair çeşitli varsayımlar öne sürülmüştür (141).

Bu çalışmada deney grupları bağımsız gruplar olarak tasarlandı. Hücrelerin önce LPS'ye maruz bırakılıp daha sonra timokinonun etkilerinin değerlendirildiği çalışmalardan farklı olarak timokinon ve LPS aynı anda konularak etkileri değerlendirildi. Bununla timokinonun profilaktik etkilerinin gösterilmesi amaçlandı. Yaptığımız bu çalışma, sadece monositler ya da tek tip hücre hattı ile değil immün yanıtın önemli faktörleri olan insan mononükleer hücrelerinin tamamı ile *in vitro* olarak yapıldı. Bu sayede hücre-hücre etkileşimleri kısmi olarak sağlanarak immün sistem uyarımı açısından simülasyon oluşturan bir model kullanılmaya çalışıldı.

Halk arasında çörekotu yağının kontrolsüzce, inflamasyon olmaksızın kullanılması, tıpkı deksametazonda olduğu gibi, immünsüpresyon gösterdiğinden hastalıklara açık kapı bırakabilir. Buna rağmen sentetik glukokortikoidlerin hücresel ve

organ bazında verdiği zarar düşünöldüğünde timokinon daha güvenli bir alternatif olabilir.

Timokinonun, etkilerinin daha güvenilir bir şekilde değerlendirmek için yapılacak *in vivo* çalışmalara gereksinim vardır.



6. KAYNAKLAR

1. Markwart R, Saito H, Harder T, Tomczyk S, Cassini A, Fleischmann-Struzek C, et al. Epidemiology and burden of sepsis acquired in hospitals and intensive care units: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med.* 2020;46(8):1536-51.
2. Kaya E, Grassi L, Benedetti A, Maisetta G, Pileggi C, Di Luca M, et al. In vitro Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms With Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:187.
3. Nathwani D, Raman G, Sulham K, Gavaghan M, Menon V. Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2014;3(1):32.
4. Wang Y, Gloss B, Tang B, Dervish S, Santner-Nanan B, Whitehead C, et al. Immunophenotyping of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Septic Shock Patients With High-Dimensional Flow Cytometry Analysis Reveals Two Subgroups With Differential Responses to Immunostimulant Drugs. *Front Immunol.* 2021;12:634127.
5. Goyal SN, Prajapati CP, Gore PR, Patil CR, Mahajan UB, Sharma C, et al. Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development of Thymoquinone: A Multitargeted Molecule of Natural Origin. *Front Pharmacol.* 2017;8:656.
6. Apte RN, Voronov E. Interleukin-1--a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions. *Semin Cancer Biol.* 2002;12(4):277-90.
7. Morsi NM. Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria. *Acta Microbiol Pol.* 2000;49(1):63-74.
8. Hossen MJ, Yang WS, Kim D, Aravinthan A, Kim JH, Cho JY. Thymoquinone: An IRAK1 inhibitor with in vivo and in vitro anti-inflammatory activities. *Sci Rep.* 2017;7:42995.
9. Yanbakan S. Virüslerin İmmün Sistemden Kaçış (Viral Evazyon) Stratejileri,. *Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri Dergisi.* 2011;2(3):175-81.
10. Songu M, Katılmış, H. . Enfeksiyondan Korunma Ve İmmün Sistem. *Journal Of Medical Updates.* 2012;2(1):31-42.
11. Janeway CA, Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. . *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*2004.
12. Male D, Champion, B., Cooke, A. *The İmmune System. Advanced Immunology.* 21991. p. 1-15.
13. Pakbaş. İ. Cep Telefonlarından Yayılan 900 mhz Elektromanyetik Alanın Rat İmmün Sistemi Üzerine Etkilerinin Araştırılması [Uzmanlık Tezi]. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2008.
14. Valins W, Amini S, Berman B. The Expression of Toll-like Receptors in Dermatological Diseases and the Therapeutic Effect of Current and Newer Topical Toll-like Receptor Modulators. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2010;3(9):20-9.
15. Fang L, Lonsdorf AS, Hwang ST. Immunotherapy for advanced melanoma. *J Invest Dermatol.* 2008;128(11):2596-605.

