T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

LİPOPOLİSAKKARİT İLE FARELERDE OLUŞTURULAN İNFLAMATUVAR HİPERALJEZİ MODELİNDE SEÇİCİ RXRα AGONİSTİ BEKSAROTENİN TLR4/MYD88/TAK1/NF-κB/COX-2 YOLU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN PROİNFLAMATUVAR SİTOKİN OLUŞUMU İLE İLİŞKİLENDİRİLEREK ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

ŞEFİKA PINAR ŞENOL

ECZACILIK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

MERSİN
AĞUSTOS-2021

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

LİPOPOLİSAKKARİT İLE FARELERDE OLUŞTURULAN İNFLAMATUVAR HİPERALJEZİ MODELİNDE SEÇİCİ RXRα AGONİSTİ BEKSAROTENİN TLR4/MYD88/TAK1/NF-κB/COX-2 YOLU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN PROİNFLAMATUVAR SİTOKİN OLUŞUMU İLE İLİŞKİLENDİRİLEREK ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

ŞEFİKA PINAR ŞENOL
ORCID ID: 0000-0002-3019-9589

DANIŞMAN
PROF. DR. BAHAR TUNÇTAN

ECZACILIK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

MERSİN
AĞUSTOS- 2021

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi

beyan ederim.

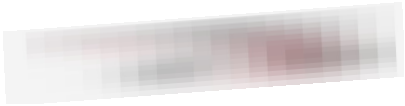
ETHICAL DECLERATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific Works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

24/08/2021

İmza / Signature



Şefika Pınar ŞENOL / Sefika Pinar SENOL

ÖZET

LİPOPOLİSAKKARİT İLE FARELERDE OLUŞTURULAN İNFLAMATUVAR HİPERALJEZİ MODELİNDE SEÇİCİ RXRα AGONİSTİ BEKSAROTENİN TLR4/MYD88/TAK1/NF-κB/COX-2 YOLU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN PROİNFLAMATUVAR SİTOKİN OLUŞUMU İLE İLİŞKİLENDİRİLEREK ARAŞTIRILMASI

Bu tezde, seçici bir retinoit X reseptörü (RXR) α agonisti olan beksarotenin lipopolisakkarit (LPS) ile farelerde oluşturulan inflamatuvar hiperaljezi modelinde santral sinir sistemi (SSS)'deki *toll* benzeri reseptör (*toll-like receptor*; TLR) 4/miyeloit farklılaşma faktörü *(myeloid differentiation factor*; MyD) 88/dönüştürücü büyüme faktörü ile etkinleştirilen kinaz (*transforming growth factor-activated kinase*; TAK) 1/nükleer faktör κB (NF-κB)/siklooksijenaz (*cyclooxygenase*; COX)-2 sinyal ileti yolu üzerindeki etkisinin proinflamatuvar sitokin oluşumu ile ilişkilendirilerek araştırılması amaçlanmıştır. *In vivo* deneyler 8 gruba ayrılan fareler kullanılarak gerçekleştirilmiştir: (1) Serum fizyolojik (SF) (kontrol grubu), (2) LPS (inflamatuvar hiperaljezi grubu), (3) dimetil sülfoksit (DMSO), (4) LPS+beksaroten (0.1 mg/kg), (5) LPS+beksaroten (1 mg/kg), (6) LPS+beksaroten (3 mg/kg), (7) LPS+beksaroten (10 mg/kg), (8) SF+beksaroten (10 mg/kg). DMSO (4 ml/kg; subkütan [s.k.]) veya beksaroten (4 ml/kg; s.k.) SF (4 ml/kg; intraperitoneal [i.p.]) ya da LPS (10 mg/kg, 4 ml/kg; i.p.) ile birlikte uygulanmıştır. SF veya LPS'nin uygulanmasından sonraki 6. saatte farelerin 30 saniye içinde termal uyarıya verdikleri tepki süreleri ölçülmüştür. Ayrıca deneyler süresince mortalite de gözlenmiştir. Ölçümlerin alınmasının ardından öldürülen farelerin beyinleri ile omurilikleri alınmıştır. Hazırlanan doku homojenatı süpernatantlarında β-tübülin, RXRα, TLR4, MyD88, TAK1, fosforile TAK1, NF-κB p65, fosforile NF-κB p65, COX-2 ve interlökin (*interleukin*; IL)-1β proteinlerinin ekspresyonları *immunoblotting* yöntemiyle, COX-2 etkinliği ile prostaglandin (PG) E_2 ve IL-1β düzeyleri ise *enzyme-linked immunosorbent assay* kitleri kullanılarak ölçülmüştür. LPS uygulanmasından sonraki 6. saatte farelerin termal uyarıya yanıt verme sürelerinin, kontrol grubunda ölçülen değerlere göre, anlamlı olarak daha az olduğu görülmüştür. LPS'nin neden olduğu hiperaljezi yalnızca 10 mg/kg dozda beksaroten ile önlenmiştir. Endotoksemik farelerin dokularında RXRα protein ekspresyonundaki azalmaya, TLR4, MyD88, fosforile TAK1, NF-κB p65, fosforile NF-κB p65, COX-2 ve IL-1β proteinlerinin ekspresyonu ile COX-2 etkinliğine ek olarak PGE_2 ile IL-1β düzeylerindeki artmanın eşlik ettiği gözlenmiştir. LPS'nin neden olduğu bu değişiklikler de beksaroten ile önlenmiştir. Bu bulgular, farelerde LPS'nin neden olduğu hiperaljezinin beksaroten ile önlendiğini göstermiştir. Ayrıca bulgularımız, endotoksemik farelerde gözlenen beksarotenin analjezik etkisine SSS'de proinflamatuvar sitokin oluşumundaki artmayla birlikte, TLR4/MYD88/TAK1/NF-κB/COX-2 sinyal ileti yolu etkinliğindeki azalmanın katkıda bulunabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Lipopolisakkarit; İnflamasyon, Hiperaljezi; Beksaroten

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SELECTIVE RXRα AGONIST BEXAROTENE, ON TLR4/MyD88/TAK1/NF-κB/COX-2 PATHWAY IN RELATION TO PROINFLAMMATORY CYTOKINE PRODUCTION IN LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED INFLAMMATORY HYPERALGESIA MODEL IN MICE

The aim of this thesis was to explore the effect of bexarotene, selective retinoid X receptor (RXR) α agonist, on toll-like receptor (TLR) 4/myeloid differentiation factor (MyD) 88/transforming growth factor-activated kinase (TAK) 1/nuclear factor κB (NF-κB)/cyclooxygenase (COX)-2 signaling pathway in the central nervous system (CNS) in relation to proinflammatory cytokine production in lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory hyperalgesia model in mice. *In vivo* experiments were performed using mice divided into 8 groups: (1) Saline (control group), (2) LPS (inflammatory hyperalgesia group), (3) dimethyl sulfoxide (DMSO), (4) LPS+bexarotene (0.1 mg/kg), (5) LPS+bexarotene (1 mg/kg), (6) saline+bexarotene (3 mg/kg), (7) LPS+bexarotene (10 mg/kg), and (8) saline+bexarotene (10 mg/kg). DMSO or bexarotene (4 ml/kg; subcutaneous [s.c.]) was administrated simultaneously with saline (10 ml/kg; intraperitoneal [i.p.]) or LPS (10 mg/kg; i.p.). At 6 hours after administration of SF or LPS, the reaction time of mice to thermal stimulation within 30 seconds was measured. Mortality was also observed during the experiments. Mortality was also be observed during the experiments. After the measurements were taken, the brains and spinal cords of the killed mice were isolated. Tissue homogenate supernatants were used for the measurement of β-tubulin, RXRα, TLR4, MyD88, TAK1, phosphorylated TAK1, NF-κB p65, phosphorylated NF-κB p65, COX-2, and interleukin (IL)-1β protein expression by using the immunoblotting method and COX-2 activity in addition to prostaglandin (PG) E_2 and IL-1β levels by using the enzyme-linked immunosorbent assay. LPS significantly decreased the latency to the thermal stimulus 6 hours after adminisration compared with the saline-injected group. Bexarotene only at 10 mg/kg dose prevented the LPS-induced hyperalgesia. Increased expression of TLR4, MyD88, phosphorylated TAK1, NF-κB p65, phosphorylated NF-κB p65, COX-2, and IL-1β proteins and COX-2 activity as well as PGE_2 and IL-1β levels were associated with decreased RXRα protein expression in the tissues of endotoxemic mice. The LPS-induced changes were also prevented by bexarotene. These findings demonstrated that LPS-induced hyperalgesia in mice was prevented by bexarotene. In addition, our findings suggested that the decrease in TLR4/MYD88/TAK1/NF-kB/COX-2 signaling pathway activity may contribute to the analgesic effect of bexarotene observed in endotoxemic mice, together with the increased production of proinflammatory cytokines in the CNS.

Keywords: Lipopolysaccharide; Inflammation, Hyperalgesia; Bexarotene

TEŞEKKÜR

Tezimin doğuşu, biçimlenmesi, gelişmesi ve sonlanmasına dek her aşamada bilgi, deneyim ve emeği ile güleryüzünü esirgemeden özveriyle çalışan canım danışman hocam sayın Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince bilgilerini ve deneyimlerini paylaşmaktan çekinmeyen sayın Prof. Dr. Seyhan ŞAHAN FIRAT ve sayın Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Nihal SARI hocalarıma, yardımlarından dolayı çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Meryem TEMİZ-REŞİTOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Demet Sinem GÜDEN'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın belirlenme sürecinde beni abi şefkatiyle gönülden desteklemiş olan sayın Dr. Vet. Hek. Tamer YENER ile Deney Hayvanları Araştırma Birimi çalışanları Muhsin YAŞAR ve Emrah YAŞAR'a teşekkürü borç bilirim.

TÜBİTAK'a "2211 Yurt içi Lisansüstü Burs Programı" desteği kapsamında verdiği burs için teşekkür ederim.

Ve tabi ki tüm kararlarımda her zaman beni destekleyen aileme en içten teşekkürlerimi sunarım. İyi ki varsınız …

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 2018-1-TP3-2814) ve TÜBİTAK (Proje No: 217S235) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLOLAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR ve SİMGELER	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Ağrı	3
2.2. İnflamatuvar Hiperaljezi	5
2.3. Deneysel Ağrı Modelleri	7
2.4. Nükleer Reseptörler	8
2.4.1. RXR'ler	11
2.4.1.1. Özellikleri	11
2.4.1.2. Ekspresyon ve Etkinliğinin Düzenlenmesi	12
2.4.1.3. Fizyopatolojik Olaylardaki Rolleri	13
2.5. TLR4	15
2.5.1. Özellikleri	15
2.5.2. Ekspresyon ve Etkinliğinin Düzenlenmesi	15
2.5.3. Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü	16
2.6. MyD88	18
2.6.1. Özellikleri	18
2.6.2. Ekspresyon ve Etkinliğinin Düzenlenmesi	18
2.6.3. Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü	19
2.7. TAK1	20
2.7.1. Özellikleri	20
2.7.2. Ekspresyon ve Etkinliğinin Düzenlenmesi	21
2.7.3. Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü	22
2.8. NF-κB	23
2.8.1. Özellikleri	23

	Sayfa
2.8.2. Ekspresyon ve Etkinliğinin Düzenlenmesi	24
2.8.3. Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü	26
2.9. COX-2	27
2.9.1. Özellikleri	27
2.9.2. Ekspresyon ve Etkinliğinin Düzenlenmesi	28
2.9.3. Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü	29
2.10. IL-1β	31
2.10.1. Özellikleri	31
2.10.2. Ekspresyon ve Etkinliğinin Düzenlenmesi	31
2.10.3. Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü	32
3. MATERYAL ve YÖNTEM	34
3.1. Materyal	34
3.1.1. Deney Hayvanı	34
3.1.2. Sarf Malzemesi	34
3.1.3. Teçhizat	36
3.2. Yöntem	37
3.2.1. İnflamatuvar Hiperaljezi Modeli	37
3.2.2. Doku Homojenatı Süpernatantlarının Hazırlanması	38
3.2.3. Toplam Protein Düzeyinin Ölçülmesi	39
3.2.4. β-Tübülin, RXRα, TLR4, MyD88, TAK1, fosforile TAK1, NF-κB p65, fosforile NF-κB p65, COX-2 ve IL-1β Proteinlerinin Ekspresyonunun Ölçülmesi	39
3.2.5. İmmünoreaktif Proteinlerin Analizi	42
3.2.6. COX-2 Etkinliği ile PGE_2 ve IL-1β Düzeylerinin Ölçülmesi	42
3.2.7. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz	42
4. BULGULAR	43
4.1. Mortalite	43
4.2. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Termal Uyarıya Yanıt Verme Süreleri Üzerinde Beksarotenin Etkisi	43
4.3. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde β-Tübülin Protein Ekspresyonu Üzerinde Beksarotenin Etkisi	45
4.4. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde RXRα Protein Ekspresyonu Üzerinde Beksarotenin Etkisi	46
4.5. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde TLR4 Protein Ekspresyonu Üzerinde Beksarotenin Etkisi	47
4.6. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde MyD88 Protein Ekspresyonu Üzerinde Beksarotenin Etkisi	49

4.7. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde TAK1 Protein Ekspresyonu ile Fosforilasyonu Üzerinde Beksarotenin Etkisi 50

4.8. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde NF-κB p65 Protein Ekspresyonu ile Fosforilasyonu Üzerinde Beksarotenin Etkisi 52

4.9. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde COX-2 Protein Ekspresyonu Üzerinde Beksarotenin Etkisi 54

4.10. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde COX-2 Etkinliği Üzerinde Beksarotenin Etkisi 56

4.11. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde PGE_2 Düzeyleri Üzerinde Beksarotenin Etkisi 57

4.12. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde IL-1β Protein Ekspresyonu Üzerinde Beksarotenin Etkisi 59

4.13. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde IL-1β Düzeyleri Üzerinde Beksarotenin Etkisi 60

5. TARTIŞMA ve SONUÇ 62

KAYNAKLAR 69

EKLER (Etik Kurul Onay Belgesi) 94

ÖZGEÇMİŞ 98

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Astrositler, mikrogliyalar ile arka kök gangliyon hücrelerinde TLR etkinliği	17
Tablo 3.1. β-Tübülin, RXRα, TLR4, MyD88, TAK1, fosforile TAK1, NF-κB p65, fosforile NF-κB p65, COX-2 ve IL-1β protein ekspresyonunun ölçülmesinde kullanılan antikorların özellikleri	41
Tablo 4.1. Kontrol ve endotoksemik farelerin termal uyarıya tepki verme süreleri üzerinde beksarotenin etkisi	43
Tablo 4.2. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde β-tübülin protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi	45
Tablo 4.3. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde RXRα protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi	46
Tablo 4.4. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde TLR4 protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi	48
Tablo 4.5. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde MyD88 protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi	49
Tablo 4.6. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliğinde TAK1 protein ekspresyonu ile fosforilasyonu üzerinde beksarotenin etkisi	51
Tablo 4.7. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliğinde NF-κB protein ekspresyonu ile fosforilasyonu üzerinde beksarotenin etkisi	53
Tablo 4.8. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde COX-2 protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi.	55
Tablo 4.9. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde COX-2 etkinliği üzerinde beksarotenin etkisi	56
Tablo 4.10. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde PGE_2 düzeyi üzerinde beksarotenin etkisi	58
Tablo 4.11. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde IL-1β protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi.	59
Tablo 4.12. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde IL-1β düzeyi üzerinde beksarotenin etkisi	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Ağrılı uyarının üst merkez tarafından algılanmasına dek izlediği yol	4
Şekil 2.2. Nükleer reseptörlerin yapısı	9
Şekil 2.3. Nükleer reseptör etkinliğinin temel mekanizması	10
Şekil 2.4. TLR4 sinyal ileti yolu	16
Şekil 2.5. Klasik ve klasik olmayan NF-κB yollarının şematik gösterimi	25
Şekil 4.1. Kontrol ve endotoksemik farelerin termal uyarıya tepki verme süreleri üzerinde beksarotenin etkisi	44
Şekil 4.2. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde RXRα protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi	47
Şekil 4.3. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde TLR4 protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi	48
Şekil 4.4. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde MyD88 protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi	50
Şekil 4.5. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliğinde TAK1 protein ekspresyonu ile fosforilasyonu üzerinde beksarotenin etkisi	52
Şekil 4.6. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliğinde NF-κB protein ekspresyonu ile fosforilasyonu üzerinde beksarotenin etkisi	54
Şekil 4.7. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde COX-2 protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi	55
Şekil 4.8. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde COX-2 etkinliği üzerinde beksarotenin etkisi	57
Şekil 4.9. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde PGE_2 düzeyleri üzerinde beksarotenin etkisi	58
Şekil 4.10. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde IL-1β protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi	60
Şekil 4.11. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde IL-1β düzeyleri üzerinde beksarotenin etkisi	61
Şekil 5.1. Farelerde bakteriyel LPS ile oluşturulan inflamatuvar hiperaljezi modelinde RXRα agonisti beksarotenin SSS'de LPS sinyal ileti yolunda oluşturduğu değişiklikler ile inflamatuvar hiperaljeziyi önleyici etkisi ile ilgili olarak önerilen mekanizma	62

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
5-HT	5-hidroksitriptamin
α	Alfa (*Alpha*)
3-AB	3-Aminobenzamit
β	Beta
γ	Gama (*Gamma*)
κ	Kapa (*Kappa*)
δ	Delta
ε	Epsilon
ζ	Zeta
AA	Araşidonik asit
AH	Alzheimer hastalığı
ALS	Amiyotrofik lateral skleroz
AMP	Adenozin monofosfat (*Adenosine monophosphate*)
AP	Etkinleştirici protein (*Activator protein*)
ASC	Apopitozla ilişkili nokta benzeri protein içeren bir kaspaz biriktirici alan *(Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain)*
Aβ	Amiloit β
BAFFR	*B-Cell-activating factor belonging to tumor necrosis factor family receptor*
Bcl	B hücresi lenfoma protein (*B-Cell lymphoma protein)*
CCL	Kemokin (C-C) motif ligandı (*Chemokine [C-C motif] ligand*)
CD	Farklılaşma kümesi (*Cluster of differentiation*)
CGRP	Kalsitonin geni ile ilişkili peptit (*Calcitonin gene-related peptide*)
CNS	*Central nervous system*
COX	Siklooksijenaz (*Cyclooxygenase*)
CXCL	Kemokin (C-X-C) motif ligandı (*Chemokine [C-X-C motif] ligand*)
DAMP	Zedelenmeyle ilişkili moleküler patern (*Damage-associated molecular pattern*)
DBD	Deoksiribonükleik asit bağlayıcı bölge (*Deoxyribonucleic acid-binding domain)*
DD	*Death domain*
DFU	5,5-dimetil-3-(3-florofenil)-4-(4-metilsülfonil)fenil-2(5H)-furanon (*5,5-Dimethyl-3-(3-florophenyl)-4-(4-methylsulphonyl-2(5H)-furanon*)
DMSO	Dimetil sülfoksit (*Dimethyl sulfoxide*)
DNA	Deoksiribonükleik asit

Kısaltma/Simge	Tanım
DTT	Ditiyotreytol
EAE	Deneysel otoimmün ensefalomiyelit (*Experimental autoimmune encephalomyelitis*)
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü (*Epidermal growth factor*)
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
eNOS	Endoteliyal nitrik oksit sentaz
EP	Prostanoit E reseptörü (*Prostanoid E receptor*)
ER	Endoplazmik retikulum
ERK	Ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz (*Extracellular signal regulated kinase)*
FDA	Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (*United States Food and Drug Administration)*
FXR	Farsenoit X reseptörü (*Farsenoid X receptor)*
GABA	Gama-aminobütirik asit
$gp91^{phox}$	Süperoksit oluşturan bir adenin dinükleotit fosfat oksidaz enzimi
HCl	Hidroklorik asit (*Hydrochloric acid*)
HEPES	4-(2-Hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit (*4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*)
IASP	Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği (*International Association for the Study of Pain*)
ICAM	İnterselüler adezyon molekülü (*Intercellular adhesion molecule*)
IFN	İnterferon (*Interferon*)
IKK	*Inhibitor of κB kinase*
IL	Interlökin (*Interleukin*)
IL-1R	İnterlökin-1 reseptörü (*Interleukin-1 receptor*)
IP	İnterferon γ ile indüklenen protein (*Interferon γ-induced protein*)
IRAK	İnterlökin-1 reseptörü ile ilişkili kinaz (*Interleukin-1 receptor-associated kinase*)
IκB	κB inhibitörü (*Inhibitor of κB)*
i.p.	İntraperitoneal (*Intraperitoneal*)
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
JNK	*c-Jun-N-terminal kinase*
KBE	Kan beyin engeli
KCl	Potasyum klorür (*Potassium chloride*)
KH_2PO_4	Potasyum dihidrojen fosfat (*potassium dihydrogenphosphate*)
L-NAME	N^G-nitro-L-arjinin metil ester

Kısaltma/Simge	Tanım
LBD	Ligant bağlayıcı bölge (*Ligand-binding domain*)
LPS	Lipopolisakkarit (*Lipopolysaccharide*)
LT-α1β2R	Lenfotoksin α1β2 reseptörü (*Lymphotoxin-α1β2 receptor*)
LXR	Karaciğer X reseptörü (*Liver X receptor*)
Lys	Lizin (*Lysine*)
MAIL	*Molecule possessing ankyrin-repeats induced by lipopolysaccharide*
MAPK	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz (*Mitogen-activated protein kinase)*
MCC950	*N*-[[(1,2,3,5,6,7-hekzahidro-s-indasen-4-il)amino]karbonil]-4-(1-hidroksi-1-metiletil)-2-furansülfonamit (*N-[[(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)amino]carbonyl]-4-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2-furansulfonamide*))
MCP	Monosit kemoatraktan protein (*Monocyte chemoattractant protein*)
MD	Miyeloit farklılaşma faktörü (*Myeloid differentiation factor*)
MEK	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz (*Mitogen-activated protein kinase kinase)*
MEKK	Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz kinaz kinaz (*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase)*
MIP	Makrofaj inflamatuvar protein (*Macrophage inflammatory protein*)
Mpk	*Mitogen-activated protein kinase homolog*
mRNA	Ulak ribonükleik asit (*Messenger ribonucleic acid*)
MS	Multipl skleroz
MyD	Miyeloit farklılaşma faktörü (*Myeloid differentiation factor)*
n	Fare sayısı
NAS	N-Asetilserotonin
NEMO	Nükleer faktör κB esansiyel düzenleyicisi (*Nuclear factor κB essential modulator*)
NF-κB	Nükleer faktör κB (*Nuclear factor κB*)
NIK	Nükleer faktör κB indükleyici kinaz (*Nuclear factor κB-inducing kinase*)
NLRP	Nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alan benzeri, lösinden zengin yinelenen ve pirin alanı içeren (*Nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing*)
NMDA	N-Metil-D-aspartat
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	Nitrik oksit
NOX	Nikotinamit adenin dinükleotit fosfat oksidaz (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxydase*)
NOX2	Süperoksit oluşturan bir adenin dinükleotit fosfat oksidaz enzimi
NOXO2	gp91^{phox}'un düzenleyici alt birimi
p	Fosforile (*Phosphorylated*)

Kısaltma/Simge	Tanım
NSAIDs	Steroit yapıda olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (*Nonsteroidal antiiinflammatory drugs*)
P	İstatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi (*Probability*)
$p47^{phox}$	$gp91^{phox}$'un düzenleyici alt birimi
PAMP	Patojen ilişkili moleküler patern (*Pathogen-associated molecular pattern)*
PG	Prostaglandin (*Prostaglandin*)
PH	Parkinson hastalığı
PI3K	Fosfoinozitit 3-kinaz (*Phosphoinositide 3-kinase*)
PK	Protein kinaz
PPAR	Peroksizom proliferatör ile etkinleştirilen reseptör (*Peroxisome proliferator-activated receptor*)
RA	Romatoit artrit
RANK	*Nükleer faktör κB için reseptör aktivatörü (Receptor activator for nuclear factor κB)*
RANTES	*Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*
RAR	Retinoik asit reseptörü
RNA	Ribonükleik asit
RNT	Reaktif nitrojen türleri
ROT	Reaktif oksijen türleri
RXR	Retinoit X reseptörü (*Retinoid X receptor*)
s.c.	*Subcutaneous*
s.k.	Subkütan
SAPK	Stres ile etkinleştirilen protein kinaz (*Stress-activated protein kinase*)
SCFβTrCP	Skp1-Cul1-Roc1-F-box ubikuitin ligaz kompleksi (*Skp1-Cul1-Roc1-F-box ubiquitin ligase complex*)
SDS	Sodyum dodesil fosfat
Ser	Serin (*Serine*)
SF	Serum fizyolojik
SSA	Sığır serum albümini
SSS	Santral sinir sistemi
TAB	Dönüştürücü büyüme faktörü ile etkinleştirilen kinaz 1 bağlayıcı protein (*Transforming growth factor beta-activated kinase-binding protein*)
TAK	Dönüştürücü büyüme faktörü ile etkinleştirilen kinaz (*Transforming growth factor beta-activated kinase*)
TCR	T hücresi reseptörü *(T-Cell receptor)*
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (*N,N,N′,N′-Tetramethylethylenediamine*)
TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü (*Transforming growth factor*)

Kısaltma/Simge	Tanım
Thr	Treonin (*Threonine*)
TIR	*Translation initiation region*
TLR	*Toll* benzeri reseptör (*Toll-like receptor*)
TNF	Tümör nekrozlaştırıcı faktör (*Tumor necrosis factor*)
TNFR	Tümör nekrozlaştırıcı faktör reseptörü (*Tumor necrosis factor receptor*)
TR	Tiroit hormon reseptörü
TRAF	Tümör nekrozlaştırıcı faktör reseptörü ile ilişkili faktör (*Tumor necrosis factor receptor-associated factor*)
TRIF	*Toll*-interlökin-1 reseptör alan içeren adaptör indükleyici interferon-β (*Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon-β*)
TTÇ	Tris tampon çözeltisi
UV	Ultraviyole
VDR	D vitamini reseptörü (*Vitamin D receptor)*
YKTS	Yağsız kurutulmuş süt tozu (*Non-fat dry milk*)

1. GİRİŞ

Ağrı, somatik duyumsamanın bir alt türü olarak gerçek ya da duyumsanan doku zedelenmesi sonucu ortaya çıkan ve bazı otonomik, psikolojik ve davranışsal tepkilerle kendini gösteren hoş olmayan duyusal, emosyonel ya da bilişsel deneyimler olarak tanımlanmaktadır [1]. Başta sitokinler olmak üzere çok sayıdaki proinflamatuvar mediyatörün kontrolünde ilerleyen doğal immün sistemin aracılık ettiği bir süreç olarak tanımlanan inflamasyon, ağrıya karşı duyarlılığın artışı ve azalmış ağrı eşiği ile kendini gösteren "hiperaljezi" adıyla bilinen duruma yol açmaktadır. Patojenleri uzaklaştırmak ve organizmayı doku zedelenmesinden korumak amacıyla gelişen bu güçlü inflamatuvar yanıt sonucunda reaktif nitrojen türleri (RNT) ve reaktif oksijen türleri (ROT), eikozanoitler ve bir dizi proteazlar gibi sitotoksik moleküllerin oluşumuna neden olan enzimatik yollardaki proteinlerin ekspresyonu artmaktadır. Gelişen bu inflamatuvar yanıt konağın yaşaması için gerekli olmasına karşın, sitotoksik moleküllerin aşırı miktarda oluşumu doku zedelenmesinin daha da ilerlemesine neden olmaktadır. İnflamasyonla ilişkili doku aşırı duyarlılığının gelişmesinin altta yatan başlıca nedeni nosiseptif nöronlar ile santral sinir sistemi (SSS)'deki ağrı yollarının duyarlılığındaki değişikliklerdir [2-4]. Ağrının yönetimi için yeni stratejilerin gerekliliği, yan etki profili daha güvenli yeni ilaçların geliştirilmesinin önünü açmaktadır. Günümüzde kullanılan ilaçlar ağrının türüne göre değişmekle birlikte sodyum kanal blokörleri, antiepileptikler, antidepresanlar, opioitler ve kanabinoitler ile steroit yapıda olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (*nonsteroidal antiinflammatory drugs*; NSAIDs)'dir. Ancak, sözü edilen ilaçların çoğunun etkisi ya sınırlıdır ya da bu ilaçlar ciddi yan etkilere neden olmaktadır [5-13].

Retinoit X reseptör (RXR)'leri hücre büyümesi, farklılaşması, yaşam ya da ölüm gibi olayları kontrol eden gen ağının başlıca düzenleyicileri olmalarının yanı sıra, türlü nükleer reseptör süper ailesi üyeleri ile zorunlu heterodimer oluşturarak birçok metabolik sistem arasında eşsiz bir düzenleyici ve bütünleştirici rol oynamaktadır. Memelilerde RXRα, RXRβ ve RXRγ biçiminde üç izotip olarak kodlanan RXR'lerin çeşitli inflamatuvar olaylarda inflamasyona karşı koruyucu rol oynadığı gösterilmiştir [14-17]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise, RXRα agonistlerinin inflamasyonla ilişkili hastalıklarda terapötik potansiyeli olabileceği ileri sürülmüştür. Seçici bir RXRα agonisti olan ve çeşitli *malign* hücrelerde hiperaljezi oluşumundaki önemi yadsınamaz bir enzim olan siklooksijenaz (*cyclooxygenase*; COX)-2 ekspresyonu/etkinliğinde azalmaya neden olduğu da gösterilen beksaroten (LGD1069, Targretin®) günümüzde onaylanmış endikasyonu olan kütanöz T hücresi lenfoması tedavisinde yüksek dozlarda kullanılmaktadır. Son zamanlarda

inflamasyonla ilişkili birçok akut ve kronik SSS hastalığında etkili olduğu gösterilen beksarotenin rodent kanser modellerinden 100 kat daha düşük dozlarda kullanıldığında travmatik beyin zedelenmesi gibi patolojisinde inflamasyonun önemli rol oynadığı nörodejenerasyonla ilişkili bozuklukların tedavisinde yararlı olabileceği bildirilmiştir [17-21]. Öte yandan, beksarotenin lipopolisakkarit (LPS)'nin neden olduğu supraspinal düzeyde algılanan inflamatuvar hiperaljezideki rolünün araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Literatürde tez konusuyla ilişkili olarak yapılan çalışmalar ile daha önce yaptığımız çalışmalardan elde ettiğimiz bulgular birlikte değerlendirildiğinde [22-24], LPS'nin SSS'de tetiklediği *toll* benzeri reseptör (*toll-like receptor*; TLR) 4/miyeloit farklılaşma faktörü (*myeloid differentiation factor*; MyD) 88/dönüştürücü büyüme faktörü ile etkinleştirilen kinaz (*transforming growth factor [TGF]-activated kinase*; TAK) 1/nükleer faktör κB (NF-κB)/COX-2 sinyal ileti yolu aracılığıyla artmış COX-2 ekspresyonu/etkinliği ve bununla ilişkili proinflamatuvar sitokinlerin oluşumundaki değişikliklerin eşlik ettiği inflamatuvar hiperaljeziyle sonuçlanabilecek olayların önlenmesinde RXRα agonistlerinin yararlı olabileceği düşünülmüştür. Dolayısıyla bu tez çalışmasında, LPS ile farelerde oluşturulan inflamatuvar hiperaljezi modelinde seçici bir RXRα agonisti olan beksarotenin SSS'deki TLR4/MyD88/TAK1/NF-κB/COX-2 sinyal ileti yolu üzerindeki etkisi proinflamatuvar sitokin oluşumu ile ilişkilendirilerek araştırılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Ağrı

Ağrı, yaşamsal önemi olan fizyolojik bir süreç olmakla birlikte, bireyin yaşam kalitesini bozan, bireyi fiziksel açıdan kısıtlayan, uyarıcı konumdan uzaklaştıran ve psikolojik açıdan zorlayan uyku bozukluklarının da birlikte görüldüğü bir durumdur. Ağrı, Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği (*International Association for the Study of Pain*; IASP) tarafından "var olan ya da olası doku zedelenmelerinin birlikte olduğu ya da bu tür zedelenmelerle birlikte olan hoş olmayan duyusal ya da duygusal deneyim" olarak tanımlanmıştır [25]. IASP Taksonomi Alt Komitesi ise, beş gruba ayırdığı ağrıyı eksenlerine göre özelliklerini şöyle tanımlamıştır: (1) Ağrının duyumsandığı vücut bölgesiyle ilişkilidir, (2) ağrıdan etkilenen sistemleri tanımlar, (3) ağrının ortaya çıkma süresini açıklar, (4) hastanın yakınmasına göre ağrının şiddetini ve süresini açıklar ve (5) ağrının etiyolojisini açıklar. Nörofizyolojik ve nöroanatomik açıdan gruplandırılan ağrının özellikleri aşağıda açıklanmıştır [26].

Nosiseptif Ağrı: Serbest nöronların uçlarında bulunan ağrı reseptörlerinin uyarılması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Ağrıyı ileten nöronlar aracılığıyla omuriliğe taşınarak talamusa iletilen uyarılar talamustan serebral kortekse taşınarak algılanır. Nosiseptif ağrı, somatik ve viseral ağrı olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Somatik ve viseral ağrı ise sırasıyla somatik aferent ve sempatik liflerle taşınmaktadır. İç organlar dışında kas, deri ile eklemleri de kapsayan ve tüm vücut alanlarında ortaya çıkabilen ağrı "somatik ağrı" olarak tanımlanır. Yüzeyel somatik ağrılar deriden, derin somatik ağrılar ise eklemler, iskelet kasları, bağ dokusu ve fasyalardan kaynak alır. Ağrı başlangıcı ani ve keskindir, iyi lokalize edilir. "Viseral ağrı" ise, iç organlardan kaynaklanır. Viseral ve somatik ağrının mekanizmaları biribirinden farklıdır. Viseral ağrı bulantı ve kusma gibi motor ve otonom reflekslerle birlikte görülür. Akciğer parankimi ile böbrek ve karaciğer gibi *solid* organlar ile ağrıya duyarlı değildir. Bu organların ağrıya duyarlı olmaması periferik reseptörlerinin değişkenliğinden kaynaklanır. Geniş bir bölgeye viseral ağrının yayılması ise, viseral aferent nosiseptif yolların SSS'deki dağılımıyla ilişkilidir. Genellikle üreter, düz kasların aşırı derecde kasılmaları veya safra yolları ve sindirim kanalı gibi içi boş olan organların aşırı derecede gerilmeleri sonucunda ağrı duyumsanır. Böbrek, karaciğer ve dalak gibi organların kapsüllerinin zorlanmasıyla da ağrı ortaya çıkabilir. *Dura mater*, periton, plevra, arter duvarları vd. bağ dokusu bulunan bölgelerde ağrı reseptörleri bulunmaktadır. Arka boynuzda somatik ağrı yoluna iç organlardan gelen otonomik aferentlerin taşınmasının ardından, somatik nöronun inerve ettiği deri alanında ağrı "yansıyan ağrı" biçiminde duyumsanır [27].

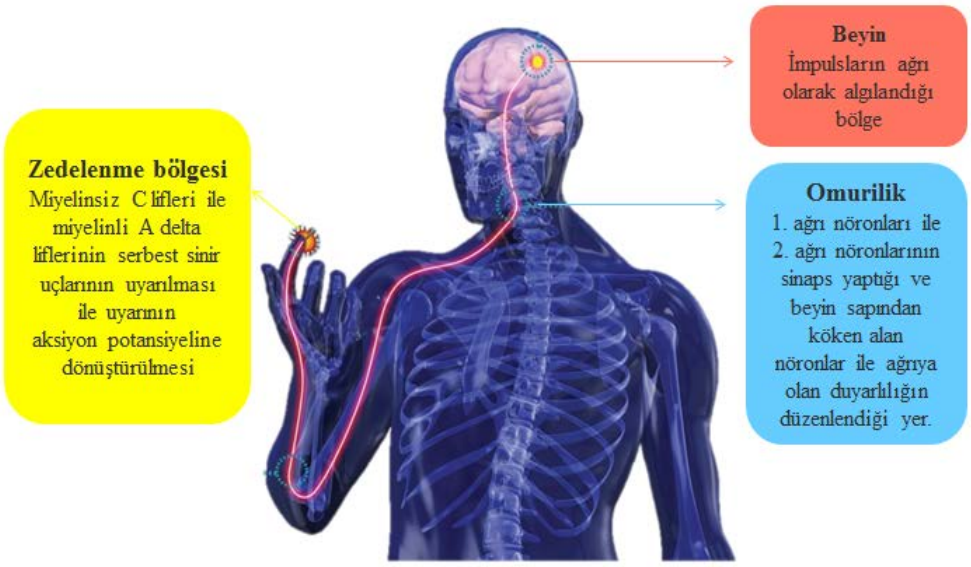
Nöropatik Ağrı: "Sinir sisteminin herhangi bir bölümündeki zedelenme sonucunda ortaya çıkan ağrı" olarak tanımlanır. Vücudun herhangi bir yerinde duyumsanan nöropatik ağrı otonom sinir sistemi, SSS ya da periferik sinir sisteminden kaynaklanabilir. Nöropatik ağrı santral ve periferik türde olabilir. Ağrı kendiliğinden ortaya çıkabilir. Omurilik yaralanması, multipl skleroz (MS), inme ve epilepsi gibi hastalıklarda ortaya çıkan yapısal değişikliklere bağlı ağrılar nöropatik ağrıya örnektir. Nöropatik ağrı opioit ilaçlara nosiseptif ağrıdan daha az yanıt verir. Nöronun inflamasyonu veya kompresyonuna bağlı mononöropati, diyabetik polinöropatiler, deaferantasyon ağrısı ile bazı nevraljiler nöropatik ağrı türlerindendir [28].

Deaferentasyon Ağrısı: SSS ve periferik sinir sistemi yaralanmaları sonucunda somatosensöriyel uyarı iletisinin SSS'ye gidişinin kesilmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır [29].

Reaktif Ağrı: Sempatik veya motor aferentlerin refleks etkinliğiyle nosiseptörlerin uyarılmasının ardından gelişen miyofasiyal ağrı örnek olarak verilebilir. Miyofasiyal ağrı sürekli, künt, derin ve sızlayıcı niteliktedir [30].

Psikosomatik Ağrı: Psikososyal ve psişik sorunların artmasına bağlı olarak gelişen durumlarda ortaya çıkan ağrı olarak tanımlanmaktadır.

Ağrılı uyaranın üst merkez tarafından algılanması transdüksiyon, transmisyon, modülasyon ile persepsiyon adı verilen birbirini izleyen dört nöral mekanizma aracılığıyla sağlanmaktadır (Şekil 2.1) [31].



Şekil 2.1. Ağrılı uyarının üst merkez tarafından algılanmasına dek izlediği yol [31].

(1) Transdüksiyon: Serbest nöronların uçlarında bulunan nosiseptörler tarafından zararlı uyaranların algılanıp elektriksel sinyallere dönüştürüldüğü aşamadır.

(2) Transmisyon: Uyarının duyusal sinir sistemi boyunca taşınması aşamasıdır. Uyarılar önce miyelinli (Aδ) ya da miyelinsiz (C) aferent nöronlar ile omuriliğe taşınır. Ağrının birinci sıra nöronları veya birincil aferent lifler olarak bilinen bu nöronların gövdeleri arka kök gangliyonlarındadır ve aksonları omuriliğin arka boynuzunda *substantia gelatinosa*'da ikinci sıra nöronlar ile sinaps yapar. Uyarı, ikinci sıra nöronlar omurilikten beyin sapı aracılığıyla talamusa ve buradan da 3. sıra nöronlar ile kortekse taşınır.

(3) Modülasyon: Ağrının modülasyonu periferde nosiseptör düzeyinde, santralde ise omurilik düzeyinde ya da supraspinal düzeyde gerçekleşebilmektedir. Bu modülasyonlar ağrıyı artırabilir ya da azaltabilir nitelikte olabilmektedir.

(4) Persepsiyon: Uyarının üçüncü sıra nöronlar ile kortekse taşınarak algılanması aşamasıdır.

2.2. İnflamatuvar Hiperaljezi

Doku zedelenmesi zedelenen hücrelerden potasyum ve hidrojen gibi iyonlar, bradikinin, histamin, 5-hidroksitriptamin (5-HT), adenozin trifosfat, nitrik oksit (NO) ve araşidonik asit (AA) yolunun etkinliğinin artması sonucunda prostanoitler ile lökotrienler gibi inflamatuvar mediyatörlerin salıverilmesine neden olur. Zedelenen bölgeye toplanan bağışıklık sistemi hücrelerinden sitokinler ile büyüme faktörleri gibi mediyatörler salıverilir. Bu mediyatörlerin bir bölümü periferik nosiseptörleri doğrudan uyararak "kendiliğinden ortaya çıkan ağrı" olarak nitelendirilebilen inflamatuvar ağrıya neden olmaktadır. Bir bölümü ise, inflamatuvar hücreler yoluyla algojenik mediyatörlerin salıverilmesine aracılık ederler. Daha da önemlisi, inflamatuvar mediyatörler ağrıyla ilişkili nöronların duyarlılığını değiştirerek artmış ağrı duyarlılığı ve azalmış ağrı eşiği ile belirgin bir durum olan hiperaljeziye yol açmaktadırlar. Bu durum, kendi reseptör moleküllerinin duyarlılığının değişmesi ya da voltaj kapılı iyon kanallarının modülasyonu yoluyla ortaya çıkabilmektedir [32, 33].

Travma, otoimmün hastalıklar ya da enfeksiyöz durumlar gibi sistemik inflamasyonla ilişkili hastalıkların yaygın olarak görüldüğü yoğun bakım birimlerinde ağrı, hastalardaki yakınmanın birincil nedenidir. Sistemik inflamasyon "hastalık yanıtı" olarak adlandırılan SSS ile ilişkili bazı adaptif değişimlere yol açmaktadır. Bu yanıtın karakteristik özellikleri ateş, uyku artışı, hareketliliğin azalması, yeme ve içme isteğinin azalması ile hormonal değişimlerdir [34]. Bu yanıtlar enfeksiyon ya da travma süresi boyunca organizmanın canlılığının sürdürülmesini amaçlar. Son zamanlarda hiperaljezinin hastanın etkinliklerini kısıtlamayı amaçlayan hastalık yanıtının

bütünleyici bir parçası olduğu görüşü vurgulanmaktadır [35]. Normal ağrıya benzer biçimde hastalığın neden olduğu hiperaljezi de fizyolojik bir yanıttır [36]. Nöropatik ağrı, kanser ve obezite ile ilişkili ağrı gibi birçok kronik ağrı durumlarında da ortaya çıkan hiperaljezinin fizyopatolojisinde de sistemik inflamasyonun önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir [2, 37, 38]. Bazı akut ya da adı geçen kronik durumlarda ortaya çıkan hiperaljeziye SSS'nin duyarlılığındaki artışın önemli ölçüde katkısı olduğu gösterilmiştir. Birçok çalışmada, santral duyarlılık artışı, omuriliğin arka boynuzundaki nöronlar ile spinal nükleus pars kaudalis, talamus, amigdala ve anteriyor singulat kortekstеki değişiklikler ile birlikte gösterilmiştir. Son zamanlarda görüntüleme yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda ağrı ile ilişkili parabrakiyal nükleus, periakvaduktal gri madde, süperiyor kolikulus ve prefrontal korteks gibi beyin yapılarında santral duyarlılık artışıyla ilişkili uyarılabilirliğin artmasıyla uyumlu değişiklikler olduğu gösterilmiştir [39, 40].

