TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METİLSÜLFONİLMETAN GLUKOZAMİN VE KONDROİTİN SÜLFATIN LPS/IFN-γ İLE UYARILMIŞ RAW 264.7 MAKROFAJ HÜCRELERİNDE APOPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİ

ARZU ZEYNEP KARABAY

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. ZELİHA BÜYÜKBİNGÖL

2011- ANKARA

İÇİNDEKİLER

İçindekiler		iii
Önsöz		vi
Simgeler ve kısaltmalar		vii
Şekiller		ix
1.	**GİRİŞ**	**1**
1.1	Apoptoz	5
1.1.1	Apoptozda rol oynayan sinyal yolakları	7
1.1.1.1	Apoptozun dışsal yolağı	7
1.1.1.2	Apoptozun içsel yolağı	8
1.1.1.3	Kaspazlar	9
1.2	Nitrik oksit sentaz ailesi ve iNOS	11
1.2.1	Nitrik oksitin biyolojik rolleri	13
1.2.2	NO-aracılı apoptozun mekanizmaları	14
1.3	NO aracılı apoptozun patolojik etkileri	17
1.4	İnflamasyon	18
1.5	Makrofajların fonksiyonları	20
1.6	Makrofaj aktivasyonu ve fonksiyonel heterojenite	21
1.7	Makrofajların klasik aktivasyonunda görev yapan indükleyiciler	24
1.7.1	Lipopolisakkarit	24
1.7.2	İnterferon gamma (IFN-γ)	25
1.7.3	LPS ve IFN-γ tarafından sinerjik gen indüksiyonu	26
1.7.4	Lipopolisakkaritler tarafından makrofaj aktivasyonunun moleküler mekanizmaları	27
1.7.5	LPS ile indüklenen sinyal yolağının bileşenleri	29
1.8	Metilsülfonilmetan (MSM)	33
1.8.1	MSM' nin etki mekanizması	34
1.8.2	MSM' nin klinik kullanımı	38
1.8.3	MSM' nin toksisitesi	38
1.9	Kondroitin sülfat (CS)	39
1.9.1	CS' nin etki mekanizması	41
1.9.2	CS' nin klinik kullanımı	43
1.9.3	CS' nin toksistesi	43
1.10	Glukozamin (GA)	44
1.10.1	GA' nın etki mekanizması	44
1.10.2	GA'nın klinik kullanımı	46
2.	**GEREÇ VE YÖNTEM**	**47**
2.1	Kullanılan Cihazlar	47
2.2	Kullanılan Kimyasal Maddeler	47
2.3	Kullanılan Hücre Serisi	47
2.4	İstatistiksel Analiz	48
2.5	Kullanılan Yöntemler	48
2.5.1	Hücre Kültürü	48
2.5.2	Hücre Sayımı ve Canlı Hücrelerin Belirlenmesi	48

2.5.3	Hücre Canlılık Testi	49
2.5.4	Nitrit Ölçümü	50
2.5.5	Protein Miktar Tayini	50
2.5.6	Mitokondri membran potansiyelinin belirlenmesi	51
2.5.7	Kaspaz-3 Aktivitesi Tayini	52
2.5.8	Annexin V ve Propidyum iyodür ile apoptoz tayini	52
3.	**BULGULAR**	**54**
3.1	Lipopolisakkarit (LPS)/İnterferon gamma (IFN-γ)'nın Nitrik Oksit Düzeyleri ve Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Zamana Bağlı Değişimi	54
3.2	Lipopolisakkarit (LPS)/İnterferon gamma (IFN-γ)'nın mitokondri membran potansiyeli ve kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri	58
3.3	MSM, GA ve CS' nin RAW 264.7 makrofaj hücreleri üzerindeki sitotoksik doz aralığının belirlenmesi	61
3.4	MSM, GA ve CS' nin RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde bazal nitrit düzeyleri üzerine etkilerinin belirlenmesi	63
3.5	MSM, GA ve CS' nin tek başına, LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit düzeyleri üzerine etkileri	65
3.6	MSM, GA ve CS' nin tek başına, LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri	66
3.7	MSM, GA ve CS' nin tek başına uygulanıklarında LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri	66
3.8	MSM, GA ve CS' nin LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkileri	67
3.9	Farklı konsantrasyonlarda MSM' nin farklı GA ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit düzeyleri üzerine etkileri.	68
3.10	Farklı konsantrasyonlarda MSM' nin farklı GA ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde canlılık üzerine etkileri	70
3.11	Farklı konsantrasyonlarda MSM' nin farklı GA ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri	72
3.12	Farklı konsantrasyonlarda MSM' nin farklı GA ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli üzerine etkileri	74
3.13	Farklı konsantrasyonlarda GA' nın farklı MSM ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit düzeyleri üzerine etkileri	76
3.14	Farklı konsantrasyonlarda GA' nın farklı MSM ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde canlılık üzerine etkileri	78

3.15 Farklı konsantrasyonlarda GA' nın farklı MSM ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri 80
3.16 GA' nın farklı MSM ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli üzerine etkileri 82
3.17 CS' nin farklı MSM ve GA konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit düzeyleri üzerine etkileri 84
3.18 CS' nin farklı MSM ve GA konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde canlılık üzerine etkileri 86
3.19 CS' nin farklı MSM ve GA konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri 88
3.20 CS' nin farklı MSM ve GA konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli üzerine etkileri 90
3.21 MSM, GA ve CS' nin LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde apoptoz üzerine etkilerinin akım sitometrik olarak saptanması 92
4. TARTIŞMA 95
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 111
SUMMARY 115
KAYNAKLAR 116
ÖZGEÇMİŞ 136

ÖNSÖZ

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, metilsülfonilmetan, glukozamin ve kondroitin sülfatın LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde apoptoz üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Antiinflamatuvar etkileri nedeni ile piyasada preparatları bulunan metilsülfonilmetan, GA ve kondroitin sülfatın immün sistemin başlıca hücreleri olan makrofajların apoptozu üzerindeki etkileri ilk kez ortaya konulmuştur.

Tezimin hazırlanması sırasında bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen, bana her zaman destek olan, yardımlarını asla unutamayacağım, değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Zeliha BÜYÜKBİNGÖL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmalarım sırasında her türlü imkanı seferber etmek için yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı, Prof. Dr. Serpil NEBİOĞLU' na, tüm bilgi ve deneyimleri ile çalışmalarıma ışık tutan Prof. Dr. Fügen AKTAN' a da teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Biyokimya Anabilim Dalı' nın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Bilgehan DOĞRU ve Doç. Dr. Net EVCİMEN'e de bugüne kadar bana verdikleri emekler için teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince cömertçe laboratuvarını bana açan ve çalışmama izin veren, çalışmalarımın yürümesi için her zaman destek olan, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na da teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında ortaya çıkan tüm sorunlarla birlikte ve omuz omuza başettiğimiz Arş. Gör. Aslı KOÇ'a, Arş. Gör. Tülin Özkan' a ve Arş. Gör. Filiz Bakar' a da destekleri ve dostlukları için teşekkür ederim.

Son olarak her zaman yanımda olan sevgili annem, dayım ve teyzeme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

APCs	Antijen sunucu hücreler
AIF	Apoptoz indükleyici faktör
BSA	Bovine Serum Albumin
CD14	Cluster of differentiation
CED	Caenorhabditis Elegans Death Genes
COX2	Siklooksijenaz 2
CREB	cAMP yanıt elemanına bağlanan protein
CREM	cAMP Responsive Element Modulator
CS	Kondroitin sülfat
DISC	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DNA	Deoksribonükleik asit
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
EGTA	Etilenglikol tetraasetik asit
eNOS	Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
GA	Glukozamin
HOCl	Hipoklorik asit
IAP	Apoptoz inhibitör protein
I-CAD	Caspase activated DNase
ICAM 1	Intercellular adhesion molecule 1
IFNγ	İnterferon gama
IκB	İnhibitör kappa B
IKK	İnhibitör kappa B kinaz
IL-1β	İnterlökin 1 beta
IL-1R	İnterlökin 1 resptörü
IL-4	İnterlökin 4
IL-10	İnterlökin 10
IL-12	İnterlökin 12
IL-13	İnterlökin 13

IRF-1	Interferon regulatory factor 1
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
LPS	Lipopolisakkarit
MAPK	Mitojen ile aktive olan protein kinaz
MHC-1	Major histocompatibility complex
MSM	Metilsülfonilmetan
MTT	[3-(*4,5-Dimethylthiazol-2-yl*)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide]
Myd88	Miyeloid diferansiyasyon faktör 88
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
$NaVO_4$	Sodyum ortovanadat
NFkB	Nükleer Faktör kappa B
NIK	NFκB inducing kinaz
nNOS	Nöral Nitrik Oksit Sentaz
NO	Nitrik Oksit
NO_2	Nitrojen dioksit
NO_2Cl	Nitril klorür
$ONOO^-$	Peroksinitrit
PARP	Poli- (ADP-riboz) polimeraz
PMSF	Fenil metil sülfonil florid
RNT	Reaktif azot türü
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
SNP	Sodyum nitropurusid
STAT	Sinyal Transdüksiyon Transkripsiyon Aktivatörü 1 alfa
TGF-β	Transforming growth faktör
Th2	T helper 2
TLR	Toll like receptor
TNF-α	Tümör nekrosis faktör alfa

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Apoptoz ve nekrozun oluşum basamakları (Goodlet ve Horn., 2008). 5
Şekil 1.2. Apoptotik hücre ölüm yolaklarının şematik gösterimi (Orrenius, 2010). 8
Şekil 1.3. Kaspaz ailesinin üyeleri (Fischer ve ark., 2003). 11
Şekil 1.4. Nitrik oksitin sentezinde görev alan kimyasal reaksiyonlar. L-arjinin, L-sitrullin ve nitrik oksite dönüştürülür (Nathan, 1992). 12
Şekil 1.5. Nitrik oksitin metabolizması (Nathan, 1992). 12
Şekil 1.6. NO-bağımlı apoptozun mekanizmaları (Bosca ve ark., 2005) 15
Şekil 1.7. Apoptozun NO-bağımlı regulasyonu (Bosca ve Hortelano, 1999). 16
Şekil 1.8. İnflamasyonun sebepleri, ve fizyolojik ve patolojik sonuçları (Medzhitov ve ark., 2008). 19
Şekil 1.9. Yerleşik ve alınan makrofajların fonksiyonel heterojenitesi (Ajay, 2010). 21
Şekil 1.10. Makrofaj aktivasyonu fonksiyonel heterojeniteye katkı sağlar (Ajay, 2010). 23
Şekil 1.11. IFN-γ ve LPS veya TNF-α tarafından sinerjistik gen indüksiyonunun moleküler mekanizmaları (Paludan, 2000) 26
Şekil 1.12. LPS reseptör kompleksinin bileşenleri (Guha ve Mackman, 2001) 29
Şekil 1.13. NFkB aktvasyonunun şematik gösterimi (Gloire ve ark., 2006). 32
Şekil 1.14. Metilsülfonilmetanın kimyasal yapısı (MSM, Monograph, 2003). 34
Şekil 1.15. Kondroitin sülfatın şematik gösterimi. (Chondroitin sulfates, Monograph, 2006). 40
Şekil 2.1. Nitrit Standart Grafiği 50
Şekil 2.2. Bradford Standart Grafiği 51
Şekil 3.1. LPS (10 ng/ml) ve LPS' nin (10 ng/ml) IFNγ (1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml) ile farklı dozlardaki kombinasyonlarının RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit üretimi üzerine etkisi 55
Şekil 3.2. LPS (25 ng/ml) ve LPS' nin (25 ng/ml) IFNγ (1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml) ile farklı dozlardaki kombinasyonlarının RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit üretimi üzerine etkisi. 55
Şekil 3.3. LPS (50 ng/ml) ve LPS' nin (50 ng/ml) IFNγ (1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml) ile farklı dozlardaki kombinasyonlarının RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit üretimi üzerine etkisi. 56
Şekil 3.4. LPS (100 ng/ml) ve LPS' nin (100 ng/ml) IFNγ (1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml) ile farklı dozlardaki kombinasyonlarının RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit üretimi üzerine etkisi. 56
Şekil 3.5. LPS (250 ng/ml) ve LPS' nin (250 ng/ml) IFNγ (1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml) ile farklı dozlardaki kombinasyonlarının RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit üretimi üzerine etkisi. 56
Şekil 3.6. LPS ve LPS' nin IFNγ ile kombinasyonlarının RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin nitrit düzeyleri üzerine etkisi. 57
Şekil 3.7. LPS ve LPS' nin IFNγ ile kombinasyonlarının RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi. 58
Şekil 3.8. Kontrol grubu ile LPS/IFN-γ grubu arasında mitokondriyal membran potansiyelinin değişimi. 59