16. Abbas AKL, A.; Pillai, S. Cells and Tissues of the Immune System. Cellular and Molecular Immunology. 10th Edition ed. Philadelphia: Elsevier; 2021.
17. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010;327(5966):656-61.
18. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669-92.
19. Delves PJM, S.J.; Burton, D.R.; Roitt, I.M. . Innate immunity. *Roitt's Essential Immunology*. 13th edition ed. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, Inc.; 2017.
20. Delves PJM, S.J.; Burton, D.R.; Roitt, I.M. . Specific acquired immunity. *Roitt's Essential Immunology*. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, Inc.; 2017.
21. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity*. 2008;29(6):848-62.
22. Tuma RA, Pamer EG. Homeostasis of naive, effector and memory CD8 T cells. *Curr Opin Immunol*. 2002;14(3):348-53.
23. Schluns KS, Lefrancois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(4):269-79.
24. Kendirli T. Yoğun Bakım Ünitelerinde Hastane Enfeksiyonu. D Y, editor. Ankara: Akademisyen Kitabevi; 2018.
25. Pier GB, Ramphal, R. *Pseudomonas aeruginosa*. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2005.
26. Laboratory surveillance of *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas* spp. bacteraemia in England, Wales and Northern Ireland: 2018 Public Health England; 2020.
27. Taylor J, Hafner, M., Yerushalmi, E., Smith, R., Bellasio, J., Vardavas, R., Bienkowska-Gibbs, T., Rubin, J. Estimating the economic costs of antimicrobial resistance, Model and Results. Santa Monica, CA; 2014.
28. Noronha IL, Niemir Z, Stein H, Waldherr R. Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 1995;10(6):775-86.
29. Abbas AK. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: Elsevier; 2018.
30. Abbas AK, Lichtman, A. H., Pillai, S., Baker, D. L., Baker, A. . Cellular and molecular immunology. Philadelphia.2015.
31. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*. 2007;13(10):1173-5.
32. Vezzani A, Granata T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia*. 2005;46(11):1724-43.
33. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2018;9(6):7204-18.
34. Sompayrac LM. How the immune system works. Hoboken, United States: John Wiley and Sons Ltd; 2022.
35. Özbal Y. Temel İmmunoloji: Nobel kitapevi LTD.; 2000.

36. Lv S, Han M, Yi R, Kwon S, Dai C, Wang R. Anti-TNF-alpha therapy for patients with sepsis: a systematic meta-analysis. *Int J Clin Pract.* 2014;68(4):520-8.
37. Song R, Kim J, Yu D, Park C, Park J. Kinetics of IL-6 and TNF-alpha changes in a canine model of sepsis induced by endotoxin. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012;146(2):143-9.
38. Güner İ, Özmen, D., Bayındır, O. . Sitokinler. . *T Klin J Med Sci*,17. 1997.
39. Güner İ, D. Özmen, O. Bayındır. Sitokinler. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences.* 1997;17:65-74.
40. Jaattela M. Biologic activities and mechanisms of action of tumor necrosis factor-alpha/cachectin. *Lab Invest.* 1991;64(6):724-42.
41. Kuş AD. Sepsisli hastalarda mortalite belirteçleri. izmir: Dokuz Eylül Üniversitesi 2010
42. Harris RL, Musher DM, Bloom K, Gathe J, Rice L, Sugarman B, et al. Manifestations of sepsis. *Arch Intern Med.* 1987;147(11):1895-906.
43. Carter A, Merchav S, Silvian-Draxler I, Tatarsky I. The role of interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha in human multiple myeloma. *Br J Haematol.* 1990;74(4):424-31.
44. Baykal Y, Karaayvaz, M. , Kutlu, M. İnterlökinler. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences.* 1998;18(2):77-84.
45. Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Radeke HH, Stein JM. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;324(1):23-33.
46. Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Watanabe K, Tateishi H, Nishiyama T, et al. IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol.* 1994;96(3):432-6.
47. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:165-90.
48. Parslow TG SD, Terr AI, Imboden JB. . *Medical immunology: McGraw Hill Professional.*2001.
49. Engelhardt M, Terpos E, Kleber M, Gay F, Wasch R, Morgan G, et al. European Myeloma Network recommendations on the evaluation and treatment of newly diagnosed patients with multiple myeloma. *Haematologica.* 2014;99(2):232-42.
50. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol.* 2007;96:41-101.
51. Kawahara K. Variation, Modification and Engineering of Lipid A in Endotoxin of Gram-Negative Bacteria. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5).
52. İSKİT A. Sepsiste Deneysel Modeller. *Yoğun Bakım Dergisi.* 2005;5(2):133-6.
53. Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Muller-Loennies S, Mamat U, et al. Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;216:39-81.