LPS, makrofaj ve dendiritik hücreler gibi bağışıklık sistemi hücreleri tarafından proinflamatuvar sitokinlerin salıverilmesine neden olan bir bakteriyel üründür. LPS'nin yapısında bulunan lipit A "endotoksin" olarak adlandırılmıştır. Deney hayvanları ile gönüllülere LPS uygulanması, hastalık yanıtının hiperaljeziyi de kapsayan fizyolojik, davranışsal ve emosyonel boyutları üzerindeki akut ve geçici bağışıklık sistemi etkinliğinin etkilerini çalışmak için iyi tanımlanmış bir araştırma yaklaşımıdır [35]. Sistemik yoldan uygulanan LPS, SSS üzerinde birkaç paralel yol aracılığıyla etki göstermektedir: (1) *Area postrema* ile sirkumventriküler organlar gibi kan beyin engeli (KBE)'den yoksun beyin yapılardaki mikrogliyal hücrelerin zarlarındaki TLR4'ü etkinleştirerek [41], (2) beyin damar endotel hücre yüzeylerinde bulunan TLR4'e bağlanıp KBE'nin geçirgenliğini artırarak [42], (3) vagal aferent nöronların uyarılmasıyla [43] ve (4) periferik hücrelerde üretilen sitokinlerin KBE'den geçişiyle [36]. Ayrıca, sistemik yoldan uygulanan LPS ile ortaya çıkan nöroinflamasyonun, endotoksemi süresince SSS'deki hematopoietik olmayan hücrelerdeki TLR4 proteini ile sürdürüldüğü bildirilmiştir [44]. Öte yandan, araştırmaların önemli bir bölümü enfeksiyona yanıt olarak ortaya çıkan hastalık yanıtına periferde proinflamatuvar sitokinlerin salıverilmesi ile başlayan olaylar dizisinin neden olduğunu göstermektedir. İnflamatuvar mediyatörler basit doku zedelenmelerinde zedelenmenin olduğu bölgede yerel olarak oluşturulup ağrı eşiğinde o bölgeye özgü değişime neden olurken, sistemik inflamasyonda ağrı algılanmasında genel bir değişiklik ortaya çıkarırlar. Bu mediyatörler periferik nöron uçları, birinci ağrı nöronu ve omurilik ile beyindeki türlü merkezlerdeki sinyal iletimine etkiyerek hiperaljezi ortaya çıkmasına aracılık ederler [34, 45, 46].

Bakteriyel LPS bağışıklık sistemi yanıtının oluşumunda rol oynayan hücre zarlarında bulunan reseptör proteini olan TLR4'e bağlanır. TLR4 sinyal ileti yolu MyD88'e ve *toll*-interlökin-1

(IL) reseptör alan içeren adaptör indükleyici interferon (IFN)-β (*toll-interleukin-1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon-β*; TRIF)'e bağlı olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. MyD88'e bağımlı yolda *toll-IL-1 receptor domain containing adaptor protein* aracılığıyla MyD88'e iletilen uyarı IL-1 reseptörü ile ilişkili kinaz 1/4, tümör nekrozlaştırıcı faktör (TNF) reseptörü (TNFR) ile ilişkili faktör (*tumor necrosis factor receptor-associated factor*; TRAF) 6, TAK1, κB inhibitörü (*inhibitor of κB*; IκB) kinaz (*IκB kinase*; IKK) α (IKK1), IKKβ (IKK2), IKKγ (IKK3) ve mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz (*mitogen-activated protein kinase*; MAPK)'ler gibi sinyalleyici moleküller (MAPK kinaz [MEK] 1, MEK3/6 ve MEK4; ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz [*extracellular signal-regulated kinase*; ERK] 1/2], p38 MAPK ve *c-Jun N-terminal kinase* [JNK] 1/2) aracılığıyla proinflamatuvar mediyatörlerin oluşumunu artırmak üzere etkinleştirici protein (*activator protein*; AP)-1 ve NF-κB gibi transkripsiyon faktörleri etkinleştirilmektedir. NF-κB LPS, sitokinler, mitojenler, mekanik ya da oksidatif stres gibi birçok fizyolojik ve patolojik uyarana yanıt olarak inflamasyon ve stres ortaya çıkmasında rol oynayan genleri doğrudan düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Etkinleşmemiş NF-κB, alt birimleri olan p65 ve p50 biçiminde sitoplazmada IκB-α'ya bağlı bulunmaktadır. LPS uyarısına yanıt olarak 2 katalitik alt birim (IKKα ve IKKβ) ile bir düzenleyici alt birim (IKKγ) içeren IKK kompleksi türlü adaptör proteinler aracılığıyla fosforillenerek etkinleşmekte ve NF-κB'nin bağlı bulunduğu IκB-α'yı fosforilleyerek proteinin ubikuitin proteazom yoluyla degredasyonuna neden olmakta ve böylece NF-κB serbestleşmektedir. Serbestleşen NF-κB nükleusa geçmekte ve hiperaljezik mediyatörlerden PGE_2 gibi prostaglandin (PG)'lerin sentezinde rol oynayan COX enzimleri ile TNF-α, IL-1β ve -6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu artırarak inflamasyonun başlaması ve yayılmasına neden olmaktadır [47-50].

2.3. Deneysel Ağrı Modelleri

Ağrı, deri, kas, eklem, viseral organlar vb. etkilenen doku ile termal, mekanik, inflamatuvar, nöropatik vb. zedelenme mekanizmasına geniş ölçüde bağımlı bir biçimde değişiklik gösteren heterojen bir fenomendir. Hayvan modellerinde ağrı davranışının ölçümü için kullanılan testler refleksif ve refleksif olmayan testler olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Zararlı uyaranlara yanıt olarak gözlenen refleksif davranışların ölçümü ağrı mekanizmasını incelemek için yıllardır kullanılmaktadır. Bu yöntemler nosisepsiyonun fizyolojik temelinin anlaşılması, ağrı davranışıyla ilişkili nörotransmiterler, reseptörler, hücre içi ulaklar ve genlerin aydınlatılmasıyla var olan farmakolojik ya da farmakolojik olmayan ağrı tedavilerinin daha iyi anlaşılmasına birincil derecede katkı sağlamışlardır. Rodent modellerinde refleksif duyusal yanıtları azaltan analjeziklerin birçoğunun farmakolojik davranışının (etki, güç, etki süresi vb.) insanlarda görülen analjezi ile

uyumlu olduğu gösterilmiştir. İnsanlarda görülen hiperaljezi rodentlerde termal (kuyruk ısıtma [*tail flick*], sıcak zemin [*hot plate*], pençeye radyan ısının uygulandığı Hargreaves [Plantar®] ve soğuk zemin [*cold plate*] testleri), basınç ya da gerim gibi mekanik (von Frey, Randall-Selitto ve gerim ölçümü [*strain gauges*] testleri), elektriksel ya da aseton buharı gibi kimyasal uyarılar kullanılarak nosiseptörler aracılığıyla verilen ağrı davranışını ölçen refleksif ağrı testleri ile incelenebilmektedir. Refleksif olmayan ağrı testleri kullanılarak da asetik asit, formalin, hardal yağı, kapsaisin ve para-benzokinon gibi enflamatuvar bir madde uygulanmasının ardından pençe yalama/kaldırma veya kıvranma gibi insanlarda görülen dinlenme durumundaki ağrıyı taklit eden kendiliğinden ortaya çıkan ağrı davranışlarının değerlendirilmesi yapılmaktadır. Bu tür çalışmalarda termal kaçış (*thermal escape*), koşullu yer kaçınma (*conditioned place avoidance*) ve yer kaçış sakınma paradigma (*place escape avoidance paradigm*) gibi yöntemlerle ağrılı uyarandan kaçınma davranışı değerlendirilebilmektedir. Ayrıca, etkinlik ve sterotipik davranışlar da değerlendirilerek ağrının yaşam kalitesi ve işlevsellik üzerindeki etkisine ilişkin veriler elde edilebilmektedir. Ağrı testlerinden kuyruk ısıtma testinde aslında spinal bir refleks ortaya çıkmasına karşın gecikme süresi beyin sapı ve kortikal yapılar tarafından düzenlenmektedir. Öte yandan, sıcak zemin testinde hayvanın hangi pençesini kaldıracağını seçmesi için supraspinal yapıların gerekliliğinin olması, bu testin refleksif test olmanın ötesine geçtiğini ve supraspinal yapıların entegrasyonunu gerektirdiğini göstermektedir. Akut ve kronik inflamatuvar ağrı modelleri ise, kapsaisin, karagenin, bakteriyel LPS ve tam Freund adjuvanı gibi irritanların deri, pençe, kas, eklem ve viseral organlara uygulanmasıyla oluşturulabilmektedir. Algılanan inflamatuvar ağrı ise, kuyruk ısıtma ve elektrik testleri dışında sıklıkla yukarıda sayılan testler ile ölçülebilmektedir [35, 51-53].

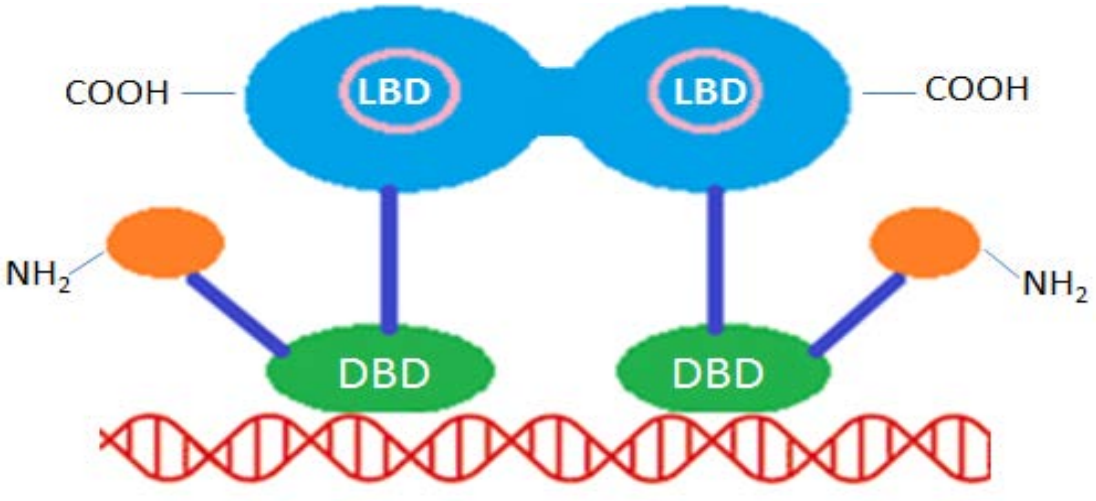
2.4. Nükleer Reseptörler

Nükleer reseptörler, türlü fizyolojik süreçler ile ilişkili hedef genlerin ekspresyonunu düzenleyen, lipofilik zardan geçebilme yeteneğine sahip ligantlar ile etkinleştirilen transkripsiyon faktörleridir. [54].

1984 yılında ilk olarak glukokortikoit hormonu reseptörünün klonlanmasından bu yana yüzlerce nükleer reseptör izole edilmiştir. Filogenetik analizler sonucunda nükleer reseptörler kapsamlı bir biçimde gruplandırılmıştır. Buna göre nükleer reseptörler altı alt aileye ayrılmıştır. Grup 1 reseptörler, retinoik asit reseptörü (RAR), tiroit hormon reseptörü (TR), D vitamini reseptörü (*vitamine D receptor*; VDR), peroksizom proliferatör ile etkinleştirilen reseptör (*peroxisome proliferator-activated receptor*; PPAR), karaciğer X reseptörü (*liver X receptor*; LXR), farsenoit X reseptörü (*farsenoid X receptor*; FXR) gibi RXR ile heterodimerizasyonları iyi

tanımlanmış reseptörleri içerir. Grup 2 reseptörleri RXR ve hepatosit nükleer faktörü oluşturmaktadır. Grup 3 reseptörler steroit hormon reseptörlerini içerir. Grup 4, 5 ve 6 reseptörler ise endojen ligantları henüz tanımlanmamış yetim reseptörleri içermektedir. Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (*Food and Drug Administration*; FDA) tarafından onaylanan ilaçların %13'ü bilinen 48 insan nükleer reseptörlerini hedeflemektedir [54-56].

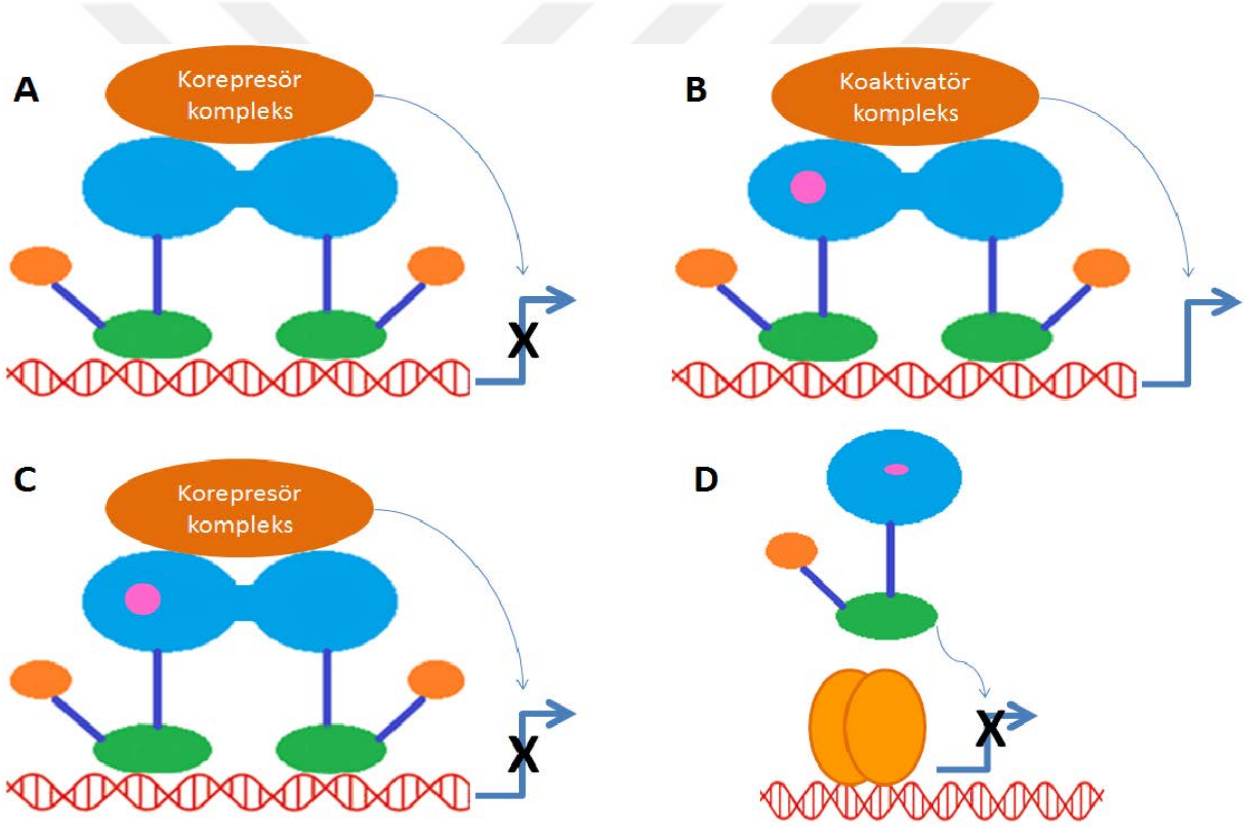
Lipit sinyalinin transkripsiyonel düzenlemeye dönüşmesi düzenleyici alanlar içeren korunmuş yapılar ile sağlanmaktadır. Reseptör yapısında N terminal bölgesi liganttan bağımsız olarak etkinleşen türlü alanları barındırır. Yüksek derecede korunmuş deoksiribonükleik asit (DNA) bağlayıcı bölge (*DNA-binding domain*; DBD) hormon yanıt elementleri olarak bilinen özelleşmiş DNA sekanslarına hedefleyen 2 çinko parmak motifi içerir. C terminal bölgesi özel lipit ligantlarını seçici bir biçimde tanıma ve dimerizasyon yüzeyi oluşturma yeteneğine sahip ligant bağlayıcı bölge (*Ligand-binding domain*; LBD)'yi kapsar. Dahası, LBD koaktivatör ve korepresör kompleksler ile etkileşerek reseptörün transkripsiyonel düzenleyici işlevindeki ligantın neden olduğu değişikliklerden sorumludur. Bu etkileşimler birincil olarak LBD'nin C terminal bölgesine yerleşik ligant bağımlı etkinleşme işlevi alanında ligant ile indüklenen yapısal değişiklikler ile düzenlenir. Değişken eklem bölgesi DBD ile LBD'yi bağlayarak reseptöre yapısal esneklik kazandırır (Şekil 2.2.) [54, 55].



Şekil 2.2. Nükleer reseptörlerin yapısı [54].

Birçok nükleer reseptörün DNA'ya bağlanma ve transkripsiyonel etkinliği için zorunlu dimerizasyon eşi olarak RXR gerekmektedir. Genel prensip olarak, RXR heterodimerleri AGGTCA dizisi içeren yanıt elementine bağlanır. RXR heterodimerleri ile represör kompleksin oluşması

yoluyla ligant yokluğunda transkripsiyonel represyonun ortaya çıktığı düşünülmektedir. Ligant bağlandığında, korepresör kompleks ile koaktivatör kompleksin moleküler değişimi sonucu transkripsiyonel aktivasyon ortaya çıkar. Ek olarak, ligant bağlı reseptörler "transrepresyon" adı verilen bir fenomen yoluyla DNA'ya bağlanmadan gen ekspresyonunun düzenlenmesine katkıda bulunabilir. Antienflamatuvar etkinliğin bu yol aracılığıyla ortaya çıktığına inanılmaktadır (Şekil 2.3.) [57]. Ligant bağlanmamış grup 3 reseptörler (steroit hormon reseptörleri) sitoplazmada ısı şok proteinleri, koşaperon p23 ve immünofilinler ile kompleks biçimde bulunurlar. Ligant varlığında reseptör kompleksten ayrılarak nükleusa girer. Öbür reseptörler ise liganttan bağımsız bir biçimde nükleusta bulunmaktadır [54, 55].



Şekil 2.3. Nükleer reseptör etkinliğinin temel mekanizması [57]. *A. Liganttan bağımsız korepresör toplanması ve gen represyonu. B. Liganta bağımlı koaktivatör toplanması ve gen etkinliği. C. Liganta bağımlı korepresör toplanması ve gen represyonu. D. Öbür transkripsiyon faktörleri ile düzenlenen gen etkinliğinin liganta bağımlı transrepresyonu.*

2.4.1. RXR'ler

2.4.1.1. Özelllikleri

A vitamini ve türevleri olan retinoitler gelişme, farklılaşma ve homeostaz başta olmak üzere birçok fizyolojik olayda retinoit reseptörlerini etkinleştiren mediyatörlerdir. RAR'lar ilk bulunan retinoit reseptörleridir. RXR ise, 1990 yılında Mangelsdorf vd. tarafından "retinoitlere duyarlı yeni bir transkripsiyon faktörü" olarak tanımlanmıştır. Bu reseptörler yapısal olarak benzer olmakla birlikte, farklı retinoit türlerine karşı değişen derecede afinite gösterirler. Özgül retinoit izomerlerinin oluşumu gerekli hücresel etkinliğe bağlı olarak düzenlenmektedir. Retinoitlerin çok sayıda etki oluşturması, retinoit etkinliğe aracılık eden nükleer reseptörlerin kompleks biyolojisini yansıtmaktadır [58, 59].

RXR'ler hücre büyümesi, farklılaşması, yaşam ya da ölüm gibi olayları kontrol eden gen ağının başlıca düzenleyicileri olmasının yanı sıra, türlü nükleer reseptör süper ailesi üyeleri ile zorunlu heterodimer oluşturarak birçok metabolik sistem arasında eşsiz bir düzenleyici ve bütünleştirici rol oynamaktadır. RXR'ler için tanımlanmış ilk endojen ligant RAR'a da bağlanabilen 9-cis retinoik asittir. Dokozahekzaenoik asit ise RXR agonisti olarak tanımlanan bir başka endojen moleküldür. Fitanik asit, metoprenik asit, honokiol ve dantron öbür doğal RXR ligantlarıdır. A vitaminine kimyasal olarak benzeyen ancak RXR'lere özgül olarak bağlanıp RAR'lara bağlanmayan bileşiklere "reksinoit" adı verilmektedir [58].

Nükleer reseptörlerin RXR ile oluşturdukları heterodimerler permisif olmayan ve permisif heterodimerler biçiminde iki türdür. Permisif olmayan heterodimerizasyonda etkinin ortaya çıkmasında RXR'nin ligantı ile etkileşiminin bir önemi yokken, yalnızca bir başka reseptörün ligantı ile etkileşimi sonucu heterodimer etkinleşebilmekte ve etki oluşmaktadır. RXR'nin VDR ve TR ile oluşturduğu heterodimer permisif olmayana örnektir. Permisif heterodimerizasyonda ise, herhangi bir reseptörün agonistle etkileşmesi etkinin ortaya çıkabilmesi için yeterlidir. Ek olarak, her ikisinin birlikte ligantı ile etkileşmesi sinerjik bir yanıt sağlayabilmektedir. RXR'nin PPAR, LXR ve FXR ile oluşturduğu heterodimer permisif dimerizasyona örnektir. Örneğin, RXR agonistleri tarafından PPAR/RXR heterodimeri etkinleştirildiğinde insülin duyarlılığına ilişkin etkiler ortaya çıkabilmektedir. Koşullu permisif heterodimerizasyonda ise, RXR'nin eş reseptörünün agonistle etkinleşmesi transaktivasyonu sağlarken, RXR agonistinin bağlanması da etkinliği artırabilir. Bu tür etkileşime örnek olarak RXR/RAR birleşmesi verilebilir. Dermatolojiden onkolojiye dek geniş bir yelpazede klinik kullanımı amaçlayan birçok RXR heterodimerini hedefleyen bileşik bulunmaktadır [58, 60, 61].

Memelilerde RXRα, RXRβ ve RXRγ olmak üzere üç izotip kodlanmaktadır. Bunların ligantları ile hedef sekansları ortaktır. Ancak, dokulardaki ekspresyon miktarları değişkenlik göstermektedir. Her izotip doku ve gelişim evrelerine özgü birçok değişik izoform içermektedir. RXRα karaciğer, akciğer, kas, böbrek, bağırsak ve beyinde yüksek oranda eksprese edilirken, RXRγ beyin, kalp ve iskelet kasında yoğun olarak eksprese edilmektedir. RXRβ ise, yaygın olarak tüm vücutta eksprese edilmektedir [58, 61].

2.4.1.2. Ekspresyon ve Etkinliğinin Düzenlenmesi

RXR hücre içinde işlevine uygun biçimde homotetramer, homodimer ya da heterodimer olarak bulunabilmektedir. Homotetramerler transkripsiyonel açıdan etkin değillerdir. Ligant bağlanması homotetramerin ayrılması ve transkripsiyonel açıdan etkin homodimerler ile heterodimerlerin oluşmasını sağlar. Canlı hücrelerde yapılan floresans çalışmalarıyla RXR heterodimer oluşumunun yalnız ekzojen RXR agonisti varlığına bağlı olmadığı gösterilmiştir. Alternatif olarak ortamda eş reseptör ligandının varlığı ile de homotetramer ayrışmasının tetiklenebileceği düşünülmektedir. Bu görüş PPARα-RXR heterodimeri başta olmak üzere birçok heterodimer ile yapılan çalışmalarla uyumludur. RXR homotetramerinin sitoplazmik bir protein olan fosfoinozitit 3-kinaz (*phosphoinositide 3-kinase*; PI3K)'ın düzenleyici alt ünitesi olan p85α ile etkileşimi sonucu PI3K/Akt yolunu etkinleştirerek genomik olmayan sitoplazmik etkilere yol açtığı gösterilmiştir [62, 63].

RXR homodimerlerinin oluşumu ile DNA'ya bağlanması *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir. Canlı hücreler bir RXR agonistine maruz bırakıldığında RXR homodimerinin oluştuğu, floresans kolerasyon spektroskopisi ile gösterilmiştir [64]. 9-*cis* retinoik asidin bağlanması homodimer oluşmasını tetiklemekte ve ardından *steroid receptor coactivator-1* ile *transcriptional intermediary factor 2* gibi koaktivatörler reseptörün yakınında toplanmaktadır. Bu adımlar, RXR-RXR homodimerinin *direct repeat 1* yanıt elementine kenetlenmesini güçlendirmektedir. Ancak, homodimer etkinliğinin fizyolojik etki derecesi RXR agonistinin doğası çözülmedikçe tam olarak değerlendirilememektedir [62, 63].

RXR etkinliği translasyon sonrası düzeyde birden çok mekanizma ile de düzenlenebilmektedir. Ubikuitin-proteazom mekanizmasının heterodimer etkinliği üzerindeki etkisinin izoforma özgül olduğunu düşündüren çalışmalar bulunmaktadır. Hücre kültürü çalışmaları ile ve *in vitro* adipoz doku çalışmalarında RXRα'nın bu yol ile degredasyona uğradığı, buna karşın RXRβ'nın degredasyona uğramadığı gösterilmiştir [65]. RXRα'nın proteazom aracılığıyla gerçekleşen degredasyonu MAPK ya da protein kinaz (PK) C tarafından özgül serin rezidülerinden fosforilasyonuyla da bağlantılıdır. Bu translasyon sonrası düzeydeki

modifikasyonun RXR'lerin hücre çoğalması ile kanser gelişimindeki potansiyel katkısı açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Tümörde bulunan RXR, katepsin L ve kalpain ile degredasyona uğratılarak 44 kDa ağırlığında bir parça oluşturmakta ve bu parça sitozole geçerek kanser hücresinin yaşam yolunu etkinleştirmektedir. Bu bulgu, ayrıca, RXR'lerin hücresel yerleşimini yöneten mekanizmaların transkripsiyonel etkinliklerini kontrol edebileceği ve buna bağlı biçimde RXR'lerin çekirdek dışında da etkilerinin olduğunu düşündürmektedir [66].

2.4.1.3. Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü

RXRα ekspresyonundaki bozukluklar RXRβ ve RXRγ ile karşılaştırıldığında çok daha önemli kayıplarla sonuçlanmaktadır. Fare cinsiyet hücrelerinde RXRα geninin işlev kaybını hedefleyen mutasyonlar homozigot embriyolarda (E13.5 ve E16.5 arasında) embriyo ölümüne neden olmaktadır [67]. Letal fenotip ventriküler septasyondaki bozukluk ve ventrikül duvarının incelmesiyle kardiyak ventriküler hipoplaziye bağlıdır. Doğum sonrası yaşamda adipoz dokuda RXRα'nın eksikliği preadiposit farklılaşmasındaki değişikliğe ve obeziteye karşı dirence neden olmaktadır. Ayrıca, açlık boyunca adipositlerde bozulmuş lipolize neden olur. PPARγ$^{+/-}$ farelerde de adipojenez bozulmuş olduğundan (PPARγ$^{-/-}$ embriyoletal), RXRα geni eksik farelerde görülen bu durumun RXRα/PPARγ heterodimerinin kaybına bağlı olduğu düşünülmektedir [68]. VDR$^{-/-}$ farelerde de bu bozukluklar gelişmekte olduğundan, RXRα/VDR heterodimerinin saç döngüsünün düzenlenmesinde kritik rol oynadığı düşünülmektedir [69]. Karaciğerde RXRα delesyonu ile LXR, PPARα, yapısal andorstan reseptörü β, pregnan X reseptörü ve FXR ile düzenlenen fizyolojik yollar riske atılmaktadır. RXRα$^{-/-}$ farelerde lipit metabolizmasındaki bozuklukların çoğu LXR$^{-/-}$ farelerdekine benzer biçimde olmuştur. RXRα/LXR heterodimerinin hepatik lipit metabolizmasında başlıca rol oynadığı gösterilmiştir. RXRα$^{-/-}$ farelerin fenotipinin PPARα$^{-/-}$'ya benzer olması yine RXRα'nın PPARα etkinliğinde kritik rol oynadığı düşüncesini desteklemektedir [70]. RXRα geni eksik farelerde hepatosit yaşam ömrü yabanıl türden daha kısadır ve rejeneratif kapasite bozulmuştur [68]. RXRα'nın prostatta da eksikliği preneoplastik lezyonlara yol açar, ayrıca multifokal hiperplazi ve sekretuvar proteinlerin profilinde değişikliğe neden olur. RXRβ *null* mutantların yarısı doğum öncesi dönemde ya da doğum sürecinde kaybedilmiştir [71]. Yaşayan erkeklerde ise kısırlık görülmüştür. RXRα$^{-/-}$ ve RXRβ$^{-/-}$ fareler, RXRα *null* farelerden daha önce ölmüştür. RXRα kaybı birçok dokuda RXRβ ile dengelenmektedir; ancak, ikisinin birden eksikliği ciddi gelişimsel anormal fenotipe neden olmaktadır. RXRγ *null* fareler normal gelişim göstermektedirler ve heterozigot/yabanıl türden ayırt edilmeleri olanaksızdır. Bu farelerde serum tiroksin ve tiroidi uyarıcı hormon düzeyi ile metabolizma hızları daha yüksek bulunmuştur [72]. RXRα$^{-/-}$ ve RXRγ$^{-/-}$ fareler RXRα$^{-/-}$'ye benzer. RXRγ$^{-/-}$ ve RXRβ$^{-/-}$ fareler ile RXRα$^{+/-}$ ve RXRβ$^{-/-}$ ile

RXRγ$^{-/-}$ mutant fareler elde edilebilir. Bunlarda büyüme yetersizliği ve RXRβ kaybına bağlı erkekte kısırlık görülmektedir; ancak, RXRα tek aleli normal gelişme ve morfojenez için yeterlidir. Günümüzde dual RXRα/β agonisti, RXRα agonisti ve RXRα/γ agonisti gibi RXR izotiplerine özgül reksinoitler geliştirilmektedir. Ancak, özgüllük açısından yetersiz olduklarından farmakolojik yaklaşım olarak kullanılabilmeleri için daha çok araştırmaya gereksinim vardır [58, 73].

RXR'ler öteki nükleer reseptörler ile heterodimer oluşturdukları için birçok biyolojik süreçte asıl düzenleyicidirler. RXR/LXR, RXR/FXR ve RXR/PXR gibi birçok permisif heterodimer aynı RXR ligandı için hedef olabilmekte, bunun sonucu olarak bazen değişik hedefler ile birbirine ters etkiler ya da yan etkiler de ortaya çıkabilmektedir. Örneğin, kütanöz T hücreli lenfoma tedavisinde kullanılan beksaroten aynı zamanda LXR/RXR heterodimerini etkinleştirip trigliserit düzeyinin yükselmesine neden olmaktadır [74]. İstenmeyen etkilerin ortaya çıkması araştırmacıları heterodimere özgül reksinoitlerin tasarım ve sentezine yönlendirmiştir. Bu çalışmalardan birinde PPAR/RXR heterodimerine özgül agonistler olan LG100754 ve LG101506 bir tip 2 diyabet modelinde kullanılan db/db farelerde kan glukoz düzeyini düşürmede etkili bulunmuş olup, ayrıca RXR homodimer antagonisti olduklarından kan trigliserit düzeyini değiştirmedikleri gösterilmiştir [75]. Benzer biçimde LXR/RXR heterodimerine özgül RXR agonistleri de yüksek kolesterol içeren aterojenik diyetle beslenen Sprague-Dawley erkek sıçanlarda kolesterol düzeyini düzenleyen bir protein olan ABCA1 ekspresyonu yoluyla toplam kolesterol düzeyini düşürmüştür [76].

RXR'lerin nükleer bir transkripsiyon faktörü olmasına ek olarak, sitozolde de bazı işlevleri olduğu gösterilmiştir. Örneğin, Zhang ve ark. [77] çalışmalarında RXR'nin insan TR3/fare Nur77/sıçan *nerve growth factor-induced clone B* ile nükleustan sitoplazmaya geçtiği ve böylelikle TR3'ün mitokondriyel *B-cell lymphoma 2* ile etkileşerek antiapopitotik etkinliğini apopitoza çevirdiğini göstermiştir. Bu durum yalnızca sitoplazmik etkinlik gösteren RXR türlerinin hedef olarak geliştirilebileceği çalışmalara olan gereksinimi ortaya koymaktadır. RXR antagonistleri ile yapılan klinik öncesi çalışmalarla ise diyet ile indüklenen obezite, tip 2 diyabet ve alerjik akciğer inflamasyonu gibi kardiyovasküler ve solunum sistemi ile ilişkili hastalıklarda RXR'lerin önemli rolü olduğu gösterilmiştir [63, 78-80].

2.5. TLR4

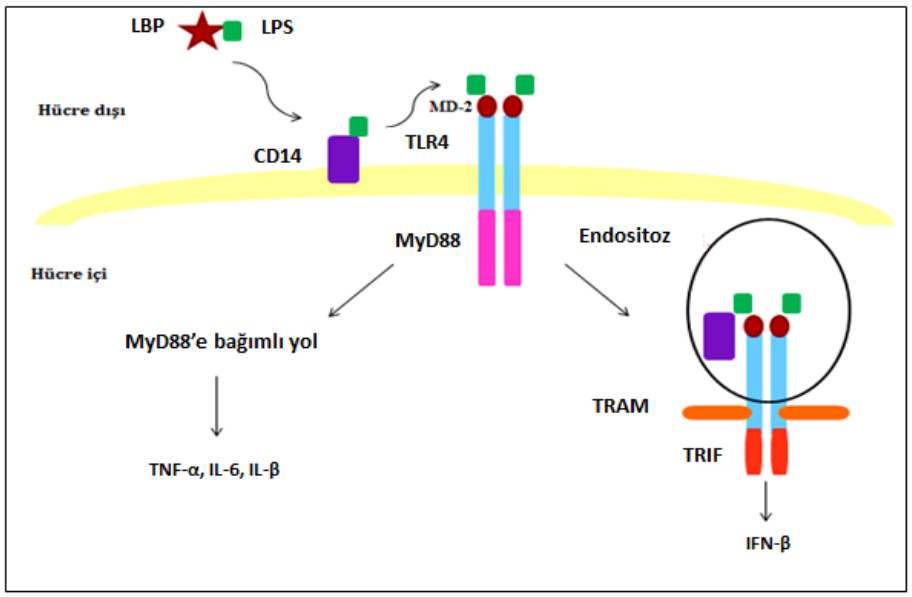
2.5.1. Özellikleri

TLR'ler tür 1 transmembranal proteinlerdir ve birçok patojen ilişkili moleküler patern (*pathogen-associated molecular pattern*; PAMP) ile etkinleştirilerek doğal bağışıklık sistemi yanıtı ile inflamasyonu başlatırlar [81]. TLR4 bakteriyel LPS'yi tanıyarak etkinleşen TLR'nin bir üyesidir. Öbür TLR'ler gibi sinyal transmisyonundan sorumlu intraselüler *translation initiation region* (TIR) bölgesi ile bağlantılı ekstraselüler kısımda bulunan lösin açısından zengin yinelenmeler ile oluşturulan modüler bir yapıya sahiptir. Dolaşımdaki LPS'nin TLR4 reseptör sistemi tarafından tanınması hücre zarında reseptör dimerizasyonunun ardından proinflamatuvar sitokinler ile interferon (*interferon*; IFN)'lerin oluşmasına yol açan bir dizi protein-protein etkileşimini başlatarak inflamatuvar ve bağışıklık sistemine ilişkin yanıtları ateşler. TLR4 LPS'ye doğrudan bağlanamaz, bir adaptör protein olan miyeloit farklılaşma faktörü (*myeloid differentiation factor*; MD-2) LPS'nin lipofilik kısmını tanıyarak ayrı bir kompleks oluşturur. Bu kompleks kovalan olmayan bağlarla TLR4'e bağlanarak $(LPS/MD\text{-}2/TLR4)_2$ heterodimerini oluşturur ve ardından sinyal hücre içine aktarılır [82, 83].

2.5.2. Ekspresyon ve Etkinliğinin Düzenlenmesi

TLR4 monositler, miyeloit dendritik hücreler, mast hücreleri ile T ve B lenfositler gibi profesyonel bağışıklık sistemi hücreleri ile sinoviyal fibroblast benzeri hücreler ve epiteliyal hücreler gibi profesyonel olmayan bağışıklık sistemi hücreleri içine alan geniş yelpazede hücre türleri tarafından eksprese edilmektedir. TLR4 ya çözünür LPS agregatlarıyla ya da tam bakteriyle etkileşim yoluyla LPS ile ilk kez ekstraselüler boşlukta karşılaşmaktadır. Sinyal hücre içine aktarılmadan önce TLR4 reseptörün proksimalindeki birçok protein ile etkileşmekte ve LPS'nin bağlanması düzenlenmektedir. TLR4'ün dimerizasyonu sonucunda "*myddosome*" adı verilen MyD88 ve TNFR ile ilişkili faktör (*TNFR-associated factor*) ile birçok serin treonin kinazı kapsayan bir yapı oluşmaktadır. Bu yapı NF-κB ve AP-1'in etkinleşmesi yoluyla inflamatuvar gen ekspresyonuna aracılık etmektedir [84]. *Myddosome* oluşmasının yanı sıra, TLR4 reseptör kompleksinin endositozu gerçekleşmektedir ve böylece adaptör proteinler *toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon-β-related adaptor molecule* ve TRIF aracılığıyla IFN-β gen ekspresyonu sağlanmaktadır (Şekil 2.4.) [85]. TLR4 reseptör kompleksinin endositozu farklılaşma kümesi (*cluster of differentiation;* CD) 14 reseptörüne bağlıdır. CD14'e bağımlı TLR4 endositozu ''inflamatuvar endositoz'' adı verilen *spleen associated tyrosine kinase/phospholipase C γ2* bağımlı yol aracılığıyla gerçekleşmektedir [86]. Öte yandan, bir başka integrin protein olan CD11b'nin

dendritik hücrelerde TLR4 endositozu ile TRIF sinyalini düzenlemesine karşın, makrofajlarda böyle bir işlevi olmadığı gösterilmiştir [87]. Makrofajlarla karşılaştırıldığında, bu hücrelerde CD11b'nin LPS'ye verilen yanıtta CD14'ün düşük ekspresyon düzeyi nedeniyle rol oynadığı düşünülmüştür. Dentritik hücrelerde TLR4'ün endositozunun etkili biçimde yapılabilmesi için CD11b gereklidir; ancak, CD11b'ü eksik olan hücrelerin sitozin-fosfo-guanin/DNA ile uyarılması CD14 ekspresyonunu artırarak bu gerekliliği ortadan kaldırabilmiştir. CD11b'nin dendritik hücrelerde TLR4 endositozuna ilişkin düzenleyici rolüne karşın, makrofajlarda TRAF ve MyD88'in degredasyonuna neden olmaktadır [88]. Sonuç olarak, tüm hücreler için tek bir hücre türündeki olaylar temsilen gösterilse de, hücre türüne özgül birçok LPS yanıtı vardır [89, 90].



Şekil 2.4. TLR4 sinyal ileti yolu [85].

2.5.3. Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü

TLR4 PAMP'lar dışında hücresel zedelenmeye yanıt olarak zedelenmiş ve nekrotik dokulardan türeyen fibronektin, hyalüronanın küçük parçaları ya da doymuş yağ asitleri gibi birçok zedelenmeyle ilişkili moleküler patern (*damage-associated molecular pattern*; DAMP) ile de etkinleştirilebilmektedir. Dahası endojen *high-mobility group box* 1 ile okside fosfolipitler de TLR4'ü etkinleştirebilmektedir. DAMP'lar ateroskleroz, romatoit artrit (RA), nöroinflamasyon ya da travma ve hemoraji gibi TLR4'ün etkinleşmesi sonucunda ortaya çıkan patolojilerde rol oynamaktadır. DAMP/PAMP'lar tarafından etkinleştirilen TLR'lerin astrositler, mikrogliyalar ve arka kök gangliyonlarında kemokin (C-C motif) ligandı *(chemokine [C-C motif] ligand*; CCL)'ler, kemokin (C-X-

C motif) ligandı *(chemokine [C-X-C motif] ligand*; CXCL)'ler, kalsitonin geni ile ilişkili peptit (*calcitonin gene-related peptide*; CGRP), IL'ler, monosit kemoatraktan protein (*monocyte chemoattractant protein*; MCP)-1, NO, indüklenebilir NO sentaz (iNOS), PGE_2, *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted* (RANTES), ROT ve TNF-α gibi proinflamatuvar mediyatörlerin salıverilmesine aracılık ederek inflamasyonla ilişkili ağrının başlatılması ve sürdürülmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Tablo 2.1.) [91]. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, TLR4'ün ilaçların kötüye kullanımı, majör depresyon ya da amiyotrofik lateral skleroz (ALS) tedavisi için terapötik hedef olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, TLR4 antagonistlerinin periferik nöropatik ağrı tedavisindeki olası yararları birçok çalışma ile ortaya konmuştur [92-96].

Tablo 2.1. Astrositler, mikrogliyalar ile arka kök gangliyon hücrelerinde TLR etkinliği [91].

	TLR'ler aracılığıyla salıverilen mediyatörler		
	Astrositler	**Mikrogliyalar**	**Arka kök gangliyonu**
TLR1	---	---	Eksprese edilmektedir.
TLR2	NO, CXCL8, MCP-1, ROT, IL-6, -12p40	iNOS, NO, COX-2, TNF-α, IL-1β, CCL2, CXCL2	Eksprese edilmektedir.
TLR3	NO, ROT, MCP-1, CCL3, TNF-α, IL-6, -1α, -1β	NO, TNF-α, IL-1β, -6, -12	PGE_2, RANTES, CXCL10, IL-1α, -1β
TLR4	iNOS, NO, MCP-1, IFN-β, TNF-α, IL-1α, -1β, -6	iNOS, NO, CCL3, CXCL2, TNF-α, IL-1α, -6, -18	CGRP, TNF-α, IL-1β
TLR5	IL-6	---	Eksprese edilmektedir.
TLR6	---	---	Eksprese edilmektedir.
TLR7	TNF-α, IL-6, -1α, -5, -13	TNF-α, IL-1α, -6, -12, -13, -15	CXCL10, PGE_2, RANTES, IL-1α, -1β
TLR9	ROS, MCP-1, TNF-α, IL-6	NO, TNF-α, IL-6, -5, -13, -15	CXCL10, PGE_2, RANTES, IL-1α, -1β

PAMP/TLR4 ile ilişkili hastalıklar arasında sepsis en ağır olanıdır. Sepsis yaşamı tehdit eden akut organ işlev bozukluğuna neden olan konak organizmanın patojenlere karşı verdiği aşırı ve düzensiz yanıtıdır [97]. TLR4'ün hücre içi ve hücre dışı bileşenleri aşırı sitokin oluşumuyla ilişkili hem akut (sepsis gibi) hem de kronik hastalıkların tedavisi için ilgi çekici terapötik hedeflerdir. Dahası, bazı enflüanza virüs suşlarının öldürücülüğü, viral enfeksiyon nedeniyle ortaya çıkan akut akciğer zedelenmesinin bir sonucu olarak oluşturulan yükseltgenmiş fosfolipitler gibi DAMP'lar tarafından normal olmayan TLR4 etkinleşmesine bağlıdır [98]. TLR4 modülatörlerinin endojen

DAMP'lar tarafından etkinleşmesi sonucu ortaya çıkan patolojilerde kullanımı henüz çok yenidir ve klinik öncesi çalışmalar umut vericidir. TLR4 reseptör blokörleri gibi bazı küçük moleküler toksisite oluşturmadan DAMP/TLR4 sinyalini engelleyerek nöropatik ağrı, ALS, RA, vasküler inflamasyon ve ateroskleroz gibi inflamatuvar ve otoimmün hastalıkları önlemede etkili bulunmuştur [99-104].