Şekil 3.9. LPS/IFNγ ile uyarılan makrofaj hücrelerinde apoptotik hücrelerin sırasıyla ışık mikroskobunda ve floresan mikroskobundaki görüntüleri. 59
Şekil 3.10. LPS /IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin Annexin V-PI ile akım sitometrik analizi (Tek bir denemenin sonuçları simgesel olarak gösterilmektedir) ve grafik halinde gösterimi. 60
Şekil 3.11. MSM'nin makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi. (Makrofaj hücreleri farklı konsantrasyonlarda MSM ile 24 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığı MTT testi ile analiz edildi. Kontrol grubunun canlılığı %100 olarak verilmektedir). 61
Şekil 3.12. CS' nin makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi. (Makrofaj hücreleri farklı konsantrasyonlarda CS ile 24 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığı MTT testi ile analiz edildi. 62
Şekil 3.13. GA'nın makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi. (Makrofaj hücreleri farklı konsantrasyonlarda GA ile 24 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığı MTT testi ile analiz edildi. 62
Şekil 3.14. MSM'nin makrofaj hücrelerinin nitrit düzeyleri üzerine etkisi. 63
Şekil 3.15. CS'nin makrofaj hücrelerinin nitrit düzeyleri üzerine etkisi. 64
Şekil 3.16. GA'nın makrofaj hücrelerinin nitrit düzeyleri üzerine etkisi. 64
Şekil 3.17. MSM, GA ve CS' nin tek başına uygulandıklarında LPS/IFN-γ ile uyarılan makrofaj hücrelerinin nitrit düzeyleri üzerine etkisi. 65
Şekil 3.18. MSM, GA ve CS' nin tek başına uygulandıklarında LPS/IFNγ ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücre canlılığı üzerine etkileri. 66
Şekil 3.19. MSM, GA ve CS' nin tek başına LPS/IFNγ ile uyarılmış makrofajlarda kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkileri. 67
Şekil 3.20. MSM, GA ve CS' nin tek başına LPS/IFNγ ile uyarılmış makrofajlarda Rh123 alımı üzerine etkileri. 68
Şekil 3.21. Farklı konsantrasyonlarda MSM' nin, farklı GA ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit düzeyi üzerine etkileri. 69
Şekil 3.22. Farklı konsantrasyonlarda MSM' nin, farklı GA ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde canlılık üzerine etkileri. 71
Şekil 3.23. Farklı konsantrasyonlarda MSM' nin, farklı GA ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri. 73
Şekil 3.24. Farklı konsantrasyonlarda MSM' nin GA ve CS ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde Rh123 alımı üzerine etkileri. 75
Şekil 3.25. Farklı konsantrasyonlarda GA' nın farklı MSM ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit düzeyi üzerine etkileri. 77
Şekil 3.26. Farklı konsantrasyonlarda GA' nın farklı MSM ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde canlılık üzerine etkileri. 79
Şekil 3.27. Farklı konsantrasyonlarda GA' nın farklı MSM ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri. 81

Şekil 3.28**.** GA' nın MSM ve CS ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde Rh123 alımı üzerine etkileri. 83
Şekil 3.29. CS' nin farklı MSM ve GA konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit düzeyi üzerine etkileri. 85
Şekil 3.30**.** CS' nin farklı MSM ve GA konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde canlılık üzerine etkileri. 87
Şekil 3.31**.** CS' nin farklı MSM ve GA konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri. 89
Şekil 3.32**.** CS' nin MSM ve GA ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde Rh123 alımı üzerine etkileri. 91
Şekil 3.33**.** Farklı dozlarda MSM, GA ve CS uygulanan LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin Annexin V-PI ile akım sitometrik analizi. 94

1. GİRİŞ

Apoptoz, doku homeostazisinin düzenlenmesi gibi normal fizyolojide ve çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde önemli rol oynayan, genetik olarak programlanmış bir hücre ölüm mekanizmasıdır (Brüne ve ark., 2003). Evrimsel olarak korunum gösteren bu ölüm mekanizmasına hemen hemen bütün hücre tiplerinin hayatlarını sürdürmeleri ve gelişimleri için ihtiyaç duyulmaktadır. Apoptoz, morfolojik olarak, hücre ve organellerin büzüşmesi, plazma membranının tekrar modellenmesi, kromatin kondensasyonu, ve nükleer fragmantasyon ile karakterize edilmektedir (Hortelano ve ark., 1998). Temel olarak apoptozu düzenleyen iki tip sinyal yolağı bulunmaktadır. Dışsal yolak, Fas ve TNFR gibi hücre yüzey reseptörlerine spesifik ölüm ligantlarının bağlanması ile başlamakta ve daha sonraki basamaklarda adaptör moleküllerin yapıya katılarak kaspazların aktive olması ile gerçekleşmektedir Aktivasyon için hücre yüzeyi ölüm reseptörlerine ihtiyaç duymayan içsel yolakta ise mitokondriyal sitokrom c ve diğer pro-apoptotik moleküller (örn. Smac/DIABLO) sitoplazmaya salınmaktadır. (Olson ve Garban, 2008).

İntrinsik yolak aracılığı ile gerçekleşen apoptozun uyaranları arasında önemli bir biyolojik aracı molekül olan nitrik oksit de yer almaktadır. Nitrik oksit, nitrik oksit sentazlar adı verilen enzimlerin katalizörlüğünde L-arjininin L-sitrulline dönüşümü sırasında ara ürün olarak olarak sentezlenmektedir. Nitrik oksit sentazın, ikisi konstitütif ve biri indüklenebilen olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır. İmmün sistemle ilişkili olan iNOS, çeşitli patojenik ajanlara karşı savunmayı sağlayan nitrik oksitin üretiminden sorumludur (Simmons ve Murphy, 1992; Magalhaes ve ark., 2006).

Yabancı ajanlara maruziyet sonucunda ortaya çıkan iNOS aktivasyonu ve yüksek düzeylerdeki NO sentezinin görüldüğü başlıca hücreleri makrofajlar oluşturmaktadır. İmmün yanıtın ortaya çıkmasında merkezi rol oynayan makrofajlar, ilk kez Aschoff tarafından tanımlanmış olan büyük fagositik hücrelerdir. Hemen her organda bulunurlar ve yerleştikleri dokuya bağlı olarak farklı şekilde isimlendirilirler.

(Gordon ve ark., 1992). Makrofajlar, gram-negatif bakterilerin dış membranında bulunan bir endotoksin olan lipopolisakkarit ve viral ve hücre içi bakteriyel infeksiyonlara karşı immün hücreler tarafından salınan bir sitokin olan interferon-γ ile aktive olabilmekte, bu aktivasyon makrofajların klasik aktivasyon modelini oluşturmaktadır. (Gordon, 2003; Dalton ve ark., 1993; Ehrt ve ark., 2001). Bu yolak üzerinden aktive olan makrofajlar hücre içi patojenlere karşı immün yanıtı oluştururlar. (Odegaard ve ark., 2008). Patojenler ve pro-inflammatuvar sitokinlerle aktivasyon, makrofajların konak canlının savunmasında görev yapan bir dizi geni ifade etmesine yol açar. Bu genlerin ifadesi, biyoaktif lipidler, reaktif oksijen ve nitrojen türleri, ve matriks metalloproteinazlar gibi pek çok pro-inflammatuvar aracının salınması ile sonuçlanır. Aktif makrofajlar tarafından nitrik oksit sentaz (NOS-2) gen ekspresyonunun uyarılması ve buna bağlı olarak nitrik oksit sentezinin artması, pek çok memelide doğuştan gelen immün yanıtın en temel sitostatik, sitotoksik, ve pro-apoptotik mekanizmaları arasında yer almaktadır. Geçtiğimiz on yıl içinde apoptozun anlaşılmasına yönelik önemli ilerlemeler kaydedilmiş ve apoptozun immün sistemin regulasyonundaki rolü tartışılmaksızın kabul edilmiştir. Ancak, hayatta kalma ve apoptozun regülatörlerinin karmaşık ağlarının immün sistemde, hücre ömrünü nasıl belirlediği hala gizemini korumaktadır.

Makrofajların LPS ve IFN-γ ile sinerjik olarak aktivasyonu sonucunda sentezlenen yüksek düzeydeki nitrik oksitin pro-apoptotik aktivitesi günümüzde artık net olarak bilinmektedir. Aktif makrofajlarda nitrik oksit bağımlı apoptoz, mitokondri membran potansiyelinin azalması, mitokondriden sitokrom c salımı, tümör baskılayıcı p53 ekspresyonunun uyarılması ve Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerinin birikimi ile gerçekleşmektedir. NOS tarafından yüksek düzeylerde sentezlenen NO, bakteriostatik ve bakteriotoksik etkiler gösterir ancak çevre dokuları etkileyerek, septik şok, otoimmün hastalık gibi çeşitli otoinflamatuvar hastalıklarda ve immün-aracılı sitotoksik etkilerin ortaya çıkmasında patolojik rol de üstlenebilmektedir (Moncada ve ark., 1993; Nathan ve ark., 1992). Makrofaj apoptozunun immün sistemdeki rolü oldukça karmaşıktır. Fagositoz gibi makrofajdaki fizyolojik fonksiyonların çoğu hücre bütünlüğünün korunmasına ve oto-apoptotik yanıtın azalmasına ihtiyaç duyar. Bu paradoksal bir durumdur, çünkü makrofajların fonksiyonlarını gerçekleştirebilmeleri ve canlı olarak tutulmaları için apoptozdan

korunmalarına ihtiyaç duyulmakta ancak, patojenlerin hücre içi parazitik etkilerinden kaçınmak için apoptotik ölüm de önem taşımaktadır. Bu bağlamda, programlanmış hücre ölümü veya apoptoz, inflamasyonun resolusyonu için son derece önemlidir (Savill ve ark., 2002) ve hücre ölümünün bu non-inflamatuvar mekanizmasına, inflammatuvar hücreleri temizlemek ve böylece makrofaj aktivasyonunu sonlandırmak için ihtiyaç duyulmaktadır (Fadok ve ark., 1998).

Bu makrofaj aktivasyon programının anormal ve kronik ifadesi ve apoptotik yolaklardaki hassas düzenlemenin bozulması temelinde inflammatuvar regulasyon bozukluklarının yattığı; artrit, ateroskleroz ve obezite ile indüklenen insülin direnci gibi metabolik hastalıkların da patogenezine eşlik etmekte (Odegaard ve ark., 2008), pro-inflamatuvar aracıların uzun süreli ve aşırı üretimi konak canlıya zararlı olabilmektedir (Alexander and Hilton, 2004). Bu nedenle, immün sistem hücrelerinin yaşam sürelerinin manipülasyonu ile inflamasyonun kontrol edilmesine yönelik stratejilerin ortaya konulması ve bu stratejilerin ışığında yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilmesi giderek önem kazanmaktadır. Bu bağlamda, apoptotik sürece müdahale edilerek bu sürecin yeniden düzenlenmesi ile kanser, kardiyovasküler ve otoimmün hastalıkların da aralarında bulunduğu oldukça geniş bir hastalık grubunda tedaviye katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

Son yıllarda, hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde, doğal kaynaklı ya da kimyasal olarak sentezlenen diyet destek preparatları yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu destek preparatları arasında; insan sağlığını iyileştirme ve interstisyel sistit, alerjik rinit, skleroderma gibi hastalıkların tedavisinde kullanımının yanısıra artritik ve romatizmal ağrıyı azaltma potansiyeli nedeniyle yaygın olarak kullanılan metilsülfonilmetan (MSM) ve MSM ile kombine preparatları bulunan glukozamin (GA) ve kondroitin sülfat (CS) da yer almaktadır (Brien ve ark., 2008; Felson ve ark., 2000).

Dimetilsülfon ($DMSO_2$) ve metil sülfon olarak da bilinen MSM, çeşitli meyvelerde, sebzelerde, tahıllarda ve hayvanlarda doğal olarak bulunan organik bir kükürt bileşiğidir (Pearson ve ark., 1981). GA ise, synovial sıvı, ligamentler ve diğer eklem yapılarında bulunan glukoproteinlerin ve glukozaminoglikanların sentezi için ihtiyaç

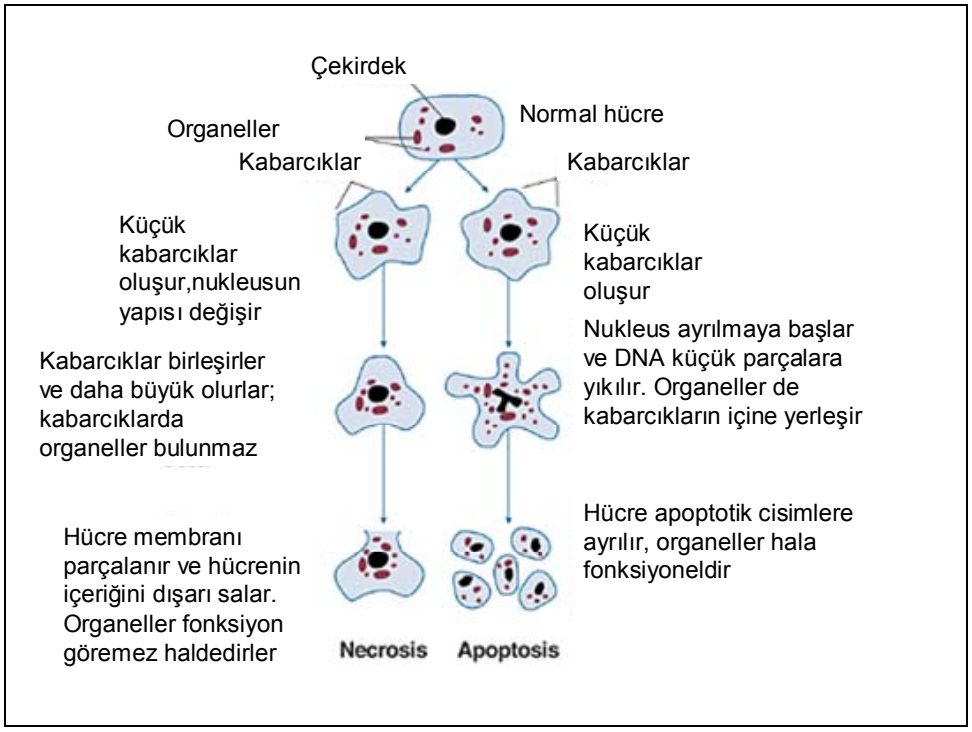
duyulan endojen bir amino şekerdir. Yine endojen bir glukozaminoglikan olan CS da eklem matriksinin oluşumunda önemli bir yapıtaşı görevini üstlenmektedir. GA ve CSın, tek başına veya bir arada kullanıldıklarında diz veya kalçanın osteoartriti için etkinlik gösterdikleri öne sürülmektedir ancak klinik çalışmalarda elde edilen sonuçların biyokimyasal temeline ilişkin bir fikir birliğine varılamamıştır (Richy ve ark., 2003; McAlindon ve ark., 2000; Towheed ve ark., 2005). Osteoartitin patogenezinin bazı doğal anahtar bileşenlerdeki bölgesel eksiklikle ilişkili olduğu ve GAin bu eksikliği gidermek üzere, kondrositler tarafından proteoglikan sentezini uyararak kartilaj tamiri için bir substrat olarak görev yaptığı düşünülmektedir (Pavelka ve ark., 2002). Kondroitin ise artikular kartilajda bulunan glikozaminoglikanların büyük bir bölümünü oluşturmakta, eklemlerdeki viskoziteyi sağlamakta ve kartilaj tamirini uyararak kartilajın dejenerasyonunu inhibe eden enzimlerin inhibisyonu yolu ile etki etmektedir (Lippiello ve ark., 2000).