54. King JD, Kocincova D, Westman EL, Lam JS. Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immun*. 2009;15(5):261-312.
55. Murray PR, Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A. Tıbbi mikrobiyoloji. Başustaoglu AC, editor. Ankara: Atlas Kitapçılık.; 2014.
56. Karatuna O, Yağcı, A. . *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. *Türk Mikrobiyoloji Dergisi*. 2008; 38(1), :42-51.
57. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(6):341-52.
58. Moison E, Xie, R., Zhang, G., Lebar, MD, Meredith, T. C., Kahne, D. . Antibiotics-based fluorescent probes for selective labeling of Gram-negative and Gram-positive bacteria in living microbiotas. *Science China-Chemistry*. 2017; 61(7)::1-5.
59. Silipo A, Erbs G, Shinya T, Dow JM, Parrilli M, Lanzetta R, et al. Glyco-conjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiology*. 2010;20(4):406-19.
60. Perez-Hernandez EG, Delgado-Coello B, Luna-Reyes I, Mas-Oliva J. New insights into lipopolysaccharide inactivation mechanisms in sepsis. *Biomed Pharmacother*. 2021;141:111890.
61. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;413(6857):732-8.
62. Tobias PS, Soldau K, Iovine NM, Elsbach P, Weiss J. Lipopolysaccharide (LPS)-binding proteins BPI and LBP form different types of complexes with LPS. *J Biol Chem*. 1997;272(30):18682-5.
63. Hubsch AP, Powell FS, Lerch PG, Doran JE. A reconstituted, apolipoprotein A-I containing lipoprotein reduces tumor necrosis factor release and attenuates shock in endotoxemic rabbits. *Circ Shock*. 1993;40(1):14-23.
64. Ellass-Rochard E, Legrand D, Salmon V, Roseanu A, Trif M, Tobias PS, et al. Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun*. 1998;66(2):486-91.
65. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990;249(4975):1431-3.
66. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 1999;189(11):1777-82.
67. Akashi S, Shimazu R, Ogata H, Nagai Y, Takeda K, Kimoto M, et al. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol*. 2000;164(7):3471-5.
68. Weinstein SL, Gold MR, DeFranco AL. Bacterial lipopolysaccharide stimulates protein tyrosine phosphorylation in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(10):4148-52.

69. Hambleton J, Weinstein SL, Lem L, DeFranco AL. Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(7):2774-8.
70. Swantek JL, Cobb MH, Geppert TD. Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol Cell Biol*. 1997;17(11):6274-82.
71. O'Neill L. The Toll/interleukin-1 receptor domain: a molecular switch for inflammation and host defence. *Biochem Soc Trans*. 2000;28(5):557-63.
72. Triantafilou M, Triantafilou K. Sepsis: molecular mechanisms underlying lipopolysaccharide recognition. *Expert Rev Mol Med*. 2004;6(4):1-18.
73. Cannon GW. Kortikosteroidler dahil immunsupresif ilaçlar. *Cecil Medicine*. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi; 2015. p. 159-61.
74. Çayakar A. Klinik pratikte steroid kullanımı. *Ulusal Romatoloji Dergisi*. 2021;13(2):73-84.
75. Singh H, Singh JR, Dhillon VS, Bali D, Paul H. In vitro and in vivo genotoxicity evaluation of hormonal drugs. II. Dexamethasone. *Mutat Res*. 1994;308(1):89-97.
76. Malkawi AK, Alzoubi KH, Jacob M, Matic G, Ali A, Al Faraj A, et al. Metabolomics Based Profiling of Dexamethasone Side Effects in Rats. *Front Pharmacol*. 2018;9:46.
77. K ÖMO. Tonsillektomi Yapılan Hastalarda Peritonsiller İnfiltrasyon İle Yapılan Deksametazon Ve İntravenöz Yapılan Deksametazon Uygulamasının Sonuçlarının Ağrı Açısından Karşılaştırılması. : Atatürk Üniversitesi.; 2016.
78. Palancıoğlu A Kİ, Can T, Selvi F, Çakarer S ve Yaltrık M. Oral Cerrahide Postoperatif Ağrı Ve Ödem Kontrolünde Kortikosteroidlerin Rolü. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*. 2012; 6::84-91
79. Liu K, Hsu CC, Chia YY. Effect of dexamethasone on postoperative emesis and pain. *Br J Anaesth*. 1998;80(1):85-6.
80. Wattwil M, Thorn SE, Lovqvist A, Wattwil L, Gupta A, Liljegren G. Dexamethasone is as effective as ondansetron for the prevention of postoperative nausea and vomiting following breast surgery. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2003;47(7):823-7.
81. Galon J, Franchimont D, Hiroi N, Frey G, Boettner A, Ehrhart-Bornstein M, et al. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J*. 2002;16(1):61-71.
82. Almawi WY, Beyhum HN, Rahme AA, Rieder MJ. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J Leukoc Biol*. 1996;60(5):563-72.
83. Franco LM, Gadkari M, Howe KN, Sun J, Kardava L, Kumar P, et al. Immune regulation by glucocorticoids can be linked to cell type-dependent transcriptional responses. *J Exp Med*. 2019;216(2):384-406.
84. Cain DW, Cidlowski JA. After 62 years of regulating immunity, dexamethasone meets COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(10):587-8.