2.6. MyD88

2.6.1. Özellikleri

MyD88 insanda viral ya da bakteriyel enfeksiyonlar sonucu ortaya çıkan bağışıklık sistemi yanıtları ile doğal bağışıklık sistemi yanıtlarını düzenleyen bir adaptör proteindir. TLR'ler ile IL-1 reseptörleri mikroorganizmalar ya da endojen ligantları tanır ve MyD88'e bağımlı sinyal ileti yolunun etkinleşmesi için gerekli olan MyD88 moleküllerinin ilgili yere toplanmasını sağlar. C terminal bölgesi TIR bölgesi taşıyan proteinler (reseptörler ya da adaptörler) ile etkileşmesine aracılık ederken, N terminal bölgesi homotipik *death domain* (DD) etkileşimi yoluyla IL-1 reseptörü ile ilişkili kinaz (*interleukin-1 receptor-associated kinase*; IRAK) ailesi üyeleriyle etkileşmesine aracılık eder. Bu rollerle uyumlu biçimde DD'nin aşırı ekspresyonu NF-κB ve JNK'nin kendiliğinden etkinleşmesine yol açmaktadır. MyD88'in orta bölgesi TIR ile DD bölgelerini bağlar. Bu bölge sözü edilen etkileşimlerde rol almıyor gibi görünse de, IRAK4'ün etkinleşmesi için önemlidir [105, 106].

2.6.2. Ekspresyon ve Etkinliğinin Düzenlenmesi

MyD88 hemen hemen tüm dokularda eksprese edilmektedir. TLR ya da IL-1 reseptörlerinin ligant ile etkinleşmesi bu reseptörlerin sitoplazmik bölümündeki TIR bölgesinin MyD88'in yapısında bulunan TIR bölgesi ile homofilik etkileşimi yoluyla dimerleşmesini sağlar. MyD88 ardından IRAK ailesi üyeleriyle DD bölgesi üzerinden homofilik etkileşerek "*myddosome*" adı verilen multimerik kompleks oluşturur. Bu kompleks sırasıyla MAPK'ler ve nükleer transkripsiyon faktörlerinin etkinleşmesini sağlayarak inflamasyona neden olur [105, 107].

TRAF3 TLR sinyal ileti yolundaki MyD88'den bağımsız yolda rol oynayan bir adaptör proteindir. TRAF3'ün TRIF kompleksindeki rolünün yanı sıra, MyD88 kompleksine de katıldığı gösterilmiştir. TRAF3, MyD88 kompleksine katıldığı zaman kompleks degredasyona uğramaktadır. Bunun anlamı, TRIF bağımlı sinyal ileti yolunun etkinliğini desteklemesinin yanı sıra, MyD88'e bağımlı sinyal ileti yolunu inhibe edici role sahip olduğudur. Ayrıca, bir E3 ubikuitin ligaz olan *ring finger protein 41* MyD88'e bağlanarak onun ubikuitinlenmesine yol açmakta ve böylece MyD88'in degredasyonu sonucu proinflammatuvar sitokin oluşumunu azalmaktadır [108, 109].

Antijen sunan hücrelerdeki *major histocompatibility complex* grup II moleküler bir kostimülatör molekül olan CD40 aracılığıyla Bruton tirozin kinazının etkinleşmesini sağlar.

Etkinleşen kinaz, MyD88 ve TRIF ile etkileşerek MyD88 ve TRIF'e bağımlı yolları etkinleştirerek sırasıyla proinflamatuvar sitokin ile tür I IFN'lerin oluşumuna neden olur [110, 111].

2.6.3. Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü

MyD88 ekspresyonu yetersiz bireylerde birçok viral, fungal ya da parazitik enfeksiyonlara karşı anormal duyarlılık görülmemekle birlikte, MyD88 yokluğu sonucu yaşamı tehdit eden pirojenik bakteriyel enfeksiyonlar ortaya çıkmaktadır. MyD88'den bağımsız sinyal yolları virüsler başta olmak üzere birçok patojene karşı ortaya çıkan doğal ve adaptif bağışıklık sistemi yanıtı oluşumuna aracılık edebilmektedir. Bu sinyal yolları MyD88 yetersizliğini dengeleyebilmektedir [112]. TLR/MyD88 sinyal ileti yolu enfeksiyonların yanı sıra, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, kronik akciğer hastalıkları ve kanser gibi kronik inflamasyonla belirgin hastalıklarla da ilişkili bulunmuştur [113-115]. Myeloit hücrelerde MyD88 eksikliğinin makrofaj toplanması ile M1 makrofaj sisteminin etkinliğini önlediği gösterilmiştir. Dahası *in vivo* ve *ex vivo* çalışmalar endoteliyal hücrelerde oluşturulan MyD88'e bağımlı büyüme faktörlerinin etkisi ile arteriyel ve adipoz dokulardaki monositlerin proinflamatuvar makrofajlara dönüşerek inflamasyonun başlaması ve ateroskleroz gelişmesine katkıda bulunduğunu göstermiştir [116, 117].

MS hayvan modelleri ile lezyon gelişim sürecinde TLR sinyalinin önemi kanıtlanmıştır. Yaygın kullanılan bir MS modeli olan deneysel otoimmün ensefalomiyelit (*experimental autoimmune encephalomyelitis*, EAE)'de lezyon oluşturmak için deney hayvanı miyelin oligodentrosit glikoprotein ile immünize edilir. MyD88 eksik farelerin, miyelin oligodentrosit glikoprotein ile immünizasyonu ile oluşturulan EAE'ye duyarlı olmadıkları görülmüştür [118]. Kronik obstrüktif akciğer hastalığına neden olan en önemli etkenler sigaradaki bakteriyel ya da fungal kirlilikler ile bakteriyel ya da viral süperenfeksiyonlardır. Bu patojenler PAMP oluşumuna neden olarak TLR/MyD88 sinyal ileti yolunu etkinleştirirler. Dahası, IL-1 reseptörü (*interleukin-1 receptor*; IL-1R)'nin birçok IL-1 ailesi üyesi ile etkinleşmesi MyD88 sinyal ileti yolunu etkinleştirerek inflamatuvar yanıtın çoğalmasına katkıda bulunur [113]. Öte yandan, insanda 265. pozisyondaki lösin amino asidinin proline değişimine yol açan MyD88 mutasyonu lenfoma gelişmesiyle ilişkili bulunmuştur. Dolayısıyla, MyD88 ve ilişkili sinyallerdeki değişikliklerin kanserle ilişkili inflamasyonun ilerleyişi ile karsinojenez gelişiminde rolü olduğu gösterilmiştir. Dahası, anormal MyD88 ekspresyonu lenfoit, karaciğer kanseri ya da kolorektal kanser gibi türlü kanser türlerinin ilerleyişi hakkında kestirimde bulunmak için de kullanılmaktadır [119]. MyD88'e bağımlı sinyal ileti yolu inflamasyon ve kanser gelişmesine aracılık eden önemli bir yol olduğu için, bu genin hedeflenmesi türlü *solid* tümörlerin tedavisinde önem kazanmaktadır. Günümüze dek

doğal ya da yapay birçok değişik bileşiğin MyD88'e bağımlı sinyal ileti yolunu hedefleyerek kolit ve kansere karşı etkinlik gösterdiği bildirilmiştir. Örneğin, Zhang vd. [120] elmadan elde ettikleri polisakkarit ekstresinin TLR4/MD-2'nin aracılık ettiği MyD88 ve TRIF ile NF-κB'nin aracılık ettiği sinyal yollarının inhibisyonu yoluyla kolit ile ilişkili kolorektal kansere karşı koruyucu rolü olduğunu göstermişlerdir. *Tripterygium wilfordii polycoride*'ın TLR4/MyD88 sinyal ileti yolunu baskılaması ve NF-κB, TNF-α ile IL-1β gibi inflamatuvar mediyatörlerin oluşumunu azaltması sonucunda intestinal mukozanın onarımı ve iyileşmesini sağladığı ve böylece ülseratif koliti önlediği gösterilmiştir [121]. Dahası, manganez süperoksit dismutazın TLR4/MyD88/NF-κB sinyal ileti yolunu baskılaması sonucunda inflamatuvar mediyatör oluşumunu önleyerek ve antioksidan etki göstererek kolite karşı koruyucu etkinlik gösterdiği bildirilmiştir [122]. Ek olarak, bir 5-HT_3 reseptör antagonisti olan ve antiemetik olarak kullanılan tropisetronun da TLR4/MyD88 sinyal ileti yolu ile ilişkili inflamatuvar yanıtları baskılayarak kolorektal kanser gelişmesini önlediği gösterilmiştir [123]. Hipolipidemik bir ilaç olan atorvastatin TLR4/MyD88/NF-κB sinyal ileti yolu üzerinden trinitrobenzensülfonik asit ile oluşturulan koliti önlemiştir [124]. Öte yandan, seçici bir MyD88 inhibitörü olan TJ-M2010-5 inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu ile bağışıklık sistemi hücrelerinin infiltrasyonunu azaltarak kolorektal kanser ilerleyişini baskılamıştır [125]. MyD88'in TLR/IL-1R ile Ras onkojenik sinyal ileti yolu arasında köprü rolü oynadığı gösterilmiştir. MyD88 inhibitörlerinin kolit ya da kolorektal kanser kontrolünde umut verici birer terapötik düzenleyici olabileceği düşünülmektedir [106].

2.7. TAK1

2.7.1. Özellikleri

TAK1 MEK kinaz (*MEK kinase*; MEKK) ailesinin evrimsel açıdan korunmuş bir üyesidir. TAK1 ilk olarak TGF-α ile kemik morfojenik protein tarafından etkinleştirilen bir PK olarak tanımlanmıştır [126]. Sonraki çalışmalar TNF-α, IL-1β, TLR ligantları, T hücresi reseptörü ile B hücresi reseptörü antijenleri gibi proinflamatuvar mediyatörlerin de TAK1'i etkinleştirebildiğini ortaya koymuştur [127]. TAK1 TAK1 bağlayıcı protein (*TAK1 binding protein*; TAB) 1, TAB2 ya da TAB3 ile üçlü kompleks oluşturmaktadır. TAB1, TAK1 kinaz etkinliğinin etkinleştiricisi işlevi göstermektedir ve son zamanlarda benzer mekanizmayla MAPK p38α'yı da etkinleştirdiği bildirilmiştir [128]. TAB2, TAK1 etkinliği düzenlenmesinde karmaşık bir role sahiptir. TRAF2 ya da TRAF6 aracılığıyla ubikuitinasyon sürecinde adaptör protein olarak görev alır ve protein fosfataz toplanması yoluyla kinaz etkisizleşmesine katkıda bulunur. TAB3'ün TAB2 ile benzer role sahip olduğu düşünülmektedir. Ek olarak, TAK1 ile TRAF6'nın etkileşimine aracılık ettiği bildirilmiştir [129]. TAK1 protein kompleksi TGF-β, TNF-α ve TLR ligantları gibi birçok mediyatör tarafından

etkinleştirilerek NF-κB, p38 MAPK ya da JNK etkinleşmesi yoluyla inflamatuvar gen ekspresyonunu düzenlemektedir. TAK1'in NF-κB'yi etkinleştirerek hücrenin canlılığını sürdürmesinde, kaspaz-8'in etkinleşmesiyle apopitoz ya da reseptör ile etkileşen PK3'e bağımlı sinyal ileti yolu aracılığıyla nekropitoza neden olarak TNF-α sinyalinin düzenlenmesinde başlıca rol oynadığı düşünülmektedir [130].

2.7.2. Ekspresyon ve Etkinliğinin Düzenlenmesi

TAK1 neredeyse tüm dokularda eksprese edilen bir proteindir. TAK1 etkinliği fosforilasyon, ubikuitinasyon, asetilasyon ya da metilasyon gibi birçok translasyon sonrası düzeyde modifikasyon ile düzenlenebilmektedir. Bu modifikasyonlar hem uyarı hem de hücre türüne göre değişmektedir ve bu durum TAK1 ilişkili sinyal aktarımının karmaşıklığını yansıtmaktadır [131, 132].

TAK1 treonin (*threonine*; Thr)^{178}, Thr^{184}, Thr^{187} ile serin (*serine*; Ser)^{192} olmak üzere dört değişik Thr ya da Ser rezidüsünden otofosforillenmektedir. Bir çalışmada IL-17'ye yanıt olarak *tumor progression locus* 2'nin aracılık ettiği Thr^{187} üzerinden fosforilasyonu sonucu TAK1 sinyal ileti yolunun etkinleştiği gösterilmiştir [133]. Bir başka çalışmada ise, TAK1'in Ser^{412} üzerinden PKA'nın aracılık ettiği fosforilasyonunun TAK1'i etkinleştirdiği gösterilmiştir [132]. TAK1'in Ser^{412} rezidüsüne alanin eklenmesi sonucunda elde edilen mutant TAK1 proteini ile RAW264.7 hücrelerinde TAK1'in aracılık ettiği osteoklast farklılaşması ile sitokin oluşumunun önlenmesi TAK1 etkinleşmesi için Ser^{412} rezidüsünden fosforilasyonunun gerekliliğini ortaya koymaktadır. Dahası, TAK1'in Ser^{412} rezidüsüne alanin bağlanması sonucu p38 MAPK, JNK ile NF-κB yollarının etkinliğinin baskılanması TAK1 etkinleşmesi için Ser^{412} fosforilasyonunun gerekliliğini desteklemektedir [131]. Thr^{187} ile Ser^{412} rezidülerinin fosforilasyonu fosfatazlar tarafından negatif biçimde düzenlenmektedir. TNF-α ve IL-1β TAK1 ile *dual-specificity phosphatase* 14'ün etkileşimine yol açarak TAK1'in Thr^{187} üzerindenden defosforilasyonunu destekler [134]. Hipertrofik uyarı da kalsiyuma bağımlı fosfataz kalsinörin ile kalsinörin düzenleyicisini içeren bir mekanizma yoluyla TAK1'in Thr^{187} üzerinden defosforilasyonuna neden olmaktadır [135]. TLR'ye bağımlı TAK1 Ser^{412} fosforilasyonunun protein fosfataz 1 ile *growth arrest and DNA damage-inducible protein* 34'ün aracılık ettiği defosforilasyonu TAK1'e bağımlı inflamatuvar yanıtların sonlanmasına yol açmıştır [136]. TAB'lar da fosforillenebilme yeteneğine sahiptir. TAB1 yedi değişik rezidü üzerinden fosforillenebilmektedir; ancak, TAK1'in etkinleşmesi için bu fosforilasyonların işlevsel rolleri biri (Ser^{438}) dışında kanıtlanamamıştır. p38 MAPK inhibitörü SB203580'in TAB1'in Ser^{423} ile Thr^{431} üzerinden fosforilasyonunu güçlü biçimde baskılaması, fosforilasyonlara p38 MAPK'nin aracılık ettiğini düşündürmektedir. TAB1'in IL-1α ya da ozmotik stres ile Ser^{438}'den fosforilasyonu ERK sinyal ileti yolu inhibitörü olan PD184352 ile ya da JNK1 ve JNK2 *double knock-out* modellerde

baskılanması, bu yolun TAB1'in fosforilasyonuna katkısı olduğunu düşündürmektedir. Tersine, bir fosfataz olan DUSP14 TAB1'i Ser^{438} üzerinden defosforilleyerek T hücresi reseptörü sinyalini negatif biçimde düzenlemektedir [137]. TAB2 ile TAB3 de türlü serin rezidülerinden fosforillenebilme yeteneğine sahip olmalarına karşın, bunların fosforilasyonlarının TAK1 etkinliğindeki rolleri henüz bilinmemektedir [131, 132].

Fosforilasyona ek olarak ubikuitinasyon da en çok çalışılan translasyon sonrası düzeydeki modifikasyonlardan biridir. Bağlantı türüne bağlı olarak ubikuitinasyon değişik biyolojik süreçleri düzenlemektedir. Lizin (*Lysine*; Lys) 48 (K48) ile bağlantılı poliubikuitin zincirleri proteazomal degredasyonun bir belirtecidir, Lys63 (K63) ile bağlantılı poliubikuitin zincirleri ise değişik hücresel işlevleri düzenlemektedir. Günümüze dek TAK1 için dört değişik lizin rezidüsü (Lys 34, Lys 158, Lys 209 ve Lys 562) K63 ile bağlantılı poliubikuitinasyon için potansiyel bölge olarak tanımlanmıştır. IL-1β, TNF-α ile TGF-β'ya verilen yanıta TRAF2 ve TRAF6, TAK1 Lys 158 rezidüsünden K63 ile bağlantılı poliubikuitinasyona aracılık etmektedir. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu da *the virulence factor cytotoxin-associated gene A*'nın aracılık ettiği TAK1'in Lys 158 rezidüsünden K63 ile bağlantılı poliubikuitasyonunu desteklemesi Lys 153'ten K63 ile bağlantılı poliubikuitinasyonun TAK1 aracılığıyla sinyali pozitif biçimde düzenlediğini düşündürmektedir. Lys 562 ise, TAK1'in LPS ile indüklenen K63 ile bağlantılı poliubikuitinasyonu için yeni bölge olarak tanımlanmıştır [50]. TAB1, TAB2 ve TAB3'e de poliubikuitin zincirlerinin bağlanması ya da deubikuitinasyon sonucunda TAK1 sinyalinin düzenlendiği gösterilmiştir [138-140].

TAK1'in fosforilasyon bölgelerinden asetilasyonu da etkinliğinin azalmasına neden olan bir başka translasyon sonrası düzeyde mekanizmadır. TAK1 etkinliğinin düzenlenmesinde rol alan öteki mekanizmalar ise TAK1, TAB2 ya da TAB3'ün amino asit rezidülerinden metilasyonu ya da glikolizasyonudur [132].

2.7.3. Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü

NF-κB ile AP-1 hücre çoğalması, farklılaşması, canlı kalma, doğal ve adaptif bağışıklık sistemi yanıtı gibi değişik biyolojik yanıtlara neden olan transkripsiyon faktörleridir. Bu trankripsiyon faktörlerinin etkinliğinin yüksek oranda TAK1'e bağımlı sinyal yolları ile düzenlenmesi TAK1'in inflamatuvar sinyal oluşumunda önemli rol oynadığını göstermektedir. Öte yandan, DNA zedelenmesi ve ozmotik şok gibi stres etkenlerinin de TAK1'in etkinleşmesine yol açması, TAK1'in stres-yanıt sinyaline katkısı olduğunu göstermektedir. PK'ler inflamatuvar hastalıkların tedavisinde umut verici moleküler hedeflerdir. İnflamatuvar sinyal ileti yolunda p38 MAPK ile IKK'yı içeren birçok PK inhibitörü RA ve solunum yolu inflamasyonu gibi inflamatuvar hastalıkların tedavisi için aday olarak geliştirilmiştir [141]. TAK1 ise, inflamatuvar bozukluklar için

hedef seçilen kinazların başında gelmektedir. İnflamasyon ve fibröz ilerleyici böbrek hastalıklarında yaygın görülen patojenik değişiklikler olduğundan, profibrötik proteinlerin başında gelen TGF-β'nın sinyal ileti yolu ile proinflamatuvar yolları hedeflemek için TAK1'in blokajı ilgi çekici bir stratejidir. TAK1 geninin silinmesi sonucunda renal inflamasyon ile fibröz baskılamaktadır. Kardiyomiyosit hipertrofisi ile serebral iskemi sonucu nöron kaybı da TAK1 baskılanmasıyla önlenmektedir [142, 143]. Dahası, dendiritik hücrelerdeki TAK1 eksikliği kulak dokusunda hapten nedeniyle oluşan kontakt aşırı duyarlılığın azalmasına yol açmıştır [144]. Son zamanlarda TAK1 üzerine yapılan araştırmaların odak noktası ise daha seçici ve oral yoldan verildiklerinde etkili TAK1 inhibitörleri geliştirmektedir [145-147].

Embriyonik fibroblast hücrelerinde TAK1'in ablasyonu TLR'nin neden olduğu sitokin oluşumunun önlenmesiyle sonuçlanmıştır. TAK1 geninin silinmesi ise, erken embriyonik ölüme neden olmaktadır [148]. Bir fare artrit modelinde TAK1 etkinliğinin *in vivo* inhibisyonu sonucunda sinoviyal inflamasyon ve kartilaj proteoglikan kaybı ile erozyon skoru belirgin biçimde azalmıştır [149]. CD11c promotörü kullanılarak dendritik hücreye özgü gen silinmesi dendritik hücre apopitozunu belirgin biçimde artırmıştır ve nötrofil, monosit ve bozulmuş T hücresi homeostazının ilerlemesi ile belirgin proliferatif miyeloit hücre hastalığı ile sonuçlanmıştır [103]. *In vitro* T lenfositlerinde TAK1 geni silinmesinin T hücre reseptörü ile indüklenmiş NF-κB etkinliğini önlemesi, bu kinazın doğal bağışıklık sisteminin yanı sıra, adaptif bağışıklık sisteminde de bir rolü olduğunu göstermektedir [150]. Bu bilgiler, bağışıklık sistemi homeostazında TAK1'in önemli düzenleyici rolü olduğunu göstermektedir [148, 150].

2.8. NF-κB

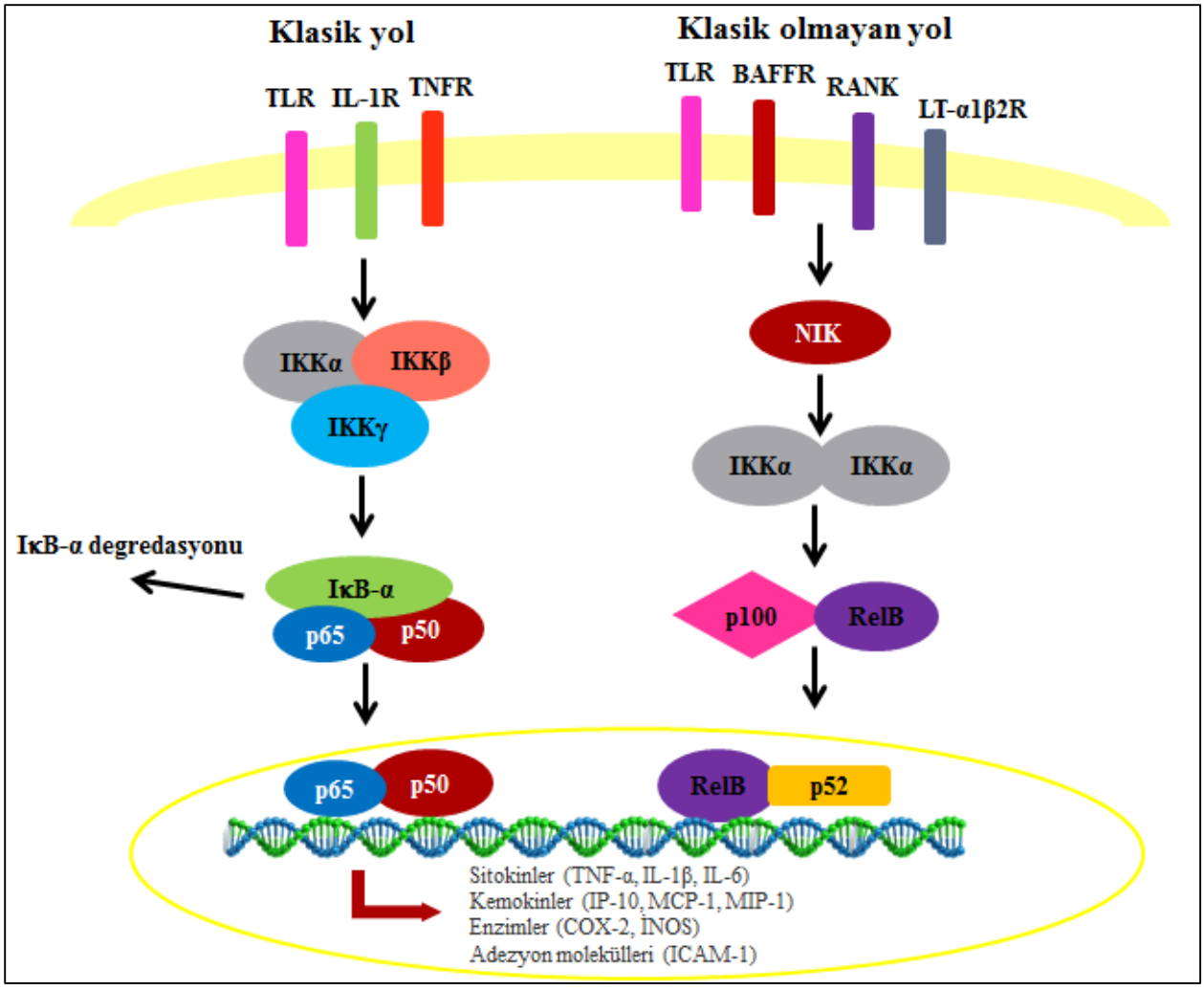
2.8.1. Özellikleri

NF-κB NF-κB/Rel ailesindeki proteinlerin türlü kombinasyonlarından oluşan dimerleri oluşturan yapısal olarak retroviral onkoprotein v-Rel ile homoloji gösteren transkripsiyonel proteinlerin bir grubudur. Memeli hücrelerinde NF-κB ailesindeki proteinlerin birinci grubunda NF-κB1 (p105 öncül proteininden oluşan p50; geni NFKB1) ve NF-κB2 (p100 öncül proteininden oluşan p52; geni NFKB2), ikinci grubunda ise RelA (p65; geni RELA), RelB (geni RELB) ve c-Rel (geni REL) bulunmaktadır. Bu proteinlerden yalnızca RelA, RelB ve c-Rel transaktivasyon alanları içermekte, transkripsiyonel olarak etkili olan NF-κB dimerlerinde de bu üç faktörden biri bulunmaktadır. NF-κB ailesindeki proteinler arasındaki etkileşmeler başka yapıda bir NF-κB dimerinin oluşmasına neden olmaktadır. Bu NF-κB dimerleri homodimer veya heterodimer olabilmektedir; öte yandan, NF-κB'nin en baskın biçimi p50/p65 heterodimeridir [151, 152].

2.8.2. Ekspresyon ve Etkinliğinin Düzenlenmesi

Ekspresyonları yalnızca lenfoit dokularda sınırlı olan RelB dışındaki NF-κB proteinleri bütün hücre türlerinde yapısal (constitutive) olarak eksprese edilmektedirler [153]. Çoğu NF-κB dimerlerinin transkripsiyon etkinleştiricileri olmalarına karşın, p52/p52, p50/p50 ve p65/p65 homodimerleri transkripsiyonel baskılayıcıdırlar. p50 veya p65 homodimeri histon deasetilaz ile bir kompleks oluşturduktan sonra DNA'ya bağlanmakta ve NF-κB'ye bağımlı gen ekspresyonunu baskılamaktadırlar. Öte yandan, RelB/p50 veya RelB/p52 dimerinin bir transkripsiyonel etkinleştirici gibi davranırken, p65/RelB heterodimerinin gen transkripsiyonunu baskıladığı gösterilmiştir [154, 155].

NF-κB'nin çeşitli stres durumları (fiziksel, kimyasal, çevresel, oksidatif, fizyolojik vb.) ve mitojenler, reseptör ligantları, modifiye proteinler, fizyolojik ve patolojik mediyatörler, apopitotik moleküller, mantarlar, bakteriler, virüsler ve parazitler ile onların ürünleri, inflamatuvar sitokinler ve çeşitli patolojik durumlarda etkinleştiği bilinmektedir. Başlıca IκB ailesindeki proteinlerden IκB-α, IκB-β, IκB-γ, IκB-ε, IκB-ζ, Bcl-3, p105, p100 ve *molecule possessing ankyrin-repeats induced by lipopolysaccharide* (MAIL) tarafından NF-κB etkinliği düzenlenmektedir. NF-κB'nin etkinleşmesinde iki yol tanımlanmıştır: (1) TLR, IL-1 reseptörü (IL-1R) ve TNFR'nin aracılık ettiği "klasik NF-κB yolu (*canonical NF-κB pathway*)" ile (2) TLR, *B-cell-activating factor belonging to TNF family receptor* (BAFFR), NF-κB için reseptör aktivatörü (*receptor activator for NF-κB*; RANK) ve lenfotoksin α1β2 (*lymphotoxin-α1β2 receptor*; LT-α1β2R)'nin aracılık ettiği "klasik olmayan NF-κB yolu (*noncanonical NF-κB pathway*)". Bu yolların etkinleşmesi TNF-α, IL-1β ve IL-6 gibi sitokinler, IFN-γ ile indüklenen protein (*IFN-γ-induced protein*; IP)-10, MCP-1 ve makrofaj inflamatuvar protein (*macrophage inflammatory protein*; MIP-1) gibi kemokinler, COX-2 ve iNOS gibi enzimler ile interselüler adezyon molekülü (*intercellular adhesion molecule*; ICAM-1) gibi adezyon moleküllerinin oluşumunda artmayla sonuçlanmaktadır (Şekil 2.5.) [156, 157].



Şekil 2.5. Klasik ve klasik olmayan NF-κB yollarının şematik gösterimi [157].

TLR, TNFR, B hücresi reseptörü ve T hücresi reseptörü (T-cell receptor; TCR) gibi doğal ve adaptif bağışıklık sistemi hücre reseptörlerinin aracılık ettiği çeşitli sinyaller tarafından tetiklenen klasik yolda, TAK1'in IKK kompleksini etkinleştirmesinin ardından IKK tarafından özellikle IκB-α'nın fosforillenerek degrade olması sonucunda başta p50/p65 heterodimerleri olmak üzere çeşitli NF-κB kompleksleri hızlı ve geçici bir biçimde nükleusa geçmektedirler; bu yolun etkinliğinin artması erken gen transkripsiyonu, geç gen ekspresyonu veya gen transkripsiyonunun baskılanmasıyla sonuçlanmaktadır. TNF ailesi reseptörüne ait B hücresini etkinleştirici faktör, CD40, lenfotoksin-β reseptörü ve NF-κB için reseptör etkinleştiricisi gibi reseptörlerin aracılık ettiği sinyaller tarafından tetiklenen klasik olmayan yolda ise, NF-κB indükleyici kinaz (*NF-κB-inducing kinase*; NIK) tarafından IKKα'nın fosforilasyonu ve etkinleşmesinden sonra bir NF-κB öncülü olan p100'ün fosforile olması ve Skp1-Cul1-Roc1-F-box ubikuitin ligaz kompleksi (*Skp1-*

Cul1-Roc1-F-box ubiquitin ligase complex; SCFβTrCP) tarafından ubikuitinlenmesinin ardından NF-κB'nin bir alt birimi olan RelB ile bağlanmak üzere yarışan p52'ye proteazom tarafından işlenmesi sonucunda oluşan RelB/p52 heterodimerleri yavaş ve kalıcı bir biçimde nükleusa geçmektedirler; bu yolun etkinleşmesi geç gen transkripsiyonu ile sonuçlanmaktadır [157-159].

2.8.3. Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü

NF-κB özellikle çok sayıda inflamatuvar moleküllerin oluşumundan sorumlu olan iNOS ve COX-2 gibi enzimler, akut faz proteinleri ile TNF-α, IFN-γ, IL-1β, -6 ve -8 gibi proinflamatuvar sitokinlere ait genlerin transkripsiyonel düzeyde ekspresyonlarının artmasına neden olduğundan dolayı, ateroskleroz, tip 2 diyabet, RA, inflamatuvar bağırsak hastalığı, septik şok gibi inflamasyon ile belirgin hastalıkların patojenezinde önemlidir bir transkripsiyon faktörüdür [160].

NF-κB MS, Alzheimer hastalığı (AH) gibi nöroinflamasyonla ilişkili hastalıkların patojenezinde kritik rol oynamaktadır. LPS'ye yanıt olarak fare beyin mikrovasküler endotel hücrelerinde NF-κB sinyal ileti yolu aracılığıyla COX-2 ekspresyonu ile PGE_2 oluşumunda artış görülmüştür [161]. Farelerde zedelenmeye yanıt olarak mikrogliyal etkinleşme yoluyla oluşturulan endojen TLR ligantları ile TLR'ler etkinleştirildiğinde NF-κB aracılığıyla IL-1β, IFN-γ ve TNF-α gibi proinflamatuvar sitokinler ile ROT salıverilmesi artmaktadır [162]. NF-κB'nin disregülasyonunun kronik inflamasyon [163] ve nörodejenerasyon [164] ile ilişkili olduğu bulunmuştur. NF-κB'nin etkinliği hedeflenerek sinaptik plastisitenin [162] değiştirildiği gösterilmiştir. İnflamasyon ile zedelenme süresince arka kök gangliyonları ile omurilik dokularında etkinleştirilmiş NF-κB immünoreaktif nöronlar ile astrositlerin yüzdeleri belirgin biçimde artmıştır [165]. Etkilenmiş dokuda şiddetli ağrı ile kendini gösteren patolojik durumlarda NF-κB'nin etkinliği iyi bilinmektedir. RA'da eklem inflamasyonunun erken ve geç evrelerinde sinoviyal dokuda NF-κB'nin etkinliğinin artışı gösterilmiştir. Fare RA modelinde NF-κB inhibisyonu sitokin oluşumuyla hastalığın şiddetinde azalmayı ve hastalığın daha geç başlamasını sağlamıştır [166]. Nöropatik ağrı ile inflamatuvar hiperaljezinin patojenezinde NF-κB'nin katkısı gösterilmiştir. NF-κB p50 *knock-out* farelerde akut ve inflamatuvar zararlı uyarılara nosiseptif yanıtın azaldığının gösterilmesi bu alt birimin nosiseptif transmisyonda rol oynadığını göstermektedir. Nosiseptif yanıttaki azalma *knock-out* farelerde omurilikteki COX-2 ekspresyonundaki azalma ile uyumlu bulunmuştur [167]. Öte yandan, adjuvan ile oluşturulmuş sıçan artrit modelinde omurilikteki NF-κB p65 geni susturulması sonucu hiperaljezi ile pençe ödeminin azaldığının görülmesi omurilikteki NF-κB p65'in periferik inflamasyon ile hiperaljeziye katkıda bulunduğunu göstermektedir [168]. Bu çalışmalar NF-κB'nin

periferal ve santral inflamasyon ile belirgin hiperaljeziye katkıda bulunduğunu göstermektedir [169].

2.9. COX-2

2.9.1. Özellikleri

COX AA yolunda serbest AA'nın prostaglandin H_2'ye dönüştürüldüğü hız kısıtlayıcı basamakta rol oynayan anahtar enzimdir. COX-1 ve COX-2 olmak üzere başlıca iki değişik izozime ek olarak, COX-3 yalnızca beyinde eksprese edilen bir başka varyanttır. COX-1 ve COX-2 sırasıyla 576 ve 581 amino asitten oluşan peptit homodimerleridir. Her monomer üç bölgeden oluşmaktadır: (1) N-terminal epidermal büyüme faktörü (*epidermal growth factor*; EGF) benzeri bölge, (2) helikal zara bağlı bölge ve (3) geniş katalitik bölge. Katatilik bölge U biçiminde kıvrılmış uzun dar bir kanalı içermektedir. COX-1 memelilerde tüm dokularda yapısal olarak eksprese edilmektedir. COX-2 ise, yüksek oranda indüklenebilen, memeli dokularında bazal durumlarda çok düşük düzeyde bulunan ve inflamasyondan sorumlu olan izozimdir ve sitokinler ya da büyüme faktörlerine yanıt olarak ekspresyon düzeyi artmaktadır [170].

COX'lar lipit yapıları, mitokondriler, filamentöz yapılar, veziküller ile nükleusta da saptanmış olmalarına karşın, yüksek oranda endoplazmik retikulum (ER) zarının lümene bakan tarafı ile nükleer kılıfta bulunmaktadırlar. ER'nin lümeni COX'ların yapısı ve işlevi için oldukça önemlidir. Oksidatif potansiyeli enzimlerin disülfit bağlarının oluşmasına olanak tanırken, ER'de gerçekleşen N-bağlantılı glikolizasyon uygun protein bağlanması için önemlidir. Dahası, COX'ların son ürünü olan PGH_2 ER'nin zarından difüze olabilecek derecede polar değildir. Hem COX-1 hem de COX-2 birbiriyle bağlantılı olan COX ve peroksidaz etkinlik biçiminde nitelendirilen iki değişik katalitik etkinlik göstermektedir: COX etkinliği AA'yı PGG_2'ye dönüştürürken, peroksidaz etkinliği PGG_2'yi PGH_2'ye indirgemektedir. PGH_2 ise, özgül sentetazlar aracılığıyla PGD, PGE, PGF, PGI ve tromboksana dönüştürülmektedir. PG'ler dokuya ya da hücreye özgül türlü etkilerini onbir değişik G proteini kenetli reseptör aracılığıyla göstermektedirler [171, 172].

PGE_2 organizmada en çok bulunan ve değişik birçok biyolojik işlevi olan prostanoitlerden biridir. Hücrelerde prostanoit E reseptörü (*E prostanoid receptor*; EP) 1, EP2, EP3 ile EP4 olmak üzere dört değişik prostanoit reseptörü ile etkilerini gösterir. EP1 G_q ile kenetlidir ve inozitol trifosfat oluşumuna neden olarak hücre içinde kalsiyum iyonunun düzeyini artırır. EP2 ile EP4 G_s aracılığıyla hücre içi siklik AMP düzeyini artırır. EP3 G_i ya da G_{12} ile kenetlenerek hücre içinde kalsiyum iyonu düzeyini artırır, siklik AMP oluşumunu önler ve küçük G proteini Rho'yu etkinleştirir. PGE_2 bağışıklık sistemi yanıtı, kan basıncı, gastrointestinal işlevler ve fertilite gibi

biyolojik işlevlerin düzenlenmesinde önemli bir mediyatördür. Öte yandan, PGE_2'nin sentezindeki bozulma ya da PGE_2 degredasyonu birçok patolojik durumla ilişkili bulunmuştur [173].

2.9.2. Ekspresyon ve Etkinliğinin Düzenlenmesi

COX-2 sıklıkla parenkimal hücrelere yerleşik olmak üzere neredeyse tüm dokularda değişen miktarlarda ancak bazılarında önemsiz sayılabilecek düzeyde eksprese edilmektedir. COX-2 geninin silinmesi postnatal böbrek gelişiminde önemli bozukluklara neden olmuştur [174]. Dişi *knockout* farelerde ovülasyon ve embriyo implantasyonundaki bozukluğa bağlı infertilite görülmüştür [175]. Yapısal COX-2 ekspresyonunun endoteliyal hücreler, beyin, omurilik, böbrek ve dişi üreme sisteminde iyi tanımlanmış olması özgül fizyolojik koşullar altında COX-2'nin homeostatik düzenleyici rolü olabileceğini düşündürmektedir. Öte yandan, inflamasyon, hipoksi ve kanser gibi fizyopatolojik durumlarda COX-2 gen ekspresyonu artmaktadır [176, 177].

Biyolojik süreçlerdeki özgül işlevlerin görüldüğü özelleşmiş hücre türleri ve dokularda COX-2'nin indüklenebilir ya da yapısal ekspresyonu olduğu saptanmıştır. Sözü edilen süreçler çoğalma, immünite, renal fizyoloji, nöronal aşırım, kemik rezorpsiyonu ve pankreatik salgılanmayı içermektedir. Bu doku ve hücrelerde COX-2 ekspresyonunu düzenleyen etkenler fizyolojik süreçler ve ilişkili dokular için özgüldür. Örneğin, granülosa hücrelerinde COX-2 ekspresyonu folikülü uyarıcı hormon ve lüteinleştirici hormon ile indüklenebiliyorken, makula densa hücrelerinde lüminal tuz derişimine bağlı olarak değişmektedir [178, 179]. Bunun anlamı ise, özelleşmiş birçok hücre türündeki COX-2 ekspresyonu dokuların eşsiz fizyolojik etkinliklerini düzenleyen uyarılara değişen derecede duyarlılık gösterdiğidir [176, 180].

COX-2 ekspresyonu hem transkripsiyonel hem de translasyon sonrası düzeyde düzenlenmektedir. COX-2 transkripsiyonu NF-κB, *CCAAT-enhancer-binding proteins, cyclic AMP response element binding protein, nuclear factor of activated T-cells*, AP-1 ve PPAR gibi transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenebilmektedir. Dahası, mikro ribonükleik asit (mikroRNA)'ların translasyonel represyon ve/veya 3' *untranslated* bölge üzerinden ulak RNA (*messenger RNA*; mRNA) degredasyonu yoluyla COX-2 ekspresyonunu susturduğu düşünülmektedir [170, 181].

NF-κB sinyal ileti yolu osteoblastik hücreler, sinoviyositler, epiteliyal hücreler, endoteliyal hücreler ve hepatositlerde TNF-α, hipoksi, endotelin ve IL-1β ile uyarılmış COX-2 ekspresyonuyla ilişkilidir. Bu efektörlerin her biri NF-κB sinyal ileti yolunu etkinleştirebilmektedir. COX-2 promotör bölgeleri NF-κB ailesi transkripsiyon faktörleri tarafından tanınmaktadır. COX-2 ekspresyonunun önlenmesi p65 proteini için *antisense* ile NF-κB bağlanma motifi içeren *decoy* oligonükleotitler, IκB

kinaz inhibitörleri olan salisilatlar ile MG-132'nin kullanıldığı ya da dominant negatif IκB mutantlarının eksprese edildiği çalışmalarda gösterilmiştir. NF-κB kompleksi oluşturabilen birçok proteinden ikisi olan p50 ve p65'in COX-2 promotörlerindeki kendilerine ait ortak tanıma dizilerine bağlanmaları elektroforetik hareketlilik kayma analizleri ile gösterilmiştir. Dahası, haberci plazmitler ile yapılan transfeksiyon deneyleri TNF-α uyarısına yanıt olarak ortaya çıkan COX-2 promotörünün transkripsiyonel düzeyde etkinleşmesini azalttığını göstermiştir. Tüm bu bulgular, özgül hücre türlerinde NF-κB'nin uygun etkinleştiricilere yanıt olarak COX-2 ekspresyonunu düzenlediğini kanıtlamaktadır [182, 183].

Büyüme faktörleri ile v-Src ile v-Ras gibi onkojenlerin rol oynadığı başlıca sinyal ileti yolu MAPK ile ilgili olan yollardır. IL-1β, TNF-α, LPS ve forbol esterleri gibi inflamatuvar moleküller de MAPK sinyal ileti yolunu etkinleştirebilmektedirler. *Ex vivo* monositler ile hücre kültürü çalışmalarında ligant ile indüklenen ve onkojene bağımlı COX-2 ekspresyonu için bu kinaz yolunun etkinleşmesinin gerekli olduğu gösterilmiştir. COX-2 ekspresyonunun kinaz sinyaline bağımlılığı, etkin kinazların aşırı ekspresyonu, dominant negatif mutant kinazların kullanımı ve ERK1/2, JNK/stres ile etkinleştirilen protein kinaz (*stress activated protein kinase*; SAPK) ile p38 MAPK/rodopsin kinaz/MAPK *homolog* (Mpk) 2 yollarından biri ya da daha çoğunu bloke eden küçük inhibitör moleküller ile gösterilmiştir. Örneğin, bir çalışmada v-Src tarafından COX-2 promotör transkripsiyonunun etkinliği MEKK1 ya da JNK dominant negatif mutantlarının aşırı ekspresyonuna bağlı biçimde azalmıştır [184]. Bu bulgu, v-Src sinyal iletisine JNK kinaz sinyal ileti yolunun aracılık ettiğini göstermektedir. Bir başka çalışmada, trombosit ya da serumdan türeyen büyüme faktörlerinin neden olduğu COX-2 promotör etkinleşmesi dominant negatif Ras, Rac1, MEKK1 ve JNK olduğu kadar, dominant negatif Raf1 ve ERK ile de önlenmiştir [185]. Bu bulgular bu büyüme faktörlerinin sinyal transdüksiyonunda JNK ve ERK yollarının her ikisinin de rol oynadığını göstermektedir [186-188].