MSM, CS ve GA' nın, pro-inflammatuvar aracıların kanda yüksek düzeylerde seyrettiği kronik bir inflamasyon tablosu ile karakterize olan osteoartrit hastalığının tedavisinde immün modülatör etkileri nedeniyle en yaygın ikili ve üçlü diyet desteği olarak kullanılmaları, (Stuber ve ark., 2011; Black ve ark., 2009) bu üç bileşiğin makrofajların apoptotik davranışları üzerindeki etkilerinin aydınlatılmasının oldukça önemli olabileceğini düşündürmektedir.

Bütün bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında LPS/IFN-γ ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücre serisi ile yüksek NO sentezine bağımlı olarak gerçekleşen inflammatuvar ve apoptotik yolakların aktive olduğu bir model oluşturularak bu hücre modeli üzerinde özellikle inflamasyona bağlı patolojik durumlarda destek preparatı olarak yaygın klinik kullanımı bulunan MSM, GA ve CS' nin ayrı ayrı ve kombine olarak test edilmeleri ve inflamasyon ve apoptoz üzerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

1.1 Apoptoz

Hücre sayısının homeostatik kontrolü, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dinamik dengenin sonucunda ortaya çıkmaktadır. Hücre ölüm süreci apoptotik veya nekrotik olarak tanımlanmaktadır (Goodlet ve Horn., 2001) (Şekil 1.1). Programlanmış hücre ölümünün başlıca mekanizması olan apoptoz, doku büyümesini düzenlemek ve homeostaziyi sağlamak için son derece önem taşıyan; fizyolojik olayları, hastalıkları ve toksisiteleri, hücre delesyonu aracılığı ile düzenleyen kontrollü bir tür hücre seleksiyonudur (Boscá ve ark., 1999). Apoptoz genellikle izole ve tek başına olan hücrelerde ortaya çıkar ve inflamasyon ve yara oluşumu gibi nekrozun karakteristikleri olan doku değişiklikleri apoptoz sırasında uyarılmaz. Apoptozu başlatıcı bileşikler arasında endojen düzenleyici proteinler, hormonlar, ksenobiyotikler, oksidatif stres, anoksi ve radyasyon gibi heterojen bir grup ajan bulunmaktadır (Bossy-Wetzel ve ark., 1998)



Şekil 1.1. Apoptoz ve nekrozun oluşum basamakları (Goodlet ve Horn., 2001).

Günümüze kadar, çeşitli hücre tiplerinde apoptozun ortaya çıkmasını düzenleyen bir dizi protein tanımlanmıştır. Bcl-2 protein ailesi, pek çok hücrenin farklı hücre dışı

agonistlere olan yanıtını düzenlemekte ve hücre canlılığı yönünde sinyalleme yapmakta (Campo ve ark., 2008), tümör baskılayıcı p53 ise negatif hücre büyümesine ve hücre ölümüne yol açmaktadır. Yabanıl tip nükleer fosfoprotein p53 hücre döngüsünde bir 'kontrol noktası ' gibi görev yapmakta (Hortelano ve ark., 1997), hasarlı DNA' nın tamirine izin vermekte veya aşırı hasar durumunda, hasarlı hücrelerin, değişime uğramış genetik materyallerinin bir sonraki nesile aktarılmasını engellemek üzere kendilerini yıkmalarına yol açmaktadır (Huser ve ark., 2008, Kim ve ark., 2002).

Apoptotik mekanizma ile ölen hücreler, kromatin kondensasyonu, nükleer fragmentasyon ve apoptotik cisimlerin oluşumu gibi morfolojik değişikliklere uğrarlar. Bundan başka, bu hücreler yüzeylerinde makrofajlar tarafından algılanarak fagositozu sağlayan 'beni ye' sinyallerini eksprese ederler (Aliprantis ve ark., 1996). Böylece apoptoz, hücre içi içeriğin hücre dışına çıkmadığı ve böylece oluşan antijenlere karşı immünolojik yanıtın sınırlandığı oldukça sıkı bir şekilde düzenlenen bir olgu olarak ortaya çıkmaktadır. Sadece immün sistemde, günde 10^9 hücreden daha fazla hücrenin apoptoza uğradığı (Boscá ve ark., 1999) ve bu hücrelerin komşu doku hücreleri veya profesyonel fagositler tarafından hızla parçalanarak inflammatuvar bir reaksiyon ortaya çıkmaksızın temizlendiği tahmin edilmektedir (Bossy-Wetzel ve ark., 1998; Campo ve ark., 2008). Aslında, patojenlerin fagositozu ve apoptotik hücrelerin alımı arasındaki en anlamlı fark immün yanıt olarak değerlendirilmektedir: Fagositozun ardından sıklıkla bir pro-inflammatuvar yanıt ortaya çıkarken apoptotik hücrelerin sindirilmesini anti-inflammatuvar sitokinlerin salımı takip eder (Hortelano ve ark., 1997). Apoptozun anormal regülasyonu, kanser (Aliprantis ve ark., 1996), nörodejenerasyon, kardiyovasküler hastalık, ve pekçok kompleks hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Apoptozun immünitedeki rolü de yoğun olarak incelenmiştir ve çeşitli çalışmalarda apoptozun bozulmasının veya apoptotik hücrelerin uzaklaştırılmasındaki mekanizmaların etkin olarak yürütülememesinin (Bossy-wetzel, 2008) sonucunda apoptoz ve otoimmünite arasında bir korelasyonun bulunduğu bildirilmiştir. Bunun yanında, yakın zamanda yapılmış olan çalışmalarda, apoptotik cisimlerin içinde otoantijenlerin bulunduğu ve bu otoantijenlerin apoptotik hücrelerin antijenlerinin sunumu (Moncada, 2010), doğuştan gelen immünitenin

aktivasyonu ve makrofaj sitokin sekresyonu (Brüne, 2008) için kritik oldukları gösterilmiştir. Apoptozun genetik düzenlemesine ilişkin ilk kanıtlar, Horvitz ve arkadaşlarının C.elegans üzerinde yapmış oldukları çalışmalardan elde edilmiştir. Bu prosesin aktive edici (Ced-4) ve inhibe edici (Ced-9) proteinlerle ilişkili olan bir hücre ölüm proteazı (Ced-3) içerdiği bilinmektedir. Böcekler, amfibiyanlar ve insanların da aralarında bulunduğu organizmalarda da homolog proteinler yer almaktadır. Ced-3, sistein proteazların kaspaz ailesinin kurucu üyesidir ve bu proteinlerin aşırı ifadelenmesi pek çok organizmada apoptotik morfoloji sergileyen hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (Horvitz, 2003).

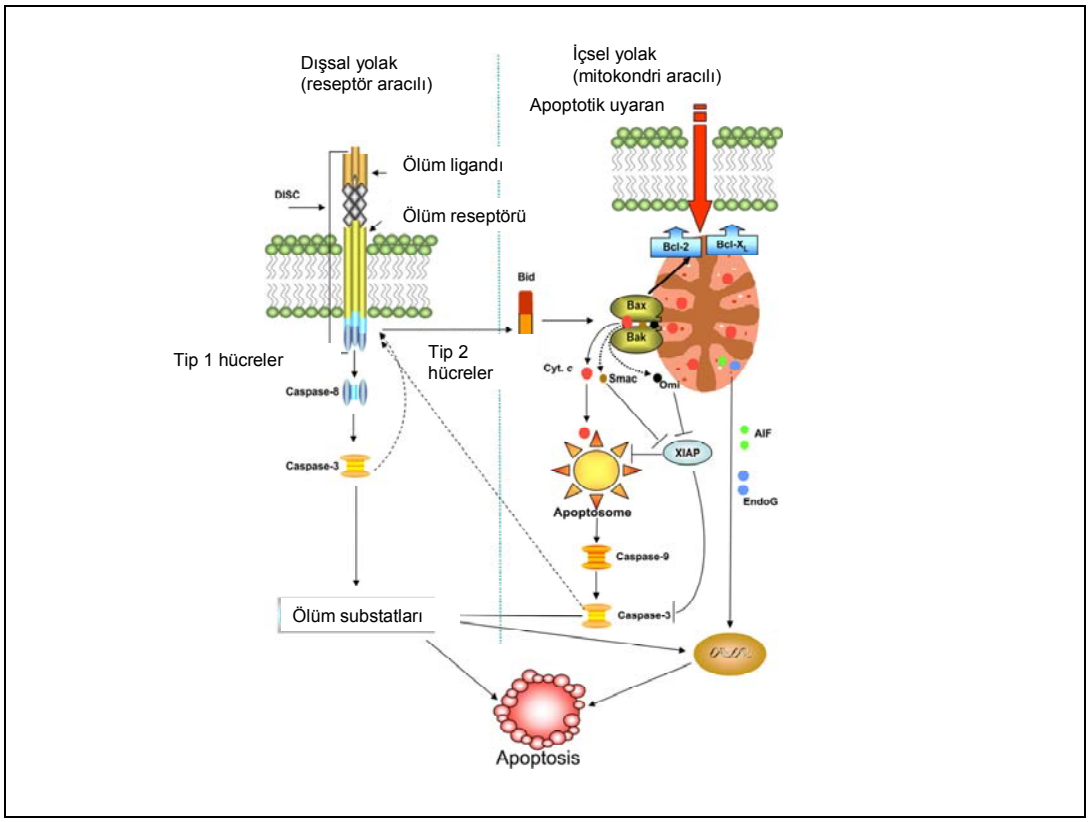
1.1.1 Apoptozda rol oynayan sinyal yolakları

1.1.1.1 Apoptozun dışsal yolağı

Memeli hücrelerinde majör sinyal yolakları apoptoza yol açabilmektedir. Bu sinyal yolakları arsında yer alan apoptozun *dışsal yolağı*, reseptörler aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bu yolakta, yüzey reseptörlerinin (CD95, TNFR1, Fas) ligasyonunu ölümü indükleyebilen sinyal kompleksinin (DISC) oluşumu ve prokaspaz-8'in aktivasyonu izler. Tip 1 hücrelerde, kaspaz-8 hedef proteinleri parçalayarak apoptoza yol açan prokaspaz-3' ü aktive etmektedir. Tip II hücrelerde ise, kaspaz-8, daha sonra Bax ve/veya Bak' ın mitokondriyal dış membrana translokasyonu, oligomerizasyonu ve girişini uyaracak olan Bid' i parçalar. Bu da Apaf-1 (apoptoz aktive edici faktör-1) ve prokaspaz-9 ile sitozolik bir apoptozom kompleksi oluşturacak olan sitokrom c gibi çeşitli proteinlerin mitokondriyal ara membran boşluğundan salınmasına yol açar. Bu süreç, prokaspaz-3' ün aktivasyonu ile kaspaz zincirini tetikleyen prokaspaz-9' un aktivasyonu ile sonuçlanır (Şekil 1.2) (Orrenius ve ark., 2010).

1.1.1.2 Apoptozun içsel yolağı

İçsel yolakta, ölüm sinyali direkt ya da indirekt olarak proapoptotik proteinlerin salımını uyarmak üzere mitokondri üzerine etki eder. Bu hücre ölüm yolağı Bcl-2 protein ailesi (sitokrom c salımının düzenlenmesi), apoptozun inhibitörü proteinleri (IAPs), kaspazların ikinci mitokondriyal aktivatörleri (Smac) ve Omi (IAPs' nin negatif düzenlenmesi) tarafından kontrol edilmektedir. İçsel yolak, apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz G (endoG) gibi iki proteinin mitokondriden salınarak nükleusa hareket ettiği kaspaz-bağımsız mekanizmalarla da gerçekleşebilmektedir. AIF' nin nükleer etkileri arasında kromatin kondensasyonu ve yüksek molekül ağırlıklı DNA fragmentlerinin oluşumu yer almaktadır. EndoG' nin hücre ölümündeki rolü ise hala net değildir. Apoptotik yanıtın tetikleyicisi DNA hasarı olduğunda, ilk aktive olan kaspaz prokaspaz-2' dir (Şekil 1.2). Bu aktivasyon da sitokrom c salımına ve apoptozom oluşumuna yol açmakta ancak asıl mekanizma net olarak bilinmemektedir (Zech ve ark, 2003).



Şekil 1.2. Apoptotik hücre ölüm yolaklarının şematik gösterimi (Orrenius, 2010).

Yakın zamanda, kaspaz-bağımsız, granzim A (GrA)-aracılı bir yolak da tanımlanmıştır (Fan ve ark., 2003). Bu yolakta ise, GrA hedef hücrenin sitoplazmasına perforin-aracılı porlar yolu ile girdikten sonra tek zincirli DNA parçaları ve apoptotik morfolojinin sergilendiği kaspaz-bağımsız bir yolağı aktive eder.