85. Alexaki VI, Henneicke H. The Role of Glucocorticoids in the Management of COVID-19. *Horm Metab Res.* 2021;53(1):9-15.
86. Tavakkoli A, Mahdian V, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Review on Clinical Trials of Black Seed (*Nigella sativa*) and Its Active Constituent, Thymoquinone. *J Pharmacopuncture.* 2017;20(3):179-93.
87. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod.* 2012;75(3):311-35.
88. el Tahir KE, Ashour MM, al-Harbi MM. The respiratory effects of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in guinea-pigs: elucidation of the mechanism(s) of action. *Gen Pharmacol.* 1993;24(5):1115-22.
89. Kalamegam G, Alfakeeh SM, Bahmaid AO, AlHuwait EA, Gari MA, Abbas MM, et al. In vitro Evaluation of the Anti-inflammatory Effects of Thymoquinone in Osteoarthritis and in silico Analysis of Inter-Related Pathways in Age-Related Degenerative Diseases. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:646.
90. Al Wafai RJ. *Nigella sativa* and thymoquinone suppress cyclooxygenase-2 and oxidative stress in pancreatic tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pancreas.* 2013;42(5):841-9.
91. Minghetti L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004;63(9):901-10.
92. Lu C, Soria JC, Tang X, Xu XC, Wang L, Mao L, et al. Prognostic factors in resected stage I non-small-cell lung cancer: a multivariate analysis of six molecular markers. *J Clin Oncol.* 2004;22(22):4575-83.
93. Cascinu S, Scartozzi M, Carbonari G, Pierantoni C, Verdecchia L, Mariani C, et al. COX-2 and NF-KB overexpression is common in pancreatic cancer but does not predict for COX-2 inhibitors activity in combination with gemcitabine and oxaliplatin. *Am J Clin Oncol.* 2007;30(5):526-30.
94. Singh B, Berry JA, Shoher A, Ramakrishnan V, Lucci A. COX-2 overexpression increases motility and invasion of breast cancer cells. *Int J Oncol.* 2005;26(5):1393-9.
95. Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejwani S, Menon M, et al. Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 2007;67(16):7782-8.
96. Richardsen E, Uglehus RD, Due J, Busch C, Busund LT. COX-2 is overexpressed in primary prostate cancer with metastatic potential and may predict survival. A comparison study between COX-2, TGF-beta, IL-10 and Ki67. *Cancer Epidemiol.* 2010;34(3):316-22.
97. Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, Leitao D, Amendoeira I, Schmitt FC. Cyclooxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol.* 2002;55(6):429-34.
98. Santos CI, Costa-Pereira AP. Signal transducers and activators of transcription-from cytokine signalling to cancer biology. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1816(1):38-49.
99. El Mezayen R, El Gazzar M, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC, Nomiyama H. Effect of thymoquinone on cyclooxygenase expression and prostaglandin