2.9.3. Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü

COX-2'nin özgül inhibitörleri bu enzimin akut inflamasyon bulguları olan ateş, kızarıklık, şişkinlik ve ağrı oluşmasında kritik rol oynadığını göstermiştir. Öte yandan, kanser, inflamatuvar bağırsak sendromu, vasküler hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi kronik inflamatuvar hastalıkların fizyopatolojisinde de COX-2 enzimi önemli rol oynamaktadır [176, 177].

Dokudaki zedelenmeye yanıt olarak COX-2 enzimi aracılığıyla PGE_2 başta olmak üzere PG'ler salıverilerek dokuya kan akışını artırırlar ve kızarıklık oluşmasına neden olurlar. Bradikinin, histamin ve lökotrienler gibi öteki mediyatörler ile PGE_2 vasküler geçirgenliği artırarak ödem oluşmasına neden olurlar. PGE_2 periferik nöronlar ile omurilik ve beyni kapsayan santral

bölgelerdeki aferent nöronları duyarlılaştırarak hiperaljeziye yol açar. PGE_2 aynı zamanda ateş oluşumunda yer alan güçlü bir piretik mediyatördür. Son olarak, PGE_2 bradikinin, histamin, nörokininler ile komplemanlar gibi öteki proinflamatuvar mediyatörler tarafından başlatılan inflamasyonu artırır ve süresini uzatır. İnflamatuvar artrit hayvan modelleri ile yapılan çalışmalardan akut ve kronik inflamasyonda COX-2 ekspresyonuna ilişkin ilk bulgular elde edilmiştir. Bu çalışmalar, inflamasyonlu eklem dokularında artmış PG oluşumundan COX-2 ekspresyonundaki artmanın sorumlu olduğunu göstermiştir. Osteoartirit hastalarından elde edilen kıkırdak dokuları ile RA hastalarından elde edilen sinoviyal sıvılarda da COX-2 indüksiyonu gözlenmiştir [189-191].

İnflamatuvar bağırsak sendromu olan hastaların kalın bağırsak dokusu ile bir inflamatuvar bağırsak sendromu modeli için kullanılan IL-10 geni silinmiş farelerin inflamasyonlu dokularında COX-2 ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Tedavide öncelikli olarak 5-aminosalisilat içeren bileşikler yeğleniyor olsa da, klinik çalışmalardan elde edilen bulgular, NSAIDs ile seçici COX-2 inhibitörlerinin bu hastalığın tedavisinde yararlı olduğunu göstermiştir. Öte yandan, ikinci grup ilaçların daha az gastrointestinal yan etkiye neden olduğu bildirilmiştir [192-194]

COX-2 birçok kanser türünde sıklıkla eksprese edilmekte ve kanserin oluşumu, şiddetlenmesi ve kemoterapi ile radyoterapiye kanser direncin gelişimi gibi birçok değişik süreçte rol oynamaktadır [195, 196]. Kanserle ilişkili fibroblastlardan, makrofaj tür 2 hücrelerden ve kanser hücrelerinden tümör mikroçevresine salıverilmektedir [197]. Kanser kök hücre benzeri etkinliğe neden olur ve kanser hücrelerinde apopitotik direnci, çoğalmayı, anjiyojenezi, inflamasyonu, invazyonu ve metastazı artırır [198, 199]. Tümör mikroçevresinde COX-2'nin aracılık ettiği hipoksi ile *Yes-associated protein* 1 ve antiapopitotik mediyatörlerin pozitif etkileşimi kemoterapötiklere karşı direnç gelişimine neden olmaktadır [200]. COX-2 etkisini en çok PGE_2 üzerinden gösterir. COX-2'nin kanser hücreleri üzerindeki etkilerine birçok sinyal ileti yolu katkıda bulunmaktadır. MAPK ailesi üyeleri, EGF reseptörü ile NF-κB kanser hücrelerinde COX-2'nin başlıca *upstream* düzenleyicileridirler [201, 202]. Dahası, COX-2 vücuttaki birçok hormon ile de etkileşebilmektedir [203, 204]. COX-2 inhibisyonu kanser tedavisinde umut vericidir. COX-2 inhibitörlerinin operasyon öncesi kullanılması kanser hastalarında metastaz riskini azaltabilmektedir [205]. Bu ilaçlar kanser hücrelerini radyoterapi ile kemoterapiye duyarlılaştırmaktadırlar. Öte yandan, kemoterapötikler COX-2 etkinliğinde azalmaya neden olmaktadırlar [196]. Bundan dolayı, kanser türüne bağlı biçimde uygun kemoterapötikler ile COX-2 inhibitörlerinin kullanımının kanser tedavisinde etkili bir adjuvan strateji olabileceği düşünülmektedir [192, 206].

Nöronlarda COX-2 ekspresyonu artışı proinflamatuvar süreçleri başlatarak ve oksidatif stres açığa çıkmasına neden olarak nöronal zedelenmeye neden olmaktadır. COX-2'nin genetik olarak silinmesi ya da farmakolojik olarak inhibe edilmesi sonucu dopaminerjik nöronlar korunmuş ve oksidatif stres azaltılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, NSAIDs'nin kronik kullanımının Parkinson hastalığı (PD) görülme sıklığının azalması ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu klinik öncesi ve klinik çalışmalar, PH'nin nörodejeneratif sürecinde COX-2'nin önemli rolü olduğunu düşündürmektedir. Ancak, bazı COX-2 inhibitörlerinin tanımlanan kardiyovasküler ve serebrovasküler yan etkilerinin artması nedeniyle, COX-2'nin terapötik hedef olarak algılanması son yıllarda azalmıştır [207-209].

2.10. IL-1β

2.10.1. Özellikleri

IL-1β onbir üyeli IL ailesinin en eski üyelerinden biridir. Tüm IL aile üyeleri gibi zimojen biçiminde eksprese edilir ve inflamazomlar tarafından biyolojik olarak etkili olgun biçimine dönüştürülür. IL-1β bağışıklık sistemi etkinliğinin çoğaltıcısı olarak rol oynar [210].

2.10.2. Ekspresyon ve Etkinliğinin Düzenlenmesi

Neredeyse tüm mikrobiyal ürünler TLR'ler yoluyla IL-1β oluşumunu uyarırlar. TLR'ler, etkinleştirilmiş kompleman komponentleri vd. sitokinlere yanıt olarak kan monositleri, doku makrofajları, derideki dendritik hücreler ile beyin mikrogliyal hücrelerde IL-1β oluşur. IL-1β kendi kendisini de indükleyebilmektedir. Pro-IL-1β olarak eksprese edilen sitokinin etkinleşmesi "inflamazom" adı verilen proteaz özelliği bulunan prokaspaz-1'i etkili biçimi kaspaz-1'e dönüştüren sitozolik sinyal kompleksleri tarafından kontrol edilir. Bu makromoleküler kompleksin anahtar bileşeni enfeksiyon, zedelenme ya da hücresel stresi algıyan bir dedektör olarak rol oynayan nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alan benzeri, lösinden zengin yinelenen ve pirin alanı içeren (*nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing*; NLRP) 3'tür. Bu proteindeki tek amino asit mutasyonu yüksek derecede etkili IL-1β salgılanmasına neden olur. Ancak, IL-1β'in aracılık ettiği inflamatuvar süreçler her zaman NLRP3 ya da kaspaz-1 etkinliğine bağlı değildir. Etkili olmayan IL-1β öncülü proteinaz-3 ya da elastaz gibi parçalama alanları kaspaz-1'e benzeyen enzimler tarafından ekstraselüler bölgede parçalanarak da etkili IL-1β'ya dönüştürülebilmektedir [210].

2.10.3. Fizyopatolojik Olaylardaki Rolü

IL-1β normal organizmada beslenme, uyuma ve sıcaklığın düzenlenmesi gibi homeostatik işlevlerde rol oynar. Enfeksiyöz hastalıklar ya da nörodejeneratif hastalıklar, akciğer hastalıkları, inflamatuvar kas-eklem hastalıkları, ağrı, tip 2 diyabet hastalığı, aterosklerotik hastalıklar, inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi steril inflamasyonla belirgin durumların fizyopatolojisinde aşırı IL-1β ekspresyonu rol oynamaktadır [211].

IL-1β güçlü bir nörotrofik sitokindir. AD, inme, PD ve ALS gibi nörodejeneratif hastalıklarda yerel ve sistemik IL-1β düzeyi yüksek bulunmuştur. IL-1β nöronal zedelenme, KBE'nin bozulması ve astrogliyoza neden olabilmektedir. Dahası, AD'ye demans ve nöronal ölüme eşlik eden amiloit β (Aβ) birikimi, NLRP3'e bağımlı IL-1β oluşumunu uyarmaktadır. NLRP3/kaspaz-1/IL-1β aksındaki moleküllerin genetik olarak silinmesi Aβ'ya yanıt olarak ortaya çıkan proinflamatuvar sitokinler ile nörotoksik faktörlerin oluşmasını belirgin biçimde düşürmüş ve beyinde mikrogliyal etkinliği önlemiştir [212]. PH'de IL-1β polimorfizmi nöropatolojiyi şiddetlendirmektedir [213]. IL-1β'nın PH hayvan modelinde dopamin nörodejenerasyonu hızını artırdığı görülmüştür [214]. IL-1 sinyali irritan nedeniyle oluşmuş akciğer zedelenmesi ile ilişkili hastalıklarda kritik bir role sahiptir. Kimyasal ile oluşturulmuş çok sayıda akciğer hastalığı modelinde IL-1 reseptörü eksik fareler akciğer zedelenmesine yüksek oranda direnç göstermişlerdir. Bu çalışmalarda, IL-1 sinyalinin bozulması bleomisin, sigara dumanı, dizel yakıtı, silika ve asbestoz uygulamasıyla ortaya çıkan proinflamatuvar sitokin oluşumunu, bağışıklık sistemi hücresinin toplanmasını ve fibrozu azaltmıştır. Dahası, NLRP3 akciğerde hava kaynaklı kirleticileri algılayan başlıca algılayıcıdır. NLRP3 eksik farelerde asbestoza maruziyet inflamatuvar hücrelerin akciğerde toplanmasını ve bununla ilişkili olarak proinflamatuvar sitokinlerin oluşumunu azaltmıştır [215-217]. NLRP3 inflamazomu ateroskleroz patojenezinde santral düzenleyici olarak tanımlanmıştır. Kolesterol kristallerinin NLRP3 inflamazomunu etkinleştirmesi sonucu etkili IL-1β ve -18 oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir. Klinik çalışmalarda IL-1β ile -1R ekspresyonunun arteriyel plaklarda belirgin biçimde arttığı ve ekspresyon düzeylerinin de hastalığın şiddetiyle bağlantılı olduğu görülmüştür [218].

IL-1β pankreas β hücrelerinde apopitoza neden olarak ve adipositlerin insülin direncini artırarak tip 2 diyabet hastalığı patojenezine katkıda bulunmaktadır. Yapılan klinik bir çalışmada, IL-1 sinyalinin inhibisyonu ile kan glukoz düzeyinin stabil durumda kaldığı ve β hücre işlevinin düzenlendiği görülmüştür [160]. IL-1β periferik dokulara enjekte edildiğinde güçlü bir mekanik ve termal hiperaljezik yanıta neden olmaktadır [219]. Karagenin, LPS ya da tam Freund adjuvanının pençeye uygulanması ile inflamasyonlu doku ile arka kök gangliyonunda IL-1β düzeyinde artış

olduğu görülmüştür [220, 221]. IL-1β'nın *transient receptor potential channels of the vanilloid 1*, sodyum iyonu kanalları, gama aminobütirik asit (GABA) reseptörleri ya da N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerini etkileyerek nöronal uyarılabilirliği düzenlediği gösterilmiştir [222]. Öte yandan, IL-1β daha çok PGE_2, IL-6 ve P maddesi gibi aljezik ve hiperaljezik mediyatörlerin etkinliğini/salıverilmesini artırarak nosiseptif duyarlılığın artışına katkıda bulunmaktadır [223, 224].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanı

Deneylerde senkronizasyonu 12 saat aydınlık/12 saat karanlık dönemleri olacak biçimde yapılan 20-40 g ağırlığında 64 adet erkek Balb/c fare kullanılmıştır. Fareler Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Merkezinden sağlanmıştır. Bu süre içerisinde su ve yem kısıtlamasında bulunulmamıştır. Bu tezde farelere uygulanan işlemler Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra gerçekleştirilmiştir (Kurulun 31/07/2017 ile 16/04/2018 tarihli ve sırasıyla 2017/17 ile 2018/20 sayılı kararları).

3.1.2. Sarf Malzemesi

4-(2-Hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit (*4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid* (HEPES) (A3724, AppliChem)

Akrilamit 4K çözeltisi (%30) (161-0157, Bio-Rad)

Amonyum persülfat (A2941, AppliChem)

Aprotinin (A2132, AppliChem)

Ayırıcı cam (*Spacer plate*) (10.1 x 8.2 cm, 1.5 mm) (165-3312, Bio-Rad)

Beksaroten (SML0282, Sigma)

Benzamidin (B6506, Sigma)

Bradford reajanı (B6916, Sigma)

Bromfenol mavisi (A3640, AppliChem)

Coomassie *brilliant blue R 250* (1.12553, Merck)

COX etkinliği *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) kiti (*COX activity assay kit*) (760151, Cayman)

COX-2 proteini için primer antikor (*COX-2 mouse monoclonal IgG1*) (SC-19999, Santa Cruz)

Dimetil sülfoksit (DMSO) (A1584, AppliChem)

Ditiyotreytol (DTT) (A2948, AppliChem)

DNA saklama kutusu (81 gözlü) (3122278, Greiner)

Düz tabanlı, 96 kuyucuklu kültür plağı (655160, Greiner)

Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (A2937, AppliChem)

Filtre kağıdı (*Whatman grade no 3MM chr chromotography paper, cellulose*) (3030-917, Whatman)

Fosforile NF-κB p65 proteini için primer antikor (*p-NF-κB p65 [Ser536] mouse monoclonal IgG*)(SC-33020, Santa Cruz)

Fosforile TAK1 proteini için primer antikor (*phospho-TAK1 [Ser412] antibody*) (9339, Cell Signalling)

Gliserol (A2926, AppliChem)

Glisin (A1067, AppliChem)

Hidroklorik asit (*Hydrochloric acid*; HCl) (100314, Merck)

IL-1 ELISA kiti (*Mouse IL-1 beta ELISA*) (ELM-IL1b-CL, RayBiotech)

IL-1β için primer antikor (*IL-1β antibody [11E5]*) (sc-52012, Santa Cruz)

İzobütanol (A1150, AppliChem)

Kısa cam (*Short plate*) (10.1 x 7.3 cm) (165-3308, Bio-Rad)

Kriyopreservasyon tüpü (*Cryo's sterile*, 1 ml, 12, 5/38 mm, *skirt*) (3123278, Greiner)

Kriyopreservasyon tüpü (*Cryo's sterile*, 2 ml, 12, 5/38 mm, *skirt*) (3122278, Greiner)

Kültür plağı (*Microplate*) (655160, Greiner)

Kültür plağı için yapışkanlı kapak (676001, Greiner)

Löpeptin (L9783, Sigma)

LPS (*Escherichia coli* [*E. coli*] lipopolisakkaridi, O111:B4) (L4130, Sigma)

Metanol (1.06008, Merck)

Mikrosantrifüj tüpü (*Microcentrifuge tub*e) (0.5 ml) (616201, Greiner)

Mikrosantrifüj tüpü (*Microcentrifuge tub*e) (1.5 ml) (616201, Greiner)

Molekül ağırlığı belirteci (*Rainbow marker, full-range*) (RPN 800E, Amersham)

MyD88 proteini için primer antikor (*MyD88 antibody [F-19]*) (sc-8197, Santa Cruz)

N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (*N,N,N′,N′-Tetramethylethylenediamine*; TEMED) (A1148, AppliChem, Almanya)

NF-κB p65 proteini için primer antikor (*NF-κB p65 mouse monoclonal IgG*) (sc-8008, Santa Cruz)

Nitroselüloz membran (162-0112, Bio-Rad)

PGE_2 ELISA kiti (*PGE_2 ELISA kit*) (514010, Cayman)

Pipet ucu (3685290, Greiner)

Pipet ucu (3686290, Greiner)

Pipet ucu (685290, Greiner)

Pipet ucu (686290, Greiner)

Pipet ucu (770291, Greiner)

Polistiren tüp (15 ml) (188271, Greiner)

Polistiren tüp (50 ml) (227261, Greiner)

Ponceau S (A1405, AppliChem)

Potasyum dihidrojen fosfat (*potassium dihydrogenphosphate*; KH_2PO_4) (1.04873, Merck)

Potasyum klorür (*Potassium chloride*; KCl) (1.04936, Merck)

Primer antikorlara özgü sekonder antikor (*Goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase*) (RPN4301, Amersham)

Primer antikorlara özgü sekonder antikor (*Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase*) (RPN4201, Amersham)

Proteinleri görüntüleme çözeltisi (*ECL Prime Western Blotting Detection Reagent*) (RPN2232, Amersham)

RXRα proteini için primer antikor (*RXR antibody [ΔN 197]*) (sc-774, Santa Cruz)

Serum fizyolojik (SF) (Eczacıbaşı-Baxter)

Sığır serum albümini (*Bovine serum albumin*; SSA) (A7906, Sigma)

Sodyum dodesil fosfat (SDS) (A2263, AppliChem)

Sodyum klorür (*Sodium chloride*; NaCl) (1.06404, Merck)

Sodyum ortovanadat (A2196, AppliChem)

Sodyum pirofosfat (A2197, AppliChem)

Sülfosalisilik asit (A0416, AppliChem)

TAK1 proteini için primer antikor (*TAK1 [D94D7] rabbit mAb*) (5206, Cell Signalling)

Tepkime tüpü (0.5 ml) (667201, Greiner)

TLR4 proteini için primer antikor (*TLR4 antibody [25]*) (sc-293072, Santa Cruz)

Trikloroasetik asit (A1431, AppliChem)

Tris baz (A2264, Applichem)

Tris HCl (A3452, Applichem)

Tween 20 (A4974, AppliChem)

Yağsız kurutulmuş süt tozu (*non-fat dry milk*) (YKST) (A0830, AppliChem)

β-Gliserofosfat (G9891, Sigma)

β-Merkaptoetanol (A1108, AppliChem)

β-Tübülin proteini için primer antikor (*β tubulin antibody [D-10]*) (sc-5274, Santa Cruz)

3.1.3. Teçhizat

Analgesic hot plate (AHP 9601, Commat Ltd.)

Çalkalayıcı (*Orbital rocker-shake*) *(MR-12, Biosan)*

Çalkalayıcı (*Red rotor orbital shaker*) (PR500-176, Hoefer)

Derin dondurucu (Dik tip, 410 L, -80°C) (Model U410, New Brunswick)

Derin dondurucu buzdolabı (Model 1060 T, Arçelik; Model 4240 T FH, Arçelik)

Elektroforez sistemi (*Mini-protean tetra 1 mm*) (165-8001, Biorad)

Güç desteği (*Power supply*) (*EV 265 consort power supply, 230 VAC*) (PS265-230V, Hoefer)

Güç kaynakları

Hassas terazi (Model APX 200, Denver)

Homojenizatör (Ultra-Turrax, T25, Ika)

Jel dökümentasyon ve analiz sistemi (*EC3-CHEMI HR imaging system*) (Ultra-Violet Products, UVP)

Manyetik karıştırıcı (*BOE 8056500 magnetic stirrer*) (MMS-3000, ACAdapter 220V, Boeco)

pH metre (Orion 3 Star, Thermo)

Plak okuma aygıtı (405, 450, 490, 550 ve 630 nm olmak üzere beş adet filtreli) (ELX800, Biotek)

Soğutmalı santrifüj (Mikro 22R, Hettich; H1850R, XiangYi/Cence)

Su banyosu (Sıcaklık: 0-100°C, hacmi: 5 L) (Precisterm) (JP Selecta)

Ultrasonik banyo (Isıtmalı, frekans ayarlı) (Elmasonic S 40 / (H), Elma)

Üstten kefeli terazi (SPB 52, Scaltec)

Vorteks (RX3, VELP Scientifica)

Yarı-kuru transfer birimi (*TE 77X semi-dry transfer unit*) (TE77X, Hoefer)

3.2. Yöntem

3.2.1. İnflamatuvar Hiperaljezi Modeli

Farelerde aşağıda belirtilen gruplar oluşturulmuştur:

Grup 1: SF (10 ml/kg; intraperitoneal [i.p.]) (kontrol grubu) (n= 8)

Grup 2: LPS (10 mg/kg; i.p.) (inflamatuvar hiperaljezi grubu) (n= 8)

Grup 3: DMSO (4 ml/kg; subkütan [s.k.]) (n= 8)

Grup 4: LPS+beksaroten (0.1 mg/kg; s.k.) (n= 8)

Grup 5: LPS+beksaroten (1 mg/kg; s.k.) (n= 8)

Grup 6: LPS+beksaroten (3 mg/kg; s.k.) (n= 8)

Grup 7: LPS+beksaroten (10 mg/kg; s.k.) (n= 8)

Grup 8: SF+beksaroten (10 mg/kg, s.k.) (n= 8)

LPS'nin neden olduğu inflamatuvar hiperaljezi, akut ağrı modellerinden biri olarak sıklıkla kullanılan sıcak zemin testi (*hot plate test*) yöntemiyle değerlendirilmiştir [225]. Bu çalışmada, kontrol grubu olarak SF (10 ml/kg; i.p.), inflamatuvar hiperaljezi grubu olarak LPS (*E. coli* LPS, O111:B4) (10 mg/kg; i.p.) uygulanan fareler kullanılmıştır [23, 24, 48]. Bu modelde etkisi araştırılan beksaroten (SF içinde %1 oranında ve son derişimi 0.011 mg/ml DMSO olacak biçimdeki çözeltisi) [20, 226] farelere SF veya LPS ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Beksaroten 0.1, 1, 3 ve 10 mg/kg (s.k.) dozlarda uygulanmıştır. Önceki çalışmalarımızda, farelere LPS uygulanmasından sonraki 6. saatte sonra sıcak zemin testinde ölçülen tepki süresi kontrol grubuna göre kısalmış, endoteliyal nitrik oksit sentaz, nöronal nitrik oksit sentaz ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz protein ekspresyonları ile etkinliğindeki azalmanın yanı sıra, NF-κB p65, kaspaz-1 p20, kaspaz-11 p20, NLRP3, apopitozla ilişkili nokta benzeri protein içeren bir kaspaz biriktirici alan (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*; ASC), nikotinamit adenin dinükleotit fosfat oksidaz (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* oxydase; NOX) alt birimlerinden $gp91^{phox}$ (NOX2; süperoksit oluşturan bir NOX enzimi) ve $p47^{phox}$ (NOXO2; $gp91^{phox}$'un düzenleyici alt birimi) ile nitrotirozin protein ekspresyonları ve nitrotirozin ile IL-1β düzeyleri artmıştır [22-24]. Bu çalışmada da, SF veya LPS enjeksiyonundan 6 saat sonra farelerin 30 saniye içinde termal uyarıya verdikleri tepkinin süresi ölçülmüştür. Deneyler süresince ölen fare olup olmadığı da gözlenmiştir. Deneylerin tamamlanmasının ardından, farelerin boyun dislokasyonu yöntemiyle öldürülmelerinin ardından beyin ve omurilikleri alınmıştır. -80°C'de saklanan dokulardan hazırlanan homojenatlarda TLR4, MyD88, TAK1, fosforile TAK1, NF-κB p65, fosforile NF-κB p65, COX-2, RXRα ve β-tübülin protein ekspresyonları *immunoblotting* yöntemiyle, COX-2 etkinliği ile IL-1β ve PGE_2 düzeyleri ise ELISA yöntemi kullanılarak ölçülmüştür.

3.2.2. Doku Homojenatı Süpernatantlarının Hazırlanması

Dondurulmuş dokuların çözünmelerinin ardından üzerlerine HEPES tamponu (1.5 ml) (mM: HEPES 20 [pH 7.5], benzamidin 10, β-gliserofosfat 20, sodyum pirofosfat 20, ditiyotreytol 1, sodyum ortovanadat 0.2, sodyum florür 20, EDTA 2, löpeptin 20 ve aprotinin 10) eklenerek homojenize edilmiştir. Homojenatların 23.910 x *g*'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edilmelerinin ardından toplanan süpernatantların üzerine 50 µl tris (50 mM, pH 8.0)+KCl (0.5 M) çözeltisi eklenmiş, su banyosu sonikatöründe 2 kez 15 saniye bekletilmiş ve 4°C'de 23.910 x *g*'de 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar -80°C'de dondurularak saklanmıştır [227].

3.2.3. Toplam Protein Düzeyinin Ölçülmesi

Hazırlanan doku homojenatı süpernatantlarındaki toplam protein düzeyi standart olarak 0-50 µg/ml aralığındaki derişimlerde SSA kullanılarak Coomassie mavisi yöntemi ile ölçülmüştür [228]. Standart çözeltiler ve distile su ile seyreltilen örnekler üzerine 200 µl Bradford reajanı eklenmesinin ardından, alınan 100 µl örnek kültür plağındaki çukurlara eklenmiş ve örneklerin verdiği absorbanslar kültür plağı okuyucusu kullanılarak 630 nm'de okunmuştur. SSA derişimlerine karşı elde edilen absorbanslardan yararlanılarak doğrusal regresyon yöntemi ile belirlenen kalibrasyon doğru denklemleri kullanılarak, örneklerde okunan absorbans değerlerinden protein düzeyleri hesaplanmıştır [227].

3.2.4. β-Tübülin, RXRα, TLR4, MyD88, TAK1, fosforile TAK1, NF-κB p65, fosforile NF-κB p65, COX-2 ve IL-1β Protein Ekspresyonunun Ölçülmesi

Hazırlanan örneklerde β-tübülin, RXRα, TLR4, MyD88, TAK1, fosforile TAK1, NF-κB p65, fosforile NF-κB p65, COX-2 ve IL-1β protein ekspresyonu daha önce tanımlandığı gibi *immunoblotting* yöntemiyle ölçülmüştür [23, 229-232]. Çalışmalarda alt jel olarak 6.7 ml %30'luk akrilamit 4K çözeltisi, 5 ml tris çözeltisi (1.5 M, pH 8.8), 0.2 ml %10'luk SDS çözeltisi, 7.9 ml distile su, 0.2 ml %10'luk amonyum persülfat çözeltisi ve 0.008 ml TEMED, üst jel olarak da 1.7 ml %30'luk akrilamit 4K çözeltisi, 1.25 ml tris çözeltisi (1 M, pH 6.8), 0.1 ml %10'luk SDS çözeltisi, 6.8 ml distile su, 0.1 ml %10'luk amonyum persülfat çözeltisi ve 0.01 ml TEMED kullanılmıştır. Üst jelde oluşturulan çukurlardan birinci çukura 5 µl molekül ağırlığı belirteci, son çukura ise 10 µl Laemmli örnek tamponu eklenmiştir. Elektroforez tampon çözeltisi olarak 500 ml distile su içinde 15 g tris, 72 g glisin ve 5 g SDS içeren bir çözelti (pH 8.3) hazırlanmış ve kullanılmadan hemen önce 1/10 oranında seyreltilerek pH değeri 8.3'e ayarlanmıştır. HEPES tamponu ve 5 µl Laemmli örnek tamponu (5 ml tris çözeltisi [0.5 M, pH 6.8], 4 ml gliserol, 40 mg bromfenol mavisi, 0.8 g SDS ve 0.8 ml β-merkaptoetanol 10 ml distile su içinde) ile doku homojenatlarından hesaplanan miktarda karıştırılarak hazırlanan beyin örnekleri için 60 µg, omurilik örnekleri için ise 90 µg toplam protein içeren -80°C'de dondurulmuş olan örnekler çözündükten sonra 2 dakika kaynar su içinde bekletilmiş, 4°C'de 23.910 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiş, beyin örnekleri için 20 µl'de 40 µg, omurilik örnekleri için ise 20 µl'de 60 µg toplam protein olacak biçimde üst jelde oluşturulan çukurlara eklenmiş ve %10 SDS-poliakrilamit jel elektroforez yöntemi ile yaklaşık 2,5 saatlik bir sürede ayrılmıştır. Jeldeki proteinler ise yarı-kuru aktarma (*semi-dry transfer*) yöntemi ile 4.5 saatlik bir sürede nitroselüloz membrana aktarılmıştır. Bu işlem için 800 ml distile su içinde 5.8 g tris, 2.9 g glisin ve 0.37 g SDS içeren bir çözelti (pH 8.3) hazırlanmış ve kullanılmadan hemen önce

pH değeri 8.3'e ayarlanarak üzerine 200 ml metanol (%20) eklenmiştir. Jelden proteinlerin nitroselüloz membrana ne derecede aktarıldığının anlaşılabilmesi için, jeller proteinleri özgül olmayan bir biçimde geri dönüşümsüz olarak bağlayan Coomassie mavisi boyama yöntemi ile boyanmıştır [233]. Coomassie mavisi çözeltisi (1000 ml distile su içinde 0.25 g Coomassie *brilliant blue R* 250, 400 ml metanol ve 70 ml asetik asit) içinde 4°C'de 12 saat inkübe edilen jeller, boyasızlaştırma çözeltisi I (*destaining solution* I) (20 ml metanol, 3.5 ml asetik asit ve 26.5 ml distile su) içinde 30 dakika inkübe edildikten sonra, boyasızlaştırma çözeltisi II (*destaining solution* II) (3.5 ml asetik asit, 2.5 ml metanol, 44 ml distile su ve 0.5 ml gliserol) içinde inkübe edilmiş. Jelin zeminindeki mavi renk açılıncaya dek boyasızlaştırma çözeltisi II 1 veya 2 kez değiştirilmiştir. Ayrıca, jelden proteinlerin nitroselüloz membrana ne derecede aktarıldığının anlaşılabilmesi için, membranlar proteinleri geri dönüşümlü olarak bağlayan Ponceau S boyası (100 ml distile su içinde 2 g Ponceau S, 30 g trikloroasetik asit, 30 g sülfosalisilik asit; kullanılmadan hemen önce 1/10 oranında distile su ile seyreltilmiştir) ile boyanmış ve distile su ile yıkanmıştır [234]. Proteinlerin jelden membrana aktarımının sağlandığı görüldükten sonra, membranlar tris tampon çözeltisi (TTÇ) (3 g tris, 8 g NaCl, 2 g KCl ve 0.5 ml Tween 20 [%0.05] 1000 ml distile içinde, pH 7.4) ile 1 kez 5 dakika yıkanmış, %5 YKST içeren TTÇ ile oda sıcaklığında 1 saat bloke edilmiş ve TTÇ ile 5 kez 10 dakika süre ile yıkanmış, ardından da RXRα, TLR4, MyD88, TAK1, fosforile TAK1, NF-κB p65, fosforile NF-κB p65, COX-2 ve IL-1β proteinleri için primer antikorlar eklenerek 4°C'de 12 saat bekletilmiştir. Membranlar, bağlanmamış proteinler TTÇ ile 3 kez 5 dakika yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra, sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiş, ardından da TTÇ ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkanmıştır. Deneylerde RXRα, TLR4, MyD88, TAK1, fosforile TAK1, NF-κB p65, fosforile NF-κB p65, COX-2 ve IL-1β proteinleri için kullanılan membranlar, TTÇ ile 1 kez 5 dakika süre ile yıkandıktan sonra, %2 YKST+%2 SSA karışımı ile oda sıcaklığında 1 saat bloke edimiş, TTÇ ile 5 kez 10 dakika süre ile yıkanmış ve β-tübülin proteinleri için primer ve sekonder antikorlar ile inkübe edilmeye hazır duruma getirilmiştir. Bu membranlar primer antikorlar ile oda sıcaklığında 2 saat veya 4°C'de 12 saat inkübe edilerek bağlanmamış proteinler TTÇ ile 3 kez 5 dakika yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra, sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiş ardından da TTÇ ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkanmıştır.

β-Tübülin, RXRα, TLR4, MyD88, TAK1, fosforile TAK1, NF-κB p65, fosforile NF-κB p65, COX-2 ve IL-1β proteinlerinin ekspresyonunun ölçülmesinde kullanılan antikorların özellikleri Tablo 3.1.'de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. β-Tübülin, RXRα, TLR4, MyD88, TAK1, fosforile TAK1, NF-κB p65, fosforile NF-κB p65, COX-2 ve IL-1β protein ekspresyonunun ölçülmesinde kullanılan antikorların özellikleri.

Protein	Molekül ağırlığı (kDa)	Primer antikor	Sekonder antikor
β-Tübülin	55	*β Tubulin antibody (D-10)(sc-5274, Santa Cruz)*	*Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (RPN 4201, Amersham)*
RXRα	50-54	*RXR antibody (ΔN 197) (sc-774, Santa Cruz)*	*Goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase) (RPN4301, Amersham)*
TLR4	95/120	*TLR4 antibody (25) (sc-293072, Santa Cruz)*	*Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (RPN 4201, Amersham)*
MyD88	33	*MyD88 (F-19) (sc-8197, Santa Cruz)*	*Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (RPN 4201, Amersham)*
TAK1	78-82	*TAK1 (D94D7) rabbit mAb (5206, Cell Signalling)*	*Goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase) (RPN4301, Amersham)*
Fosforile TAK1	82	*Phospho-TAK1 (Ser412) antibody (9339, Cell Signalling)*	*Goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase) (RPN4301, Amersham)*
NF-κB p65	65	*NF-κB p65 mouse monoclonal IgG (SC-8008, Santa Cruz)*	*Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (RPN 4201, Amersham)*
Fosforile NF-κB p65	~ 65	*p-NF-κB p65 (Ser 536) mouse monoclonal IgG (SC-33020, Santa Cruz)*	*Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (RPN 4201, Amersham)*
COX-2	70	*COX-2 [29] mouse monoclonal IgG_1*	*Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase(RPN 4201, Amersham)*
IL-1β	31/17	*IL-1β antibody (11E5) (sc-52012, Santa Cruz)*	*Sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (RPN 4201, Amersham)*

3.2.5. İmmünoreaktif Proteinlerin Analizi

Coomassie mavisi boyama yöntemi ile boyanan jeller doğrudan, nitroselüloz membranda bulunan immünoreaktif proteinler ise membranların görüntüleme çözeltisi ile inkübe edilmesinin ardından jel dökümentasyon ve analiz sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Jel dokümantasyon ve analiz sistemi ile görüntülenen immünoreaktif proteinlerin yoğunluk analizi bir yazılım programı (*NIH image software; ImageJ 1.46r, Wayne Rasband,* National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) kullanılarak yapılmıştır.

3.2.6. COX-2 Etkinliği ile PGE_2 ve IL-1β Düzeylerinin Ölçülmesi

Doku homojenatı süpernatantlarında COX-2 etkinliği ile PGE_2 ve IL-1β düzeyleri ELISA kitleri kullanılarak ölçülmüştür.

3.2.7. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiş, kullanılan fare sayısı ise "n" ile ifade edilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Bartlett testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılıma uygunluğu belirlenen veriler için iki grup arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar Student's *t* testi kullanılarak yapılmıştır. β-Tübülin protein ekspresyonu açısından gruplar arasındaki farklılığı belirlemek amacıyla tek yönlü varyans analizi ve ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi kullanılmıştır. 0.05'ten küçük *P* değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Mortalite

Farelere SF, DMSO, LPS ve/veya beksaroten uygulanmasından ardından geçen 6 saat içinde mortalite görülmemiştir.

4.2. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Termal Uyarıya Yanıt Verme Süreleri Üzerinde Beksarotenin Etkisi

SF veya LPS ile birlikte 0.1, 1, 3 veya 10 mg/kg dozlarda uygulanan beksarotenin farelerin termal uyarıya tepki verme sürelerindeki değişiklikler üzerindeki etkilerine ilişkin bulgular Tablo 4.1. ve Şekil 4.1.'de verilmiştir.

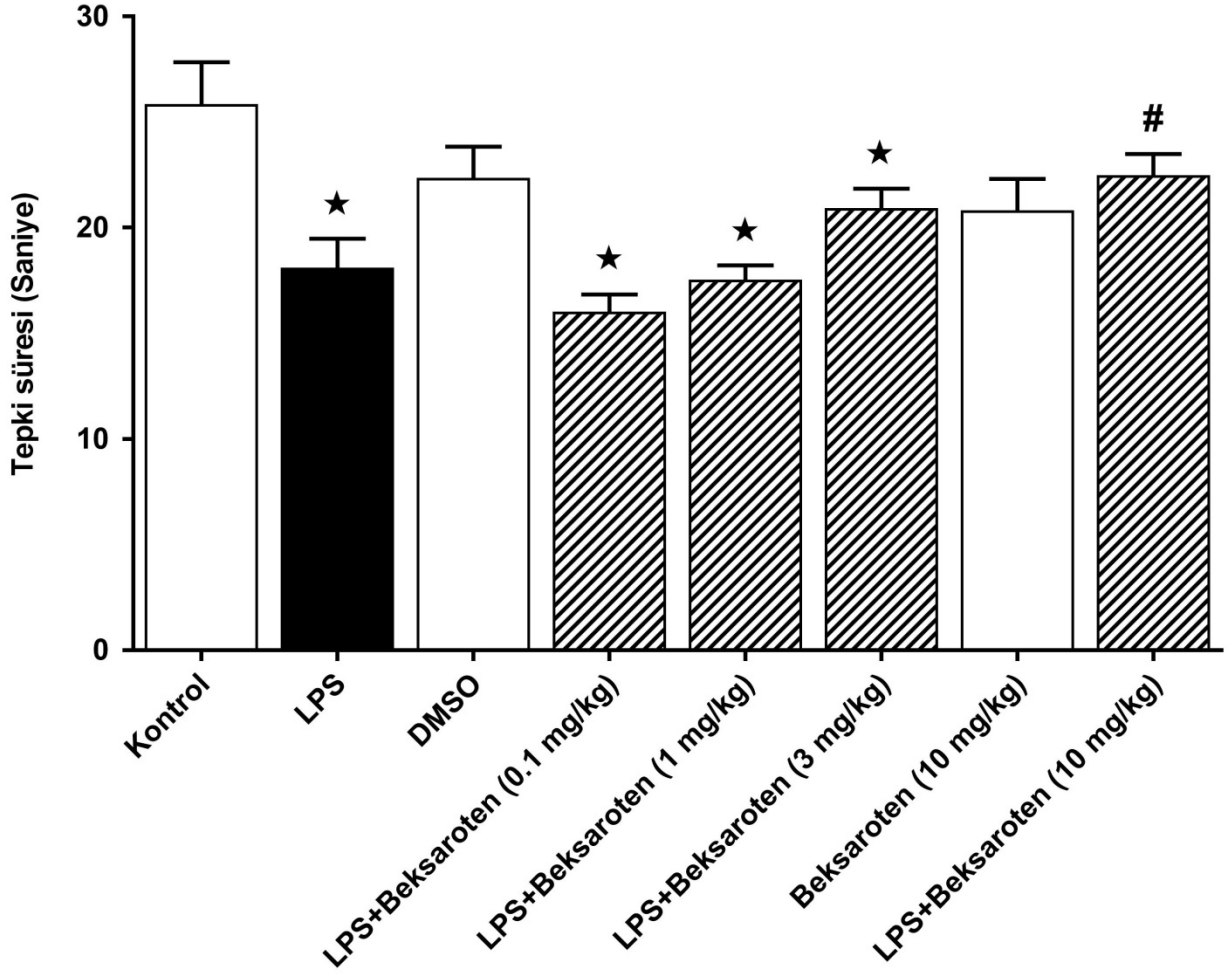
Farelere LPS uygulandıktan sonraki 6. saatte ölçülen termal uyarıya yanıt verme sürelerinin, kontrol grubundakilere göre, daha az olduğu görülmüştür (*P < 0.05*). LPS'nin neden olduğu hiperaljezi yalnızca 10 mg/kg dozda beksaroten ile önlenmiştir (*P < 0.05*). Beksaroten tek başına uygulandığında farelerin termal uyarıya yanıt verme sürelerinde bir değişiklik oluşturmamıştır (*P < 0.05*).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 6 saat sonra hiperaljezi geliştiğini göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu hiperaljezi beksaroten ile önlenebilmektedir.

Tablo 4.1. Kontrol ve endotoksemik farelerin termal uyarıya tepki verme süreleri üzerinde beksarotenin etkisi.

	Tepki süresi (Saniye)
Kontrol	25.84 ± 1.99 (n= 8)
LPS	18.11 ± 1.36 (n= 8)*
DMSO	22.35 ± 1.45 (n= 8)
LPS+Beksaroten (0.1 mg/kg)	16.03 ± 0.81 (n= 8)*
LPS+Beksaroten (1 mg/kg)	17.53 ± 0.69 (n= 8)*
LPS+Beksaroten (3 mg/kg)	20.91 ± 0.92 (n= 8)*
SF+Beksaroten (10 mg/kg)	20.82 ± 1.49 (n= 8)
LPS+Beksaroten (10 mg/kg)	22.49 ± 1.00 (n= 8)#

*DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (0.1, 1, 3 ve 10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme süreleri ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. *Kontrol, #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*



Şekil 4.1. Kontrol ve endotoksemik farelerin termal uyarıya tepki verme süreleri üzerinde beksarotenin etkisi. *DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (0.1, 1, 3 ve 10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg, i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme süreleri ölçülmüştür. 8 fareden elde edilen sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. *Kontrol, #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*

4.3. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde β-Tübülin Protein Ekspresyonu Üzerinde Beksarotenin Etkisi

Farelere SF ve/veya LPS ile birlikte beksaroten uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilikte β-tübülin protein ekspresyonundaki değişiklikler ile ilgili bulgular Tablo 4.2.'de verilmiştir.

SF, LPS ve/veya beksaroten uygulanan farelerden izole edilen dokularda β-tübülin protein ekspresyonunda oluşan değişiklikler bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (*P > 0.05*).

Bu bulgular LPS ve/veya beksaroten uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte β-tübülin protein ekspresyonunun değişmediğini göstermiştir.

Tablo 4.2. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde β-tübülin protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi.

	β-Tübülin protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/mg toplam protein)
Beyin	
Kontrol	9293.00 ± 1720.00 (n= 4)
LPS	10429.00 ± 1456.00 (n= 4)
DMSO	11695.00 ± 1090.00 (n= 4)
Beksaroten	11417.00 ± 1775.00 (n= 4)
LPS+Beksaroten	10617.00 ± 1637.00 (n= 4)
Omurilik	
Kontrol	7384.00 ± 348.80 (n= 4)
LPS	7212.00 ± 620.90 (n= 4)
DMSO	9922.00 ± 1617.00 (n= 4)
Beksaroten	9463.00 ± 504.60 (n= 4)
LPS+Beksaroten	7902.00 ± 567.10 (n= 4)

DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme sürelerinin ölçülmesinin ardından izole edilen beyin ve omuriliklerden hazırlanan örneklerde β-tübülin protein ekspresyonu immunoblotting yöntemiyle ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir.

4.4. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde RXRα Protein Ekspresyonu Üzerinde Beksarotenin Etkisi

Farelere SF veya LPS ile birlikte beksaroten uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilikte RXRα protein ekspresyonundaki değişiklikler ile ilgili bulgular Tablo 4.3. ve Şekil 4.2.'de verilmiştir.