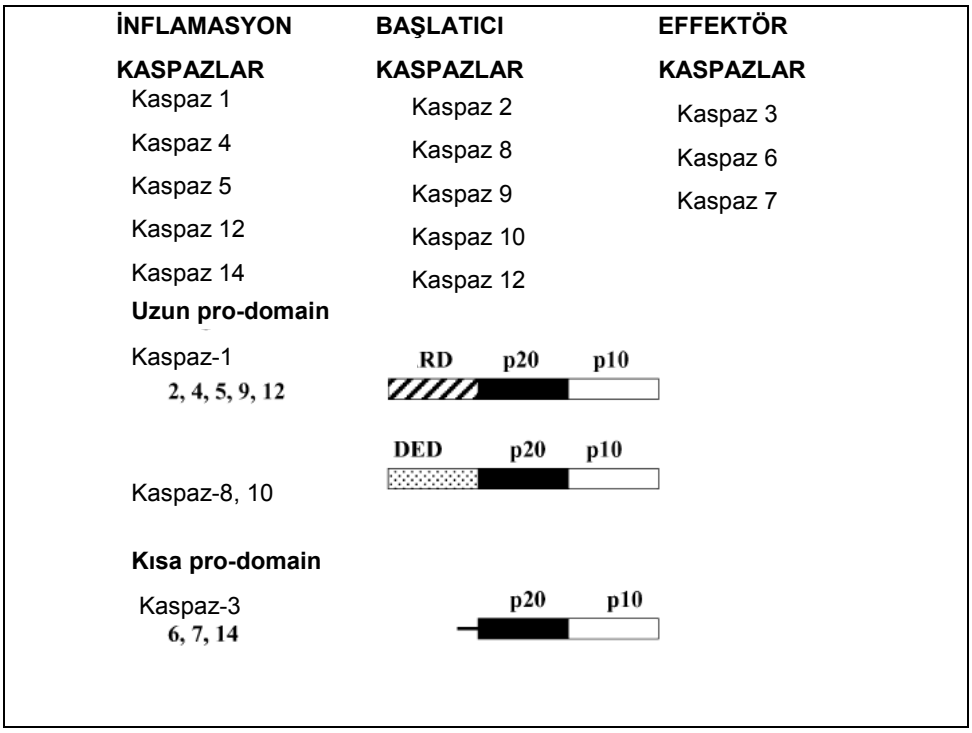
Apoptozun belirteçleri arasında apoptozun içsel ya da dışsal yolakları ile aktive olabilen kaspaz enzim ailesi yer almaktadır.

1.1.1.3 Kaspazlar

Kaspazlar, bir aspartat rezidüsünü izleyen bölgeden substratlarını parçalama yeteneğine sahip sisteinil aspartat proteazlar ailesidir. Kaspaz ailesinin ilk bilinen üyesi, IL1β' nın olgunlaşması için gerekli olan ve başlangıçta IL1β dönüştürücü enzim olarak tanımlanan kaspaz-1' dir (Thornberry ve ark., 1992; Cerretti ve ark., 1992; Nicholson ve ark., 1999). Kaspaz ailesinin üyeleri primer sekans ve substrat spesifiteleri açısından farklılık gösterebilmektedir; buna rağmen ortak çeşitli özellikleri de bulunmaktadır. Örneğin bütün kaspazlar bir N-terminal ön bölge, bir büyük alt ünite ve bir küçük alt ünite içeren inaktif zimojenler şeklinde sentezlenirler (Shi, 2002). Kaspaz zimojenleri küçük bir miktar katalitik aktiviteye sahip olsalar da çeşitli düzenleyici moleküller tarafından kontrol altında tutulmaktadırlar. Kaspazların olgunlaşması bir aspartat rezidüsünde gerçekleşen kaspaz aracılı parçalanma sonucunda gerçekleşmektedir (Boatright ve ark., 2003). Apoptotik bir sinyal alındıktan sonra, kaspaz zimojenleri aktif enzimi ortaya çıkaran iki alt üniteyi oluşturmak üzere proteolitik işlenmeye uğrarlar (Fuentes-Prior ve Salvesen, 2004; Degterev ve ark., 2003). Sonuç olarak oluşan her bir aktif kaspaz iki benzer büyük alt ünite ve iki benzer küçük alt üniteyi içeren bir tetramer şeklindedir (Salvesen ve Abrams, 2004).

Kaspazlar fonksiyonlarına göre gruplandırılmaktadırlar (Şekil 1.3). Sitokinlerin olgunlaşmasında görev yapan ilk grup kaspazlar 1, 4, 5 ve 14'ü içermektedir (Los ve ark., 2003). Bu kaspazların apoptoz sürecindeki rolü açık değildir. İkinci grupta yer alan kaspaz 2, 3, 6, 7, 8, 9 ve 10 ise apoptozda görev yapmaktadır. Kaspaz 2, 8, 9,10 ve 12 algılanabilen homotipik protein-protein interaksiyon motiflerine sahip büyük ön bölgeler içermektedir. Bu bölgeler arasında çeşitli sinyallerin proteolitik aktiviteye iletilmesini sağlayan ölüm effektör domaini (DED) veya kaspaz yapıya katılma domaini (CARD) de bulunmaktadır. İki majör başlatıcı kaspazlar (Kaspaz 8 ve 9), sitozolde asıl effektör prokaspaz 3' ün aktivasyonu ile sonuçlanan farklı yolaklar aracılığı ile fonksiyon gösterirler. Kaspaz 3, 6 ve 7 ise effektör kaspazlar olarak bilinmektedirler. Bu kaspazların zimojenleri kısa ön bölgeler içerirler ve içsel enzimatik aktiviteden yoksundurlar (Şekil 1.3). Prokaspazlar proteolitik aktivasyon sonrasında aktive olurlar, bu aktivasyon çoğu zaman kendileri tarafından başlatılır ve büyük ve küçük alt üniteler arasındaki parçalanma ile sonuçlanır (Degterev ve ark., 2003). Başlatıcı kaspazlar, üzerinde hala tartışılan bir mekanizma ile aktive olurlar, bu mekanizma başlatıcı kaspazlar tarafından gerçekleştirilen proteolitik bir kaskad sonucunda zimojenin ve effektör kaspazın bölgesel konsantrasyonunda bir artışa yol açar (Shi, 2004). Effektör kaspazlar DNA fragmentasyon faktörü 45 (DFF45), poli-(ADP-riboz) polimeraz (PARP) ve lamin gibi nükleer apoptozun karakteristikleri arasında yer alan bilinen apoptotik substratların çoğunun yıkımından sorumludur (Fischer ve ark., 2003).

Effektör kaspazların başlatıcı kaspazlar tarafından aktivasyonunda görev yapan iki temel hücresel yolak bulunmaktadır: Bu yolaklar, başlatıcı kaspazlar olarak kaspaz 8 ve 10 ile gerçekleşen ölüm reseptör yolağı ve başlatıcı kaspaz 9 ile gerçekleşen ve apoptozomun ve kaspaz 3, 6 ve 7' nin aktive olduğu mitokondiryel yolaktır. Sitozolik proteinlerin bir ailesi olan IAPs (apoptozun inhibitörü olan proteinler) effektör kaspazlarıon nötralizasyonundan sorumludur (Degretev ve ark., 2003).



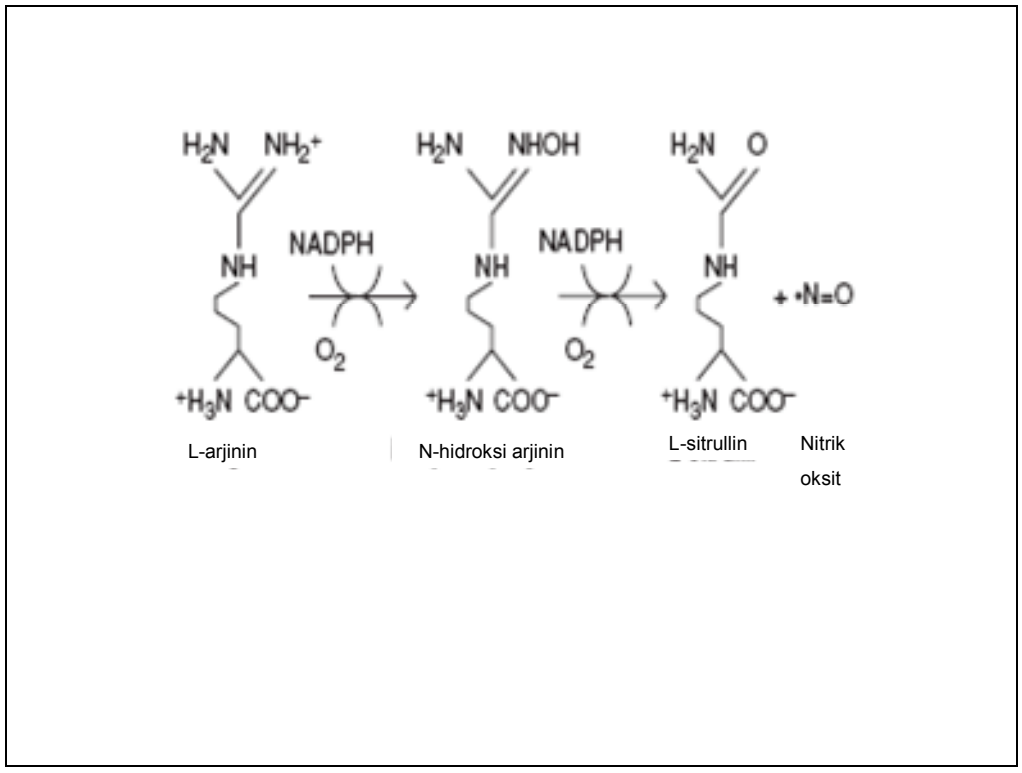
Şekil 1.3. Kaspaz ailesinin üyeleri (Fischer ve ark., 2003).

Kaspazların da görev yaptığı intrinsik yolak aracılı apoptozda rol oynayan ve bu yolak üzerinden hücre ölümünü uyaran moleküller arasında, önemli fizyolojik ve hücresel görevler üstlenen aracı molekül nitrik oksit de yer almaktadır. Nitrik oksit organizmada üç farklı formu bulunan nitrik oksit sentaz enzim ailesi tarafından sentezlenmektedir.

1.2 Nitrik oksit sentaz ailesi ve iNOS

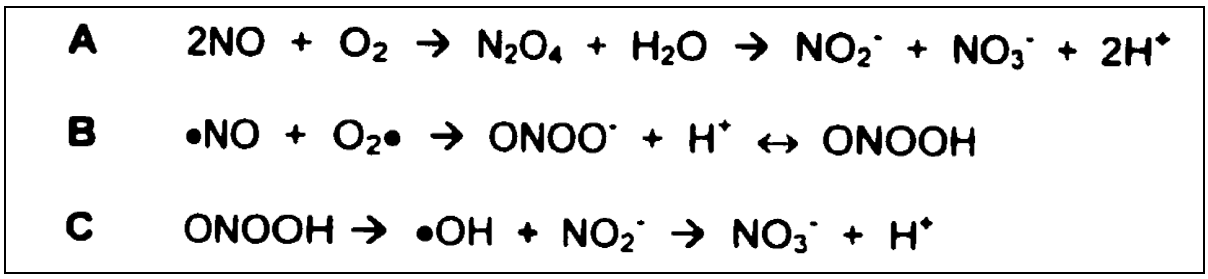
NOS geninin ürünü olan NOS enzimi, L-arjininin L-sitrulline oksidasyonunu katalizler ve bir RNS olarak kabul edilen nitrik oksit radikalini (●NO) oluşturur. Nitrik oksit sentaz (NOS) geni, kanser gibi çeşitli kronik hastalıkların gelişimi ile ilişkilendirilmektedir (Tamir ve Tannenbaum., 1996). Nitrik oksit sentezi ile sonuçlanan reaksiyon (Şekil 1.4), oksijen ve ko-substrat nikotinamid adenin

dinükleotid fosfat (NADPH) varlığında nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından katalizlenir. NOS, flavonlar ve tetrahidrobiyopterin gibi çeşitli ko-faktörlere ihtiyaç duyar (Singh ve Ewans., 1997).



Şekil 1.4. Nitrik oksitin sentezinde görev alan kimyasal reaksiyonlar. L-arjinin, L-sitrullin ve nitrik oksite dönüştürülür (Nathan, 1992).

Aşağıdaki reaksiyon dizisi günümüzde bilinen ●NO metabolizmasını ortaya koymaktadır (Şekil 1.5) (Beckman ve ark., 1990). ●NO' in normal metabolitleri nitrit (NO2-) ve (NO3-)' tır.



Şekil 1.5. Nitrik oksitin metabolizması (Nathan, 1992).

NOS geninin üç izoformu bulunmaktadır. Nöronal NOS (nNOS) ve endoteliyal NOS (eNOS) sürekli olarak eksprese olurlar ve bu genlerin ürünleri olan enzimler sadece düşük düzeylerde ve kısa zaman periyotları için ●NO sentezlemektedirler (Nathan, 1992). İndüklenen nitrik oksit sentaz (iNOS) ise reaktif oksijen türleri (ROT) veya diğer oksidanların düzeylerinde artışa neden olan olaylar (reseptöre sitokin bağlanması) tarafından indüklenmektedirler. iNOS' un normal ekspresyonu, mikroorganizmalar, patojenler ve tümör hücreleri tarafından istilaya karşı kendini savunma gibi çok önemli fizyolojik etkiler için hayatsal önem taşımaktadır (Snyder ve Bredt, 1992). Makrofajlar tarafından sentezlenen ●NO, makrofajdan diffüzlenerek 1) DNA sentezinin inhibisyonu, 2) glikolizdeki ve sitrik asit döngüsündeki belirli enzimlerin bozulması, 3) elektron taşıma zincirinin inhibisyonu aracılığı ile tümör hücrelerinin öldürülmesinde kritik rol oynamaktadır (Snyder ve Bredt, 1992, Moncada ve ark., 1991).