- production in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunol Lett.* 2006;106(1):72-81.
100. Magdy MA, Hanan el A, Nabila el M. Thymoquinone: Novel gastroprotective mechanisms. *Eur J Pharmacol.* 2012;697(1-3):126-31.
 101. Sallehuddin N, Nordin A, Bt Hj Idrus R, Fauzi MB. Nigella sativa and Its Active Compound, Thymoquinone, Accelerate Wound Healing in an In Vivo Animal Model: A Comprehensive Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(11).
 102. Kundu J, Kim DH, Kundu JK, Chun KS. Thymoquinone induces heme oxygenase-1 expression in HaCaT cells via Nrf2/ARE activation: Akt and AMPK α as upstream targets. *Food Chem Toxicol.* 2014;65:18-26.
 103. Umar S, Zargan J, Umar K, Ahmad S, Katiyar CK, Khan HA. Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats. *Chem Biol Interact.* 2012;197(1):40-6.
 104. El Gazzar M, El Mezayen R, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC. Downregulation of leukotriene biosynthesis by thymoquinone attenuates airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1760(7):1088-95.
 105. Ammar el SM, Gameil NM, Shawky NM, Nader MA. Comparative evaluation of anti-inflammatory properties of thymoquinone and curcumin using an asthmatic murine model. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(12):2232-6.
 106. Kohandel Z, Farkhondeh T, Aschner M, Samarghandian S. Anti-inflammatory effects of thymoquinone and its protective effects against several diseases. *Biomed Pharmacother.* 2021;138:111492.
 107. de Almeida AR, Dantas AT, Pereira MC, Cordeiro MF, Goncalves RSG, de Melo Rego MJB, et al. Dexamethasone inhibits cytokine production in PBMC from systemic sclerosis patients. *Inflammopharmacology.* 2019;27(4):723-30.
 108. Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria - A review. *Acta Histochem.* 2018;120(4):303-11.
 109. Niles AL, Moravec RA, Riss TL. In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening. *Curr Chem Genomics.* 2009;3:33-41.
 110. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
 111. Badary OA, Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Hamada FM. The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicology.* 2000;143(3):219-26.
 112. Badary OA. Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. *J Ethnopharmacol.* 1999;67(2):135-42.
 113. Qureshi KA, Imtiaz M, Parvez A, Rai PK, Jaremko M, Emwas AH, et al. In Vitro and In Silico Approaches for the Evaluation of Antimicrobial Activity, Time-Kill Kinetics, and Anti-Biofilm Potential of Thymoquinone (2-Methyl-5-propan-2-ylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione) against Selected Human Pathogens. *Antibiotics (Basel).* 2022;11(1).

114. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int Immunopharmacol*. 2005;5(13-14):1749-70.
115. Alandag C, Kancagi DD, Karakus Sir G, Cakirsoy D, Ovali E, Karaman E, et al. The effects of thymoquinone on pancreatic cancer and immune cells. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2022;68(8):1023-6.
116. Velagapudi R, Kumar A, Bhatia HS, El-Bakoush A, Lepiarz I, Fiebich BL, et al. Inhibition of neuroinflammation by thymoquinone requires activation of Nrf2/ARE signalling. *Int Immunopharmacol*. 2017;48:17-29.
117. De A, Blotta HM, Mamoni RL, Louzada P, Bertolo MB, Foss NT, et al. Effects of dexamethasone on lymphocyte proliferation and cytokine production in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2002;29(1):46-51.
118. Cobourne-Duval MK, Taka E, Mendonca P, Soliman KFA. Thymoquinone increases the expression of neuroprotective proteins while decreasing the expression of pro-inflammatory cytokines and the gene expression NFkappaB pathway signaling targets in LPS/IFNgamma -activated BV-2 microglia cells. *J Neuroimmunol*. 2018;320:87-97.
119. Kikkawa I, Saito S, Tominaga K, Hoshino Y, Ooi Y, Nakano M. Lipopolysaccharide (LPS) stimulates the production of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by osteoclasts (OCL) in murine bone marrow cell culture. *Microbiol Immunol*. 1998;42(9):591-8.
120. Huang H, Fletcher A, Niu Y, Wang TT, Yu L. Characterization of lipopolysaccharide-stimulated cytokine expression in macrophages and monocytes. *Inflamm Res*. 2012;61(12):1329-38.
121. Thomas G, Frederick E, Thompson L, Bar-Or R, Mulugeta Y, Hausburg M, et al. LMWF5A suppresses cytokine release by modulating select inflammatory transcription factor activity in stimulated PBMC. *J Transl Med*. 2020;18(1):452.
122. Adib-Conquy M, Cavaillon JM. [Host inflammatory and anti-inflammatory response during sepsis]. *Pathol Biol (Paris)*. 2012;60(5):306-13.
123. Wendel M, Paul R, Heller AR. Lipoproteins in inflammation and sepsis. II. Clinical aspects. *Intensive Care Med*. 2007;33(1):25-35.
124. Shaterzadeh-Yazdi H, Noorbakhsh MF, Hayati F, Samarghandian S, Farkhondeh T. Immunomodulatory and Anti-inflammatory Effects of Thymoquinone. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2018;18(1):52-60.
125. Mansour M, Tornhamre S. Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2004;19(5):431-6.
126. Uçan S.U SZ, Sakmanoğlu A. , Uslu A. Effect of thymoquinone on proliferation of bovine peripheral blood mononuclear cells. *Eurasian J Vet Sci*, 2018, 34, 1, 1-6. 2017;34(1):1-6.
127. Petersen A, Carlsson T, Karlsson JO, Jonhede S, Zetterberg M. Effects of dexamethasone on human lens epithelial cells in culture. *Mol Vis*. 2008;14:1344-52.