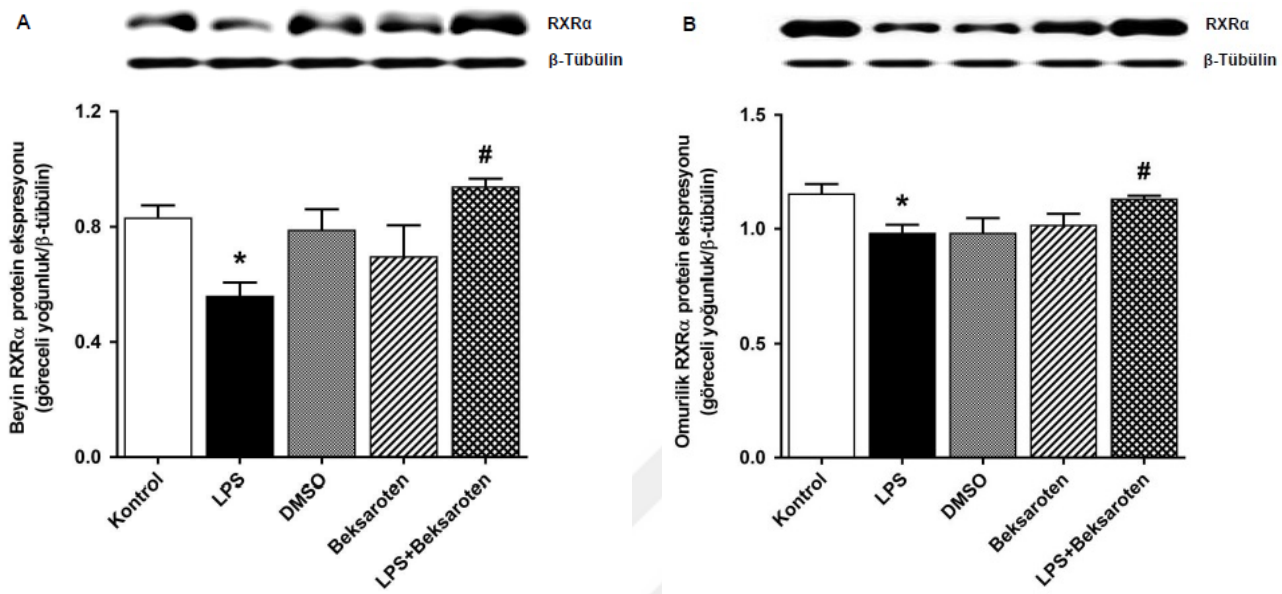
LPS uygulanan farelerden izole edilen dokularda RXRα protein ekspresyonunda azalma olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin RXRα protein ekspresyonunda neden olduğu azalma beksaroten ile önlenmiştir ($P < 0.05$). Beksaroten tek başına uygulandığında RXRα protein ekspresyonunda bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte RXRα protein ekspresyonunun azaldığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu RXRα protein ekspresyonundaki azalma beksaroten ile önlenebilmektedir.

Tablo 4.3. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde RXRα protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi.

	RXRα protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/β-tübülin)
Beyin	
Kontrol	0.83 ± 0.04 (n= 4)
LPS	0.56 ± 0.05 (n= 4)*
DMSO	0.79 ± 0.07 (n= 4)
Beksaroten	0.70 ± 0.11 (n= 4)
LPS+Beksaroten	0.94 ± 0.03 (n= 4)#
Omurilik	
Kontrol	1.16 ± 0.04 (n= 4)
LPS	0.98 ± 0.04 (n= 4)*
DMSO	0.98 ± 0.06 (n= 4)
Beksaroten	1.02 ± 0.05 (n= 4)
LPS+Beksaroten	1.13 ± 0.01 (n= 4)#

*DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme sürelerinin ölçülmesinin ardından izole edilen beyin ve omuriliklerden hazırlanan örneklerde RXRα protein ekspresyonu immunoblotting yöntemiyle ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. *Kontrol ve #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*



Şekil 4.2. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde RXRα protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi. *DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme sürelerinin ölçülmesinin ardından izole edilen beyin ve omuriliklerden hazırlanan örneklerde RXRα protein ekspresyonu immunoblotting yöntemiyle ölçülmüştür. 4 fareden elde edilen sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. *Kontrol ve #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*

4.5. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde TLR4 Protein Ekspresyonu Üzerinde Beksarotenin Etkisi

Farelere SF veya LPS ile birlikte beksaroten uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilikte TLR4 protein ekspresyonundaki değişiklikler ile ilgili bulgular Tablo 4.4. ve Şekil 4.3.'te verilmiştir.

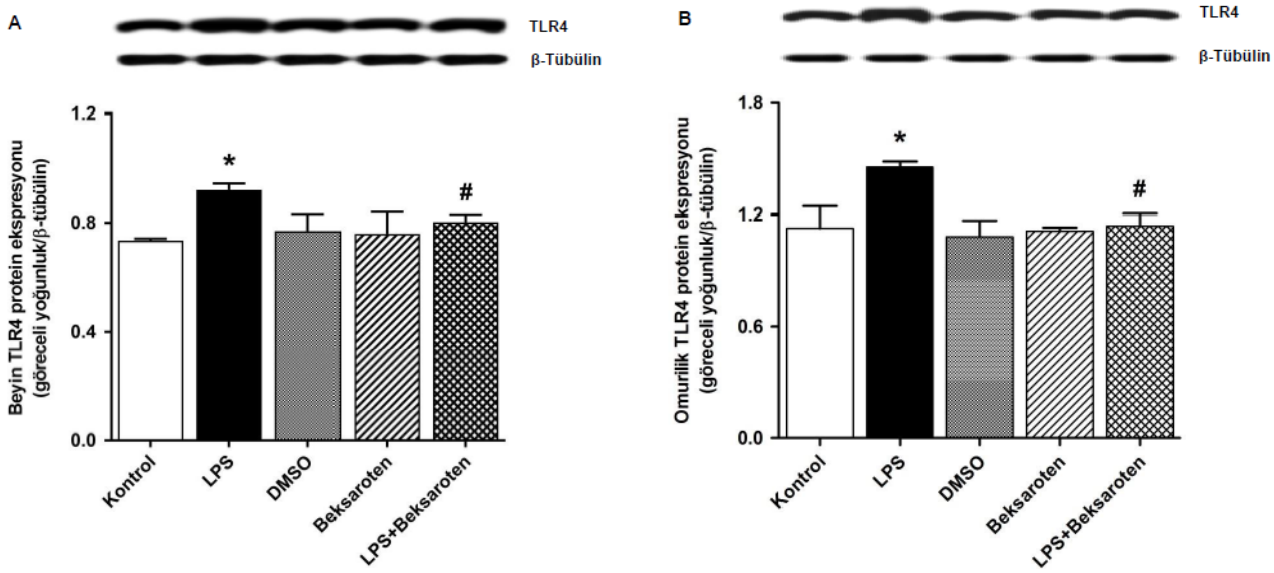
LPS uygulanan farelerden izole edilen dokularda TLR4 protein ekspresyonunda artma olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin TLR4 protein ekspresyonunda neden olduğu artma beksaroten ile önlenmiştir ($P < 0.05$). Beksaroten tek başına uygulandığında TLR4 protein ekspresyonunda bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte TLR4 protein ekspresyonunun arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu TLR4 protein ekspresyonundaki artma beksaroten ile önlenebilmektedir.

Tablo 4.4. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde TLR4 protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi.

	TLR4 protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/β-tübülin)
Beyin	
Kontrol	0.74 ± 0.01 (n= 4)
LPS	0.92 ± 0.02 (n= 4)*
DMSO	0.77 ± 0.06 (n= 4)
Beksaroten	0.76 ± 0.08 (n= 4)
LPS+Beksaroten	0.80 ± 0.03 (n= 4)#
Omurilik	
Kontrol	1.13 ± 0.12 (n= 4)
LPS	1.45 ± 0.03 (n= 4)*
DMSO	1.08 ± 0.09 (n= 4)
Beksaroten	1.11 ± 0.02 (n= 4)
LPS+Beksaroten	1.14 ± 0.06 (n= 4)#

*DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme sürelerinin ölçülmesinin ardından izole edilen beyin ve omuriliklerden hazırlanan örneklerde TLR4 protein ekspresyonu immunoblotting yöntemiyle ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. *Kontrol ve #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*



Şekil 4.3. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde TLR4 protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi. *DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme sürelerinin ölçülmesinin ardından izole edilen beyin ve omuriliklerden hazırlanan örneklerde TLR4 protein ekspresyonu immunoblotting yöntemiyle ölçülmüştür. 4 fareden elde edilen sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. *Kontrol ve #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*

4.6. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde MyD88 Protein Ekspresyonu Üzerinde Beksarotenin Etkisi

Farelere SF veya LPS ile birlikte beksaroten uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilikte MyD88 protein ekspresyonundaki değişiklikler ile ilgili bulgular Tablo 4.5. ve Şekil 4.4.'te verilmiştir.

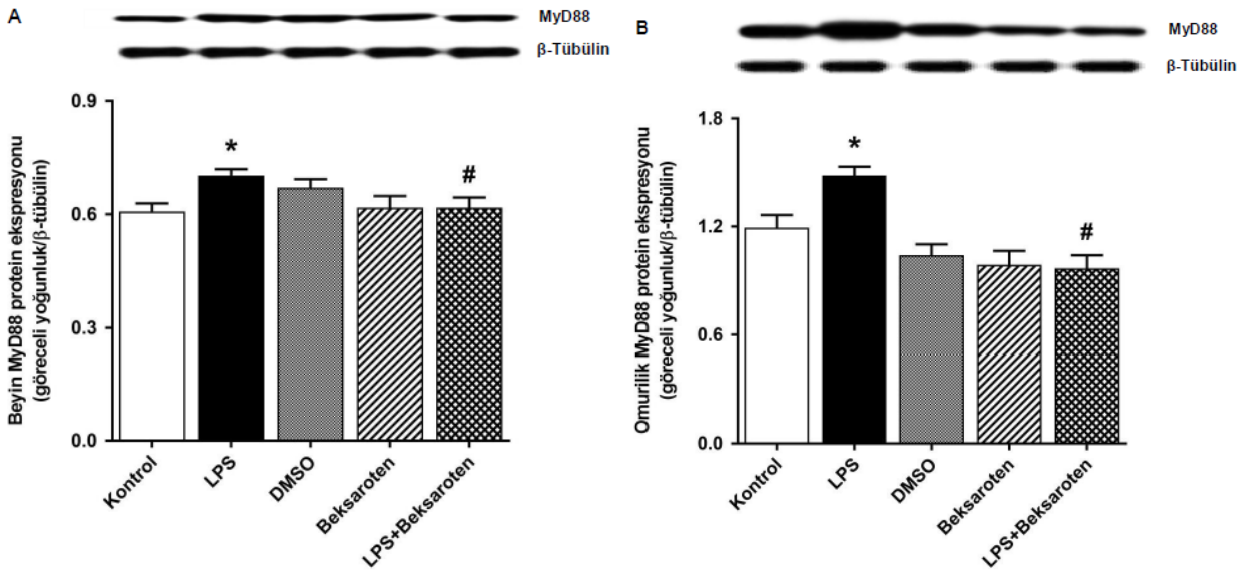
LPS uygulanan farelerden izole edilen dokularda MyD88 protein ekspresyonunda artma olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin MyD88 protein ekspresyonunda neden olduğu artma beksaroten ile önlenmiştir ($P < 0.05$). Beksaroten tek başına uygulandığında MyD88 protein ekspresyonunda bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte MyD88 protein ekspresyonunun arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu MyD88 protein ekspresyonundaki artma beksaroten ile önlenebilmektedir.

Tablo 4.5. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde MyD88 protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi.

	MyD88 protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/β-tübülin)
Beyin	
Kontrol	0.61 ± 0.02 (n= 4)
LPS	0.70 ± 0.02 (n= 4)*
DMSO	0.67 ± 0.02 (n= 4)
Beksaroten	0.62 ± 0.03 (n= 4)
LPS+Beksaroten	0.62 ± 0.02 (n= 4)#
Omurilik	
Kontrol	1.19 ± 0.07 (n= 4)
LPS	1.48 ± 0.05 (n= 4)*
DMSO	1.04 ± 0.06 (n= 4)
Beksaroten	0.99 ± 0.08 (n= 4)
LPS+Beksaroten	0.97 ± 0.07 (n= 4)#

*DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme sürelerinin ölçülmesinin ardından izole edilen beyin ve omuriliklerden hazırlanan örneklerde MyD88 protein ekspresyonu immunoblotting yöntemiyle ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. *Kontrol ve #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*



Şekil 4.4. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde MyD88 protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi. *DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme sürelerinin ölçülmesinin ardından izole edilen beyin ve omuriliklerden hazırlanan örneklerde MyD88 protein ekspresyonu immunoblotting yöntemiyle ölçülmüştür. *Kontrol ve #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*

4.7. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde TAK1 Protein Ekspresyonu ile Fosforilasyonu Üzerinde Beksarotenin Etkisi

Farelere SF veya LPS ile birlikte beksaroten uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilikte TAK1 protein ekspresyonu ile fosforilasyonundaki değişiklikler ile ilgili bulgular Tablo 4.6. ve Şekil 4.5.'te verilmiştir.

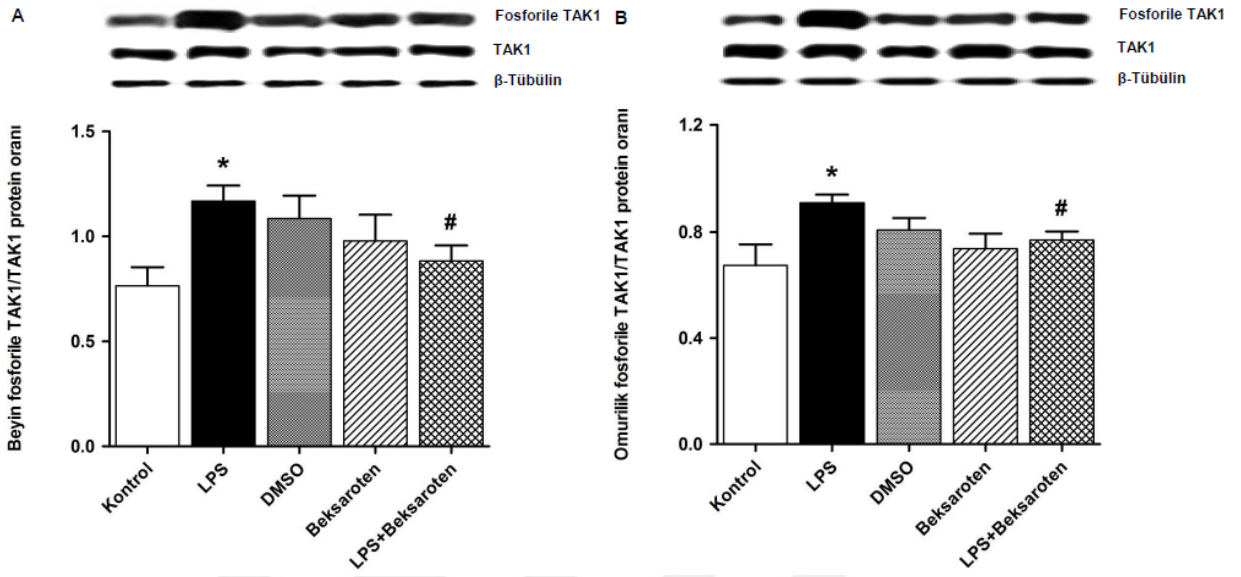
LPS uygulanan farelerden izole edilen dokularda TAK1 protein ekspresyonunda değişiklik gözlenmezken ($P > 0.05$), fosforile TAK1 protein ekspresyonu ile fosforile TAK1/TAK1 protein oranında artış olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin TAK1 protein fosforilasyonu ile fosforile TAK1/TAK1 protein oranında neden olduğu artma beksaroten ile önlenmiştir ($P < 0.05$). Beksaroten tek başına uygulandığında doku TAK1 ve fosforile TAK1 protein ekspresyonu ile fosforile TAK1/TAK1 protein oranında bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte TAK1 protein ekspresyonu değişmezken, etkinliğinin arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu TAK1 etkinliğindeki artma beksaroten ile önlenebilmektedir.

Tablo 4.6. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliğinde TAK1 protein ekspresyonu ile fosforilasyonu üzerinde beksarotenin etkisi.

	TAK1 protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/β-tübülin)	Fosforile TAK1 protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/β-tübülin)	Fosforile TAK1/TAK1 protein oranı
Beyin			
Kontrol	2.71 ± 0.18 (n= 4)	2.04 ± 0.16 (n= 4)	0.77 ± 0.09 (n= 4)
LPS	2.47 ± 0.10 (n= 4)	2.86 ± 0.07 (n= 4)*	1.17 ± 0.08 (n= 4)*
DMSO	2.33 ± 0.08 (n= 4)	2.51 ± 0.20 (n= 4)	1.09 ± 0.11 (n= 4)
Beksaroten	2.51 ± 0.14 (n= 4)	2.41 ± 0.17 (n= 4)	0.98 ± 0.13 (n= 4)
LPS+Beksaroten	2.83 ± 0.18 (n= 4)	2.47 ± 0.10 (n= 4)#	0.88 ± 0.07 (n= 4)#
Omurilik			
Kontrol	1.34 ± 0.04 (n= 4)	0.90 ± 0.09 (n= 4)	0.68 ± 0.08 (n= 4)
LPS	1.39 ± 0.01 (n= 4)	1.26 ± 0.05 (n= 4)*	0.91 ± 0.03 (n= 4)*
DMSO	1.27 ± 0.04 (n= 4)	1.03 ± 0.06 (n= 4)	0.81 ± 0.05 (n= 4)
Beksaroten	1.45 ± 0.03 (n= 4)	1.07 ± 0.08 (n= 4)	0.74 ± 0.06 (n= 4)
LPS+Beksaroten	1.42 ± 0.05 (n= 4)	1.09 ± 0.02 (n= 4)#	0.77 ± 0.03 (n= 4)#

*DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme sürelerinin ölçülmesinin ardından izole edilen beyin ve omuriliklerden hazırlanan örneklerde TAK1 ve fosforile TAK1 protein ekspresyonu immunoblotting yöntemiyle ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. *Kontrol ve #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05)*



Şekil 4.5. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliğinde TAK1 protein ekspresyonu ile fosforilasyonu üzerinde beksarotenin etkisi. *DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme sürelerinin ölçülmesinin ardından izole edilen beyin ve omuriliklerden hazırlanan örneklerde TAK1 ve fosforile TAK1 protein ekspresyonu immunoblotting yöntemiyle ölçülmüştür. *Kontrol ve #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*

4.8. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde NF-κB p65 Protein Ekspresyonu ile Fosforilasyonu Üzerinde Beksarotenin Etkisi

Farelere SF veya LPS ile birlikte beksaroten uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilikte NF-κB p65 protein ekspresyonu ile fosforilasyonundaki değişiklikler ile ilgili bulgular Tablo 4.7. ve Şekil 4.6.'da verilmiştir.

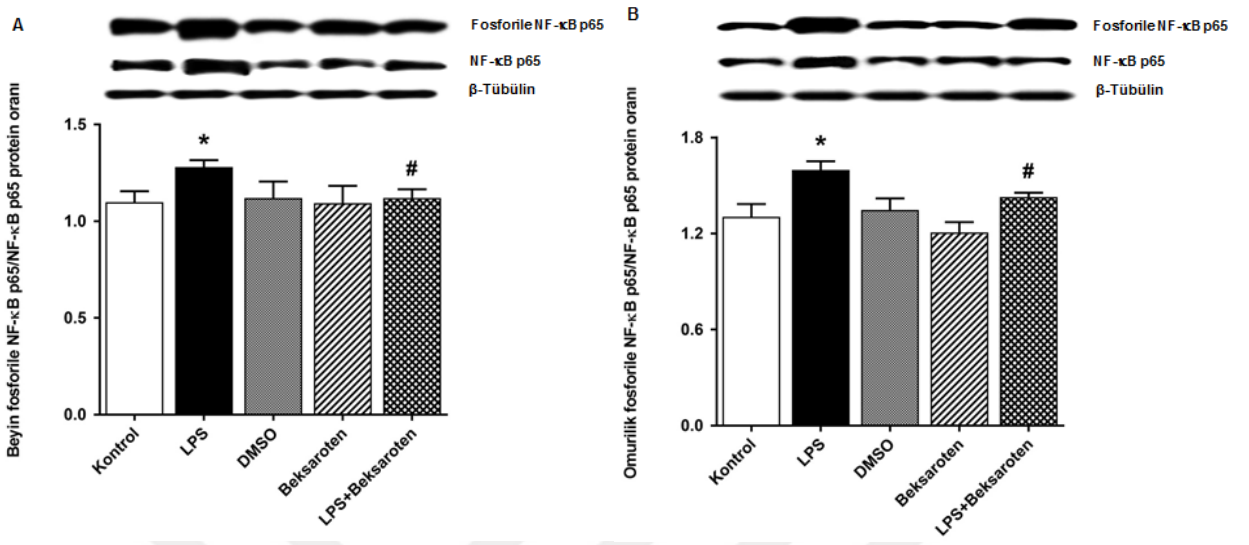
LPS uygulanan farelerden izole edilen dokularda NF-κB p65 protein ekspresyonunda değişiklik gözlenmezken ($P > 0.05$), fosforile NF-κB p65 protein ekspresyonu ile fosforile NF-κB p65/NF-κB p65 protein oranında artış olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin NF-κB p65 protein fosforilasyonu ile fosforile NF-κB p65/NF-κB p65 protein oranında neden olduğu artma beksaroten ile önlenmiştir ($P < 0.05$). Beksaroten tek başına uygulandığında doku NF-κB p65 ve fosforile NF-κB p65 protein ekspresyonu ile fosforile NF-κB p65/NF-κB p65 protein oranında bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte NF-κB p65 protein ekspresyonu değişmezken, etkinliğinin arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu NF-κB etkinliğindeki artma beksaroten ile önlenebilmektedir.

Tablo 4.7. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliğinde NF-κB p65 protein ekspresyonu ile fosforilasyonu üzerinde beksarotenin etkisi.

	NF-κB p65 protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/β-tübülin)	Fosforile NF-κB p65 protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/β-tübülin)	Fosforile NF-κB p65/ NF-κB p65 protein oranı
Beyin			
Kontrol	0.97 ± 0.03 (n= 4)	1.21 ± 0.08 (n= 4)	1.10 ± 0.06 (n= 4)
LPS	1.33 ± 0.07 (n= 4)*	1.45 ± 0.03 (n= 4)*	1.28 ± 0.04 (n= 4)*
DMSO	0.92 ± 0.07 (n= 4)	1.14 ± 0.10 (n= 4)	1.12 ± 0.09 (n= 4)
Beksaroten	1.05 ± 0.02 (n= 4)	1.15 ± 0.10 (n= 4)	1.09 ± 0.09 (n= 4)
LPS+Beksaroten	0.99 ± 0.04 (n= 4)#	1.19 ± 0.04 (n= 4)#	1.12 ± 0.05 (n= 4)#
Omurilik			
Kontrol	0.98 ± 0.04 (n= 4)	1.41 ± 0.19 (n=4)	1.31 ± 0.08 (n= 4)
LPS	1.39 ± 0.02 (n= 4)*	2.02 ± 0.08 (n=4)*	1.60 ± 0.05 (n= 4)*
DMSO	0.91 ± 0.10 (n= 4)	1.34 ± 0.12 (n=4)	1.35 ± 0.07 (n= 4)
Beksaroten	1.04 ± 0.07 (n= 4)	1.38 ± 0.11 (n=4)	1.21 ± 0.06 (n= 4)
LPS+Beksaroten	1.01 ± 0.08 (n= 4)#	1.67 ± 0.08 (n=4)#	1.43 ± 0.03 (n= 4)#

*DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme sürelerinin ölçülmesinin ardından izole edilen beyin ve omuriliklerden hazırlanan örneklerde NF-κB ve fosforile NF-κB p65 protein ekspresyonu immunoblotting yöntemiyle ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. *Kontrol ve #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*



Şekil 4.6. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliğinde NF-κB p65 protein ekspresyonu ile fosforilasyonu üzerinde beksarotenin etkisi. *DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme sürelerinin ölçülmesinin ardından izole edilen beyin ve omuriliklerden hazırlanan örneklerde NF-κB p65 ve fosforile NF-κB p65 protein ekspresyonu immunoblotting yöntemiyle ölçülmüştür. 4 fareden elde edilen sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. *Kontrol ve #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*

4.9. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde COX-2 Protein Ekspresyonu Üzerinde Beksarotenin Etkisi

Farelere SF veya LPS ile birlikte beksaroten uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilikte COX-2 protein ekspresyonundaki değişiklikler ile ilgili bulgular Tablo 4.8. ve Şekil 4.7.'de verilmiştir.

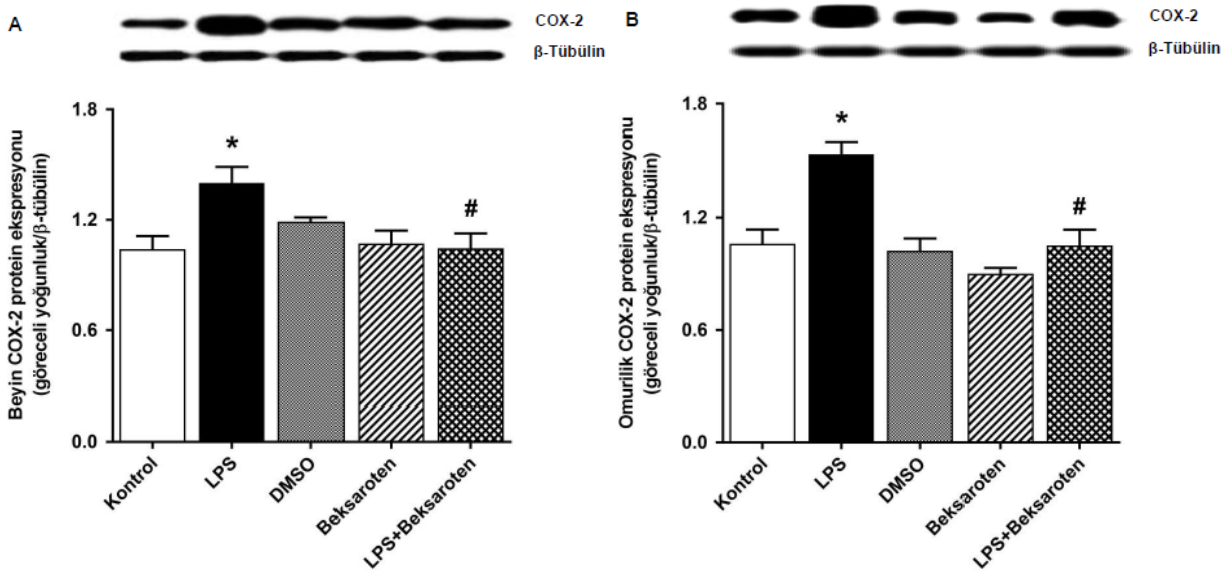
LPS uygulanan farelerden izole edilen dokularda COX-2 protein ekspresyonunda artma olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin COX-2 protein ekspresyonunda neden olduğu artma beksaroten ile önlenmiştir ($P < 0.05$). Beksaroten tek başına uygulandığında COX-2 protein ekspresyonunda bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte COX-2 protein ekspresyonunun arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu COX-2 protein ekspresyonundaki artma beksaroten ile önlenebilmektedir.

Tablo 4.8. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde COX-2 protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi.

	COX-2 protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/β-tübülin)
Beyin	
Kontrol	1.04 ± 0.07 (n= 4)
LPS	1.40 ± 0.09 (n= 4)*
DMSO	1.19 ± 0.02 (n= 4)
Beksaroten	1.07 ± 0.07 (n= 4)
LPS+Beksaroten	1.05 ± 0.08 (n= 4)#
Omurilik	
Kontrol	1.06 ± 0.76 (n= 4)
LPS	1.54 ± 0.07 (n= 4)*
DMSO	1.02 ± 0.07 (n= 4)
Beksaroten	0.90 ± 0.031 (n= 4)
LPS+Beksaroten	1.05 ± 0.09 (n= 4)#

*DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme sürelerinin ölçülmesinin ardından izole edilen beyin ve omuriliklerden hazırlanan örneklerde COX-2 protein ekspresyonu immunoblotting yöntemiyle ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. *Kontrol ve #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*



Şekil 4.7. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde COX-2 protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi. *DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme sürelerinin ölçülmesinin ardından izole edilen beyin ve omuriliklerden hazırlanan örneklerde COX-2 protein ekspresyonu immunoblotting yöntemiyle ölçülmüştür. 4 fareden elde edilen sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. *Kontrol ve #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*

4.10. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde COX-2 Etkinliği Üzerinde Beksarotenin Etkisi

Farelere SF veya LPS ile birlikte beksaroten uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilikte COX-2 etkinliğindeki değişiklikler ile ilgili bulgular Tablo 4.9. ve Şekil 4.8.'de verilmiştir.

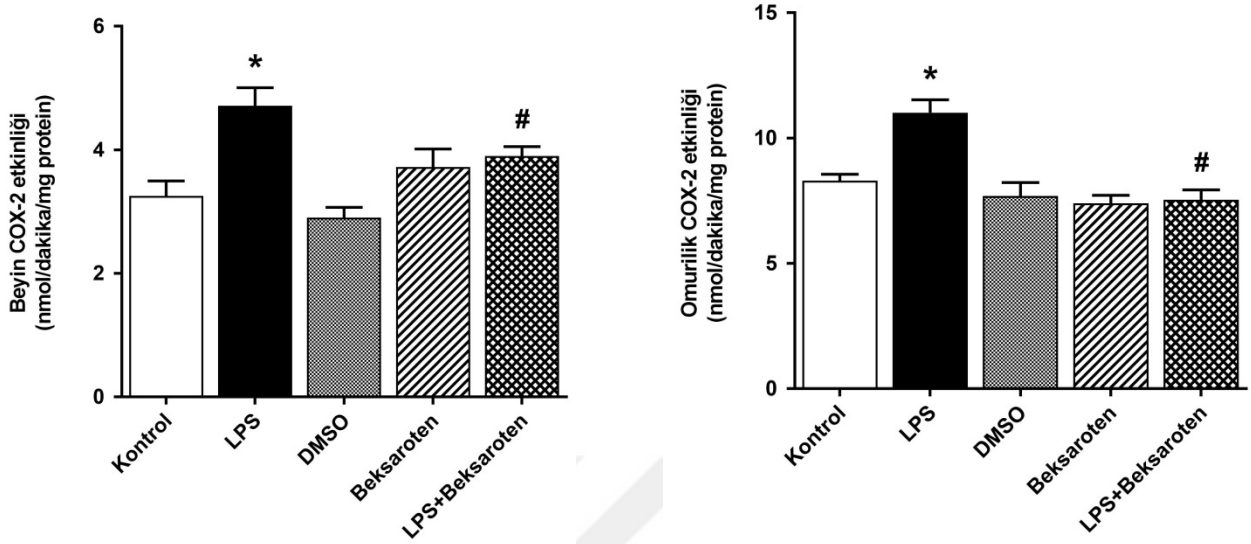
LPS uygulanan farelerden izole edilen dokularda COX-2 etkinliğinde artma olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin COX-2 etkinliğinde neden olduğu artma beksaroten ile önlenmiştir ($P < 0.05$). Beksaroten tek başına uygulandığında COX-2 etkinliğinde bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte COX-2 etkinliğinin arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu COX-2 etkinliğindeki artma beksaroten ile önlenebilmektedir.

Tablo 4.9. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde COX-2 etkinliği üzerinde beksarotenin etkisi.

	COX-2 etkinliği (nmol/min/mg protein)
Beyin	
Kontrol	3.25 ± 0.24 (n= 5)
LPS	4.71 ± 0.29 (n= 5)*
DMSO	2.90 ± 0.17 (n= 4)
Beksaroten	3.72 ± 0.30 (n= 4)
LPS+Beksaroten	3.89 ± 0.15 (n= 5)#
Omurilik	
Kontrol	8.30 ± 0.25 (n= 5)
LPS	11.01 ± 0.52 (n= 5)*
DMSO	7.69 ± 0.53 (n= 4)
Beksaroten	7.39 ± 0.32 (n= 4)
LPS+Beksaroten	7.53 ± 0.40 (n= 5)#

*DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme sürelerinin ölçülmesinin ardından izole edilen beyin ve omuriliklerden hazırlanan örneklerde COX-2 etkinliği ELISA kiti kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. *Kontrol ve #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*



Şekil 4.8. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde COX-2 etkinliği üzerinde beksarotenin etkisi. *DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme sürelerinin ölçülmesinin ardından izole edilen beyin ve omuriliklerden hazırlanan örneklerde COX-2 etkinliği ELISA kiti kullanılarak ölçülmüştür. 4-5 fareden elde edilen sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. *Kontrol ve #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*

4.11. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde PGE_2 Düzeyleri Üzerinde Beksarotenin Etkisi

Farelere SF veya LPS ile birlikte beksaroten uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilikte PGE_2 düzeylerindeki değişiklikler ile ilgili bulgular Tablo 4.10. ve Şekil 4.9.'da verilmiştir.

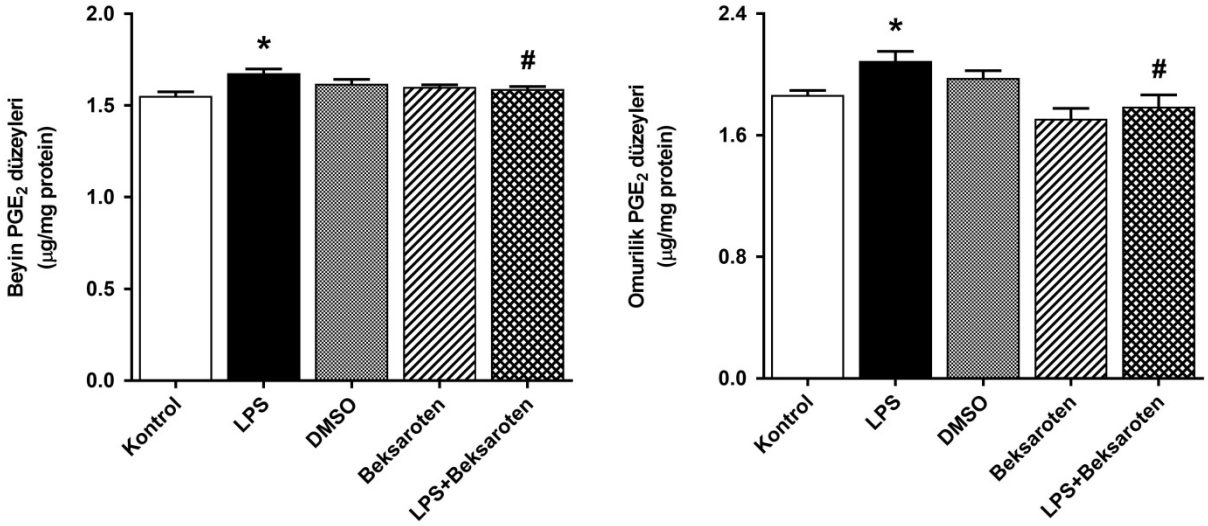
LPS uygulanan farelerden izole edilen dokularda PGE_2 düzeylerindeki artma olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin PGE_2 düzeylerindeki neden olduğu artma beksaroten ile önlenmiştir ($P < 0.05$). Beksaroten tek başına uygulandığında PGE_2 düzeylerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte PGE_2 düzeylerinin arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu PGE_2 düzeylerindeki artma beksaroten ile önlenebilmektedir.

Tablo 4.10. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde PGE_2 düzeyleri üzerinde beksarotenin etkisi.

	PGE_2 düzeyleri (µg/mg protein)
Beyin	
Kontrol	1.55 ± 0.02 (n= 7)
LPS	1.68 ± 0.06 (n= 7)*
DMSO	1.62 ± 0.02 (n= 7)
Beksaroten	1.60 ± 0.01 (n= 7)
LPS+Beksaroten	1.59 ± 0.02 (n= 7)#
Omurilik	
Kontrol	1.86 ± 0.03 (n= 7)
LPS	2.09 ± 0.06 (n= 7)*
DMSO	1.98 ± 0.05 (n= 7)
Beksaroten	1.71 ± 0.07 (n= 7)
LPS+Beksaroten	1.79 ± 0.08 (n= 7)#

*DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme sürelerinin ölçülmesinin ardından izole edilen beyin ve omuriliklerden hazırlanan örneklerde PGE_2 düzeyleri ELISA kiti kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. *Kontrol ve #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*



Şekil 4.9. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde PGE_2 düzeyleri üzerinde beksarotenin etkisi. *DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme sürelerinin ölçülmesinin ardından izole edilen beyin ve omuriliklerden hazırlanan örneklerde PGE_2 düzeyleri ELISA kiti kullanılarak ölçülmüştür. 7 fareden elde edilen sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. *Kontrol ve #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*

4.12. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde IL-1β Protein Ekspresyonu Üzerinde Beksarotenin Etkisi

Farelere SF veya LPS ile birlikte beksaroten uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilikte IL-1β protein ekspresyonundaki değişiklikler ile ilgili bulgular Tablo 4.11 ve Şekil 4.10'da verilmiştir.

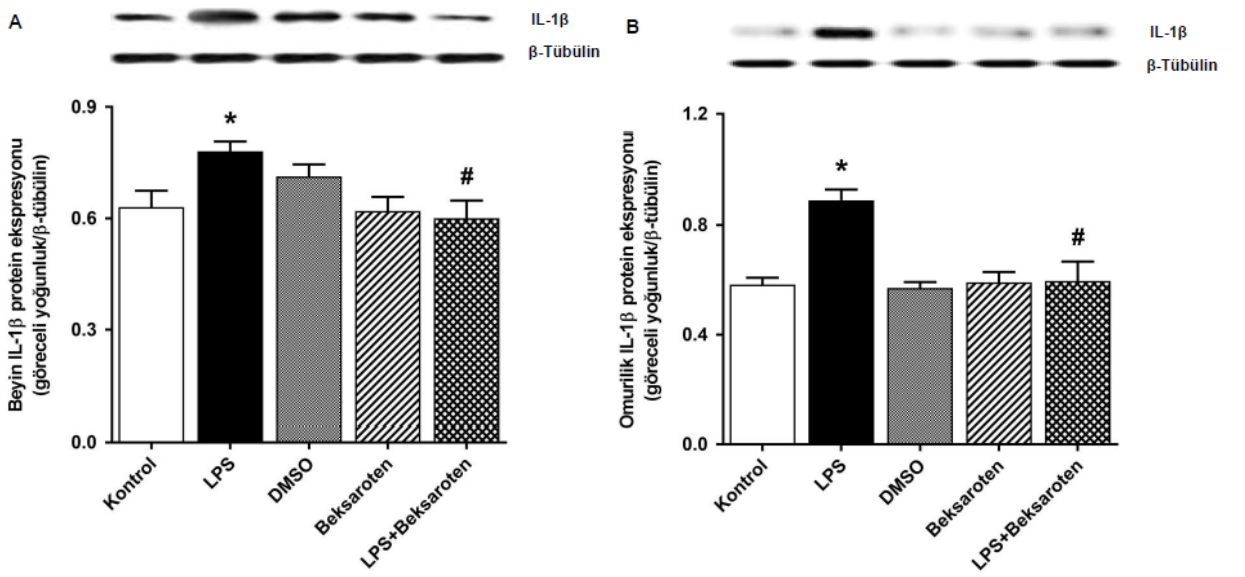
LPS uygulanan farelerden izole edilen dokularda IL-1β protein ekspresyonunda artma olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin IL-1β protein ekspresyonunda neden olduğu artma beksaroten ile önlenmiştir ($P < 0.05$). Beksaroten tek başına uygulandığında IL-1β protein ekspresyonunda bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte IL-1β protein ekspresyonunun arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu IL-1β protein ekspresyonundaki artma beksaroten ile önlenebilmektedir.

Tablo 4.11. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde IL-1β protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi.

	IL-1β protein ekspresyonu (göreceli yoğunluk/β-tübülin)
Beyin	
Kontrol	0.63 ± 0.04 (n= 4)
LPS	0.78 ± 0.03 (n= 4)*
DMSO	0.71 ± 0.03 (n= 4)
Beksaroten	0.62 ± 0.04 (n= 4)
LPS+Beksaroten	0.60 ± 0.05 (n= 4)#
Omurilik	
Kontrol	0.58 ± 0.03 (n= 4)
LPS	0.89 ± 0.04 (n= 4)*
DMSO	0.57 ± 0.02 (n= 4)
Beksaroten	0.59 ± 0.04 (n= 4)
LPS+Beksaroten	0.60 ± 0.07 (n= 4)#

*DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme sürelerinin ölçülmesinin ardından izole edilen beyin ve omuriliklerden hazırlanan örneklerde IL-1β protein ekspresyonu immunoblotting yöntemiyle ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. *Kontrol ve #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*



Şekil 4.10. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde IL-1β protein ekspresyonu üzerinde beksarotenin etkisi. *DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme sürelerinin ölçülmesinin ardından izole edilen beyin ve omuriliklerden hazırlanan örneklerde IL-1β protein ekspresyonu immunoblotting yöntemiyle ölçülmüştür. 4 fareden elde edilen sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. *Kontrol ve #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*

4.13. Kontrol ve Endotoksemik Farelerin Beyin ve Omuriliğinde IL-1β Düzeyleri Üzerinde Beksarotenin Etkisi

Farelere SF veya LPS ile birlikte beksaroten uygulanmasından 6 saat sonra izole edilen beyin ve omurilikte IL-1β düzeylerindeki değişiklikler ile ilgili bulgular Tablo 4.12. ve Şekil 4.11.'de verilmiştir.

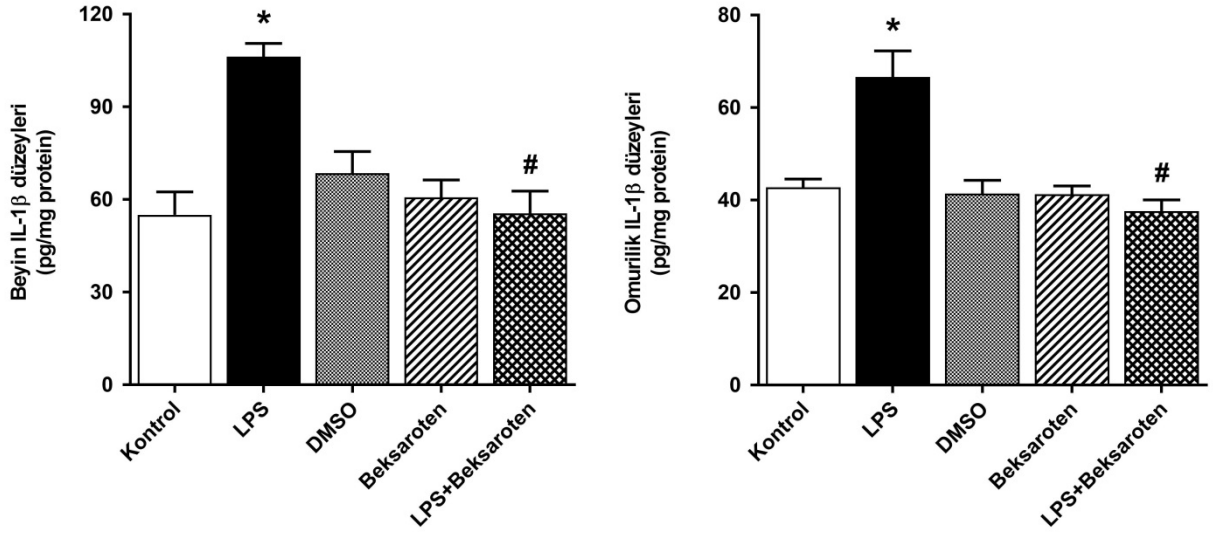
LPS uygulanan farelerden izole edilen dokularda IL-1β düzeylerinde artma olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$). LPS'nin IL-1β protein düzeylerinde neden olduğu artma beksaroten ile önlenmiştir ($P < 0.05$). Beksaroten tek başına uygulandığında IL-1β düzeylerinde bir değişiklik oluşturmamıştır ($P > 0.05$).