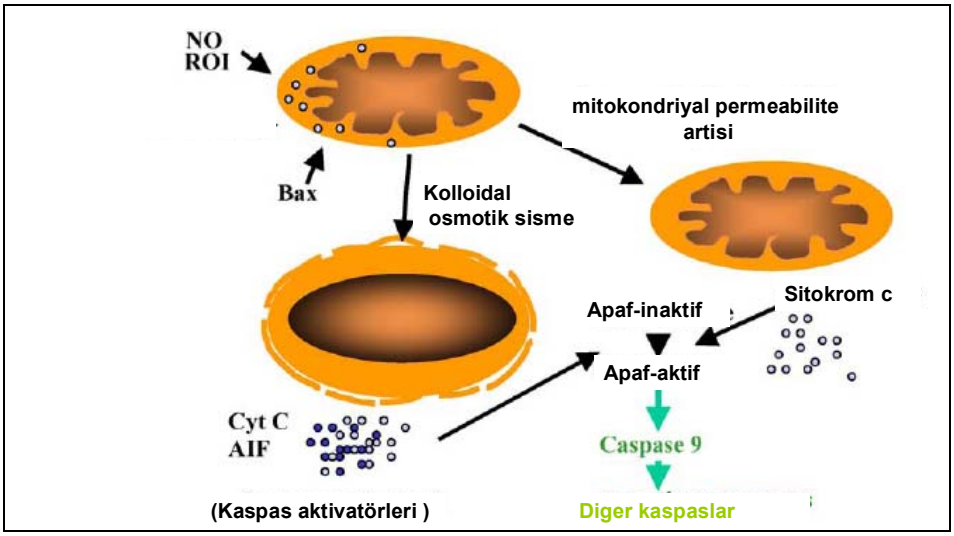
1.2.1 Nitrik oksitin biyolojik rolleri

Nitrik oksit (NO), hücreler arasında serbest olarak difüzlenebilen kısa ömürlü bir gaz ve serbest radikal moleküldür. Geçtiğimiz yıllarda NO' nun çok çeşitli biyolojik etkileri gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Brüne, 2002). Bu etkilerin en önemlilerinden bir tanesi NO' nun tümör hücreleri ve mikroorganizmalar için gösterdiği sitotoksik etkidir (Moncada, 1999). Bu bağlamda, NO-aracılı sitotoksisiteden sorumlu prototip effektör hücreler olan makrofajların kendilerinin de NO için hedef oldukları ve iNOS ekspresse etmek üzere aktive edildiklerinde prematüre olarak öldükleri şaşırtıcı bir şekilde belirlenmiştir (Hortelano, 2003). Makrofajların NO üretimi ile ilişkili olarak uğradıkları hücre ölüm mekanizmalarına ilişkin iki farklı mekanizma öne sürülmüştür. Bu mekanizmalar, katastrofik toksik veya travmatik olaylar tarafından ortaya çıkan ve bu nedenle pasif, düzensiz, ve rastgele bir şekilde ortaya çıkan nekroz ve kendine özgün tanımlayıcı morfolojik ve moleküler karakteristikler sergileyen aktif bir süreç olan programlanmış hücre ölümü veya apoptozdur (Bosca, 1999). Apoptoza uğrayan hücreler morfolojik olarak tipik nükleer ve sitoplazmik kondensasyona uğrarken nekroza uğrayan hücrelerde organeller şişer, erken

membran bozulması, ve bunu izleyen bütünlük kaybı meydana gelir. Moleküler çıkış noktasından bakıldığında apoptotik hücrelerin nükleer DNA' sı endonükleaz aracılığı ile 180-200 bp lik spesifik fragmentasyona uğrarken nekrotik hücrelerden izole edilen DNA ise elektroforetik jel üzerinde rastgele DNA parçalanması ile karakterize diffüz bir simir görüntüsü oluşturur. Morfolojik ve moleküler kanıtlar NO üretimi ile ilişkili makrofaj ölümünün apoptotik mekanizmalar aracılığı ile gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. (Albina ve ark., 1993).

1.2.2 NO-aracılı apoptozun mekanizmaları

Nitrik oksitin, hücre yaşamının ve ölümünün bir regulatörü olarak aktivitesinin önemli bir bölümü, mitokondriyal fonksiyon üzerine olan etkisinden kaynaklanır. Nitrik oksit, biyoenerjetik yolakların çeşitli enzim bileşenlerindeki substrat bağlama bölgeleri için oksijenle yarışır ve aynı zamanda pek çok mitokondriyal proteinde bulunan 'hem' ve demir-sülfür kümeleri ile kompleksler oluşturarak katalitik aktiviteye etki eder. Buna ek olarak, NO, doğrudan mitokondriyal iç potansiyeli bozma ve izole mitokondride 'şişme' yi uyarma potansiyeline de sahiptir. Bu fenomenlerin her ikisi de mitokondriyel-apoptotik yolağın erken basamaklarıdır (Hortelano ve ark., 1997; Bossy-Wetzel ve ark., 1998; Costa ve ark., 2003; Radi ve ark., 2002; Brown ve Borutaite, 2002; Boveris ve ark., 2002; Brookes ve ark., 2002; Kuwana ve ark., 2002). İzole mitokondri ya da intakt hücrelerin NO donorleri ile (inflamatuvar koşullarda etkili olan konsantrasyonlarda ya da yüksek iNOS ekspresyonunda oluşan NO düzeylerinde) inkübasyonu sonrasında sitokrom c' nin ve apoptoz indükleyici faktörün (AIF) salınımı saptanmıştır. Mitokondri, yüksek konsantrasyonlardaki NO' yu algılayarak mitokondriyal membranlar arası boşluktaki pro-apoptotik bileşenleri (sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktör(AIF)) salar. Bu aracı moleküllerin salımı, mitokondriyal iç membran potansiyelindeki artışın ya da azalmanın her ikisinden de kaynaklanabilir. NO, bu aracıların nitrozilasyonunu ve/veya nitrasyonunu teşvik edebilir (Bosca ve ark., 2005). (Şekil 1.6).



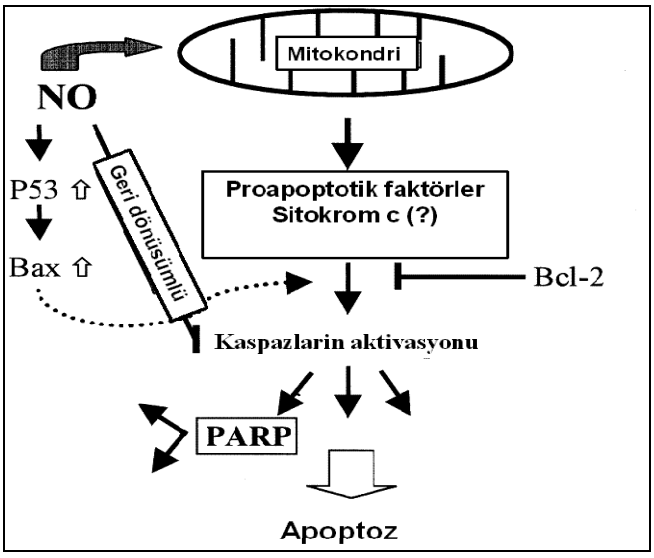
Şekil 1.6. NO-bağımlı apoptozun mekanizmaları (Bosca ve ark., 2005)

NO' nun hücre canlılığı üzerine etkisi oldukça değişkendir. NO, hücre tipi ve oluşan konsantrasyonuna bağlı olarak hücre canlılığını ya da apoptotik ölümü indükleyebilmektedir (Hortelano ve ark., 1999; Bosca and Hortelano, 1999). Örneğin makul NO konsantrasyonları, B lenfositlerinde bazal apoptozu (Mannick ve ark., 1994), hepatositlerde potent bir sitokin olan TGF-β tarafından indüklenen apoptozu ve çeşitli hücresel inflamasyon modellerinde Fas-bağımlı apoptozu inhibe etmektedir. NO' nun bu koruyucu etkilerine ilişkin çeşitli etki şekilleri belirlenmiştir. Bunlar arasında, başlangıç pro-apoptotik sinyal yolağının 'desensitizasyonu', prokaspazların işlenmesi sonucu kaspaz aktivitesinin inhibisyonu (Zech ve ark., 2003), ve apoptoz inhibitör ailesinin (IAP) anti-apoptotik genlerinin ekspresyonu bulunmaktadır (Wang ve ark., 1998).

Kaspazlar, sistein/histidin katalitik bir mekanizma ile spesifik protein yıkımını katalizleyen proteazlar ailesidir, ancak aktif olmak için intermoleküler işlenmeye ihtiyaç duyarlar. Kaspaz enzimlerinin aktif bölgeleri, NO tarafından S-nitrozilasyona duyarlı bir sistein rezidüsü içerirler. Bu özellik, NO tarafından apoptozun regulasyonunda olası bir fizyolojik mekanizma ile ilişkilidir (Kim ve ark., 2002; Laubach ve ark., 1995; Mannick ve ark., 2001; Thornberry ve Lazebnik, 1998; Shi, 2002; Zech ve ark., 1999; Torok ve ark., 2002).

NO-bağımlı apoptozla bağlantılı erken olaylardan bir tanesi, NO' nun neden olduğu hücre stresini yansıtan tümör supressor ürünü p53'deki birikim ve hızlı artıştır (Ambs ve ark., 1997; Calmels ve ark., 1997). P53, genomik stabilitenin kontrolünde merkezi role sahiptir, p53' ün bazal düzeyi hücreler arasında değişiklik gösterse de NO varlığında, UV ışığa maruziyet ya da DNA hasarından sonra bu düzeylerde bir artış gözlenmektedir (Ambs ve ark., 1997; Calmels ve ark., 1997; Agarwal ve ark., 1998).

NO-bağımlı p53 birikimi apoptozda görev yapan çeşitli proteinlerin ekspresyonuna yol açar. Bu proteinlerden bir tanesi, peritoneal makrofajlar gibi dinlenme halindeki hücrelerde düşük düzeylerde bulunan Bax' tır. p53' deki artışı takiben, Bax düzeyleri yükselir ve Bcl-2 ailesinin diğer üyeleri ile heterodimerizasyon sonrasında Bax apoptozu uyarır NO, mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna yol açar ve proapoptotik faktörlerin salımını indükler. Bu etki, kaspaz inhibitörleri tarafından inhibe edilebilir. Alternatif olarak, NO çeşitli kaspazların geri dönüşümlü inhibisyonunu uyararak apoptozdan koruma sağlar. Yüksek düzeylerdeki anti-apoptotik proteinler (Bcl-2) NO-bağımlı apoptozu inhibe eder (Yang ve ark., 1997; Kroemer ve ark., 1997).. Hücrelerin NO' ya maruziyeti p53' ün konsantrasyona bağımlı artmış regulasyonuna yol açar, bu da Bax gibi apoptogenik proteinlerin ifade edlmesini uyarır (Bosca ve Hortelano., 1999) (Şekil 1.7)



Şekil 1.7. Apoptozun NO-bağımlı regulasyonu (Bosca ve Hortelano, 1999).

NO; p53 ve Bcl-2 ailesinin proteinlerinin kontrolü üzerine olan etkilerinin yanında, DNA yıkımını tetikleyen mitokondriyal pro-apoptotik aracıları salarak da hücre canlılığını düzenlemektedir (Kroemer ve ark., 1997; Hortelano ve ark., 1997). NO, bu apoptotik mekanizma ile ilgili olarak, büyük bir mitokondriyal membran geçişini uyarır. Apoptoza uğrayan hücrelerde, mitokondriyal solunum zincirinde elektron taşıyıcısı olarak rol alan sitokrom c sitoplazmaya salınır (Şekil 6) (Barinaga ve ark., 1998; Yang ve ark., 1997; Bossy-Wetzel ve ark., 1998).

1.3 NO aracılı apoptozun patolojik etkileri

iNOS tarafından yüksek düzeylerde sentezlenen NO, bakteriostatik ve bakteriotoksik etkiler gösterir, fakat aynı zamanda çevre dokuları etkileyerek, septik şok, otoimmün hastalık gibi çeşitli otoinflamatuvar hastalıklarda ve immün-aracılı sitotoksik etkilerin ortaya çıkmasında patolojik rol de üstlenebilmektedir (Moncada ve ark., 1993; Nathan ve ark., 1992). NO' nun progresif oluşumunun sitotoksik olduğu ve nekrotik olayları indükleyebildiği bilinmektedir. Bundan başka, NO, makrofajlar (Velasco ve ark., 1997; Kim ve ark., 1997; Li ve ark., 1997), β-hücreleri (Ambs ve ark., 1997), ve timositler (Calmels ve ark., 1997) gibi çeşitli hücrelerde apoptozun biyokimyasal yolaklarını indükleyebilmektedir.

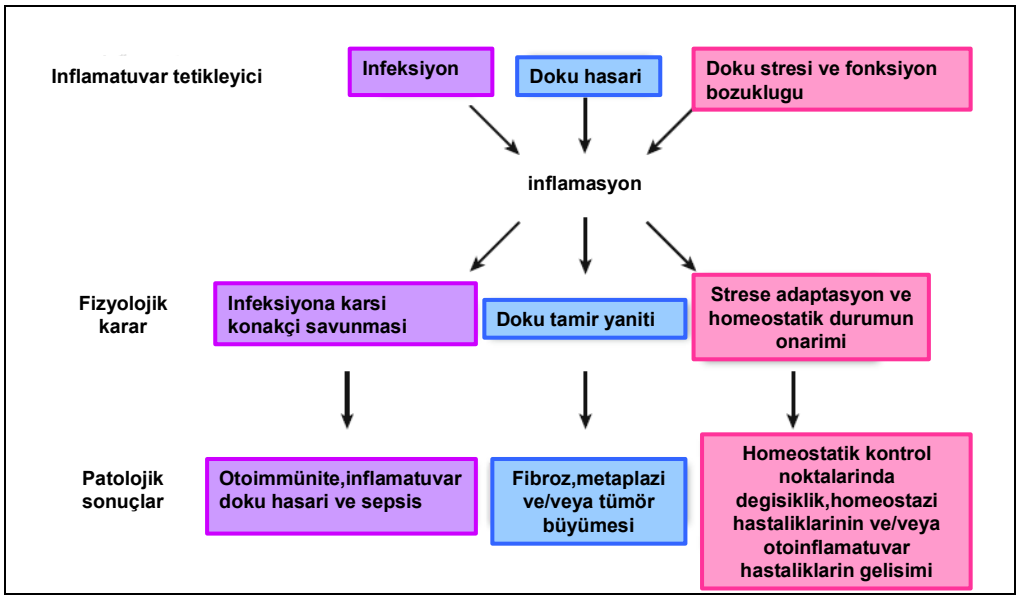
NO' nun proapoptotik etkilerinden sorumlu olan NO türleri tam olarak bilinmemektedir. Bazı araştırmacılar, NO' nun belirlenen proapoptotik etkilerinin NO ile $O^{-}_{2}{}^{\cdot}$ nin reaksiyon ürünü olan $ONOO^{-}$ (peroksinitrit) oluşumunun sonucunda ortaya çıktığını ileri sürmektedir (Petit ve ark., 1998; Aliprantis ve ark., 1996).