128. Xu J, Zhao Y, Aisa HA. Anti-inflammatory effect of pomegranate flower in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophages. *Pharm Biol.* 2017;55(1):2095-101.
129. Grebowska A, Moran AP, Matusiak A, Bak-Romaniszyn L, Czkwianianc E, Rehcinski T, et al. Anti-phagocytic activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide (LPS)--possible modulation of the innate immune response to these bacteria. *Pol J Microbiol.* 2008;57(3):185-92.
130. Moreira-Tabaka H, Peluso J, Vonesch JL, Hentsch D, Kessler P, Reimund JM, et al. Unlike for human monocytes after LPS activation, release of TNF-alpha by THP-1 cells is produced by a TACE catalytically different from constitutive TACE. *PLoS One.* 2012;7(3):e34184.
131. Alkharfy KM, Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alokail MS. The protective effect of thymoquinone against sepsis syndrome morbidity and mortality in mice. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(2):250-4.
132. Guida MS, Abd El-Aal A, Kafafy Y, Salama SF, Badr BM, Badr G. Thymoquinone Rescues T Lymphocytes from Gamma Irradiation-Induced Apoptosis and Exhaustion by Modulating Pro-Inflammatory Cytokine Levels and PD-1, Bax, and Bcl-2 Signaling. *Cell Physiol Biochem.* 2016;38(2):786-800.
133. Murray PRRKSPMA. *Medical microbiology.* 2021.
134. Huwait E, Al-Gharawi N, Al-Ghamdi MA, Gari M, Prola A, Natesan Pushparaj P, et al. Thymoquinone (TQ) Inhibits Inflammation and Migration of THP-1 Macrophages: Mechanistic Insights into the Prevention of Atherosclerosis Using In-Vitro and In-Silico Analysis. *Curr Issues Mol Biol.* 2022;44(4):1740-53.
135. Dinarello CA. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell.* 2010;140(6):935-50.
136. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1beta secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011;22(4):189-95.
137. Attiq A, Yao LJ, Afzal S, Khan MA. The triumvirate of NF-kappaB, inflammation and cytokine storm in COVID-19. *Int Immunopharmacol.* 2021;101(Pt B):108255.
138. Ortolani C, Pastorello EA. Hydroxychloroquine and dexamethasone in COVID-19: who won and who lost? *Clin Mol Allergy.* 2020;18:17.
139. Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB in immunobiology. *Cell Res.* 2011;21(2):223-44.
140. Wang W, Ye L, Ye L, Li B, Gao B, Zeng Y, et al. Up-regulation of IL-6 and TNF-alpha induced by SARS-coronavirus spike protein in murine macrophages via NF-kappaB pathway. *Virus Res.* 2007;128(1-2):1-8.
141. H U, S M, A A, Pk M, R K, R D, et al. Effects of Active Compounds of *Nigella sativa* in COVID-19: A Narrative Review. *Recent Adv Antiinfect Drug Discov.* 2023.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı: Nurşen BEKTÖRE

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2019-2023, Biyolog, ALKÜ Eğitim Araştırma Hastanesi, Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı
- 2012-2016, Biyolog, GATA Haydarpaşa Eğitim vs Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi-Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı
- 2012, Gazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
- 2009-2012, Tıbbi laboratuvar Teknikeri, GATA Ankara, Acil Biyokimya Laboratuvarı
- 2000-2009, Tıbbi laboratuvar Teknikeri, GATA Haydarpaşa Eğitim vs Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi-Kan Merkezi
- 2007, İstanbul Üniversitesi, Atatürk Sağlık Hizmetleri MYO, Tıbbi Laboratuvar

Yabancı Dil Bilgisi:

İngilizce