Bu bulgular, LPS uygulanmasından 6 saat sonra beyin ve omurilikte IL-1β düzeylerinin arttığını göstermektedir. Bulgularımıza göre, LPS'nin neden olduğu IL-1β düzeylerindeki artma beksaroten ile önlenebilmektedir.

Tablo 4.12. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde IL-1β düzeyleri üzerinde beksarotenin etkisi.

	IL-1β düzeyleri (pg/mg protein)
Beyin	
Kontrol	55.07 ± 7.39 (n= 7)
LPS	106.20 ± 4.31 (n= 7)*
DMSO	68.52 ± 7.01 (n= 7)
Beksaroten	60.70 ± 5.64 (n= 7)
LPS+Beksaroten	55.51 ± 7.22 (n= 7)#
Omurilik	
Kontrol	42.76 ± 1.80 (n= 7)
LPS	66.62 ± 5.63 (n= 7)*
DMSO	41.41 ± 2.90 (n= 7)
Beksaroten	41.29 ± 1.78 (n= 7)
LPS+Beksaroten	37.61 ± 2.45 (n= 7)#

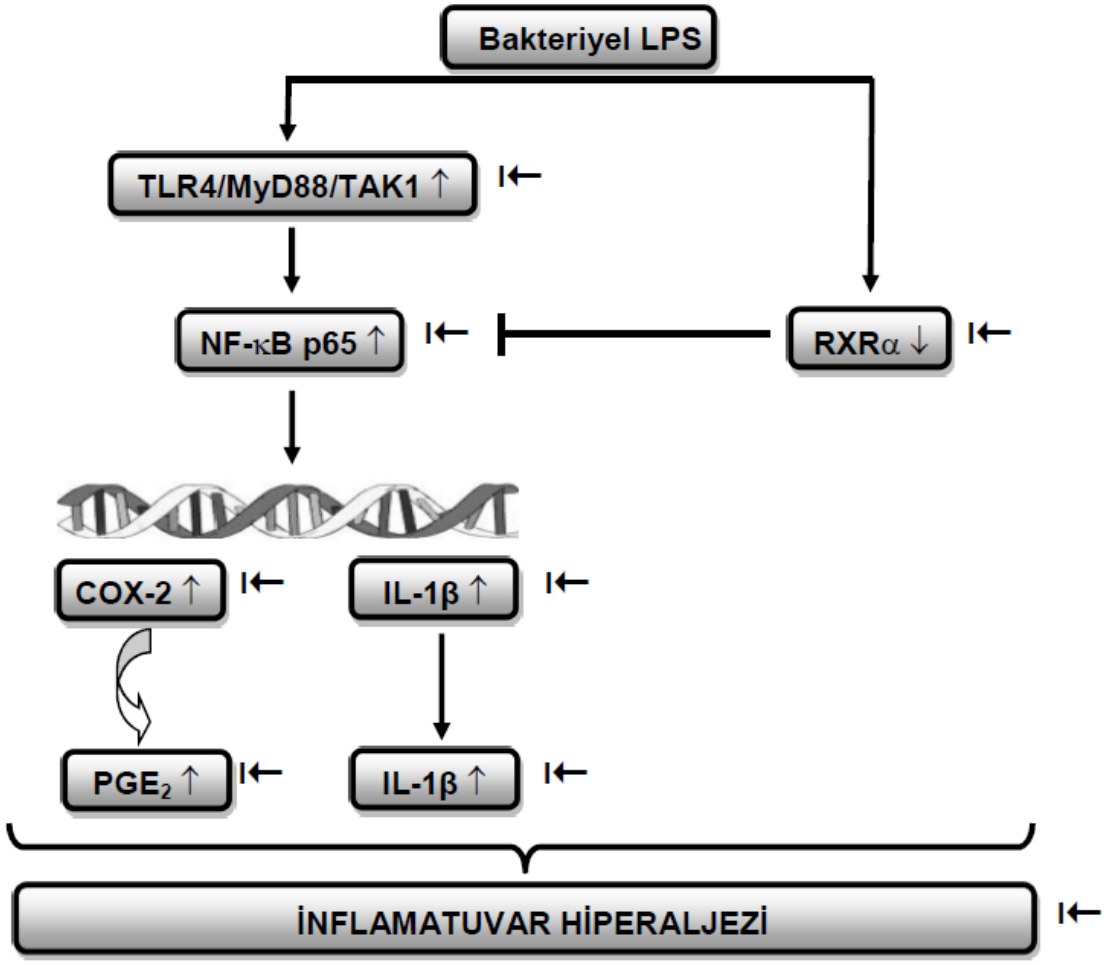
*DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme sürelerinin ölçülmesinin ardından izole edilen beyin ve omuriliklerden hazırlanan örneklerde IL-1β düzeyleri ELISA kiti kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. *Kontrol ve #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*



Şekil 4.11. Kontrol ve endotoksemik farelerin beyin ve omuriliklerinde IL-1β düzeyleri üzerinde beksarotenin etkisi. *DMSO (4 ml/kg; s.k.) ya da beksaroten (10 mg/kg; s.k.), SF (10 ml/kg; i.p.) veya LPS (10 mg/kg; i.p.) ile birlikte aynı zamanda uygulanmıştır. Farelere maddelerin uygulanmasından sonraki 6. saatte 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme sürelerinin ölçülmesinin ardından izole edilen beyin ve omuriliklerden hazırlanan örneklerde IL-1β düzeyleri ELISA kiti kullanılarak ölçülmüştür. 7 fareden elde edilen sonuçlar ortalama ± ortalamaların standart hatası olarak gösterilmiştir. *Kontrol ve #LPS değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (P < 0.05).*

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında, LPS ile oluşturulan inflamatuvar hiperaljezi modelinde seçici bir RXRα agonisti olan beksarotenin SSS'de TLR4/MyD88/TAK1/NF-κB/COX-2 sinyal ileti yolu etkinliği ve ilişkili olarak proinflamatuvar ve hiperaljezik mediyatörlerin oluşumları üzerinde oluşturabileceği değişiklikler araştırılmıştır. Daha önceki çalışmalarımızın bulguları ile bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, LPS ile oluşturulan inflamatuvar hiperaljezi modelinde beksaroten ile LPS'nin neden olduğu RXRα ekspresyonundaki azalmanın geri çevrildiğini, SSS'de TLR4/MyD88/TAK1/NF-κB/COX-2 sinyal ileti yolu etkinliği ve ilişkili olarak PGE_2 ile IL-1β düzeylerindeki artışın, nosiseptif duyarlılıktaki artışa paralel biçimde önlendiğini göstermektedir (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. Farelerde bakteriyel LPS ile oluşturulan inflamatuvar hiperaljezi modelinde RXRα agonisti beksarotenin SSS'de LPS sinyal ileti yolunda oluşturduğu değişiklikler ile inflamatuvar hiperaljeziyi önleyici etkisi ile ilgili olarak önerilen mekanizma.

"Endotoksin" olarak da bilinen ve *E. coli* gibi Gram-negatif bakterilerin hücre duvarının bir bileşeni olan LPS'nin lipit A bölümünün [235] sıçan ve farelere uygulanan LPS'nin neden olduğu inflamasyon ve SSS'de ağrı ile ilgili yolların duyarlılaşmasının sonucu olarak supraspinal düzeyde duyumsanan ağrının derecesinn ölçüldüğü sıcak zemin testinde termal uyarıya karşı nosiseptif uyarı eşiğinin düşmesinden sorumlu olduğu bildirilmiştir [22-24, 236-240]. Öte yandan, LPS'nin yüksek dozda analjezi, düşük dozda ise hiperaljeziye neden olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [241]. Ağrı beyin ve omurilikteki yüksek derecede organize olmuş nöral yollar aracılığıyla düzenlenmektedir. Tek doz LPS uygulanması ile rodentlerde davranışsal hiperaljezi oluşturulabildiği gösterilmiştir [23, 24, 48, 49]. Daha önce yaptığımız bir çalışmada sistemik yoldan LPS uygulanması ile termal uyarıya yanıtın 3. ve 6. saatte aşamalı olarak arttığı görülmüştür [24]. Yoon ve ark. [48] tarafından yapılan bir çalışmada ise, LPS uygulanmasından 3, 6, 9 ve 24 saat sonra sıcak zeminde kalma süresi ölçüldüğünde 6. saatte termal uyarıya karşı en yüksek yanıt alınmış ve yanıtın 6. saatten sonra aşamalı olarak azaldığı görülmüştür. Zhao ve ark. [49] ise, termal uyarıya duyarlılıktaki artışın LPS uygulanmasından 2 saat sonra başlayarak 6. saatte en yüksek değere yükseldiğini ve 8. saatteki ölçümde ise düştüğünü göstermişlerdir. Bu çalışmaların sonuçlarını göz önünde bulundurarak tasarlanan bu tez çalışmasında da, LPS uygulanmasından 6 saat sonra termal uyarıya verilen yanıt süresindeki azalmayla belirlenen termal hiperaljezi ortaya çıkmıştır.

Çalışmamızda LPS uygulanmasından 6 saat sonra belirlenen termal uyarıya yanıttaki artışın beksaroten ile önlendiği görülmüştür. Bu bulgu, seçici bir RXRα agonisti beksarotenin LPS'nin nosiseptif sistemde neden olduğu değişiklikleri önlediğini göstermiştir. RXR'ler SSS ile ilişkili birçok fizyolojik ve patolojik süreçte önemli rol oynamaktadırlar. RXR agonisti 9-*cis* retinoik asidin MS lezyonu bulunan SSS patolojisinde remiyelinizasyonu artırdığı ve nöroinflamasyonu önlediği gösterilmiştir [242]. Yine bir başka çalışmada, LPS'nin neden olduğu mikrogliyal NO, TNF-α, IL-1β ve -12 p40 oluşumunun 9-*cis* retinoik asit ile önlendiği gösterilmiştir [243]. Heras-Sandoval ve ark. [244], bir RXR agonisti olan dokozahekzaenoik asidin AD'de gliyal hücre etkinliğini önlediği ve inflamatuvar yanıtları azalttığını göstermişlerdir. Certo ve ark. [245] ise, farelerde oluşturulan iskemik inme modelinde beksarotenin fokal serebral iskemiyle ilişkili histolojik ve nörolojik bulguları iyileştirerek nöroprotektif etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Beksarotenin ayrıca inflamatuvar yanıtları önleyerek travmatik beyin zedelenmesine karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir [17]. AH fare modelinde azalan RXRα ekspresyonunun beksaroten ile geri çevrildiği ve beksarotenin amiloit β nedeniyle ortaya çıkan endoplazmik retikulum stresi ile proapopitotik *Bcl2-associated agonist of cell death protein* etkinliğine karşı hücreleri koruduğu gösterilmiştir [246]. Bir başka çalışmada, intestinal tümör hücrelerinde azalmış RXR mRNA ekspresyonunun beksaroten ile

arttığı görülmüş ve bu sonucun COX-2 mRNA ekspresyonundaki azalma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [247]. Bizim çalışmamızda da benzer biçimde, beksaroten LPS'nin neden olduğu RXRα protein ekspresyonundaki azalmayı önlemiştir. Gui ve ark. [248], bir sıçan modelinde kronik daralma yaralanma ile ortaya çıkan nöroinflamasyon ile nöropatik ağrının beksaroten ile azaldığını göstermişlerdir ve aynı çalışmada tek başına beksaroten tedavisi ile mekanik ya da termal uyarılara karşı verilen yanıtta bir değişiklik görülmediği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da benzer biçimde, beksarotenin tek başına termal uyarıya yanıt üzerinde bir etkisi olmamıştır. Tüm bu bulgular beksarotenin LPS'nin neden olduğu RXRα protein ekspresyonundaki azalmayı önlemesinin inflamatuvar hiperaljezinin önlenmesine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. Öte yandan, her ne kadar RXRα agonisti olarak bilinen beksarotenin, LPS'nin neden olduğu RXRα protein ekspresyonundaki azalmayı hangi mekanizma ile önlediği henüz açıklanamasa da, en azından bu deney modelinde, beksarotenin transkripsiyonal (gen ekspresyonu gibi), translasyonal (ulak ribonükleik asit ekspresyonu ve stabilitesi gibi) ve/veya translasyon sonrası (protein stabilitesi gibi) düzeydeki olaylar üzerindeki etkisiyle RXRα ekspresyonunu düzenlediği ileri sürülebilir [246, 249]. Ayrıca, RXRα'nın *up*-regülasyonuna kromatinin yeniden biçimlenmesinin aracılık etmesi de olası gibi görünmektedir [246]. Ancak, bu hipotezlerin geçerliliklerinin kanıtlanabilmesi için ek deneylerin yapılması gerekmektedir.

Bir adaptör molekül olan MyD88 TLR2, -4 ya da -9'a bağlanarak bu reseptörler ile *downstream* moleküller olan MAPK'lar ve NF-κB arasında iletişimi sağlayarak sitokin genlerin ekspresyonuna yol açmaktadır. Gen ekspresyonunu sağlayabilmek için RXR ile permisif heterodimer oluşturan LXR ligant ile etkinleştirildiğinde LPS'nin neden olduğu NF-κB ile MAPK'nin aracılık ettiği gen ekspresyonunu, MyD88'in peritoneal makrofaj hücre zarlarının lipit raftlarında toplanmasını önleyerek engellemiştir. Bu çalışmada, LXR agonisti LPS'nin neden olduğu MyD88 protein ekspresyonundaki artışı önlemiştir [250]. Bu bulgu LXR-RXR heterodimerini etkinleştirebilen bir yaklaşımın LPS'nin neden olduğu TLR sinyalini önleyerek patofizyolojisinde bu sinyal ileti yolunun rol oynadığı hastalıkların tedavisinde umut verici olduğunu düşündürmektedir. Bir başka çalışmada, beksaroten kardiyomiyositlerde yüksek miktarda glukoz uygulaması ile etkinleştirilen IKK/IκBα/NF-κB sinyal ileti yolu etkinliği ile IL-6, TNF-α ve MCP-1 gibi proinflamatuvar mediyatörlerin gen ekspresyonunu önlemiştir [251]. Cras ve ark. [252], tarafından yapılan tiroit kanseri hücre kültürü çalışmasında ise, beksarotenin NF-κB'nin transkripsiyonel etkinliğini önlediği gösterilmiştir. Yapılan öteki çalışmalarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda seçici bir RXRα agonisti olan beksaroten farelerde LPS'nin neden olduğu inflamatuvar hiperaljezi modelinde SSS'de TLR4/MyD88/TAK1/NF-κB/COX-2 sinyal ileti yolunun etkinliğini önlemiştir.

LPS ile çok sayıda hücrede bir nükleer transkripsiyon faktörü olan NF-κB'nin uyarılmasının ardından etkinliği artan iNOS aracılığıyla oluşan NO ile birlikte NOX2 ve NOXO2 etkinliğinin artmasıyla birlikte oluşumları artan proinflamatuvar sitokinler ile ROT/RNT gibi moleküllerin inflamasyonun çeşitli aşamalarında rol oynadıklarının gösterildiği akut ve kronik inflamasyon modellerinde yapılan çalışmalar bulunmaktadır [35, 253-261]. LPS'nin rodentler ya da sağlıklı insanlara uygulanması ile dolaşımdaki TNF-α, IL-1β ve -6 düzeylerinin artışıyla belirgin geçici bağışıklık sistemi etkinliği ortaya çıkmaktadır. Bu mediyatörlerin salıverilmesi LPS'nin neden olduğu inflamasyonun davranışsal ve fizyolojik etkileriyle nedensel açıdan bağlantılıdır. LPS'nin neden olduğu bağışıklık sistemi etkinliğinin hiperaljezinin sürdürülmesinden çok başlamasına aracılık ettiği ve hiperaljezinin olasılıkla daha çok SSS'deki bağışıklık sistemi hücrelerinden salıverilen proinflamatuvar mediyatörler aracılığıyla sürdürüldüğü düşünülmektedir [262]. Arka kök ganglion hücreleri ile yapılan bir çalışmada, LPS uygulanması ile TLR4/MyD88/TAK1 sinyal ileti yolu aracılığıyla NF-κB ve MAPK sinyal ileti yollarının etkinleşmesinin iNOS ve COX-2 ekspresyonu ile TNF-α, IL-1β ve -6 düzeylerinin artışıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir [50]. Benzer biçimde bir başka çalışmada, LPS'nin i.p. yoldan uygulanması ile erişkin farelerin hipokampüs dokusunda TLR4/NF-κB sinyal ileti yolunun etkinleştiği gösterilmiştir [263]. LPS ile SSS'deki bağışıklık sistemi hücrelerinin membranlarındaki TLR4 etkinleştirildiğinde TNF-α, IL-1β ve -6 gibi proinflamatuvar mediyatörler salıverilerek santral ağrının amplifikasyonuna ve kronikleşmesine katkıda bulunmaktadırlar [91, 264]. SSS'de sitokinler asimetrik dimetilarjinin ve NMDA reseptörleri ile ilişkili eksitatör akımları güçlendirirken, GABA ve glisin reseptörleriyle ilişkili inhibitör akımların baskılanmasına yol açarak ve daha önemlisi COX-2 etkinliğini artırarak PGE_2 gibi hiperaljezik mediyatörlerin oluşumunu artırıp, ağrı duyarlılığının artışına katkıda bulunmaktadırlar [224, 265]. NF-κB, COX-2 ve IL-1β gibi inflamasyonla ilişkili proteinlerin ekspresyonuna aracılık etmektedir. SSS'de IL-1β'nın COX-2 indüksiyonu için başlıca etken olduğu düşünülmektedir [266]. IL dönüştürücü enzim ya da COX-2 inhibitörlerinin intratekal uygulanması ile inflamasyonun neden olduğu artmış santral COX-2 düzeyleri ve mekanik hiperaljezi baskılanmıştır [224]. Bir çalışmada, IL-1β ile indüklenmiş spinal COX-2 *up*-regülasyonu ile inflamatuvar ağrı duyarlılığı artışının spinal NF-κB sinyal ileti yolu etkinliği ile düzenlendiği gösterilmiştir [267]. COX-2 AA'dan ağrıya duyarlılığı artıran başlıca prostanoit olan PGE_2 oluşumuna aracılık eden anahtar enzimdir. İnflamatuvar ve nosiseptif uyarılar sonucu birçok çalışmada beyin ve omurilikteki düzeyi artan PGE_2, nosiseptif nöronların duyarlılığını artırmanın yanı sıra, SSS'de etkin rol oynayarak hiperaljeziye neden olmaktadır [268]. PGE_2'nin intratekal yoldan uygulanması ile de farelerde hiperaljezi geliştiği görülmüştür [269]. Dahası, sistemik LPS

injeksiyonuyla hipotalamusta PGE_2 düzeylerinin arttığı ve PGE_2'nin hipotalamusun belirli çekirdeklerine injeksiyonuyla sıçanlarda hiperaljezi geliştiği bildirilmiştir [270]. Zhao ve ark [49], farelerin beyin dokusu ile serebral astrositlerinde IKKβ/IκB/NF-κB sinyal ileti yolu aracılığıyla artmış PGE_2 ve COX-2 gibi proinflamatuvar mediyatörlerin düzeylerinin LPS ile oluşturulan hiperaljeziyle ilişkili olduğunu göstermişlerdir. PGE_2'nin santral hiperaljeziye katkısı birçok inflamatuvar ağrı modellerinde gösterilmiştir. Örneğin, spinal PGE_2 salıverilmesinin santral duyarlılık artışına katkıda bulunduğu karagenin ile oluşturulmuş akut artrit ve Freud adjuvanı ya da zimosan ile oluşturulan kronik arka pençe inflamasyonu modelleriyle gösterilmiştir [224, 271, 272]. PGE_2 omuriliğin arka kökünde hem sinaps öncesi nöronlardan glutamat, P maddesi ve CGRP gibi eksitatör mediyatörlerin salıverilmesini artırarak hem de sinpas sonrası nöronlarda glisin gibi inhibitör mediyatörlerin etkinliğini azaltarak hiperaljezi gelişmesine katkıda bulunmaktadır [273]. Zhang ve ark. [274], tarafından yapılan bir çalışmada, deneysel ve faz 1 klinik çalışmalarda analjezik etkisi gösterilmiş bir maddenin santral antinosiseptif etkisinin beyin sapındaki PGE_2 ve TNF-α ekspresyonundaki artışı önlemesiyle ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Bir RXRα agonisti olan LG101305'in fare kolit modelinde TNF-α ile IL-1β düzeylerindeki artışı önleyerek kolon inflamasyonuna karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir [275]. Bir çalışmada intestinal neoplazi gelişmiş $Apc^{Min/+}$ farelerde COX-2 mRNA ekspresyonu ile COX-2 ile indüklenen IL-1β, -2, -4, -6, -10, -12, -17A, TNF-α ve IFN-γ gibi proinflamatuvar mediyatörlerin düzeylerindeki artışın beksaroten tedavisi ile geri çevrildiği bildirilmiştir [247]. Bir başka çalışmada ise, beksarotenin artmış IL-1β ve -6 ile TNF-α oluşumunu önleyerek travmatik beyin zedelenmesinin iyileşmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir [17]. Yine bir çalışmada, insan meme kanseri hücrelerinde beksarotenin COX-2 ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir [276]. Bu çalışmalarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da, beksaroten LPS'nin beyin ve omurilikte neden olduğu NF-κB ile COX-2'nin ekspresyonundaki/etkinliğindeki ve PGE_2 ile IL-1β düzeylerindeki artışı önlemiştir. Bu bulgular, beksarotenin adı geçen parametreler üzerindeki etkisinin LPS'nin neden olduğu hiperaljeziyi önleyici etkisine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

Daha önce LPS ile oluşturulan inflamatuvar hiperaljezi modelinde yaptığımız bir çalışmada, beyin, akciğer, kalp ve böbrek dokularında NLRP3 inflamazomunun altbirimleri olan NLRP3, ASC ve kaspaz-I protein ekspresyonları artmış ve bu inflamazomun etkinleşmesiyle etkili biçime dönüşen IL-1β ekspresyonu ile düzeyi artmıştır. Ayrıca, LPS NF-κB p65, iNOS, nöronal NOS (nNOS), endoteliyal NOS (eNOS), nitrotirozin, kaspaz-11 ve NOX ekspresyonunu/etkinliğini değiştirmiştir. NLRP3 inflamazom inhibitörü *N*-[[(1,2,3,5,6,7-hekzahidro-s-indasen-4-il)amino]karbonil]-4-(1-hidroksi-1-metiletil)-2-furansülfonamit (*N-[[(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)amino]carbonyl]-*

4-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2-furansulfonamide; MCC950) ile LPS'nin neden olduğu tüm bu değişiklikler geri çevrilmiştir. Bu bulgular, NLRP3 inflamazomun NF-κB p65, iNOS, nNOS, eNOS, kaspaz-11 ve NOX ile ilişkili biçimde LPS'nin neden olduğu inflamatuvar hiperaljezide rol oynadığını düşündürmüştür [23]. Sıcak zemin testi kullanarak yaptığımız bir başka çalışmamızda, (1) kontrol grubundaki farelere termal uyarı uygulanmasının ardından sonraki 6. saatte tepki süresinde değişme olmaksızın serum nitrit düzeyleri artmış, (2) bazal ağrı duyarlılığı ile serum nitrit düzeyleri NF-κB inhibitörü N-asetilserotonin (NAS), NO öncülü L-arjinin, yapısal NOS inhibitörü N^G-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME), iNOS inhibitörü aminoguanidin, seçici olmayan COX inhibitörü indometasin ve seçici COX-2 inhibitörü 5,5-dimetil-3-(3-florofenil)-4-(4-metilsülfonil)fenil-2(5H)-furanon (*5,5-dimethyl-3-(3-florophenyl)-4-(4-methylsulphonyl-2(5H)-furanon*; DFU) ile değişmemiş ve (3) poli adenozin difosfat riboz polimeraz sentaz inhibitörü 3-aminobenzamit (3-AB) ile serum nitrit düzeyleri değişmeksizin tepki süresi uzamıştır. LPS (10 mg/kg, i.p.) uygulanan farelerde ise NAS, L-arjinin, L-NAME, indometasin, DFU ve 3-AB LPS'nin neden olduğu tepki süresindeki kısalmayı önlemişlerdir [24]. Öte yandan, LPS uygulanan farelerin serum nitrit düzeylerindeki azalma NAS, L-arjinin, indometasin, DFU ve 3-AB ile önlenebilmiştir. Bunlara ek olarak, yalnızca L-arjinin ve aminoguanidin ile LPS'nin neden olduğu serum 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ olarak ölçülen PGI_2 düzeylerindeki artma önlenebilmiştir. LPS, böbrek nitrit düzeylerinde bir değişiklik oluşturmasa da, kalp, akciğer ve beyin nitrit düzeylerinde neden olduğu azalma NAS, L-arjinin, L-NAME, aminoguanidin, DFU ve 3-AB ile önlenmiştir. Ayrıca, LPS'nin neden olduğu kalp, böbrek, beyin ve/veya akciğerde malondialdehit düzeyleri ve/veya miyeloperoksidaz etkinliğindeki azalmayı, LPS ile azalan sistemik NO oluşumunu önleyen dozlarda kullanılan NAS, L-arjinin, L-NAME, aminoguanidin, DFU ve/veya 3-AB'nin önledikleri gözlenmiştir. Bulgularımız, NO'nun LPS'nin neden olduğu lipit peroksidasyonu ile nötrofil infiltrasyonundaki azalmayı önleyebileceğinin yanı sıra, NO'nun proinflamatuvar ve prooksidan bir molekül olabileceği ile ilgili çalışmalrın sonuçlarını desteklemektedir. Bir başka çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ise, karaciğer nitrit ile serum PGE_2 ve TNF-α düzeylerindeki azalmanın yanı sıra, beyin ve sistemik dolaşımdaki nitrit düzeylerindeki artma olduğu kadar, doku lipit peroksidasyonu ve nötrofil infiltrasyonundaki değişikliklerin, bir TNF-α inhibitörü olan talidomidin LPS'nin neden olduğu hiperaljeziyi önleyici ve COX inhibitörlerinden indometasin, nimesulit ile parasetamolün analjezik etkinliğini artırıcı etkisine katkıda bulunduğunu düşündürmüştür [22].

Seçici bir NLRP3 inflamazom inhibitörü olan MCC950 kullanarak yaptığımız bir çalışmada, NLRP3/ASC/pro-kaspaz-1 inflamazom oluşumu/etkinliği önlendiğinde, farelerde LPS'nin neden olduğu inflamatuvar hiperaljeziye eşlik eden NF-κB p65, kaspaz-1/11 p20, NOX2, NOXO2, eNOS,

nNOS ve iNOS ekspresyonlarındaki/etkinliklerindeki değişikliklerin önlenebileceği sonucuna varılmıştır [23]. Sıçanlarda LPS ile septik şok modeli oluşturduğumuz bir başka çalışmada ise, LPS ile birlikte uygulanan beksaroten 0.03, 0.1, 0.3 veya 1 mg/kg (s.k.) dozlarda taşikardiyi önlememiş, ayrıca 0.3 ve 1 mg/kg dozlarda %20 oranında mortaliteye neden olmuştur. Öte yandan, LPS ile birlikte 0.1 mg/kg dozda uygulanan beksarotenin inflamasyon ve doku zedelenmesi ile ilişkili hipotansiyona karşı koruyucu etkili olduğu gösterilmiştir [226].

Sonuç olarak bu çalışmanın bulguları, seçici bir RXRα agonisti olan beksarotenin SSS'de TLR4/MyD88/TAK1/NF-κB/COX-2 sinyal ileti yolu ekspresyonu/etkinliği ile proinflamatuvar sitokin oluşumunda azalmaya neden olarak LPS'nin neden olduğu inflamatuvar hiperaljeziyi önleyebileceğini göstermiştir. Nöropatik ağrı, kanser ile ilişkili ağrı ve postoperatif ağrı gibi birçok kronik ağrılı durumların fizyopatolojisinde inflamatuvar mediyatörlerin rol oynaması inflamasyonun ağrıya duyarlılığı artırıcı etkisinin olası klinik önemini desteklemektedir. Yoğun bakım birimlerinde günlük pratikte opiyatların sıkça kullanımının hiperaljeziye neden olması bu birimlerde yatan hastaların ağrı tedavisinde yeni moleküllerin gereksinimi görüşünü desteklemektedir. Bulgularımız, beksaroten gibi seçici RXRα agonistlerinin bakteriyel enfeksiyonlara bağlı olarak gelişebilecek ağrının da eşlik ettiği inflamatuvar hastalıkların yanında fizyopatolojisinde inflamasyonun yer aldığı ağrıya duyarlılığın arttığı kronik ağrılı durumların önlenmesi ve tedavisinde de analjezik/antiinflamatuvar ilaç olarak yararlı olabileceğini göstermektedir. Beksarotenin reseptör dimerleşmesine ilişkin etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, heterodimere özgül agonistlerin yan etkiler açısından daha güvenilir olduğunu düşündürmektedir. Bundan sonra tasarlanacak çalışmalar beksarotenin etki mekanizmasını aydınlatmaya yönelik olabileceği gibi, heterodimere özgül moleküllerin de geliştirilebileceği düşünülmektedir. Böylece, bu çalışmadan elde edilen sonuçların inflamasyon ile ağrının eşlik ettiği hastalıkların tedavisinde yeni terapötik yaklaşımlara kapı açabileceği beklenmektedir.

KAYNAKLAR

[1]. Terman, G. W.; Bonica, J. J., Bonica's Management of Pain. 3rd ed.; Lippincott Williams and Wilkins: Pennsylvania, **2003**; p 73.

[2]. Laird, B. J.; McMillan, D. C.; Fayers, P.; Fearon, K.; Kaasa, S.; Fallon, M. T.; Klepstad, P., The systemic inflammatory response and its relationship to pain and other symptoms in advanced cancer. Oncologist **2013**, 18, (9), 1050-1055.

[3]. Linley, J. E.; Rose, K.; Ooi, L.; Gamper, N., Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology **2010**, 459, (5), 657-669.

[4]. Muley, M. M.; Krustev, E.; McDougall, J. J., Preclinical assessment of inflammatory pain. CNS Neuroscience and Therapeutics **2016,** 22, (2), 88-101.

[5]. Bruni, N.; Della Pepa, C.; Oliaro-Bosso, S.; Pessione, E.; Gastaldi, D.; Dosio, F., Cannabinoid delivery systems for pain and inflammation treatment. Molecules **2018,** 23, (10), pii: E2478.

[6]. Saad, J.; Mathew, D., Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Toxicity. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2021.

[7]. Sala, A.; Proschak, E.; Steinhilber, D.; Rovati, G. E., Two-pronged approach to anti-inflammatory therapy through the modulation of the arachidonic acid cascade. Biochemical Pharmacology **2018,** 158, 161-173.

[8]. Sekiguchi, F.; Tsubota, M.; Kawabata, A., Involvement of voltage-gated calcium channels in inflammation and inflammatory pain. Biological and Pharmaceutical Bulletin **2018,** 41 (8), 1127-1134.

[9]. Singh, A. K.; Kumar, S.; Vinayak, M., Recent development in antihyperalgesic effect of phytochemicals: anti-inflammatory and neuro-modulatory actions. Inflammation Research **2018,** 67 (8), 633-654.

[10]. Stein, C., New concepts in opioid analgesia. Expert Opinion on Investigational Drugs **2018,** 27, (10), 765-775.

[11]. Theken, K. N., Variability in analgesic response to non-steroidal anti-inflammatory drugs. Prostaglandins and Other Lipid Mediators **2018,** 139, 63-70.

[12]. Tomic, M.; Pecikoza, U.; Micov, A.; Vuckovic, S.; Stepanovic-Petrovic, R., Antiepileptic drugs as analgesics/adjuvants in inflammatory pain: current preclinical evidence. Pharmacology and Therapeutics **2018,** 192, 42-64.

[13]. Zhou, Y. Q; Mei, W.; Tian, X. B.; Tian, Y. K.; Liu, D. Q.; Ye, D. W., The therapeutic potential of Nrf2 inducers in chronic pain: Evidence from preclinical studies. Pharmacology and Therapeutics **2021,** 107846.

[14]. Cao, M.; Royce, D. B.; Risingsong, R.; Williams, C. R.; Sporn, M. B.; Liby, K. T., The rexinoids LG100268 and LG101506 inhibit inflammation and suppress lung carcinogenesis in A/J mice. Cancer Prevention Research **2016,** 9 (1), 105-114.

[15]. Fujii, U.; Miyahara, N.; Taniguchi, A.; Oda, N.; Morichika, D.; Murakami, E.; Nakayama, H.; Waseda, K.; Kataoka, M.; Kakuta, H.; Tanimoto, M.; Kanehiro, A., Effect of a retinoid X receptor partial agonist on airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma. Respiratory Research **2017,** 18 (1), 23.

[16]. Yamamoto, A.; Kakuta, H.; Sugimoto, Y., Involvement of glucocorticoid receptor activation on anti-inflammatory effect induced by peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist in mice. International Immunopharmacology **2014,** 22, (1), 204-208.

[17]. Zhong, J.; Cheng, C.; Liu, H.; Huang, Z.; Wu, Y.; Teng, Z.; He, J.; Zhang, H.; Wu, J.; Cao, F.; Jiang, L.; Sun, X., Bexarotene protects against traumatic brain injury in mice partially through apolipoprotein E. Neuroscience **2017**, 343, 434-448.

[18]. Bomben, V.; Holth, J.; Reed, J.; Cramer, P.; Landreth, G., Bexarotene reduces network excitability in models of Alzheimer's disease and epilepsy. Neurobiology of Aging **2014,** 35, 2091-2095.

[19]. Lerner, V.; Miodownik, C.; Gibel, A.; Sirota, P.; Bush, I., Original research the retinoid X receptor agonist bexarotene relieves positive symptoms of schizophrenia: a 6-week, randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial. Journal of Clinical Psychiatry **2014**, 74, 1224-1232.

[20]. McFarland, K.; Spalding, T. A.; Hubbard D.; Ma, J. N.; Olsson, R.; Burstein E. S., Low dose bexarotene treatment rescues dopamine neurons and restores behavioral function in models of Parkinson's disease. ACS Chemical Neuroscience **2013**, 4, 1430-1438.

[21]. Xu, L.; Cao, F.; Xu, F.; He, B.; Dong, Z., Bexarotene reduces blood-brain barrier permeability in cerebral ischemia-reperfusion injured rats. PLoS One **2015,** 10, (4), e0122744.

[22]. Buharalioglu, K.; Ozbasoglu, O.; Korkmaz, B.; Cuez, T.; Sahan-Firat, S.; Yalcin, A.; Tunctan, B., Thalidomide potentiates analgesic effect of COX inhibitors on endotoxin-induced hyperalgesia by modulating TNF-α, PGE and NO synthesis in mice. Federation of American Societies for Experimental Biology **2009**, 23, (1), 742.4.

[23]. Dolunay, A.; Senol, S. P.; Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; Sari, A. N.; Sahan-Firat, S.; Tunctan, B., Inhibition of NLRP3 inflammasome prevents LPS-induced inflammatory hyperalgesia in mice: contribution of NF-κB, caspase-1/11, ASC, NOX, and NOS isoforms. Inflammation **2017,** 40, (2), 366-386.

[24]. Tunctan, B.; Ozveren, E.; Korkmaz, B.; Buharalioglu, C. K.; Tamer, L.; Degirmenci, U.; Atik, U., Nitric oxide reverses endotoxin-induced inflammatory hyperalgesia via inhibition of prostacyclin production in mice. Pharmacological Research **2006**, 53, (2), 177-192.

[25]. Merskey, H.; Lindblom, U.; Mumford, J. M.; Nathan, P. W.; Sunderland, S., Classification of Chronic Pain. 2nd ed.; IASP Task Force on Taxonomy IASP Press: Seattle, 1994; p 209-214.

[26]. Popkirov, S.; Enax-Krumova, E.K.; Mainka, T.; Hoheisel, M.; Hausteiner-Wiehle, C., Functional pain disorders - more than nociplastic pain. NeuroRehabilitation **2020**, 47, (3), 343-353.

[27]. Lampl, Y. Pain In: Encyclopedia of Human Behavior. 2nd ed.; Academic Press: Cambridge, **2012**; p 1-13.

[28]. Morgan, G. E.; Mikhail, M. G., Pain management. In: Clinical Anesthesiology, 2nd ed., Prenttice-Hall International Inc: New Jersey, **1996**; p 274-316.

[29]. Hanakawa, T., Neural mechanisms underlying deafferentation pain: a hypothesis from a neuroimaging perspective. Journal of Orthopaedic Science **2012,** 17, (3), 331-335.

[30]. Cheeti, A.; Chakraborty, R. K.; Ramphul, K., Reactive Arthritis. StatPearls (Internet) StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), **2021.**

[31]. Osterweis, M.; Kleinman, A.; Mechanic, D., The anatomy and physiology of pain. In: Pain and Disability: Clinical, Behavioral, and Public Policy Perspectives. National Academies Press (US): Washington (DC), **1987,** p 123-145.

[32]. Hung, C. Y.; Tan, C. H., TRP channels in nociception and pathological pain. Advances in Experimental Medicine and Biology **2018,** 1099, 13-27.

[33]. Malcangio M. Role of the immune system in neuropathic pain. Scandinavian Journal of Pain **2019,** 20, (1), 33-37.

[34]. de Goeij, M.; van Eijk, L. T.; Vanelderen, P.; Wilder-Smith, O. H.; Vissers, K. C.; van der Hoeven, J. G.; Kox, M.; Scheffer, G. J.; Pickkers, P., Systemic inflammation decreases pain threshold in humans in vivo. PLoS One **2013**, 8, (12), e84159.

[35]. Benson, S.; Engler, H.; Schedlowski, M.; Elsenbruch, S., Experimental endotoxemia as a model to study neuroimmune mechanisms in human visceral pain. Annals of the New York Academy of Sciences **2012**, 1262, 108-117.

[36]. Wieseler-Frank, J.; Maier, S.F.; Watkins, L.R., Immune-to-brain communication dynamically modulates pain: physiological and pathological consequences. Brain, Behavior, and Immunity **2005**, 19, (2), 104-111.

[37]. Paley, C. A.; Johnson, M. I., Physical activity to reduce systemic inflammation associated with chronic pain and obesity: a narrative review. Clinical Journal of Pain **2016,** 32, (4), 365-370.

[38]. Shamji, M. F.; Guha, D.; Paul, D.; Shcharinsky, A., Systemic inflammatory and Th17 immune activation among patients treated for lumbar radiculopathy exceeds that of patients treated for persistent postoperative neuropathic pain. Neurosurgery **2017,** 1, 81, (3), 537-544.

[39]. Cagnie, B.; Coppieters, I.; Denecker, S.; Six, J.; Danneels, L.; Meeus, M., Central sensitization in fibromyalgia? A systematic review on structural and functional brain MRI. Seminars in Arthritis and Rheumatism **2014**; 44, (1), 68-75.

[40]. Mouraux, A.; Iannetti, G. D., The search for pain biomarkers in the human brain. Brain **2018**, 141, (12), 3290-3307.

[41]. Laflamme, N.; Rivest, S., Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating Gram-negative bacterial cell wall components. Federation of American Societies for Experimental Biology **2001**, 15, (1), 155-163.

[42]. Hines, D. J.; Choi, H. B.; Hines, R. M.; Phillips, A. G.; MacVicar, B. A., Prevention of LPS-induced microglia activation, cytokine production and sickness behavior with TLR4 receptor interfering peptides. PLoS One **2013**, 8, (3), e60388.

[43]. Gaykema, R. P. A.; Goehler, L. E.; Tilders, F. J.; Bol, J. G.; McGorry, M.; Fleshner, M.; Maier, S. F.; Watkins, L. R., Bacterial endotoxin induces fos immunoreactivity in primary afferent neurons of the vagus nerve. Neuroimmunomodulation **1998**, 5, 234-240.

[44]. Chakravarty, S.; Herkenham, M., Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. Journal of Neuroscience **2005**, 25, (7), 1788-1796.

[45]. Farrell, S.F.; de Zoete, R. M. J.; Cabot, P. J.; Sterling, M., Systemic inflammatory markers in neck pain: A systematic review with meta-analysis. European Journal of Pain **2020,** (9), 1666-1686.

[46]. Griton, M.; Konsman, J. P., Neural pathways involved in infection-induced inflammation: recent insights and clinical implications. Clinical Autonomic Research **2018**, 28, (3), 289-299.

[47]. An, J.; Chen, B.; Kang, X.; Zhang, R.; Guo, Y.; Zhao, J.; Yang, H., Neuroprotective effects of natural compounds on LPS-induced inflammatory responses in microglia. American Journal of Translational Research **2020,** 12, (6), 2353-2378.

[48]. Yoon, S.Y.; Patel, D.; Dougherty, P.M., Minocycline blocks lipopolysaccharide induced hyperalgesia by suppression of microglia but not astrocytes. Neuroscience **2012,** 221, 214-224.

[49]. Zhao, H.; Luo, F.; Li, H.; Zhang, L.; Yi, Y.; Wan, J., Antinociceptive effect of tetrandrine on LPS-induced hyperalgesia via the inhibition of IKKb phosphorylation and the COX-2/PGE2 pathway in mice. PLoS One **2014**, 9, (4), e94586.

[50]. Chen, I. T.; Hsu, P. H.; Hsu, W. C.; Chen, N. J., Tseng, P. H., Polyubiquitination of transforming growth factor β-activated kinase 1 (TAK1) at lysine 562 residue regulates TLR4-mediated JNK and p38 MAPK activation. Scientific Reports **2015**, 5, 12300.

[51]. Deuis, J. R.; Dvorakova, L.S.; Vetter, I., Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. Frontiers in Molecular Neuroscience **2017**, 10, 284.

[52]. Holzer, P.; Farzi, A.; Hassan, A. M.; Zenz, G.; Jacan, A.; Reichmann, F., Visceral inflammation and immune activation stress the train. Frontiers in Immunology **2017**, 8, 1613.

[53]. Yam, M. F.; Loh, Y. C.; Oo, C. W.; Basir, R., Overview of Neurological Mechanism of Pain Profile Used for Animal "Pain-Like" Behavioral Study with Proposed Analgesic Pathways. International Journal of Molecular Sciences **2020,** 21, (12), 4355.

[54]. Jones, B. G.; Penkert, R. R.; Surman, S. L.; Sealy, R. E.; Hurwitz, J. L., Nuclear receptors, ligands and the mammalian B cell. International Journal of Molecular Sciences **2020**, 21, (14), 4997.

[55]. De Bosscher, K.; Desmet, S. J.; Clarisse, D.; Estébanez-Perpiña, E.; Brunsveld, L., Nuclear receptor crosstalk - defining the mechanisms for therapeutic innovation. Nature Reviews Endocrinology **2020**, 16, (7), 363-377.

[56]. Pan, P.; Chen, X., Nuclear receptors as potential therapeutic targets for myeloid leukemia. Cells **2020,** 19, 9, (9), 1921.

[57]. Weikum, E. R.; Liu, X.; Ortlund, E. A., The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. Protein Science **2018**, 27, (11), 1876-1892.

[58]. Brtko, J.; Dvorak, Z., Natural and synthetic retinoid X receptor ligands and their role in selected nuclear receptor action. Biochimie **2020**; 179, 157-168.

[59]. Mangelsdorf, D. J.; Borgmeyer, U.; Heyman, R. A.; Zhou, J.; Ong, E. S.; Oro, A.; Kakizuka, A.; Evans, R. M., Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. Genes and Development **1992**, 6, 329-344.

[60]. Dawson, M. I.; Xia, Z., The retinoid X receptors and their ligands. Biochimica et Biophysica Acta **2012**, 1821, 21-56.