Nitrik oksit, immünite ve inflamasyonla ilişkili pekçok hücre tipi tarafından sentezlenmekte, özellikle iNOS tarafından uzun süreli ve yüksek düzeydeki NO sentezi infeksiyöz ajanlara karşı savunma molekülü olarak görev yapmaktadır. Geçtiğimiz yıllarda yapılan çalışmalar, nitrik oksitin akut ve kronik inflamasyonda da önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır (Bogdan, 2001; MacMicking ve ark., 1997; Nathan ve ark., 1992).

1.4 İnflamasyon

İnflamasyon, infeksiyon ve doku hasarı gibi zararlı uyaranlar ve durumlar tarafından tetiklenen adaptif bir yanıttır (Majno ve Joris, 2004; Kumar ve ark., 2003; Medhzitov, 2008) (Şekil 1.8). İnfeksiyona karşı akut inflamatuvar yanıtın ortaya çıkmasında rol oynayan hücresel ve moleküler olayların açıklığa kavuşmasında büyük ilerleme kaydedilmiş, kronik infeksiyonlar ve otoimmün hastalıklar gibi bölgesel kronik infeksiyona yol açan patolojiler ise kısmen anlaşılmıştır. Tip 2 diyabetin ve kardiyovasküler hastalıkların da aralarında bulunduğu çok geniş bir hastalık grubunda ortaya çıkan sistemik kronik inflamasyonun etkenleri ve mekanizmaları hakkında günümüzde çok az şey bilinmektedir. Buna göre, akut inflamasyonda, hasarlı bölgeye infiltre olmak üzere immün ve immün olmayan hücrelerin bir dizi sitokin ve kimokinle aktif hale getirilmesi gerçekleşir. Akut inflamasyon süreci genellikle kendi kendini sınırlayıcı niteliktedir çünkü iyileşme gerçekleşirken pro-inflamatuvar sitokinlerin yerini anti-inflamatuvar sitokinler alır. Akut inflamasyonla karşılaştırıldığında tanımlanması daha zor olan kronik inflamasyonda ise mononükleer hücreler, nötrofiller, makrofajlar, lenfositler ve plazma hücreleri görev yapmakta ve aktif doku yıkımı ve tamiri aynı anda gerçekleşmektedir (Medzhitov, 2008).

Bu iyileşme sürecinin başlıca bileşenleri anjiyogenez ve fibrozistir. İnflamasyonun kanser üzerindeki etkilerine ilişkin farklı görüşler bulunmakla birlikte akut inflamasyonun kanser gelişimine karşı koyduğu, kronik inflamasyonun ise bunun tersine teşvik ettiği düşünülmektedir (Philip ve ark., 2004). Kronik inflamasyonun, inflamasyonun klasik öğeleri olan infeksiyon ve hasar tarafından başlatılmadıkları düşünülmektedir. Bunun yerine, konak savunması veya doku tamiri ile fonksiyonel olarak doğrudan ilişkili olmayan çeşitli fizyolojik sistemlerden birindeki homeostatik dengesizliğe bağlı oluşan doku bozukluğundan kaynaklandıkları düşünülmektedir. İnflamatuvar yanıt, tetikleyici etkene bağlı olmak üzere farklı fizyolojik ve patolojik sonuçlara yol açar. Üç olası başlangıç uyaranından, sadece infeksiyonla-indüklenen inflamasyon, bir immun yanıtın indüksiyonu ile kenetlenmiştir (Medzhitov, 2008).



Şekil 1.8. İnflamasyonun sebepleri, ve fizyolojik ve patolojik sonuçları (Medzhitov ve ark., 2008).

Uyaranlara karşı oluşan kontrollü inflamatuvar yanıtın (örneğin, infeksiyona karşı koruma sağlayarak) yararlı olduğu, ancak bu yanıtta meydana gelen düzenleme bozukluklarının (örneğin, septik şoka yol açarak) zararlı olduğu düşünülmektedir. Böylece, her patolojik inflamatuvar durumun fizyolojik bir karşılığı bulunmaktadır. Temel düzeyde, infeksiyon veya doku hasarı ile tetiklenen akut inflamatuvar yanıt, kan bileşenlerinin (plazma ve lökositler) infeksiyon veya hasar bölgesine koordine olarak salımını içermektedir (Majno ve Joris, 2004; Kumar ve ark., 2003). Bu yanıt, Toll-benzeri reseptörler (TLR) gibi doğuştan gelen immün sistemin reseptörleri tarafından tetiklenen mikrobiyal infeksiyonlar için çok iyi şekilde karakterize edilmiştir (Barton, 2008). İnfeksiyonun bu ilk algılanması, kemokinler, sitokinler, vazoaktif aminler, eikozanoidler ve proteolitik yolakların ürünleri gibi bir dizi inflamatuvar aracı tarafından gerçekleşir. Bu aracıların en temel ve hızlı etkisi bölgesel bir inflamatuvar yanıt yaratmaktır: Normalde kan damarları ile sınırlı bulunan plazma proteinleri ve lökositler (başlıca nötrofiller), postkapiller venüller aracılığı ile infeksiyonlu veya hasarlı bölgelerdeki ekstravasküler dokulara ulaşırlar. Kan damarlarının aktive olmuş endoteli nötrofillerin selektif ekstravazasyonuna olanak tanırken eritrositlerin çıkışına engel olur (Pober ve Sessa, 2007). Nötrofiller, etkilenen doku bölgesine ulaştıklarında doğrudan patojenlerle temas ya da dokuda yerleşik hücreler tarafından salınan sitokinlerin etkileri sonucunda aktive olurlar.

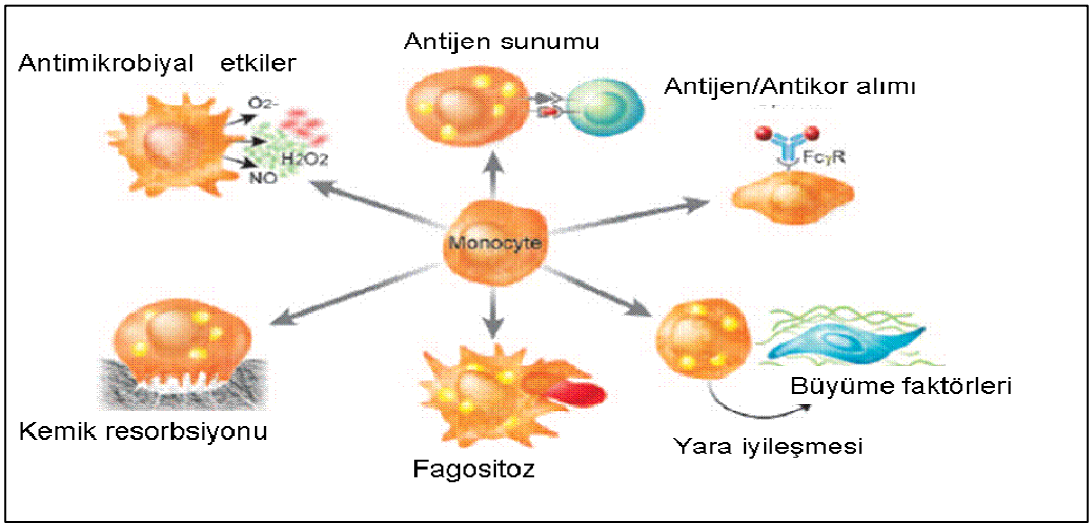
Nötrofiller granüllerinden reaktif oksijen veya nitrojen türleri gibi toksik içerikleri salarak istilacı ajanları öldürmeye çalışırlar (Nathan, 2006). Bu oldukça potent effektörler mikrobiyal hedefler ve konak arasında ayrım yapamadıkları için konak dokularına kaçınılmaz hasar meydana gelebilmektedir (Nathan, 2002). Başarılı bir akut inflamatuvar yanıt, infeksiyöz ajanların eliminasyonunu izleyen, başlıca makrofajların aracılık ettiği rezolusyon ve tamir fazı ile gerçekleşir (Serhan ve Savill., 2005).

Akut inflamatuvar yanıt ile patojen elimine edilemezse, inflamatuvar süreç devam eder ve yeni karakteristikler kazanır. Nötrofil infiltrat makrofajlarla veya T hücreleri ile yer değiştirebilir. Bu hücrelerin kombine olarak etkileri yetersiz olduğunda ise granülomalar ve tersiyer lenfoid dokuların oluşumunu içeren kronik bir inflamatuvar durum ortaya çıkmaktadır (Kumar ve ark., 2003; Drayton ve ark., 2006). Bu inflamatuvar durumun karakteristikleri ortamda bulunan T hücrelerinin efektör sınıfına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Kronik inflamasyon, ısrarcı patojenlere ek olarak otoimmün yanıtlar gibi doku hasarının diğer etkenlerinden veya parçalanamayan yabancı antijenlerden kaynaklanabilmektedir. Makrofajların patojenleri veya yabancı cisimleri parçalamasındaki başarısızlıklar, konağı korumaya yönelik son bir girişim olarak granülomaların oluşmasına yol açar (Majno ve Joris, 2004; Kumar ve ark., 2003).

1.5 Makrofajların fonksiyonları

Doğuştan gelen immünitede görev yapan başlıca hücreler olan makrofajlar, hemen her dokuda yerleşik durumdadırlar ve hücre yüzey belirteçleri, yerleşimleri ve fonksiyonlarına bağlı olarak anlamlı heterojenite sergilerler (Gordon ve ark., 1992). Bu uzun ömürlü yerleşik doku makrofajları, konak savunması, hücre debrisinin uzaklaştırılması, dokuların tekrar modellenmesi ve inflammatuvar yanıtın düzenlenmesi gibi pekçok fonksiyon üstlenmektedirler. Monositik hücreler, son derece büyük bir fonksiyonel heterojenite gösteren dokulardaki yerleşik hücrelere ve sonradan alınan hücrelere dönüşmektedirler (Sunderkotter ve ark., 2004).

Makrofajlar inflammatuvar ve respiratuvar patlama yolu ile ve adaptif immüniteyi aktive etmek üzere antijen sunumunu başlatarak hücre içindeki patojenlere karşı savunmanın ilk adımını atarlar. Splenik kırmızı makrofajlar ve osteoklastlar gibi bir kısım doku makrofajları ise yerleşimlerinde ve fonksiyonlarında yüksek derecede özelleşmişlerdir. Splenik kırmızı pulp makrofajlar senesan kırmızı kan hücrelerinin geri dönüşümü ve temizlenmesi için adapte olurken osteoklastlar ise erişkinin hayatı boyunca kemiğin tekrar modellenmesi için kritik önem taşımaktadır (Şekil 1.9). Dolaşımdaki monositlerin doku yerleşik makrofajlara dönüştüğü bilinmekte (Gordon ve Taylor, 2005), ancak makrofajların farklı fonksiyonel altgruplara özelleşmelerini düzenleyen yolaklar büyük ölçüde bilinmemektedir. Bununla birlikte, osteoklastlar ve splenik kırmızı pulp makrofajlar adı verilen iki tip doku makrofajı için sinyal ve transkripsiyonel yolaklar aydınlığa kavuşturulmuştur.



Şekil 1.9. Yerleşik ve alınan makrofajların fonksiyonel heterojenitesi (Ajay, 2010).

1.6 Makrofaj aktivasyonu ve fonksiyonel heterojenite

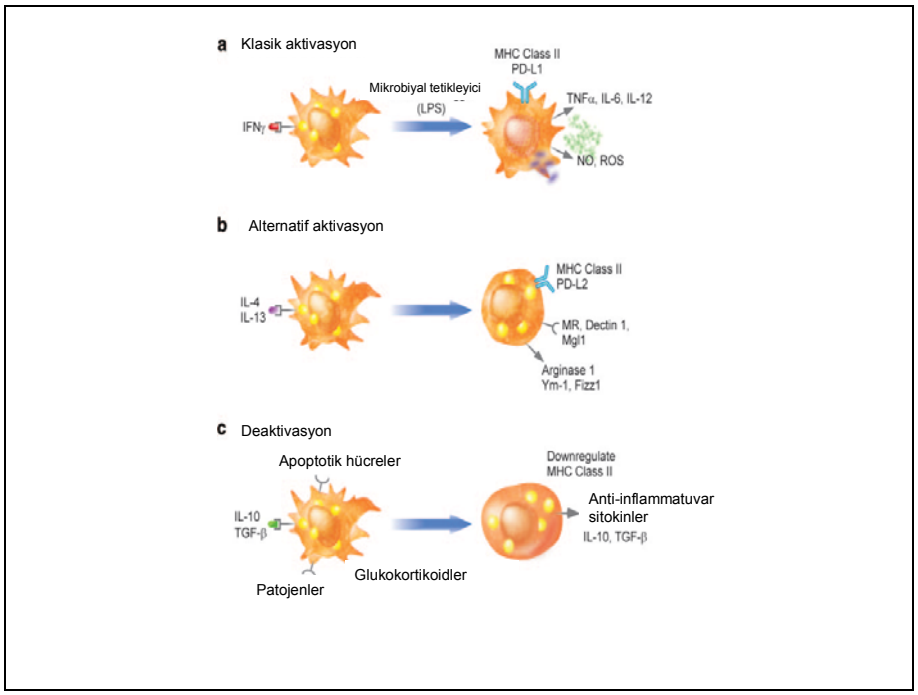
Makrofajların farklı aktivasyon programlarını kullanma yeteneği ve bu aktivasyon durumlarının inherent plastisitesi doku makrofajlarında ve alınan makrofajlarda fonksiyonel spesifitenin ortaya çıkmasına aracılık eder. Makrofajlar, ilk kez Siamon Gordon tarafından önerilen sınıflandırma şekline göre, klasik aktivasyon (M1),

alternatif aktivasyon (M2), veya deaktivasyon sergileyen makrofajlar olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadırlar (Gordon, 2003). Bu üç aktivasyon durumu, makrofajların hücre içi ve hücre dışı patojenlerle enfeksiyon sırasındaki fonksiyonel fenotiplerini ifade etmekte ve bu nedenle bu hücrelerin fizyolojik fonksiyonlarına karşılık transkriptom veya proteomlarının ne şekilde ifade edildiğinin anlaşılmasına yönelik oldukça yararlı bir çerçeve sunmaktadır (Mosser ve Edwards, 2008; Stout ve Suttles, 2004).

Sitokin sinyallerine yanıt olarak, bölgeye alınan ve yerleşik makrofajlar farklı aktivasyon programlarına uğrayabilir. Th1 sitokin IFNγ ve LPS gibi mikrobiyal ürünler klasik olark aktive olan makrofajların olgunlaşmasına yol açar. Respiratuvar patlama sırasında reaktif oksijen türleri (ROT) ve nitrik oksit (NO) makrofajların mikrobisidal etkilerini teşvik ederler, TNFα ve IL-12 gibi sitokinlerin salımı hücre aracılı immüniteyi arttırır. Th2 sitokinler IL-4 ve IL-13 parasitik helmintlerle infeksiyon sırasında alternatif olarak aktive olan makrofajların olgunlaşmasını uyarır. Majör doku uyum kompleksi sınıf II' nin indüksiyonu ile de karakterize şekilde aktive olan makrofajlar farklı bir dizi hücre yüzey reseptörünü sergilerler. Bu iki aktivasyon durumunun tersine apoptotik hücrelerin sindirilmesi veya IL-10 veya glukokortikoidler tarafından stimülasyon sonucunda makrofajların doğuştan gelen veya sonradan edinilmiş baskılanmaları, bu hücrelerin antijen sunumunu ve proinflmmatuvar patlama sergilemelerine engel olur. Klasik veya alternatif aktivasyonun tersine deaktivasyon MHC sınıf II moleküllerinin ifadesini dramatik olarak baskılar (Şekil 1.10) (Ajay, 2010).

Klasik olarak aktive edilen makrofajlar (Şekil 1.10), Th1-sitokin interferon olan IFNγ ve TLR4 sinyalizasyonunu uyaran bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) gibi mikrobiyal tetikleyicilere karşı yanıt geliştirirler (Gordon, 2003; Dalton ve ark., 1993; Ehrt ve ark., 2001). Bu yolak üzerinden olgunlaşan makrofajlar, hücre içi patojenlere karşı immüniteyi oluşturan mikrobisidal bir program ekspresse ederler. Klasik olarak aktive olan makrofajların respiratuvar inflammatuvar patlaması, istilacı patojenlerin hızlıca temizlenmesi için son derece önemlidir, bu makrofaj aktivasyon programının anormal ve kronik ekspresyonu, ateroskleroz ve obezite ile indüklenen

insülin direnci gibi metabolik hastalıkların patogenezine eşlik etmektedir (Odegaard, 2008).



Şekil 1.10. Makrofaj aktivasyonu fonksiyonel heterojeniteye katkı sağlar (Ajay, 2010).

Yapılmış olan çalışmalarda bu bulgu ile uyumlu olarak, klasik olarak aktive olan fenotipin olgunlaşmasında veya ekspresyonunda rol oynayan genlerin genetik olarak ortadan kaldırılmasının ateroskleroz ve /veya diyetle indüklenen insülin direncine karşı anlamlı olarak koruma sağladığı belirlenmiştir (Odegaard, 2008; Glass ve Witztum, 2001).

Alternatif olarak aktive olan makrofajların dokularda olgunlaşması Th-2 sitokinler olan IL-4 ve IL-13 tarafından kontrol edilmektedir. Bu yolak üzerinde yapılan ilk çalışmalarda, IL-4’ ün insan monositlerinde ve makrofajlarında respiratuvar ve inflammatuvar patlamayı inhibe ettiği gösterilmiş ve böylece fagositlerde IFNγ tarafından düzenlenen klasik yolakları antagonize ettiği düşünülmüştür (Abramson ve Galin, 1990; Standiford ve ark., 1990). Ancak,IL-4 ile aktive olan makrofajlarda mannoz reseptörünün yüksek indüklenen bir belirteç olarak ve IL-4’ ün majör doku uyum kompleksi II (Cao ve ark., 1989) sınıfından bir molekül olarak keşfedilmeleri

farklı sekretuvar ve fonksiyonel aktiviteye sahip özgün bir grup fagositik reseptör ile ilişkili olan farklı bir makrofaj programı olarak 'alternatif aktivasyon' konseptini ortaya koymuştur (Stein ve ark., 1992). 10 yıllık süre zarfında, çeşitli araştırıcılar tarafından yapılan çalışmalar, alternatif olarak aktive olan makrofajların özgün transkripsiyonel imzasını, Siamon Gordon' un alternatif aktivasyonun fonksiyonel olarak farklı bir durum olduğuna ilişkin ilk hipotezini destekleyen şekilde ortaya koymuştur (Şekil 2a) (Gratchev ve ark., 2001; Loke ve ark., 2002; Nair ve ark., 2005; Martinez ve ark., 2006; Loke ve Allison, 2003; Raes ve ark., 2002; Raes ve ark., 2005).

Bu iki aktivasyon durumunun tersine, makrofaj deaktivasyonu ise klasik ve alternatif olarak aktive olmuş makrofajları kapatan, azalan antijen sunumu ve artmış immünbaskılama ile sonuçlanan aktif bir süreçtir. IL-10, glukokortikoidler ve transforme edici büyüme faktörü-β makrofaj deaktivasyonunun potent uyarıcılarıdır (Gordon, 2003). Apoptotik hücrelerin fagositozu, deaktife edici sitokinler IL-10 ve (TGF-β) transforme edici büyüme faktörü-β salımına yol açarak makrofajları LPS ile klasik uyarıma karşı refraktör hale getirmektedir (Voll ve ark., 1997; Savill ve ark., 1992; Fadok ve ark., 2001). Buna ek olarak, apoptotik hücrelerin sindirilmesi makrofajlarda nükleer sinyalizasyonu aktive eder ve inflammasyonun baskılanması ile sonuçlanır. İnflamasyonun indükleyicileri ekzojen ya da endojen kaynaklıdırlar. Ekzojen indükleyiciler mikrobiyal ya da non-mikrobiyal bileşenler olabilmektedir. Endojen indükleyiciler ise, stres, hasar ya da fonksiyon görmeyen dokular tarafından üretilen uyaranların ürettiği sinyallerdir.

1.7 Makrofajların klasik aktivasyonunda görev yapan indükleyiciler

1.7.1 Lipopolisakkarit

Lipopolisakkarit, ilk kez Vibrio cholerae' nin lizatlarında, hayvanlarda toksik şoka yol açan ısıya-dirençli bir toksin olarak belirlenmiştir. Bu toksin, ekzotoksinin

tersine, bakteri tarafından salgılanmadığından endotoksin olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra bu toksinin başlıca toksik bileşeninin, Gram-negatif bakterilerin dış membranını oluşturan lipopolisakkarit (LPS) olduğu belirlenmiştir. 1950' lerden bu yana, LPS' yi ekstrakte etmeye ve saflaştırmaya yönelik teknikler geliştirilmiş ve daha sonra şeker ve lipid kimyası kullanılarak LPS' nin temel yapısı aydınlatılmaya çalışılmıştır (Caroff ve ark., 2002).

LPS molekülleri, divalan katyonlar tarafından stabilize edilen dış membran yüzeyinin matriksini oluşturan bifosforillenmiş bir lipid (lipid A) tabakası ve bakteriden dışarıya doğru uzayan bir hidrofilik polisakkaritten oluşmaktadır. Polisakkarit yapısı ise, 10-12 şeker içeren çekirdek bir oligosakkarit ile O- spesifik zincir adı verilen tekrar eden ünitelerin polisakkarit zinciri olmak üzere iki farklı bölgeden oluşmaktadır (Caroff ve ark., 2002).

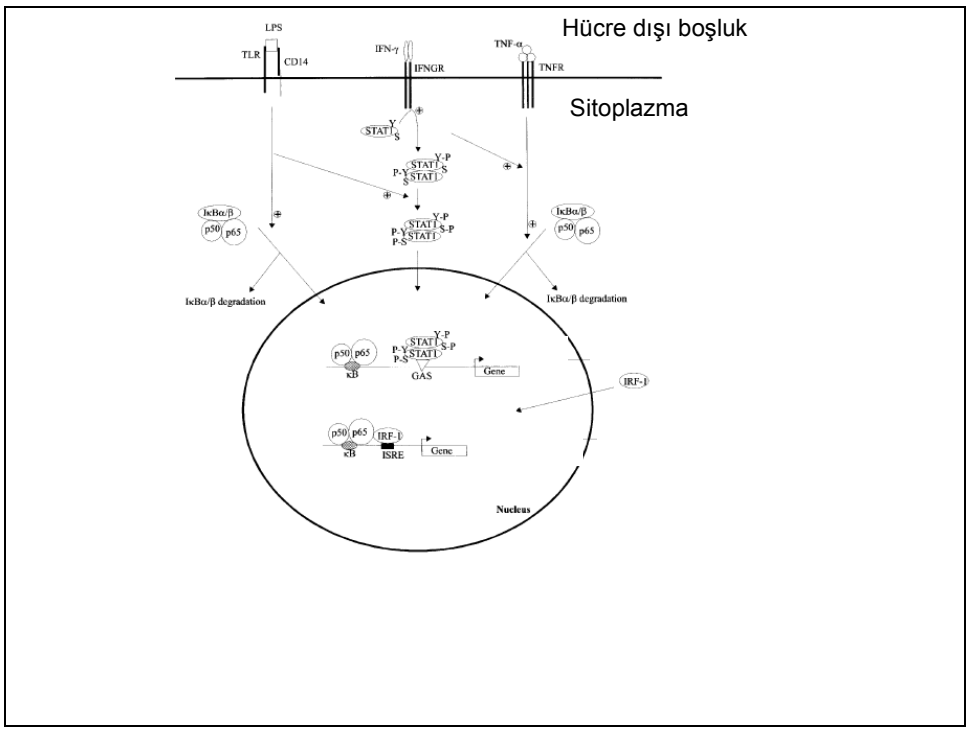
1.7.2 İnterferon gamma (IFN-γ)

İnterferonlar, pek çok farklı hücresel programı, çok sayıdaki genin transkripsiyonel kontrolü aracılığı ile düzenleyen sitokinler olup reseptör özgüllüklerine ve sekans homolojilerine göre tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki gruba ayrılırlar. İnterferon gamma tip 2 interferonların tek üyesidir (Bach ve ark., 1997). Yapısal olarak tip 1 interferonlarla ilişkisizdir, farklı bir reseptöre bağlanmakta ve farklı bir kromozomal bölge tarafından kodlanmaktadır. Profesyonel antijen sunucu hücreler (APCs)(Monosit/makrofaj, dendritik hücreler) tarafından IFN-γ üretimi, lokal olarak etki göstererek hücrenin kendi aktivasyonunda ve komşu hücrelerin aktivasyonunda görev yapar (Konnenbach ve ark, 2004).

İnterferon-gamma, LPS ile aktive edilmiş makrofajlarda iNOS/NO biyosentezi ile sinerjik etki gösterir (Lorsbach ., 1993; Gao et al., 1997; Held et al., 1999; Chan and Riches, 2001; Huang et al., 2004). IFN-gamma'nın iNOS mRNA ekspresyonunu pozitif olarak düzenlediği bildirilmiştir (Lorsbach ve ark., 1993; Gao ve ark., 1997).

1.7.3 LPS ve IFN-γ tarafından sinerjik gen indüksiyonu

Geçtiğimiz yıllarda IFN-γ' nın TNF-α sinerjik etkilerine yol açan hücre içi olayların büyük bir bölümü aydınlatılmıştır. Şekil 1.11, sinerjistik yanıtların oluşmasında görev yapan sinyal iletim yolaklarının sadeleştirilmiş bir gösterimini sunmaktadır (Paludan, 2000). TNF-α veya LPS tarafından aktive edilen NFkB, IFN-γ tarafından aktive edilen STAT1 ile sinerjistik olarak etki gösterir. IFN-γ tarafından indüklenen IRF-1 de NFkB ile kooperatif olarak etki etmektedir. IFN-γ, aktivasyonu bazı hücre tiplerinde düşük konsantrasyonlardaki TNF-α tarafından indüklenen NFkB aktivasyonunu arttırır. LPS ve TNF-α bazı hücre tiplerinde IFN-γ ile sinerjik olarak IRF-1 indüksiyonunu gerçekleştirir. LPS STAT1' in fosforilasyonunu indükler ve böylece trans-aktive edici potansiyeli arttırır.