[61]. Shao, M.; Lu, L.; Wang, Q.; Ma, L.; Tian, X.; Li, C.; Li, C.; Guo, D.; Wang, Q.; Wang, W.; Wang, Y., The multi-faceted role of retinoid X receptor in cardiovascular diseases. Biomedicine and Pharmacotherapy **2021,** 137, 111264.

[62]. Zhang, H.; Chen, L.; Chen, J.; Jiang, H.; Shen, X., Structural basis for retinoic X receptor repression on the tetramer. Journal of Biological Chemistry **2011;** 286, (28), 24593-24598.

[63]. Chen, L.; Aleshin, A.E.; Alitongbieke, G.; Zhou, Y.; Zhang, X.; Ye, X.; Hu, M.; Ren, G.; Chen, Z.; Ma, Y.; Zhang, D.;, Liu, S.; Gao, W.; Cai, L.; Wu, L.; Zeng, Z.; Jiang, F.; Liu, J.; Zhou, H.; Cadwell, G.; Liddington, R C.; Su, Y.; Zhang, X. K., Modulation of nongenomic activation of PI3K signalling by tetramerization of N-terminally-cleaved RXRα. Nature Communications **2017**; 8, 16066.

[64]. Chen, Z. P.; Iyer, J.; Bourguet, W.; Held, P.; Mioskowski, C.; Lebeau, L.; Noy, N.; Chambon, P.; Gronemeyer, H., Ligand- and DNA-induced dissociation of RXR tetramers. Journal of Molecular Biology **1998**, 275, (1), 55-65.

[65]. Matsushima-Nishiwaki, R.; Okuno, M.; Adachi, S.; Sano, T.; Akita, K.; Moriwaki, H.; Friedman, S. L.; Kojima, S., Phosphorylation of retinoid X receptor alpha at Serine 260 impairs its metabolism and function in human hepatocellular carcinoma. Cancer Research **2001,** 61, 7675-7682.

[66]. Rodriguez, V.; Bailey, R.; Larion, M.; Gilbert, M. R., Retinoid receptor turnover mediated by sumoylation, ubiquitination and the valosin-containing protein is disrupted in glioblastoma. Scientific Reports **2019,** 9, (1), 16250.

[67]. Szanto, A.; Narkar, V.; Shen, Q.; Uray, I. P.; Davies, P. J. A.; Nagy, L., Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. Cell Death and Differentiation **2004**, 2, S126-143.

[68]. Imai, T.; Jiang, M.; Chambon, P.; Metzger, D., Impaired adipogenesis and lipolysis in the mouse upon selective ablation of the retinoid X receptor alpha mediated by a tamoxifen- inducible chimeric Cre recombinase (Cre- ERT2) in adipocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences **2001**, 98, 224-228.

[69]. Barak, Y.; Ong, E. S.; Jones, Y. Z.; Ruiz-Lozano, P.; Chien, K. R.; Koder, A.; Evans, R. M., PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. Molecular Cell **1999**, 4, 585-595.

[70]. Wang, D.; Westerheide, S. D.; Hanson, J. L.; Baldwin, A .S. Jr., Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. Journal of Biological Chemistry **2000**, 275, 32592-32597.

[71]. Kastner, P.; Mark, M.; Leid, M.; Gansmuller, A.; Chin, W.; Grondona, J. M.; Décimo, D.; Krezel, W.; Dierich, A.; Chambon, P., Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice. Genes and Development **1996**, 10, 80-92.

[72]. Krezel, W.; Dupe, V.; Mark, M.; Dierich, A.; Kastner, P.; Chambon, P., RXR gamma null mice are apparently normal and compound RXR alpha +/-/RXR beta -/-/RXR gamma -/- mutant mice are viable. Proceedings of the National Academy of Sciences **1996**, 93, 9010-9014.

[73]. Martínez, C.; Souto, J. A.; de Lera, A. R., Ligand design for modulation of RXR functions. Methods in Molecular Biology **2019**, 2019, 51-72.

[74]. Yamada, S.; Kakuta, H., Retinoid X receptor ligands: a patent review (2007-2013). Expert Opinion on Therapeutic Patents **2014**, 24, (4), 443-452.

[75]. Forman, B.M., The antidiabetic agent LG100754 sensitizes cells to low concentrations of peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands. Journal of Biological Chemistry **2002**, 277, (15), 12503-12506.

[76]. Lagu, B.; Lebedev., R.; Pio, B.; Yang, M.; Pelton, P. D., Dihydro-[1H]-quinolin-2-ones as retinoid X receptor (RXR) agonists for potential treatment of dyslipidemia. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters **2007**, 17, 3491-3496.

[77]. Zhang, X. K., Targeting Nur77 translocation. Expert Opinion on Therapeutic Targets **2007**, 11, 69-79.

[78]. Khatib, T.; Marini, P.; Nunna, S.; Chisholm, D. R.; Whiting, A.; Redfern, C.; Greig, I. R.; McCaffery, P., Genomic and non-genomic pathways are both crucial for peak induction of neurite outgrowth by retinoids. Cell Communication and Signaling **2019,** 17, (1), 40.

[79]. Unsworth, A. J.; Flora, G. D.; Gibbins, J. M., Non-genomic effects of nuclear receptors: insights from the anucleate platelet. Cardiovascular Research **2018,** 114, (5), 645-655.

[80]. Watanabe, M.; Kakuta, H., Retinoid X receptor antagonists. International Journal of Molecular Sciences. **2018**, 19, (8), 2354.

[81]. O'Neill, L. A.; Golenbock, D.; Bowie, A. G., The history of toll-like receptors-redefining innate immunity. Nature Reviews Immunology **2013**, 13, 453-460.

[82]. Ciesielska, A.; Matyjek, M.; Kwiatkowska, K., TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. Cellular and Molecular Life Sciences **2021**, 78, (4), 1233-1261.

[83]. Kuzmich, N. N.; Sivak, K. V.; Chubarev, V. N.; Porozov, Y. B.; Savateeva-Lyubimova, T. N.; Peri, F., TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis. Vaccines **2017,** 5, (4), 34.

[84]. Bonham, K. S.; Orzalli, M. H.; Hayashi, K.; Wolf, A. I.; Glanemann, C.; Weninger, W.; Iwasaki, A.; Knipe, D. M.; Kagan, J. C., A promiscuous lipid-binding protein diversifies the subcellular sites of toll-like receptor signal transduction. Cell **2014**, 156, 705-716.

[85]. Płóciennikowska, A.; Hromada-Judycka, A.; Borzęcka, K.; Kwiatkowska, K., Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. Cellular and Molecular Life Sciences **2015,** 72, (3), 557-581.

[86]. Zanoni, I.; Ostuni, R.; Marek, L. R.; Barresi, S.; Barbalat, R.; Barton, G. M.; Granucci, F.; Kagan, J. C., CD14 controls the LPS-induced endocytosis of toll-like receptor 4. Cell **2011**, 147, 868-880.

[87]. Ling, G. S.; Bennett, J.; Woollard, K. J.; Szajna, M.; Fossati-Jimack, L.; Taylor, P. R.; Scott, D.; Franzoso, G.; Cook, H. T.; Botto M., Integrin CD11b positively regulates TLR4-induced signalling pathways in dendritic cells but not in macrophages. Nature Communications **2014**, 5, 3039.

[88]. Han, C.; Jin, J.; Xu, S.; Liu, H.; Li, N.; Cao, X., Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. Nature Immunology **2010**, 11, 734-742.

[89]. Zhou, Y.; Chen, Y.; Xu, C.; Zhang, H.; Lin, C., TLR4 Targeting as a promising therapeutic strategy for Alzheimer disease treatment. Frontiers in Neuroscience **2020**, 14, 602508.

[90]. Manjili, F. A.; Yousefi-Ahmadipour, A.; Arababadi, M. K., The roles played by TLR4 in the pathogenesis of multiple sclerosis; A systematic review article. Immunology Letters **2020**, 220, 63-70.

[91]. Nicotra, L.; Loram, L. C.; Watkins, L. R.; Hutchinson, M. R., Toll-like receptors in chronic pain. Experimental Neurology **2012,** 234, (2), 316-329.

[92]. Bachtell, R.; Hutchinson, M. R.; Wang, X.; Rice, K. C.; Maier, S. F.; Watkins, L. R., Targeting the toll of drug abuse: the translational potential of Toll-like receptor 4. CNS and Neurological Disorders - Drug Targets **2015**, 14, 692-699.

[93]. de Paola, M.; Sestito, S. E.; Mariani, A.; Memo, C.; Fanelli, R.; Freschi, M.; Bendotti, C.; Calabrese, V.; Peri, F., Synthetic and natural small molecule TLR4 antagonists inhibit motoneuron death in cultures from ALS mouse model. Pharmacological Research **2016**, 103, 180-187.

[94]. Jang, G. Y.; Lee, J. W.; Kim, Y. S.; Lee, S. E.; Han, H. D.; Hong, K. J.; Kang, T. H.; Park, Y. M., Interactions between tumor-derived proteins and Toll-like receptors. Experimental and Molecular Medicine **2020**; 52, (12), 1926-1935.

[95]. Thakur, K. K.; Saini, J.; Mahajan, K.; Singh, D.; Jayswal, D.P.; Mishra, S.; Bishayee, A.; Sethi, G.; Kunnumakkara, A. B., Therapeutic implications of toll-like receptors in peripheral neuropathic pain. Pharmacological Research **2017**, 115, 224-232.

[96]. Yang, H.; Wang, H.; Andersson, U., Targeting Inflammation Driven by HMGB1. Frontiers in Immunology **2020**, 11, 484.

[97]. Singer, M.; Deutschman, C. S.; Seymour, C. W.; Shankar-Hari, M.; Annane, D.; Bauer, M.; Bellomo, R.; Bernard, G. R.; Chiche, J. D.; Coopersmith, C. M.; Hotchkiss R. S.;, Levy, M. M.; Marshall, J. C.; Martin, G. S.; Opal, S. M.; Rubenfeld, G. D.; van der Poll, T.; Vincent, J. L.; Angus, D. C., The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). Journal of the American Medical Association **2016**, 315, 801-810.

[98]. Perrin-Cocon, L.; Aublin-Gex, A.; Sestito, S. E.; Shirey, K. A.; Patel, M. C.; Andre, P.; Blanco, J. C.; Vogel, S. N.; Peri, F.; Lotteau, V., TLR4 antagonist FP7 inhibits LPS-induced cytokine production and glycolytic reprogramming in dendritic cells, and protects mice from lethal influenza infection. Scientific Reports **2017**, 7, 40791.

[99]. Lacagnina, M. J.; Watkins, L. R.; Grace, P. M., Toll-like receptors and their role in persistent pain. Pharmacology and Therapeutics **2018**; 184, 145–158.

[100]. Paudel, Y. M.; Angelopoulou, E.; Akyuz, E.; Piperi, C.; Othman, I.; Shaikh, M. F. Role of innate immune receptor TLR4 and its endogenous ligands in epileptogenesis. Pharmacological Research **2020**, 160, 105172.

[101]. Roh, J. S.; Sohn, D. H., Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases. Immune Network **2018**, 18, (4), e27.

[102]. Venkatesha, S. H.; Dudics, S.; Astry, B.; Moudgil, K. D., Control of autoimmune inflammation by celastrol, a natural triterpenoid. Pathogens and Disease **2016**,74, (6), ftw059.

[103]. Wang, J.; Lu, J.; Lan, Y.; Zhou, H.; Li, W.; Xiang, M., Total coumarins from urtica dentata hand prevent murine autoimmune diabetes via suppression of the TLR4-signaling pathways. Journal of Ethnopharmacology **2013**, 146, 379-392.

[104]. Zhang, P.; Yang, M.; Chen, C., Liu, L.; Wei, X.; Zeng, S., Toll-like receptor 4 (TLR4)/opioid receptor pathway crosstalk and impact on opioid analgesia, immune function, and gastrointestinal motility. Frontiers in Immunology **2020**, 11, 1455.

[105]. Gay, N. J., Role of self-organising myddosome oligomers in inflammatory signalling by Toll-like receptors. BMC Biology **2019,** 17, 15.

[106]. Wang, L.; Yu, K.; Zhang, X.; Yu, S., Dual functional roles of the MyD88 signaling in colorectal cancer development. Biomedicine and Pharmacotherapy **2018,** 107, 177-184.

[107]. Moncrieffe, M.C.; Bollschweiler, D.; Li, B.; Penczek, P. A.; Hopkins, L.; Bryant, C. E.; Klenerman, D.;, Gay, N. J., MyD88 death-domain oligomerization determines myddosome architecture: implications for toll-like receptor signaling. Structure **2020,** 28, (3), 281-289.e3.

[108]. Murphy Schafer, A. R.; Smith, J. L.; Pryke, K. M.; DeFilippis, V. R.; Hirsch, A. J., The E3 ubiquitin ligase SIAH1 targets MyD88 for proteasomal degradation during dengue virus infection. Frontiers in Microbiology **2020**, 11, 24.

[109]. Li, Q.; Wang, F.; Wang, Q.; Zhang, N.; Zheng, J.; Zheng, M.; Liu, R.; Cui, H.; Wen, J.; Zhao, G., SPOP promotes ubiquitination and degradation of MyD88 to suppress the innate immune response. PLOS Pathogens **2020,** 16, (5), e1008188.

[110]. Liu, X.; Zhan, Z.; Li, D.; Xu, L.; Ma, F.; Zhang, P.; Yao, H.; Cao, X., Intracellular MHC class II molecules promote TLR-triggered innate immune responses by maintaining of the kinase Btk. Nature Immunology **2011**, 12, 416-424.

[111]. Yang, G.; Zhou, Y.; Liu, X.; Xu, L.; Cao, Y.; Manning, R. J.; Patterson, C. J.; Buhrlage, S. J.; Gray, N.; Tai, Y. T.; Anderson, K. C.; Hunter, Z. R.; Treon, S. P., A mutation in MYD88 (L265P) supports the survival of lymphoplasmacytic cells by activation of Bruton tyrosine kinase in Waldenström macroglobulinemia. Blood **2013,** 122, (7), 1222-1232.

[112]. Picard C.; Casanova, J.; Puel, A., Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or IkBa deficiency. Clinical Microbiology Reviews **2011**, 24, 490-497.

[113]. Di Padova, F.; Quesniaux, V. F. J.; Ryffel, B., MyD88 as a therapeutic target for inflammatory lung diseases. Expert Opinion on Therapeutic Targets **2018,** 22, (5), 401-408.

[114]. Roshan, M. H.; Tambo, A.; Pace, N. P., The role of TLR2, TLR4, and TLR9 in the pathogenesis of atherosclerosis. International Journal of Inflammation **2016**, 1532832.

[115]. Xiang, W.; Chao, Z. Y.; Feng, D. Y., Role of toll-like receptor/MYD88 signaling in neurodegenerative diseases. Nature Reviews Neuroscience **2015,** 26, (4), 407-414.

[116]. Koide, N.; Odkhuu, E.; Naiki, Y.; Tsolmongyn, B.; Ito, K.; Komatsu, T.; Yoshida, T.; Yokochi, T., Augmentation of LPS-induced vascular endothelial cell growth factor production in macrophages by transforming growth factor-β1. Innate Immunity **2014,** 20 (8), 816-825.

[117]. Chen, T.; Huang, W.; Qian, J.; Luo, W.; Shan, P.; Cai, Y.; Lin, K.; Wu, G.; Liang, G., Macrophage-derived myeloid differentiation protein 2 plays an essential role in ox-LDL-induced inflammation and atherosclerosis. EBioMedicine **2020**, 53, 102706.

[118]. Marta, M.; Andersson, A.; Isaksson, M.; Kämpe, O.; Lobell, A., Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis. European Journal of Immunology **2008**, 38, 565-575.

[119]. Xu, X.; Yin, Y.; Tang, J.; Xie, Y.; Han, Z.; Zhang, X.; Liu, Q.; Qin, X.; Huang, X.; Sun, B., Long non-coding RNA Myd88 promotes growth and metastasis in hepatocellular carcinoma via regulating Myd88 expression through H3K27 modification. Cell Death Disease **2017**, 8, (10), e3124

[120]. Zhang, D.; Mi, M.; Jiang, F.; Sun, Y.; Li, Y.; Yang, L.; Fan, L.; Li, Q.; Meng, J.; Yue, Z.; Liu, L.; Mei, Q., Apple polysaccharide reduces NF-κB mediated colitis-associated colon carcinogenesis. Nutrition and Cancer **2015,** 67 (1) 177-190.

[121]. Qin, D. P.; Sun, P. N.; Zhou, Y. J.; Chen, F. M.; Zhang, C. L.; Han, J. X.; Yang, X. J., Effect of Tripterygium wilfordii polycoride upon inflammation and TLR4/MyD88 signaling pathway in ulcerative colitis rats model. Chinese Medical Journal **2016,** 96, (18), 1444-1449.

[122]. Wang, Y. H.; Dong, J.; Zhang, J. X.; Zhai, J.; Ge, B., Effects of mimic of manganese superoxide dismutase on 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. Archives of Pharmacal Research **2016,** 39, (9).

[123]. Amini-Khoei, H.; Momeny, M.; Abdollahi, A.; Dehpour, A.R.; Amiri, S.; Haj-Mirzaian, A.; Tavangar, S. M.; Ghaffari, S. H.; Rahimian, R.; Mehr, S. E., Tropisetron suppresses colitis-associated cancer in a mouse model in the remission stage. International Immunopharmacology **2016**, 36, 9-16.

[124]. Rashidian, A.; Muhammadnejad, A.; Dehpour, A. R.; Mehr, S. E.; Akhavan, M. M.; Shirkoohi, R.; Chamanara, M.; Mousavi, S. E.; Rezayat, S. M., Atorvastatin attenuates TNBS-induced rat colitis: the involvement of the TLR4/NF-kB signaling pathway. Inflammopharmacology **2016,** 24, (2-3), 109-118.

[125]. Xie, L.; Jiang, F. C.; Zhang, L. M.; He, W. T.; Liu, J. H.; Li, M. Q.; Zhang, X.; Xing, S.; Guo, H.; Zhou, P., Targeting of MyD88 homodimerization by novel synthetic inhibitor TJ-M2010-5 in preventing colitis-associated colorectal cancer. Journal of the National Cancer Institute **2015**, 108, (4).

[126]. Yamaguchi, K.; Shirakabe, K.; Shibuya, H.; Irie, K.; Oishi, I.; Ueno, N.; Taniguchi, T.; Nishida, E.; Yamamoto, K.; Arakawa, T.; Ueda, N.; Yamamoto, S., Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. Journal of Biological Chemistry **1995,** 270, 31315-31320.

[127]. Ajibade, A. A.; Wang, H. Y.; Wang, R. F., Cell type-specific function of TAK1 in innate immune signaling. Trends Immunology **2013**, 34, 307-316.

[128]. de Nicola, G.F.; Martin, E.D.; Chaikuad, A.; Bassi, R.; Clark, J.; Martino, L.; Verma, S.; Sicard, P.; Tata, R.; Atkinson, R.A.; Knapp, S.; Conte, M. R.; Marber, M. S., Mechanism and consequence of the autoactivation of p38α mitogen activated protein kinase promoted by TAB1. Nature Structural and Molecular Biology **2013**, 20, (10), 1182-1190.

[129]. Broglie, P.; Matsumoto, K.; Akira, S.; Brautigan, D. L.; Ninomiya-Tsuji, J., Transforming growth factor β-activated kinase 1 (TAK1) kinase adaptor, TAK1-binding protein 2, plays dual roles in TAK1 signaling by recruiting both an activator and an inhibitor of TAK1 kinase in tumor necrosis factor signaling pathway. Journal of Biological Chemistry **2010,** 285, (4), 2333-2339.

[130]. Mukhopadhyay, H.; Lee, N. Y., Multifaceted roles of TAK1 signaling in cancer. Oncogene **2020,** 39, (7), 1402-1413.

[131]. Hirata, Y.; Takahashi, M.; Morishita, T.; Noguchi, T.; Matsuzawa, A., Post-translational modifications of the TAK1-TAB complex. International Journal of Molecular Sciences **2017**; 18, (1), 205.

[132]. Xu, Y. R.; Lei, C. Q., TAK1-TABs complex: a central signalosome in inflammatory responses. Frontiers in Immunology **2021**; 11, 608976.

[133]. Xiao, Y.; Jin, J.; Chang, M.; Nakaya, M.; Hu, H.; Zou, Q.; Zhou, X.; Brittain, G. C.; Cheng, X.; Sun, S. C., TPL2 mediates autoimmune inflammation through activation of the TAK1 axis of IL-17 signaling. Journal of Experimental Medicine **2014**, 211, 1689-1702.

[134]. Zheng, H.; Li, Q.; Chen, R.; Zhang, J.; Ran, Y.; He, X.; Li, S.; Shu, H.B., The dual-specificity phosphatase DUSP14 negatively regulates tumor necrosis factor- and interleukin-1-induced nuclear factor-κB activation by dephosphorylating the protein kinase TAK1. Journal of Biological Chemistry **2013**, 288, 819-825.

[135]. Liu, Q.; Busby, J. C.; Molkentin, J. D., Interaction between TAK1-TAB1-TAB2 and RCAN1-calcineurin defines a signalling nodal control point. Nature Cell Biology **2009**, 11, 154-161.

[136]. Gu, M.; Ouyang, C.; Lin, W.; Zhang, T., Cao, X.; Xia, Z.; Wang, X., Phosphatase holoenzyme PP1/GADD34 negatively regulates TLR response by inhibiting TAK1 serine 412 phosphorylation. Journal of Immunology **2014**, 192, 2846-2856.

[137]. Yang, F.; Tang, E.; Guan, K.; Wang, C. Y., IKK beta plays an essential role in the phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 induced by lipopolysaccharide. Journal of Immunology **2003,** 170, 5630-5635.

[138]. Charlaftis, N.; Suddason, T.; Wu, X.; Anwar, S.; Karin, M.; Gallagher, E., The MEKK1 PHD ubiquitinates TAB1 to activate MAPKs in response to cytokines. EMBO Journal **2014**, 33, 2581-2596.

[139]. Sheng, C.; Wang, Z.; Yao, C.; Chen, H.M.; Kan, G.; Wang, D.; Chen, H.; Chen, S., CALML6 controls TAK1 ubiquitination and confers protection against acute inflammation. Journal of Immunology **2020**, 204, (11), 3008-3018.

[140]. Song, Z.; Wei, W.; Xiao, W.; Al-Saleem, E. D.; Nejati, R.; Chen, L.; Yin, J.; Fabrizio, J.; Petrus, M. N.; Waldmann, T.A.;, Yang, Y., Essential role of the linear ubiquitin chain assembly complex and TAK1 kinase in A20 mutant Hodgkin lymphoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **2020**, 117, (46), 28980-28991.

[141]. Defnet, A. E.; Hasday, J. D.; Shapiro, P., Kinase inhibitors in the treatment of obstructive pulmonary diseases. Current Opinion in Pharmacology **2020,** 51, 11-18.

[142]. Neubert, M.; Ridder, D. A.; Bargiotas, P.; Akira, S.; Schwaninger, M., Acute inhibition of TAK1 protects against neuronal death in cerebral ischemia. Cell Death and Differentiation **2011**, 18, (9), 1521-1530.

[143]. Watkins, S. J.; Borthwick, G. M.; Oakenfull, R.; Robson, A.; Arthur, H. M., Angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy in vitro is TAK1-dependent and Smad2/3-independent. Hypertension Research **2012,** 35, 393-398.

[144]. Zhao, Y. G.; Wang, Y.; Hao, W.; Wan, Y. Y., An essential role for TAK1 in the contact hypersensitivity response. Cellular and Molecular Immunology **2011,** 8, 315-324.

[145]. Campolo, M.; Lanza, M.; Casili, G.; Paterniti, I.; Filippone, A.; Caffo, M.; Cardali, S. M.; Puliafito, I.; Colarossi, C.; Raciti, G.; Cuzzocrea, S.; Esposito, E., TAK1 inhibitor enhances the therapeutic treatment for glioblastoma. Cancers **2020**; 25, 13, (1), 41.

[146]. Scarneo, S. A.; Mansourati, A.; Eibschutz, L.S.; Totzke, J.; Roques, J. R.; Loiselle, D.; Carlson, D.; Hughes, P.; Haystead, T. A. J., Genetic and pharmacological validation of TAK1 inhibition in macrophages as a therapeutic strategy to effectively inhibit TNF secretion. Scientific Reports **2018,** 8, (1), 17058.

[147]. Totzke, J.; Scarneo, S. A.; Yang, K. W.; Haystead, T. A. J., TAK1: a potent tumour necrosis factor inhibitor for the treatment of inflammatory diseases. Open Biology **2020,** 10, (9), 200099.

[148]. Sakamachi, Y.; Morioka, S.; Mihaly, S. R.; Takaesu, G.; Foley, J. F.; Fessler, M. B.; Ninomiya-Tsuji, J., TAK1 regulates resident macrophages by protecting lysosomal integrity. Cell Death and Disease **2017,** 8, (2), e2598.

[149]. Courties, G.; Seiffart, V.; Presumey, J.; Escriou, V.; Scherman, D.; Zwerina, J.; Ruiz, G.; Zietara, N.; Jablonska, J.; Weiss, S.; Hoffmann, A.; Jorgensen, C.; Apparailly, F.; Gross, G., In vivo RNAi mediated silencing of TAK1 decreases inflammatory Th1 and Th17 cells through targeting of myeloid cells. Blood **2010,** 116, (18), 3505-3516 .

[150]. Cordas Dos Santos, D. M.; Eilers, J.; Sosa Vizcaino, A.; Orlova, E.; Zimmermann, M.; Stanulla, M.; Schrappe, M.; Börner, K.; Grimm, D.; Muckenthaler, M. U.; Kulozik, A. E.; Kunz, J. B., MAP3K7 is recurrently deleted in pediatric T-lymphoblastic leukemia and affects cell proliferation independently of NF-κB. BMC Cancer **2018**, 18, 663.

[151]. Choi, M. C.; Jo, J.; Park, J.; Kang, H. K.; Park, Y., NF-κB signaling pathways in osteoarthritic cartilage destruction. Cells **2019**, 8, (7), 734.

[152]. Thoma, A.; Lightfoot, A. P., NF-kB and inflammatory cytokine signalling: role in skeletal muscle atrophy. Advances in Experimental Medicine and Biology **2018**, 1088, 267-279.

[153]. Carrasco, D.; Ryseck, R. P.; Bravo, R., Expression of relB transcripts during lymphoid organ development: specific expression in dendritic antigen-presenting cells. Development **1993**, 118, 1221-1231.

[154]. Albensi, B. C., What Is Nuclear factor kappa B (NF-κB) doing in and to the mitochondrion? Frontiers in Cell and Developmental Biology **2019**, 7, 154.

[155]. Mitchell, S.; Vargas, J.; Hoffmann, A., Signaling via the NFκB system. Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine **2016**, 8, (3), 227-241.

[156]. Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S. C., NF-κB signaling in inflammation. Signal Transduction and Targeted Therapy **2017**, 2, 17023.

[157]. Dorrington, M. G.; Fraser, I. D. C., NF-κB signaling in macrophages: dynamics, crosstalk, and signal integration. Frontiers in Immunology **2019**, 10, 705.

[158]. Khongthong, P.; Roseweir, A.K.; Edwards, J., The NF-KB pathway and endocrine therapy resistance in breast cancer. Endocrine-Related Cancer **2019**, 26, (6), R369-R380.

[159]. Wyatt, G.L.; Crump, L.S.; Young, C.M.; Wessells, V.M.; McQueen, C.M.; Wall, S.W.; Gustafson, T.L.; Fan, Y.Y.; Chapkin, R.S.; Porter, W. W.; Lyons, T. R., Cross-talk between SIM2s and NFκB regulates cyclooxygenase 2 expression in breast cancer. Breast Cancer Research **2019,** 21, (1), 131.

[160]. Yu, H.; Lin, L.; Zhang, Z.; Zhang, H.; Hu, H., Targeting NF-κB pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. Signal Transduction and Targeted Therapy **2020**, 5, (1), 209.

[161]. Lin, C. C.; Hsieh, H. L.; Shih, R. H.; Chi, P. L.; Cheng, S. E.; Yang, C. M., Up-regulation of COX-2/PGE2 by endothelin-1 via MAPK-dependent NF-κB pathway in mouse brain microvascular endothelial cells. Cell Communication and Signaling **2013,** 11, (1), 8.

[162]. Dresselhaus, E. C.; Meffert, M. K., Cellular Specificity of NF-κB Function in the Nervous System. Frontiers in immunology, 2019, 10, 1043.

[163]. Ramalingam, P.; Poulos, M. G.; Lazzari, E.; Gutkin, M. C.; Lopez, D.; Kloss, C. C.; Crowley, M.J.; Katsnelson, L.; Freire, A.G.; Greenblatt, M.B.; Park, C.Y.; Butler, J. M., Chronic activation of endothelial MAPK disrupts hematopoiesis via NFKB dependent inflammatory stress reversible by SCGF. Nature Communications **2020**, 11, 666.

[164]. Li, Y. X.; Sibon, O. C. M.; Dijkers, P. F., Inhibition of NF-κB in astrocytes is sufficient to delay neurodegeneration induced by proteotoxicity in neurons. Journal of Neuroinflammation **2018,** 15, 261.

[165]. Souza, G.R.; Cunha, T.M.; Silva, R.L.; Lotufo, C.M.; Verri, W.A. Jr.; Funez, M. I.; Villarreal, C. F.; Talbot, J.; Sousa, L. P.; Parada, C. A.; Cunha, F. Q.; Ferreira, S. H., Involvement of nuclear factor kappa B in the maintenance of persistent inflammatory hypernociception. Pharmacology Biochemistry and Behavior **2015**, 134, 49-56.

[166]. Yu, F.; Xie, C.; Jiang, C.; Sun, J.; Huang, X., TNF-α increases inflammatory factor expression in synovial fibroblasts through the toll-like receptor-3-mediated ERK/AKT signaling pathway in a mouse model of rheumatoid arthritis. Molecular Medicine Reports **2018,** 17, 8475-8483.

[167]. Niederberger, E.; Schmidtko, A.; Gao, W.; Kuhlein, H.; Ehnert, C.; and Geisslinger, G., Impaired acute and inflammatory nociception in mice lacking the p50 subunit of NFkappaB. European Journal of Pharmacology **2007,** 559, 55-60.

[168]. Luo, J. G.; Zhao, X. L.; Xu, W. C.; Zhao, X. J.; Wang, J. N.; Lin, X. W.; Sun, T.; Fu, Z. J., Activation of spinal NF-kappaB/p65 contributes to peripheral inflammation and hyperalgesia in rat adjuvant-induced arthritis. Arthritis Rheumatology **2014,** 66, 896-906.

[169]. Li, Y.; Yang, Y.; Guo, J.; Guo, X.; Feng, Z.; Zhao, X., Spinal NF-kB upregulation contributes to hyperalgesia in a rat model of advanced osteoarthritis. Molecular Pain **2020,** 16, 1744806920905691.

[170]. Alexanian, A.; Sorokin, A., Cyclooxygenase 2: protein-protein interactions and posttranslational modifications. Physiological genomics **2017,** 49, (11), 667–681.

[171]. Ganesh, T., Prostanoid receptor EP2 as a therapeutic target. Journal of Medicinal Chemistry **2014,** 57, 4454-4465.

[172]. Wang, B.; Wu, L.; Chen, J.; Dong, L.; Chen, C.; Wen, Z.; Hu, J.; Fleming, I.; Wang, D. W., Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. Signal Transduction and Targeted Therapy **2021**, 6, 94.

[173]. Mahesh, G.; Anil Kumar, K.; Reddanna, P., Overview on the discovery and development of anti-inflammatory drugs: should the focus be on synthesis or degradation of PGE2? Journal of Inflammation Research **2021**, 14, 253–263.

[174]. Lipsky, P. E.; Brooks, P.; Crofford, L. J.; DuBois, R.; Graham, D.; Simon, L. S.; van de Putte, L. B.; Abramson S. B., Unresolved issues in the role of cyclooxygenase-2 in normal physiologic processes and disease. JAMA Internal Medicine **2000,** 160, 913-920.

[175]. Langenbach, R.; Loftin, C.; Lee, C.; Tiano, H., Cyclooxygenase knockout mice: models for elucidating isoform-specific functions. Biochemical Pharmacology **1999,** 58, 1237-1246.

[176]. Moon, H.; White, A. C.; Borowsky, A. D., New insights into the functions of Cox-2 in skin and esophageal malignancies. Experimental and Molecular Medicine **2020**, 52, 538–547.

[177]. Zhou, Y.; Dong, X.; Xiu, P.; Wang, X.; Yang, J.; Li, L.; Li, Z.; Sun, P.; Shi, X.; Zhong, J., Meloxicam, a selective COX-2 inhibitor, mediates hypoxia-inducible factor- (HIF-) 1α signaling in hepatocellular carcinoma. Oxidative Medicine and Cellular Longevity **202**, 2020, 7079308.

[178]. Harris, R. C.; McKanna, J. A.; Akai, Y.; Jacobson, H. R.; Dubois, R. N.; Breyer, M. D., Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. Journal of Clinical Investigation **1994,** 94, 2504-2510.

[179]. Sirois, J.; Simmons, D. L.; Richards, J., Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding a novel isoform of prostaglandin endoperoxide H synthase in rat preovulatory follicles. Journal of Biological Chemistry **1992,** 267, 11586-11592.

[180]. Ye, Y.; Wang, X.; Jeschke, U.; von Schönfeldt, V., COX-2-PGE2-EPs in gynecological cancers. Archives of Gynecology and Obstetrics **2020**, 301, 1365–1375.

[181]. Young, L. E.; Sanduja, S.; Bemis-Standoli, K.; Pena, E. A.; Price, R. L.; Dixon, D. A., The mRNA binding proteins HuR and tristetraprolin regulate cyclooxygenase 2 expression during colon carcinogenesis. Gastroenterology **2009,** 136, 1669-1679.

[182]. Kitanaka, N.; Nakano, R.; Kitanaka, T.; Namba, S.; Konno, T.; Nakayama, T.; Sugiya, H., NF-κB p65 and p105 implicate in interleukin 1β-mediated COX-2 expression in melanoma cells. PLoS One **2018**, 13, (12), e0208955.

[183]. Sharma, P.; Caldwell, T. S.; Rivera, M. N.; Gullapalli, R. R., Cadmium exposure activates Akt/ERK Signaling and pro-inflammatory COX-2 expression in human gallbladder epithelial cells via a ROS dependent mechanism. Toxicology in Vitro **2020**, 67, 104912.

[184]. Xie, W.; Herschman, H. R., v-src induces prostaglandin synthase 2 gene expression by activation of the c-Jun N-terminal kinase and the c-Jun transcription factor. Journal of Biological Chemistry **1995,** 270, 27622-27628.

[185]. Xie, W.; Herschman, H. R., Transcriptional regulation of prostaglandin synthase 2 gene expression by platelet-derived growth factor and serum. Journal of Biological Chemistry **1996,** 271, 31742-31748.

[186]. Atef, M. M.; El-Deeb, O. S.; Sadek, M. T.; Abo El Gheit, R. E.; Emam, M. N.; Hafez, Y. M.; El-Esawy, R. O., Targeting ERK/COX-2 signaling pathway in permethrin-induced testicular toxicity: a possible modulating effect of matrine. Molecular Biology Reports **2020**, 47, 247–259.

[187]. Sun, Y.; Gao, L.; Hou, W.; Wu, J., β-Sitosterol alleviates inflammatory response via inhibiting the activation of ERK/p38 and NF-κB pathways in LPS-exposed BV2 cells. BioMed Research International **2020,** 7532306.

[188]. Zhang, Y.; Li, Y.; Zhang, J.; Qi, X.; Cui, Y.; Yin, K.; Lin, H., Cadmium induced inflammation and apoptosis of porcine epididymis via activating RAF1/MEK/ERK and NF-κB pathways. Toxicology and Applied Pharmacology **2021**, 415, 115449.

[189]. Chern, C. M.; Zhou, H.; Wang, Y. H.; Chang, C. L.; Chiou, W. F.; Chang, W. T.; Yao, C. H.; Liou, K. T.; Shen, Y. C., Osthole ameliorates cartilage degradation by downregulation of NF-κB and HIF-2α pathways in an osteoarthritis murine model. European Journal of Pharmacology **2020,** 867, 172799.

[190]. Wu, H.; Zhang, M.; Li, W.; Zhu, S.; Zhang, D., Stachydrine attenuates IL-1β-induced inflammatory response in osteoarthritis chondrocytes through the NF-κB signaling pathway. Chemico-Biological Interactions **2020**, 326, 109136.

[191]. Yang, C. M.; Chen, Y. W.; Chi, P. L.; Lin, C. C.; Hsiao, L. D., Resveratrol inhibits BK-induced COX-2 transcription by suppressing acetylation of AP-1 and NF-κB in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Biochemical Pharmacology **2017**, 132, 77-91

[192]. Abdalla, L. F.; Chaudhry Ehsanullah, R.; Karim, F.; Oyewande, A. A.; Khan, S., Role of using nonsteroidal anti-Inflammatory drugs in chemoprevention of colon cancer in patients with inflammatory bowel disease. Cureus **2020**, 12, (5), e8240.

[193]. Ferrer, M. D.; Busquets-Cortés, C.; Capó, X.; Tejada, S.; Tur, J. A.; Pons, A.; Sureda, A., Cyclooxygenase-2 inhibitors as a therapeutic target in inflammatory diseases. Current Medicinal Chemistry **2019**, 26, (18), 3225-3241.

[194]. Lee, Y. M.; Shin, D. W.; Lim, B. O., Chlorogenic acid improves symptoms of inflammatory bowel disease in interleukin-10 knockout mice. Journal of Medicinal Food **2020**, 23, (10), 1043-1053.

[195]. Montezuma, M. A. P.; Fonseca, F. P.; Benites, B. M.; Soares, C. D.; do Amaral-Silva, G .K.; de Almeida, O. P.; Soares, F. A.; Pagano, R. L.; Fregnani, E. R., COX-2 as a determinant of lower disease-free survival for patients affected by ameloblastoma. Pathology Research and Practice **2018,** 214, 907-913.

[196]. Zhao, Y.; Cui, L.; Pan, Y.; Shao, D.; Zheng, X.; Zhang, F.; Zhang, H.; He, K.; Chen, L.; Chen, L., Berberine inhibits the chemotherapy-induced repopulation by suppressing the arachidonic acid metabolic pathway and phosphorylation of FAK in ovarian cancer. Cell Proliferation **2017,** 50, (6), e12393.

[197]. Gan, L.; Qiu, Z.; Huang, J.; Li, Y.; Huang, H.; Xiang, T.; Wan, J.; Hui, T.; Lin, Y.; Li, H.; Ren G., Cyclooxygenase-2 in tumor-associated macrophages promotes metastatic potential of breast cancer cells through Akt pathway. International Journal of Biological Sciences **2016,** 12, (12), 1533-1543.

[198]. Echizen, K.; Oshima, H.; Nakayama, M.; Oshima, M., The inflammatory microenvironment that promotes gastrointestinal cancer development and invasion. Advances in Biological Regulation **2018,** 68, 39-45.

[199]. Gungor, H.; Ilhan, N.; Eroksuz, H., The effectiveness of cyclooxygenase-2 inhibitors and evaluation of angiogenesis in the model of experimental colorectal cancer. Biomedicine and Pharmacotherapy **2018,** 102, 221-229.

[200]. Dong, X. F.; Liu, T. Q.; Zhi, X. T.; Zou, J.; Zhong, J. T.; Li, T.; Mo, X. L.; Zhou, W.; Guo, W. W.; Liu, X.; Chen, Y. Y.; Li, M. Y.; Zhong, X. G.; Han, Y. M.; Wang, Z. H.; Dong, Z. R., COX-2/PGE2 axis regulates HIF-2α activity to promote hepatocellular carcinoma hypoxic response and reduce the sensitivity of sorafenib treatment. Clinical Cancer Research **2018,** 24, 3204-3216.

[201]. Hao, J.; Xu, H.; Luo, M.; Yu, W.; Chen, M.; Liao, Y.; Zhang, C.; Zhao, X.; Jiang, W.; Hou, S.; Feng, X.; Zou, K.; Chen, Y.; Huang, W.; Guo, W.; Kang, L.; Deng, W., The tumor-promoting role of TRIP4 in melanoma progression and its involvement in response to BRAF-targeted therapy. Journal of Investigative Dermatology **2018,** 138, (1), 159-170.

[202]. Hu, H.; Han, T.; Zhuo, M.; Wu, L.; Yuan, C.; Wu, L.; Yuan, C.; Wu, L.; Lei, W.; Jiao, F.; Wang, L. W., Elevated COX-2 expression promotes angiogenesis through EGFR/p38-MAPK/Sp1-dependent signalling in pancreatic cancer. Scientific Reports **2017,** 7, (1), 470.

[203]. Lin, H. Y.; Hsieh, M. T.; Cheng, G. Y.; Lai, H. Y.; Chin, Y. T.; Shih, Y.J.; Nana, A.W.; Lin, S. Y.; Yang, Y. S. H.; Tang, H. Y.; Chiang, I. J.; Wang, K., Mechanisms of action of nonpeptide hormones on resveratrol-induced antiproliferation of cancer cells. Annals of the New York Academy of Sciences **2017,** 1403, 92-100.

[204]. Brizzolara, A.; Benelli, R.; Venè, R.; Barboro, P.; Poggi, A.; Tosetti, F.; Ferrari, N., The ErbB family and androgen receptor signaling are targets of Celecoxib in prostate cancer. Cancer Letters **2017,** 400, 9-17.

[205]. Sorski, L.; Melamed, R.; Matzner, P.; Lavon, H.; Shaashua, L.; Rosenne, E.; Ben-Eliyahu, S., Reducing liver metastases of colon cancer in the context of extensive and minor surgeries through β-adrenoceptors blockade and COX2 inhibition. Brain, Behavior, and Immunity **2016,** 58, 91-98.

[206]. Esbona, K.; Yi, Y.; Saha, S.; Yu, M.; Van Doorn, R. R.; Conklin, M. W.; Graham, D. S.; Wisinski, K. B.; Ponik, S. M.; Eliceiri, K. W.; Wilke, L. G.; Keely, P. J., The presence of cyclooxygenase 2, tumor-associated macrophages, and collagen alignment as prognostic markers for invasive breast carcinoma patients. American Journal of Pathology **2018,** 188, (3), 559-573.

[207]. López, D.E.; Ballaz, S. J., The Role of Brain Cyclooxygenase-2 (Cox-2) Beyond Neuroinflammation: Neuronal Homeostasis in Memory and Anxiety. Molecular Neurobiolology **2020**, 57, (12), 5167-5176.

[208]. Ardah, M. T.; Bharathan, G.; Kitada, T.; Haque, M. E., Ellagic acid prevents dopamine neuron degeneration from oxidative stress and neuroinflammation in MPTP model of Parkinson's disease. Biomolecules **2020**, 10, (11), 1519.

[209]. Arora, M.; Choudhary, S.; Singh, P. K.; Sapra, B.; Silakari, O., Structural investigation on the selective COX-2 inhibitors mediated cardiotoxicity: A review. Life Sciences **2020**, 251, 117631.

[210]. Cheng, R., Wu, Z., Li, M. Meiying, Shao M.; Hu, T., Interleukin-1β is a potential therapeutic target for periodontitis: a narrative review. International Journal of Oral Science **2020**, 12, 2.

[211]. Dinarello, C. A., Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. Immunological Reviews **2018**, 281, (1), 8-27.

[212]. Halle, A.; Hornung, V.; Petzold, G. C.; Stewart, C. R.; Monks, B. G.; Reinheckel, T.; Fitzgerald, K. A.; Latz, E.; Moore, K. J.; Golenbock, D. T., The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. Nature Immunology **2008,** 9, 857-865.

[213]. McGeer, P. L.; Yasojima, K.; McGeer, E. G., Association of interleukin-1beta polymorphisms with idiopathic Parkinson's disease. Neuroscience Letters **2002,** 326, 67-69.

[214]. Voet, S.; Srinivasan, S.; Lamkanfi, M.; van Loo G., Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. EMBO Molecular Medicine **2019**, 11, (6), e10248.

[215]. Mahalanobish, S.; Dutta, S.; Saha, S.; Sil, P. C., Melatonin induced suppression of ER stress and mitochondrial dysfunction inhibited NLRP3 inflammasome activation in COPD mice. Food and Chemical Toxicology **2020**, 144, 111588.

[216]. Kadariya, Y.; Menges, C. W.; Talarchek, J.; Cai, K. Q.; Klein-Szanto, A. J.; Pietrofesa, R. A.; Christofidou-Solomidou, M.; Cheung, M.; Mossman, B. T.; Shukla, A.; Testa, J. R., Inflammation-related IL1β/IL1R signaling promotes the development of abestos-induced malignant mesothelioma. Cancer Prevention Research **2016,** 9, (5), 406-414.

[217]. Rumora, L.; Somborac-Bačura, A.; Hlapčić, I.; Hulina-Tomašković, A.; Rajković, M. G., Cigarette smoke and extracellular Hsp70 induce secretion of ATP and differential activation of NLRP3 inflammasome in monocytic and bronchial epithelial cells. Cytokine **2020**, 135, 155220.

[218]. Silvis, M. J. M.; Demkes, E. J.; Fiolet, A. T. L.; Dekker, M.; Bosch, L.; van Hout, G. P. J.; Timmers, L.; de Kleijn L. P. V., Immunomodulation of the NLRP3 inflammasome in atherosclerosis, coronary artery disease, and acute myocardial infarction. Journal of Cardiovascular Translational Research **2021**, 14, 23–34.

[219]. Zelenka, M.; Schafers, M.; Sommer, C., Intraneural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. Pain **2005,** 116, (3), 257-263.

[220]. Woolf, C. J.; Allchorne, A.; Safieh-Garabedian, B.; Poole, S., Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. British Journal of Pharmacology **1997,** 121, 417-424.

[221]. Cunha, J. M.; Cunha, F. Q.; Poole, S.; Ferreira, S. H., Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. British Journal of Pharmacology **2000,** 130, 1418-1424.

[222]. Schäfers, M.; Sorkin, L., Effect of cytokines on neuronal excitability. Neuroscience Letters **2008,** 437, 188-193.

[223]. Willemen, H. L.; Eijkelkamp, N.; Garza Carbajal, A.; Wang, H.; Mack, M.; Zijlstra, J.; Heijnen, C. J.; Kavelaars, A., Monocytes/Macrophages control resolution of transient inflammatory pain. Journal of Pain **2014,** 15, (5), 496-506.

[224]. Samad, T. A.; Moore, K. A.; Sapirstein, A.; Billet, S.; Allchorne, A.; Poole, S.; Bonventre, J. V.; Woolf, C. J., Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. Nature **2001,** 410, 471-475.

[225]. Turner, R. A., Screening Methods in Pharmacology. Academic Press: New York, 1965**;** p 100-132.

[226]. Tunctan, B.; Kucukkavruk, S. P.; Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; Sari, A. N.; Sahan-Firat, S., Bexarotene, a selective RXRα agonist, reverses hypotension associated with inflammation and tissue injury in a rat model of septic shock. Inflammation **2018,** 41, (1), 337-355.

[227]. Tunctan, B.; Korkmaz, B.; Yildirim, H.; Tamer, L.; Atik, U.; Buharalioglu, C. K., Increased production of nitric oxide contributes to renal oxidative stress in endotoxemic rat. American Journal of Infectious Diseases **2005**, 1, (2), 111-115.

[228]. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry **1976**, 72, 248-254.

[229]. Sari, A. N.; Korkmaz, B.; Serin, M. S.; Kacan, M.; Unsal, D.; Buharalioglu, C. K.; Sahan Firat, S.; Manthati, V. L.; Falck, J. R.; Malik, K. U.; Tunctan, B., Effects of 5,14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, on lipopolysaccharide-induced changes in MyD88/TAK1/IKKβ/IκB-α/NF-κB pathway and circulating miR-150, miR-223, and miR-297 levels in a rat model of septic shock. Inflammation Research **2014**, 63, 741-756.

[230]. Senol, S. P.; Temiz, M.; Guden, D. S.; Cecen, C.; Sari, A. N.; Sahan-Firat, S.; Falck, J. R.; Dakarapu, R.; Malik, K. U.; Tunctan, B., Contribution of PPARα/β/γ, AP-1, importin-α3, and RXRα to the protective effect of 5,14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, against hypotension, tachycardia, and inflammation in a rat model of septic shock. Inflammation Research **2016**, 65, 367-387.

[231]. Tunctan, B.; Korkmaz, B.; Sari, A. N.; Kacan, M.; Unsal, D.; Serin, M. S.; Buharalioglu, C. K.; Sahan-Firat, S.; Cuez, T.; Schunck, W. H.; Falck, J. R.; Malik, K. U., 5,14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, reverses hypotension and improves survival in a rodent model of septic shock: contribution of soluble epoxide hydrolase, CYP2C23, MEK1/ERK1/2/IKKβ/IκB-α/NF-κB pathway, and proinflammatory cytokine formation. Prostaglandins and Other Lipid Mediators **2013**, 102-103, 31-41.

[232]. Tunctan, B.; Korkmaz, B.; Sari, A. N.; Kacan, M.; Unsal, D.; Serin, M. S.; Buharalioglu, C. K.; Sahan-Firat, S.; Cuez, T.; Schunck, W. H.; Manthati, V. L.; Falck, J. R.; Malik, K. U., Contribution of iNOS/sGC/PKG pathway, COX-2, CYP4A1, and gp91(phox) to the protective effect of 5,14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, against vasodilation, hypotension, tachycardia, and inflammation in a rat model of septic shock. Nitric Oxide **2013**, 33, 18-41.

[233]. Wilson, C. M., Staining of proteins on gels: comparison of dyes and procedures. Methods in Enzymology **1983**, 91, 236-247.

[234]. Salinovich, O.; Montelano, R. C., Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Analytical Biochemistry **1986**, 156, 341-347.

[235]. Schade, U.; Rietschel, E. T., The role of prostaglandins in endotoxic activities. Wiener klinische Wochenschrift **1982,** 60, (14), 743-5.

[236]. Cahill, C. M.; Dray, A.; Coderre, T. J. Priming enhances endotoxin-induced thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in rats. Brain Research **1998**, 808, (1), 13-22.

[237]. Kanaan, S. A.; Safieh-Garabedian, B.; Haddad, J. J.; Atweh, S. F.; Abdelnoor, A. M.; Jabbur, S. J.; Saade, N. E., Effects of various analgesic and anti-inflammatory drugs on endotoxin-induced hyperalgesia in rats and mice. Pharmacology **1997**, 54, (6), 285-297.

[238]. Mbagwu, H. O.; Anene, R. A.; Adeyemi, O. O., Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory properties of Mezoneuron benthamianum Baill (Caesalpiniaceae). Nigerian Quarterly Journal of Hospital Medicine **2007**, (1), 35-41.

[239]. Saade, N. E.; Abou Jaoude, P. G.; Saadeh, F. A.; Hamoui, S.; Safieh-Garabedian, B.; Kanaan, S. A.; Atweh, S. F.; Jabbur, S. J., Fos-like immunoreactivity induced by intraplantar injection of endotoxin and its reduction by morphine. Brain Research **1997,** 769 (1), 57-65.

[240]. Safieh-Garabedian, B.; Poole, S.; Haddad, J. J.; Massaad, C. A.; Jabbur, S. J.; Saade, N. E., The role of the sympathetic efferents in endotoxin-induced localized inflammatory hyperalgesia and cytokine upregulation. Neuropharmacology **2002,** 42 (6), 864-872.

[241]. Romanovsky, A. A.; Shido, O.; Sakurada, S.; Sugimoto, N.; Nagasaka, T., Endotoxin shock: thermoregulatory mechanisms. American Journal of Physiology **1996**, 270, (4 Pt 2), R693-703.

[242]. Huang, J. K.; Jarjour, A. A.; Nait Oumesmar, B.; Kerninon, C.; Williams, A.; Krezel, W.; Kagechika, H.; Bauer, J.; Zhao, C.; Baron-Van Evercooren, A.; Chambon, P.; Ffrench-Constant, C.; Franklin, R. J. M., Retinoid X receptor gamma signaling accelerates CNS remyelination. Nature Neuroscience **2011,** 14, (1), 45-53.

[243]. Xu, J.; Drew, P. D., 9-Cis-retinoic acid suppresses inflammatory responses of microglia and astrocytes. Journal of Neuroimmunology **2006,** 171, (1-2), 135-144.

[244]. Heras-Sandoval, D.; Pedraza-Chaverri, J.; Perez-Rojas, J. M., Role of docosahexaenoic acid in the modulation of glial cells in Alzheimer's disease. Journal of Neuroinflammation **2016,** 13, (1), 61.

[245]. Certo, M.; Endo, Y.; Ohta, K.; Sakurada, S.; Bagetta, G.; Amantea, D., Activation of RXR/PPARγ underlies neuroprotection by bexarotene in ischemic stroke. Pharmacological Research **2015,** 102, 298-307.

[246]. Dheer, Y.; Chitranshi, N.; Gupta, V.; Abbasi, M.; Mirzaei, M.; You Y.; Chung, R.; Graham, S. L.; Gupta, V., Bexarotene Modulates Retinoid-X-receptor expression and is protective against neurotoxic endoplasmic reticulum stress response and apoptotic pathway activation. Molecular Neurobiology **2018,** 55, 9043-9056.

[247]. Janakiram, N. B.; Mohammed, A.; Qian, L.; Choi, C.I.; Steele, V. E.; Rao, C. V., Chemopreventive effects of RXR-selective rexinoid bexarotene on intestinal neoplasia of Apc(Min/+) mice. Neoplasia **2012,** 14, (2), 159-168.

[248]. Gui, Y.; Duan, S.; Xiao, L.; Tang, J.; Li, A., Bexarotent attenuated CCI-induced spinal neuroinflammation and neuropathic pain by targeting MKP-1. Journal of Pain **2019,** 21, (11-12), 1149-1159.

[249]. de Almeida, N. R.; Conda-Sheridan, M., A review of the molecular design and biological activities of RXR agonists. Medicinal Research Reviews **2019,** 39, (4), 1372-1397.

[250]. Ito, A.; Hong, C.; Rong, X.; Zhu, X.; Tarling, E. J.; Hedde, P. N.; Gratton, E.; Parks, J.; Tontonoz, P., LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling. eLife **2015,** 4, e08009.

[251]. Nizamutdinova, I. T.; Guleria, R. S.; Singh, A. B.; Kendall, J. A. Jr.; Baker, K. M.; Pan, J., Retinoic acid protects cardiomyocytes from high glucose-induced apoptosis through inhibition of NF-κB signaling pathway. Journal of Cell Physiology **2013,** 228, (2), 380-392.

[252]. Cras, A.; Politis, B.; Balitrand, N.; Darsin-Bettinger, D.; Boelle, P. Y.; Cassinat, B.; Toubert, M. E.; Chomienne, C., Bexarotene via CBP/p300 induces suppression of NF-κB-dependent cell growth and invasion in thyroid cancer. Clinical Cancer Research **2012,** 18, (2), 442-453.

[253]. Coutaux, A.; Adam, F.; Willer, J. C.; Le Bars, D., Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. Joint Bone Spine **2005,** 72 (5), 359-371.

[254]. Hori, T.; Oka, T.; Hosoi, M.; Abe, M.; Oka, K., Hypothalamic mechanisms of pain modulatory actions of cytokines and prostaglandin E2. Annals of the New York Academy of Sciences **2000,** 917, 106-120.

[255]. Petho, G.; Reeh, P. W., Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. Physiological Reviews **2012,** 92, (4), 1699-1775.

[256]. Salvemini, D.; Little, J. W.; Doyle, T.; Neumann, W. L., Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. Free Radical Biology and Medicine **2011**, 51, (5), 951-966.

[257]. Serhan, C. N.; Chiang, N., Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. British Journal of Pharmacology **2008,** 153, (Suppl 1), S200-S205.

[258]. Serhan, C. N.; Yacoubian, S.; Yang, R., Anti-inflammatory and proresolving lipid mediator. Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease **2008,** 3, 279-312.

[259]. Sharma, J. N.; Al-Omran, A.; Parvathy, S. S., Role of nitric oxide in inflammatory diseases. Inflammopharmacology **2007,** 15 (6), 252-259.

[260]. Sung, C. S.; Wong, C. S., Cellular mechanisms of neuroinflammatory pain: the role of interleukin-1beta. Acta Anaesthesiologica Taiwanica **2007,** 45 (2), 103-109.

[261]. Turner, M. D.; Nedjai, B.; Hurst, T.; Pennington, D. J., Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. Biochimica et Biophysica Acta **2014,** 1843, (11), 2563-2582.

[262]. Guo, L. H.; Schluesener, H. J., Acute but not chronic stimulation of glial cells in rat spinal cord by systemic injection of lipopolysaccharide is associated with hyperalgesia. Acta Neuropathologica **2006,** 112, (6), 703-713.

[263]. Badshah, H.; Ali, T.; Kim, M. O., Osmotin attenuates LPS-induced neuroinflammation and memory impairments via the TLR4/NFκB signaling pathway. Science Reports **2016,** 6, 24493.

[264]. Sandkuhler, J., Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. Physiological Reviews **2009,** 89, 707-758.

[265]. Kawasaki, Y.; Zhang, L.; Cheng J. K.; Ji R. R., Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1β, interleukin-6, and tumor necrosis factor-α in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. Journal of Neuroscience **2008,** 28, (20), 5189-5194.

[266]. Schuligoi, R.; Ulcar, R.; Peskar, B. A.; Amann, R., Effect of endotoxin treatment on the expression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin synthases in spinal cord, dorsal root ganglia, and skin of rats. Neuroscience **2003,** 116, (4), 1043-1052.

[267]. Lee, K. M.; Kang, B. S.; Lee, H. L.; Son, S. J.; Hwang, S.H.; Kim, D. S.; Park, J. S.; Cho, H. J., Spinal NF-kB activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. European Journal of Neuroscience **2004**, 19, (12), 3375.

[268]. Reinold, H.; Ahmadi, S.; Depner, U. B.; Layh, B.; Heindl, C.; Hamza, M.; Pahl, A.; Brune, K.; Narumiya, S.; Müller, U.; Zeilhofer, H. U., Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E receptors of the EP2 subtype. Journal of Clinical Investigation **2005,** 115, (3), 673-679.

[269]. Minami, T.; Nishihara, I.; Uda, R.; Ito, S.; Hyodo, M.; Hayaishi, O., Characterization of EP-receptor subtypes involved in allodynia and hyperalgesia induced by intrathecal administration of prostaglandin E2 to mice. British Journal of Pharmacology **1994,** 112, (3), 735.

[270]. Abe, M.; Oka, T.; Hori, T.; Takahashi, S., Prostanoids in the preoptic hypothalamus mediate systemic lipopolysaccharide-induced hyperalgesia in rats. Brain Research **2001,** 19, 916, (1-2), 41-49.

[271]. Ebersberger, A.; Grubb, B. D.; Willingale, H. L.; Gardiner, N. J.; Nebe, J.; Schaible, H. G., The intraspinal release of prostaglandin E2 in a model of acute arthritis is accompanied by an up-regulation of cyclo-oxygenase-2 in the spinal cord. Neuroscience **1999,** 93, (2), 775-781.

[272]. Guhring, H.; Gorig, M.; Ates, M.; Coste, O.; Zeilhofer H. U., Pahl, A.; Rehse K.; Brune K., Suppressed injury-induced rise in spinal prostaglandin E 2 production and reduced early thermal hyperalgesia in iNOS deficient mice. Journal of Neuroscience **2000,** 20, (17), 6714-6720.

[273]. Fujikawa, M.; Ibuki, T.; Matsumura, K.; Sawa, T., Inflammatory hyperalgesia: the role of the prostaglandin system in the spinal cord. Advances in Neuroimmune Biology **2012,** 3, (2), 197-207.

[274]. Zhang, H.; Wu, L.; Liu, Y.; Peng, S.; Wang, W., The antinociceptive effect and mechanism of action of SY0916. International Immunopharmacology **2016,** 32, 16-23.

[275]. Desreumaux, P.; Dubuquoy, L.; Nutten, S.; Peuchmaur, M.; Englaro, W.; Schoonjans, K.; Derijard, B.; Desvergne, B.; Wahli, W.; Chambon, P.; Leibowitz, M. D.; Colombel, J. F.; Auwerx, J., Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. Journal of Experimental Medicine **2001,** 193, (7), 827-838.

[276]. Kong, G.; Kim, H. T.; Wu, K.; DeNardo, D.; Hilsenbeck, S. G.; Xu, X. C.; Lamph, W. W.; Bissonnette, R.; Dannenberg, A. J.; Brown, P. H., The retinoid X receptor-selective retinoid, LGD1069, down-regulates cyclooxygenase-2 expression in human breast cells through transcription factor crosstalk: implications for molecular-based chemoprevention. Cancer Research **2005,** 65, (8), 3462-3469.

EKLER

Etik Kurul Onay Belgesi

Mersin Üniversitesi - HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
Tarih: 07.08.2017 12:00
Sayı: 52602694-050.01.04-E.00000483542

E.00000483542

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52602694-050.01.04
Konu : Etik Kurul Kararı

Sayın Prof.Dr. Bahar TUNÇTAN
Eczacılık Fakültesi Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü
Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Sorumluluğunuzda yapılması tasarlanan "Lipopolisakkarit ile farelerde oluşturulan inflamatuvar hiperaljezi modelinde seçici RXRa agonisti beksarotenin TLR4/MyD88/TAK1/NF-KB/COX-2 yolu üzerindeki etkisinin proinflamatuvar sitokin oluşumu ile ilişkilendirilerek araştırılması" adlı araştırmaya ilişkin 31/07/2017 tarihli ve 2017/17 sayılı Kurul Kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-imzalıdır
Prof.Dr. Ali NAYCI
Kurul Başkanı

EK- Kurulun 31/07/2017 tarihli ve 2017/17 sayılı kararı (1 sayfa)

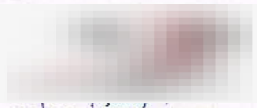
Adres:Mersin Üniversitesi Personel Daire Başkanlığı Çiftlikköy Kampüsü 33343, Yenişehir MERSİN
E-posta: addemir@mersin.edu.tr
Telefon: +90 -
Ayrıntılı bilgi için:0324 361 00 01-4016
Fax: +90 0324 361 07 66
Elektronik ağ:www.mersin.edu.tr

Evrakın elektronik imzalı suretine https://e-belge.mersin.edu.tr adresinden 03b5ac26-4dab-4900-b297-815b8eeef1fb kodu ile erişebilirsiniz.
Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu'na uygun olarak Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır.

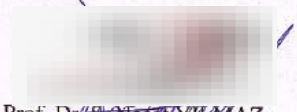
T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (HADYEK)

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
31/07/2017	06	17

Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan "Lipopolisakkarit ile farelerde oluşturulan inflamatuvar hiperaljezi modelinde seçici RXRa agonisti beksarotenin TLR4/MyD88/TAK1/NF-κB/COX-2 yolu üzerindeki etkisinin proinflamatuvar sitokin oluşumu ile ilişkilendirilerek araştırılması" adlı araştırma için hazırlanmış olan ve 21/06/2017 tarihinde sunulan Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ile ilgili belgeler ve araştırmada deney hayvanları üzerinde yapılacak tüm işlemler gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın yürürlükte olan ilgili yasal düzenlemelere uyularak yürütülmesi ve sonuçlandırılması koşulu ile gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.



Prof. Dr. Ali NAYCI



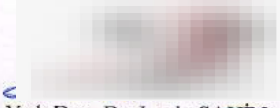
(Katılmadı)
Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN
Üye

Prof. Dr. S. Necat YILMAZ

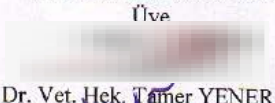
(Katılamadı)
Prof. Dr. Emine Arzu KANIK
Üye



Prof. Dr. Yusuf ÇAMLICA
Üye

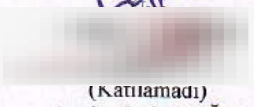


Yrd. Doç .Dr. Leyla ŞAHİN
Üye



Dr. Vet. Hek. Tamer YENER

(Katılamadı)
Uzm. Vet. Hek. Cem FIRAT
Üye



(Katılamadı)
Avukat Lale DAĞLI
Üye

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52602694-050.01.04 705327 17/04/2018
Konu : Etik Kurul Kararı

Sayın Prof.Dr. Bahar TUNÇTAN
Eczacılık Fakültesi Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü
Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Sorumluluğunuzda yapılması tasarlanan "Lipopolisakkarit ile farelerde oluşturulan inflamatuvar hiperaljezi modelinde seçici RXRa agonisti beksarotenin TLR4/MyD88/TAK1/NF-KB/COX-2 yolu üzerindeki etkisinin proinflamatuvar sitokin oluşumu ile ilişkilendirilerek araştırılması" adlı araştırmaya ilişkin 16/04/2018 tarihli ve 2018/20 sayılı Kurul Kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Ali NAYCI
Kurul Başkanı

EK- Kurulun 16/04/2018 tarihli ve 2018/20 sayılı kararı (1 sayfa)

Adres : MEÜ Çiftlikköy Kampüsü 33110 Yenişehir / MERSİN Ayrıntılı bilgi için irtibat: Ayla DURDU
Tel : 0324 361 00 01/14417 Fax :
e-posta : hadyek@mersin.edu.tr Elektronik Ağ : www.mersin.edu.tr

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (HADYEK)

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
16/04/2018	06	20

Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN'ın yürüttücüsü olduğu 31.07.2017 tarihli ve 2017/17 sayılı etik kurul onayı bulunan projesi "Lipopolisakkarit ile farelerde oluşturulan inflamatuvar hiperaljezi modelinde seçici RXRa agonisti beksarotenin TLR4/MyD88/TAK1/NF-KB/COX-2 yolu üzerindeki etkisinin proinflamatuvar sitokin oluşumu ile ilişkilendirilerek araştırılması" ile ilgili yapılan değişiklik başvurusu incelenmiş olup araştırmanın yürürlükte olan ilgili yasal düzenlemelere uyularak yürütülmesi ve sonuçlandırılması koşulu ile gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Ali NAYCI

(Katılamadı)
Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN
Üye

Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ
Üye

Doç.Dr. Gülhan TEMEL
Üye

(Katılamadı)
Prof. Dr. Yusuf ÇAMLICA
Üye

Yrd. Doç .Dr. Leyla ŞAHİN
Üye

Dr. Vet. Hek. Tamer YENER
Üye

(Katılamadı)
Uzm. Vet. Hek. Cem FIRAT
Üye

Avukat Lale DAĞLI
Üye

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı

Doğum Tarihi

E-mail

Öğrenim Durumu :

İş Deneyimi

YAYINLAR (Makaleler/Bildiriler/Ödüller)

1.MAKALELER

a) Araştırma makalesi

[1]. **Senol, S. P.;** Temiz, M.; Guden, D. S.; Cecen, P.; Sari, A. N.; Sahan-Firat, S.; Falck, J. R.; Dakarapu, R.; Malik, K. U.; Tunctan, B., Contribution of PPARα/β/γ, AP-1, importin-α3, and RXRα to the protective effect of 5,14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, against hypotension, tachycardia, and inflammation in a rat model of septic shock. Inflammation Research **2016,** 65, (5), 367-387.
[2]. Dolunay, A.; **Senol, S. P.;** Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; Sari, A. N.; Sahan-Firat, S.; Tunctan, B., Inhibition of NLRP3 inflammasome prevents LPS-induced inflammatory hyperalgesia in mice: contribution of NF-κB, caspase-1/11, ASC, NOX, and NOS isoforms. Inflammation **2017,** 40, (2), 366-386.
[3]. Temiz-Resitoglu, M.; **Kucukkavruk, S. P.;** Guden, D. S.; Cecen, P.; Sari, A. N.; Tunctan, B.; Gorur, A.; Tamer-Gumus, L.; Buharalioglu, C. K.; Malik, K. U.; Sahan-Firat, S., Activation of mTOR/IκB-α/NF-κB pathway contributes to LPS-induced hypotension and inflammation in rats. European Journal of Pharmacology **2017,** 802, 7-19.
[4]. Tunctan, B.; **Kucukkavruk, S. P.;** Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; Sari, A. N.; Sahan-Firat, S.; Paudyal, M. P.; Falck, J. R.; Malik, K. U., Inhibition of NLRP3 inflammasome contributes to protective effect of 5,14-HEDGE against lipopolysaccharide-induced septic shock. International Journal of Pharmacology **2017,** 13, (6), 654-666.
[5]. Sahan-Firat, S.; Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; **Kucukkavruk, S. P.;** Tunctan, B.; Sari, A. N.; Kocak, Z.; Malik, K. U., Protection by mTOR inhibition on zymosan-induced systemic inflammatory response and oxidative/nitrossative stress: contribution of mTOR/MEK1/ERK1/2/IKKβ/IκB-α/NF-κB signalling pathway. Inflammation **2018,** 41, (1), 276-298.

[6]. Tunctan, B.; **Kucukkavruk, S. P.;** Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; Sari, A. N.; Sahan-Firat, S., Bexarotene, a selective RXRα agonist, reverses hypotension associated with inflammation and tissue injury in a rat model of septic shock. Inflammation **2018,** 41, (1), 337-355.
[7]. Sahan-Firat S.; Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; **Senol, S. P.;** Sari A. N.; Cil, M.; Unsal, D.; Korkmaz, B.; Tunctan, B.; Malik, K.U.; Buharalioglu C.K. NF-κB activation mediates LPS- or zymosan-induced hypotension and inflammation reversed by BAY61-3606, a selective Syk inhibitor, in rat models of septic and non-septic shock. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology **2019,** 46, (2), 173-182.
[8]. Biliktu, M.; **Senol, S. P.;** Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D.S.; Horat, M. F.; Sahan-Firat, S.; Sevim, S.; Tunctan, B., Pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase attenuates chronic experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating inflammatory and anti-inflammatory pathways in an inflammasome-dependent and -independent manner. Inflammopharmacology **2020,** 28, (6), 1509-1524.
[9]. Cagli, A.; **Senol, S. P.;** Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; Sari, A. N.; Sahan-Firat, S.; Tunctan, B., Soluble epoxide hydrolase inhibitor trifluoromethoxyphenyl-3-(1-propionylpiperidin-4-yl)urea prevents hyperalgesia through regulating NLRC4 inflammasome-related pro-inflammatory and anti-inflammatory signaling pathways in the lipopolysaccharide-induced pain mouse model. Drug Development Research **2021**, Feb 8. doi: 10.1002/ddr.21786.
[10]. **Senol, S. P.;** Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; Sari, A. N.; Sahan-Firat, S.; Tunctan, B. Suppression of TLR4/MyD88/TAK1/NF-kB/COX-2 signaling pathway in the central nervous system by bexarotene, a selective RXR agonist, prevents hyperalgesia in the lipopolysaccharide-induced pain mouse model. Neurochemical Research **2021,** 46, (3), 624-637.
[11]. Guden, D. S.; Temiz-Resitoglu, M.; **Senol, S. P.;** Kibar, D.; Yilmaz, S. N.; Tunctan, B.; Malik, K. U.; Sahan-Firat, S., mTOR inhibition as a possible pharmacological target in the management of systemic inflammatory response and associated neuroinflammation by lipopolysaccharide challenge in rats. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology **2021**, Feb 27, 1-14.

b) Derleme

[1]. Tunctan, B.; **Senol, S. P.;** Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; Sahan-Firat, S.; Falck, J. R.; Malik, K. U., Eicosanoids derived from cytochrome P450 pathway of arachidonic acid and inflammatory shock. Prostaglandins and Other Lipid Mediators **2019,** 145, 106377.

1.2. En az bir uluslararası alan indeksi kapsamında olan dergilerde

a) Araştırma makalesi

[1]. **Senol, S. P.;** Tiftik, E. N.; Unal, S.; Akdeniz, A.; Tasdelen, B.; Tunctan, B., Quality of life, clinical effectiveness, and satisfaction in patients with beta thalassemia major and sickle cell anemia receiving deferasirox chelation therapy. Journal of Basic and Clinical Pharmacy **2016,** 7, (2), 49-59.
[2]. Cevher, F.; Ünal, S.; **Küçükkavruk, S. P.;** Taşdelen, B.; Tunçtan, B., Quality of life, clinical effectiveness, and satisfaction in pediatric and young adult patients with sickle cell disease receiving hydroxyurea therapy. Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences **2018,** 38, (1), 30-39.

b) Derleme

[1]. **Şenol Ş. P.;** Tunçtan B., Peroksizom proliferatör ile etkinleştirilen reseptörlerin insülin direnci ve septik şok patojenezindeki rolü. Clinical and Experimental Health Sciences **2015,** 5, (4): 247-258.
[2]. Bahçeli, Ö.; **Şenol, Ş. P.;** Tunçtan B. Deneysel nöroinflamatuar hastalık modelleri. Türkiye Klinikleri Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi **2021**, 10, (2), 153-165.

3. Ulusal hakemli dergilerde

a) Araştırma makalesi

---

b) Derleme

[1]. **Şenol Ş. P.;** Tunçtan B., Miyokardiyal ve renal iskemi/reperfüzyon zedelenmesi ve deneysel modelleri. Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences **2016;** 5, (2):93-109.
[2]. **Şenol, Ş. P.;** Tunctan, B., Eczacılık eğitiminde yenilikler. Journal of Education in Health Sciences **2018,** 1, (1), 22-26.
[3]. Bahçeli, Ö.; **Şenol, Ş. P.;** Tunçtan, B., Deneysel nöroinflamatuvar hastalık modelleri. Türkiye Klinikleri Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi **2021,** DOI: 10.5336/pharmsci.2020-79790.

2. BİLDİRİLER

2.1. Uluslararası

a) Sözlü ve tam metin yayımlananlar

[1]. Guden, D. S.; Temiz-Resitoglu, M.; **Kucukkavruk, S. P**.; Tunctan, B.; Sahan-Firat, S., Protective effect of mTOR inhibition on LPS-induced systemic inflammation and tissue injury: Contribution of mTOR//IκB-α/NF-κB/HIF-1 signaling pathway and NADPH oxidase system activity. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, Turkey, 25-29 une 2018, pp. 34-35.
[2]. Temiz-Resitoglu, M; Guden, D. S.; **Senol**, S. P.; Vezir, O.; Sucu, N.; Tunctan, B.; Sahan-Firat, S., Rapamycin reverses kidney injury in DOCA-salt induced hypertensive rats: Contribution of mTOR. 2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, Ankara, Turkey, 28-29 June 2019, pp. 827-833.

b) Sözlü ve özeti yayımlananlar

[1]. Tunctan, B.; Dolunay, A.; **Senol, S. P.;** Temiz Resitoglu, M.; Guden, D. S.; Sari, A. N.; Sahan Firat, S., Inhibition of NLRP3 inflammasome prevents lipopolysaccharide-induced inflammatory hyperalgesia in mice: contribution of NF-κB, caspase-1/11, ASC, NADPH oxidase, and NOS isoforms. 7th European Congress of Pharmacology (EPHAR2016), Istanbul, Turkey, 26-30 June 2016, pp. 115.
[2]. Tunctan, B.; **Kucukkavruk, S. P.;** Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; Sari, A. N.; Sahan-Firat, S., Protective effect of bexarotene, a selective RXRα agonist, against hypotension associated with inflammation and tissue injury linked to decreased circulating inos levels in a rat model of septic shock. ICI 2017: 19th International Conference on Inflammation, Amsterdam, Holland, 14-15 May 2017, pp. 1070.
[3]. Tunctan, B.; **Kucukkavruk, S. P.;** Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; Sari, A. N.; Sahan-Firat, S.; Paudyal, M. P.; Falck, J. R.; Malik, K. U., Contribution of NLRP3 inflammasome to the protective effect of 5,14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, against LPS-induced septic shock in rats. ICI 2017: 19th International Conference on Inflammation, Amsterdam, Holland, 14-15 May 2017, pp. 1071.
[4]. Sahan-Firat, S.; Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; **Kucukkavruk, S. P.;** Tunctan, B.; Sari, A. N.; Kocak, Z., Contribution of mTOR oxidative/nitrosative stress via NADPH oxidase system activation in zymosan-induced systemic inflammation in rats. ICI 2017: 19th International Conference on Inflammation, Amsterdam, Holland, 14-15 May 2017, pp. 1176.

[5]. Guden, D. S.; Temiz-Resitoglu, M.; **Senol, S. P.;** Kibar, D.; Yilmaz, S. N.; Tunctan, B.; Sahan-Firat, S., mTOR contributes to LPS-triggered neuroinflammation: Modulation of IκB-α/NFκB/HIF-1α signaling pathway. 21st Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT) and the 21st Annual Meeting of the Association of the Clinical Pharmacology(VKliPha), Stuttgart, Germany, 25-28 February 2019, Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 2019, 392, (Suppl 1), S6.
[6]. **Senol, S.;** Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. Sari, A.; Sahan-Firat, S.; Tunctan, B., Inhibition of TLR4/MyD88/TAK1/NF-κB/COX-2 pathway activation contributes to protective effect of bexarotene, a RXR agonist, against lipopolysaccharide-induced inflammatory hyperalgesia. XVIIIth Congress of the European Shock Society and IXth Congress of the Int'l Federation of Shock Societies, Chania, Crete, Greece, 8-12 October 2019, pp. 85.
[7]. Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; **Senol, S. P.;** Vezir, O.; Sucu, N.; Kibar, D.; Yilmaz, Ş. N.; Tunctan, B.; Sahan-Firat, S., mTOR contributes to cardiovascular injury caused by DOCA-salt administration in rats. 5th International Hippocrates Congress on Medical and Health Sciences, 18-19 December 2020, pp. 495-496.

c) Poster ve özeti yayımlananlar

[1]. Temiz, M.; **Senol, S. P.;** Guden, D. S.; Cecen, P.; Sari A. N., Tunctan B.; Tamer, L.; Buharalıoglu, C. K.; Sahan-Firat S., Inhibition of mammalian target of rapamycin reverses lipopolysaccharide-induced hypotension and inflammation in rats. 11th Interational Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, Turkey, 9-12 June 2015, pp. 188-189.
[2]. Sahan Firat, S.; Temiz Resitoglu, M.; Buharalioglu, C. K.; Guden, D. S.; **Senol, S. P.;** Sari, A. N.; Kacan, M.; Unsal, D.; Korkmaz, B.; Tunctan, B., The role of IκB-α/NF-κB pathway activation in hypotension and inflammation reversed by BAY 61-3606, a selective Syk inhibitor, in rat models of septic and non-septic shock. 7th European Congress of Pharmacology (EPHAR2016), Istanbul, Turkey, 26-30 June 2016, pp. 276.
[3]. Tunctan, B.; **Kucukkavruk, S. P.;** Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; Sari, A. N.; Sahan-Firat, S., Bexarotene, a selective RXRα agonist, reverses hypotension associated with inflammation and tissue injury via increased formation of PPARα/β/γ-RXRα heterodimers in a rat model of septic shock. 17th Congress of European Shock Society: numerous "premières", Paris, France, 13-15 September 2017, pp. 219.
[4]. Sahan Firat, S.; Temiz Resitoglu, M.; Guden, D. S.; **Kucukkavruk, S. P.;** Tunctan, B.; Sari, A. N.; Kocak, Z., Activation of mTOR/MEK1/ERK1/2/IKKβ/IκB-α//NF-κB p65 pathway contributes to zymosan-induced systemic inflammatory response in rats. 2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2017), Ankara, Turkey, 11-13 October 11-13 2017, pp. 150.
[5]. **Kucukkavruk, S. P.,** Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; Sari, A. N.; Sahan-Firat, S.; Tunctan, B. Bexarotene, a RXRα agonist, prevents lipopolysaccharide-induced inflammatory hyperalgesia in mice. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, Turkey, 25-29 June 2018, pp. 216-217.
[6]. **Senol, S. P.;** Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; Sari, A. N.; Sahan-Firat, S.; Tunctan, B. Inhibition of TLR4/MYD88/TAK1/NF-κB/COX-2 pathway activation contributes to protective effect of Bexarotene, a RXRα agonist, against lipopolysaccharide-induced inflammatory hyperalgesia. 11th Congress of the European Pain Federation, Valencia, Spain, 4-7 September 2019, pp. 414.
[7]. Cagli, A.; **Senol, S. P.;** Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; Sari, A. N.; Sahan-Firat, S.; Tunctan, B., Inhibition of soluble epoxide hydrolase prevents lipopolysaccharide induced inflammatory in hyperalgesia in mice: Contribution of NLRC4 inflammasome, NLRC3, NOX, INOS, AND NNOS. 11th Congress of the European Pain Federation, Valencia, Spain, 4-7 September 2019, pp. 363-364.

[8]. Cagli, A.; **Senol, S.;** Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D.; Sari, A.; Sahan-Firat, S.; Tunctan, B., Inhibition of soluble epoxide hydrolase prevents lipopolysaccharide-induced inflammatory hyperalgesia in mice: Contribution of NLRC4 Inflammasome, NLRC3, NOX, iNOS, and nNOS. XVIIIth Congress of the European Shock Society and IXth Congress of the Int'l Federation of Shock Societies, Chania, Crete, Greece, 8-12 October 2019, pp. 132.
[9]. Biliktü, M.; **Şenol**, **S. P.;** Temiz Reşitoğlu, M.; Güden, D. S.; Horat, M. F.; Şahan Fırat, S.; Sevim, M. S.; Tunçtan, B., Seçici çözünebilir epoksit hidrolaz inhibitörü TPPU NLRC4/ASC/prokaspaz-1 inflamazom oluşumu ve etkinliği ile antienflamatuvar NLRC3 ekspresyonundaki değişikliklerin eşlik ettiği deneysel otoimmün ensefalomiyelit bulgularını azaltabilmektedir. 2. Uluslararası Türk Dünyası Multipl Skleroz Kongresi, Antalya, 13-16 Şubat 2020, pp. 32.
[10]. Bahceli, O.; **Senol, S. P.;** Temiz-Resitoglu, M.; Horat, M. F.; Sahan-Firat, S.; Tunctan, B., PPARα/β/γ and c-Jun contribute to preventive effect of bexarotene, a RXR agonist, against LPS-induced inflammatory hyperalgesia. Pharmacology 2021, September 7-9, Online, England, Abstract ID: 1133, Presentation Number: P038 (2021).
[11]. Horat, M. F.; **Senol, S. P.;** Bahceli, O.; Temiz-Resitoglu, M.; Sahan-Firat, S.; Sevim, S.; Tunctan, B., GPR75/$G\alpha_{q/11}$ and c-Jun contribute to the therapeutic effect of pharmacological sEH inhibition in chronic EAE in mice. Pharmacology 2021, September 7-9, Online, England, Abstract ID: 1158, Presentation Number: P039 (2021).
[12]. Tunctan, B.; **Senol, S. P.;** Temiz-Resitoglu, M.; Guden, D. S.; Bahceli, O.; Horat, M. F.; Sahan-Firat, S.; Sari, A. N.; Falck, J. R.; Malik, K. U., GPR75/$G\alpha_{q/11}$ signaling pathway contributes to the protective effect of 5,14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, against hypotension in a rat model of septic shock. Pharmacology 2021, September 7-9, Online, England, Abstract ID: 1161, Presentation Number: P001 (2021).

2.2. Ulusal

a) Sözlü ve tam metin yayımlananlar

---

b) Sözlü ve özeti yayımlananlar

[1]. **Şenol, Ş. P.;** Temiz, M.; Güden, D. S.; Çeçen, P.; Sarı, A. N.; Şahan-Fırat, S.; Falck, J. R.; Dakarapu, R.; Malik, K. U.; Tunçtan, B., Sıçanlarda oluşturulan deneysel septik şok modelinde 20-HETE mimetik 5,14-HEDGE'nin hipotansiyon, taşikardi ve enflamasyona karşı koruyucu etkisine PPARα/β/γ, AP-1, importin-α3 ve RXRα'nın katkısı. 23. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Ankara, 7-10 Eylül 2015, pp. 127.
[2]. Temiz, M.; **Şenol, Ş. P.;** Güden, D. S.; Çeçen, P.; Sarı, A. N.; Tunçtan, B.; Görür, A.; Tamer, L.; Buharalıoğlu, C. K.; Şahan-Fırat, S. Endotoksemik sıçanlarda ortaya çıkan sistemik inflamatuvar yanıtta mTOR/IκB-α/NF-κB yolu etkinliğinin rolü. 23. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Ankara, 7-10 Eylül 2015, pp. 136.
[3]. **Şenol, Ş. P.;** Temiz Reşitoğlu, M.; Güden, D. S.; Sarı, A. N.; Şahan Fırat, S.; Tunçtan, B., Seçici RXRα agonisti beksarotenin lipopolisakkarit ile farelerde oluşturulan inflamatuvar hiperaljeziyi önleyici etkisine TLR4/MyD88/TAK1/NF-κB/COX-2 yolu etkinliğinin inhibisyonu katkıda bulunmaktadır. 25. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Kuşadası, 4-7 Kasım 2019, pp. 111.
[4]. Cağli, A.; **Şenol, S. P.;** Temiz Reşitoğlu, M.; Güden, D. S.; Sarı, A. N.; Şahan Fırat, S.; Tunçtan, B., Seçici Çözünebilir Epoksit Hidrolaz İnhibitörü TPPU'nun Lipopolisakkarit ile Farelerde Oluşturulan Enflamatuvar Hiperaljeziyi Önleyici Etkisine NLRC4 İnflamazomu ve Antienflamatuvar NLRC3'ün Katkısı. 25. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Kuşadası, 4-7 Kasım 2019, pp. 115.

c) Poster ve özeti yayımlananlar

[1]. **Şenol, Ş. P.;** Tiftik, E. N.; Ünal, S.; Akdeniz, A.; Taşdelen, B.; Tunçtan, B., Beta talasemi majör ve orak hücreli anemi hastalarında demir şelatörlerine uyuncun karşılaştırılması. 1. Talasemi ve Hemoglobinopatiler Kongresi, Çeşme, İzmir, 20-23 Kasım 2014, pp. 206-207.
[2]. Tunçtan, B.; **Küçükkavruk, Ş. P.;** Temiz, M.; Güden, D. S.; Şahan-Fırat, S.; Sarı, A. N., Sıçanlarda oluşturulan deneysel septik şok modelinde seçici bir RXRα agonisti olan beksaroten enflamasyon ve doku zedelenmesi ile birlikte olan hipotansiyonu geri çevirmektedir. 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Trabzon, 17-20 Ekim 2017, pp. 114.
[3]. Cevher, F.; Ünal, S.; **Küçükkavruk, Ş. P.;** Taşdelen, B.; Tunçtan, B. Hidroksiüre tedavisi alan orak hücre hastalığı olan pediatrik ve genç erişkin hastalarda yaşam kalitesi, klinik etkinlik ve tedaviden memnuniyetin değerlendirilmesi. 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Trabzon, 17-20 Ekim 2017, pp. 68.
[4]. Tunçtan, B.; **Küçükkavruk, Ş. P.** Temiz, M.; Güden, D. S.; Sarı, A. N.; Şahan-Fırat, S. Sıçanlarda oluşturulan deneysel septik şok modelinde seçici bir RXRα agonisti beksaroten enflamasyon ve doku zedelenmesi ile birlikte olan hipotansiyonu geri çevirmektedir. 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Trabzon, 17-20 Ekim 2017, pp. 114.

3. ÖDÜLLER

3.1. Uluslararası

4. BİLİMSEL KURULUŞLARA ÜYELİKLER

[1]. Türk Farmakoloji Derneği

5. KURSLAR