Şekil 1.11. IFN-γ ve LPS veya TNF-α tarafından sinerjistik gen indüksiyonunun moleküler mekanizmaları (Paludan, 2000)

Buna göre, IFN-γ, transkripsiyon faktörü STAT1' in aktivasyonunu indüklerken bu faktör de IRF-1' in üretimini tetikler. Bu iki protein, transkripsiyonu birbirlerinden bağımsız olarak aktive ederler ve bu proteinlerin IFN-γ tarafından indüklenen

genlerin transkripsiyonu için büyük ölçüde sorumlu oldukları düşünülmektedir (Boehm ve ark., 1997).

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda IRF-1 ve STAT1 arasında belirli ölçüde bir kooperasyon olduğu ve her iki faktör için de bağlanma bölgeleri içeren promotorların bulunduğu belirlenmiştir (Chon ve ark., 1996). IRF-1' in bazı hücre tiplerinde hem LPS hem de TNF-α tarafından indüklenebilmesi (Neish ve ark., 1995; Hayes ve Zoon., 1993) IRF-1 ve STAT1 arasındaki kooperasyonun olasılıkla sinerjistik gen indüksiyonuna yol açtığına işaret etmektedir.

Ancak, sinerjistik promotor aktivasyonu oluşumunun en büyük katılımcısının STAT1/IRF-1' in NFkB ile sinerjistik aktivitesi olduğu düşünülmektedir. Sinerjik olarak IFN-γ ve LPS/TNF- α tarafından indüklenen promotorların büyük bir bölümü STAT1 veya IRF-1 ve NFkB için bağlanma bölgeleri içermektedir (Paludan, 2000).

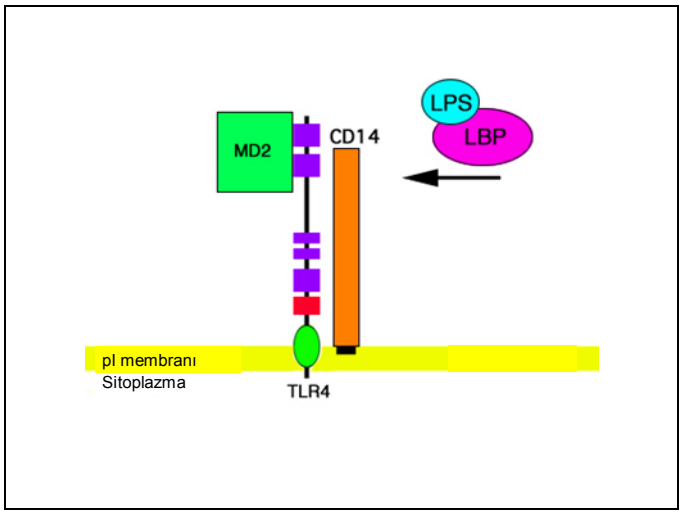
Kolektif olarak, IFN-γ ve TNF-α/LPS' nin sinerjik aktivitesinin altında yatan moleküler mekanizmalara ilişkin bulgular, IFN-γ tarafından aktive edilen STAT1/IRF-1 ve TNF- α/LPS tarafından aktive edilen NFkB arasındaki kooperasyonun varlığını ortaya koymaktadır. Bu etkilere ek olarak LPS ile İnterferon-gamma, LPS ile aktive edilmiş makrofajlarda iNOS/NO biyosentezi ile sinerjik etki gösterir (Lorsbach, 1993; Gao et al., 1997). IFN-gamma'nın iNOS mRNA ekspresyonunu pozitif olarak düzenlediği bildirilmiştir (Lorsbach ve ark., 1993; Gao ve ark., 1997).

1.7.4 Lipopolisakkaritler tarafından makrofaj aktivasyonunun moleküler mekanizmaları

Gram negatif bakterilerin dış membranının başlıca bileşeni olan LPS, inflamasyonun en potent mikrobiyal başlatıcıları arasında bulunmaktadır. LPS, monositleri ve makrofajları tümör nekroz faktörü-α (TNF-α), interlökin IL-1, IL-6, IL-8, ve IL-12 gibi proinflammatuvar sitokinleri üretmek üzere aktive eder. Makrofajlar da LPS' ye

yanıt olarak, platelet aktive edici faktör, prostaglandinler, enzimler, ve nitrik oksit gibi serbest radikallerin de aralarında bulunduğu bir dizi biyolojik yanıt aracılarını salar. Monositler/makrofajlar tarafından bu inflammatuvar sitokinlerin ve aracıların üretilmesi, istilacı patojenlerin büyümesinin ve yayılımının kontrol altına alınmasına katkı sağlamaktadır. Ancak, bu inflammatuvar sitokinlerin ve aracıların kontrolsüz ve aşırı salınımı, mikrodolaşım bozukluğu, doku hasarı ve yüksek düzeyde ölüme yol açan septik şok gibi ciddi sistemik komplikasyonlara yol açabilmektedir.

LPS ile indüklenen makrofaj aktivasyonu ve desensitizasyonunun moleküler mekanizmaları üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar, protein kinaz A (Muroi & Suzuki, 1993),protein kinaz C (Fujihara et al., 1994a), Src-ilişkili kinazlar (Herrera-Velit ve Reiner, 1996), ve mitojen ile aktive olan protein kinazlar (MAPK): ekstrasellüler sinyal ile düzenlenen kinaz (ERK) 1 ve ERK2 (Weinstein ve ark., 1992), p38 MAPK (Han ve ark., 1994), ve c-Jun N-terminal kinazlar (JNK) (Hambleton ve ark., 1996) gibi çeşitli kinazların bu moleküler mekanizmalar ile ilişkisini ortaya koymuştur. LPS ile uyarılan makrofajlarda, nükleer faktör kappa B (NFκB) ve aktivatör protein-1(AP-1) gibi transkripsiyon faktörleri aracılığı ile çok sayıda inflammatuvar sitokinin yanı sıra aracı moleküller ekspresse olmaktadır (Fujihara ve ark., 1993; Muroi ve ark., 1993; Guha ve Mackman, 2001). LPS' yi algılayarak ona bağlanma ve LPS' ye yanıta aracılık etmede hayatsal rol oynayan LPS reseptör kompleksinde yer alan moleküllerin tanımlanmasında büyük ilerleme sağlanmıştır. Buna göre LPS reseptör kompleksi, CD14, Toll-benzeri reseptör 4 (TLR4), ve myeloid differansiyasyon proteini-2 (MD-2) proteinlerinden oluşmaktadır (Şekil 1.12).



Şekil 1.12. LPS reseptör kompleksinin bileşenleri (Guha ve Mackman, 2001)

1.7.5 LPS ile indüklenen sinyal yolağının bileşenleri

Toll-benzeri reseptörler, immün hücrelerin yabancı maddeleri algılamasına aracılık eden bir reseptör ailesidir**.** Doğuştan gelen immün hücrelerde 'Motifin tanınması' kavramı konakçı organizmanın infeksiyöz ajanları nasıl saptadığını ve kendi dokularını etkilemeksizin mikroorganizmaları nasıl ortadan kaldırdığını açıklamak üzere ortaya konulmuş bir kavramsal çerçevedir (Janeway ve Medzhitov, 2002). Doğuştan gelen immün hücreler, bakteriler tarafından üretilen ürünleri (LPS, lipoporoteinleri peptidoglikan, ve lipoteikoik asitler) tanırlar ancak ökaryotik hücreler tarafından oluşturulan maddeleri tanımazlar. Her ürünün ailesel- ve türsel-spesifik varyasyonları ile ince bir kimyasal yapısı bulunsa da, bu ürünler patojenler arasında değişkenlik göstermeyen ve yüksek korunum sergileyen ortak bir moleküler motife de sahiptirler ve bu motife patojenle ilişkili moleküler motif (PAMP) adı verilir (Janeway, 1989). Doğuştan gelen immün hücreler PAMP' leri TLRs adı verilen proteinlerin ailesi aracılığı ile tanırlar.

Günümüzde hala yeni elemanları keşfedilmeye devam eden doğuştan gelen immün reseptörlerin bu ailesi ilk kez Drosophila' da tanımlanmıştır. Reseptörün

ekstrasellüler kısmında bulunan Lösince zengin bölge (LRR), sisteince zengin bölge ve intrasellüler kısmında bulunan Toll/IL-1R (TIR) homoloji bölgesi, bilinen bütün Toll proteinlerinin yapısal bir özelliğidir (Gay ve ark., 1991). Günümüze kadar, Meyve sineğinde Toll' un 10 homoloğu memelilerde belirlenmiştir ve Toll-benzeri reseptörler (TLRs) olarak isimlendirilmektedirler. Toll' da yapılan mutasyonların meyve sineklerini fungal enfeksiyonlara yatkın hale getirdiği belirlenmiştir (Lemaitre ve ark., 1996). İnsan TLR4, ilk olarak karakterize edilen TLR' dir ve makrofajlar ve dendritik hücreler gibi immün hücrelerde predominant olarak bulunmaktadır (Medzhitov ve ark., 1997). TLR4' ün LPS için sinyal-iletiminden sorumlu reseptör olarak fonksiyonu ilk kez, LPS'e yanıtsızlaşmadan sorumlu LPS geninin klonlama çalışmaları ile belirlenmiştir (Poltorak et al., 1999; Qureshi et al., 1999). RAW 264.7 makrofaj-benzeri hücre serisinin LPS' ye yanıt vermeyen C3H/HeJ farelerdeki Tlr4' ün missense bir mutantı ile transfeksiyonunun, LPS ile indüklenen NFκB aktivasyonunu ve siklooksijenaz ekspresyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir (Rhee & Hwang, 2000). TLR4 nakavt fareler de C3H/HeJ fareler gibi LPS' ye yanıt vermemektedir, bu da TLR4' ün LPS sinyalizasyonundaki önemini ortaya koymaktadır (Hoshino ve ark., 1999). Ancak insan ve sıçan TLR2 LPS sinyalizasyonuna katılmamaktadır. Böylece, TLR2' nin aşırı ekspresyonunun hücre serilerini, LPS preperasyonlarındaki minör non-LPS kontaminantlara karşı aşırı hassas hale getirdiği düşünülmektedir (Heine et al., 1999; Takeuchi et al., 1999; Underhill et al., 1999a; Faure et al., 2000). Çeşitli transfeksiyon çalışmaları, LPS' yanıt vermeyen insan embryonik böbrek hücrelerinde (HEK293) memeli TLR2 ekspresyonunun LPS' ye yanıt veren bir fenotip oluşturduğunu ortaya koymaktadır (Kirschning ve ark., 1998; Yang ve ark., 1998).

LPS' nin veya lipid A2 nın doğrudan TLR4 ile etkileşime girip girmediğine ilişkin tartışmalar yapılmaktadır. Örneğin, TLRs' nin LPS' ye bağlanma yeteneğini belirlemek üzere yapılan ilk çalışmalar, ^{3}H işaretli LPS'nin TLR2' ye bağlandığını ortaya koymuştur. Ancak, bu birleşmenin kinetiklerinin yavaş ve Kd değerinin düşük olduğu belirlenmiştir ve bu bulgular düşük afiniteli bir interaksiyona işaret etmektedir (Yang ve ark., 1998). TLR4' ün LPS' ye hücresel yanıttaki rolü, aktif bir sinyal kompleksinin oluşumu ile gerşekleşmektedir. Böylece, LPS ve TLR4

arasındaki yakın fiziksel proksimitenin sinyalizasyonun başlaması için esansiyel olduğu belirlenmiştir (Dobrovolskaia ve ark., 2002).

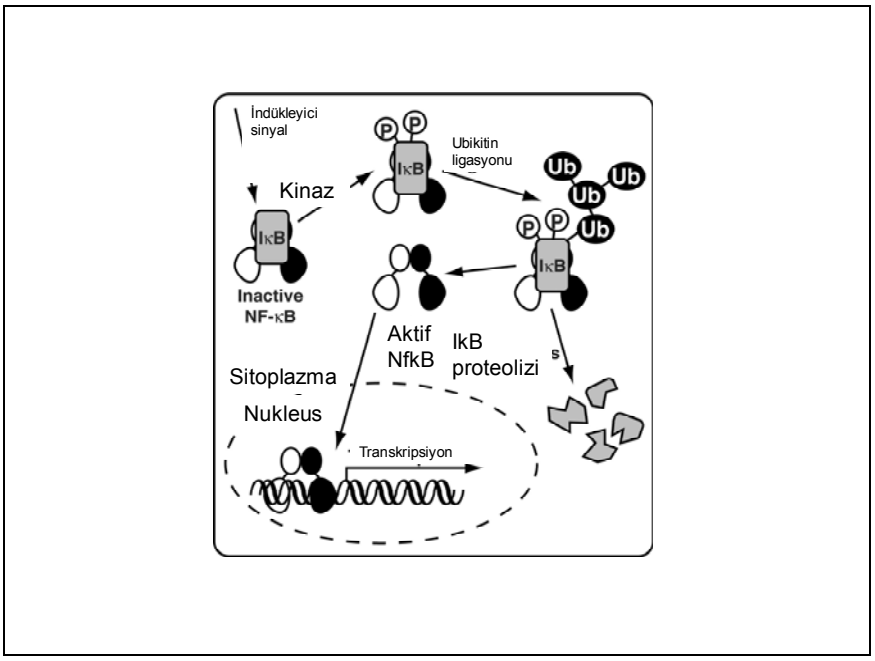
CD14 glikoproteini, 55-kDa molekül ağırlığında LPS reseptör kompleksinin esansiyel bir bileşenidir (Wright ve ark., 1990b). Enterobakteriyel LPS, ilk olarak serum LPS bağlayan proteine (LBP) bağlanır, bu protein, bir LPS monomerini bakteriyel hücre duvarından monositlerin ve makrofajların membrana bağlı CD14' üne transfer eder ve böylece LPS yanıtının ortaya çıkmasını sağlar (Schumann ve ark., 1990). CD14, LPS' nin yanı sıra peptidoglikan, lipoteikoik asit, ve lipoarabinomannan gibi diğer bakteriyel ürünlerin tanınması için de gereklidir (Pugin ve ark., 1994; Gupta ve ark., 1996).

CD14, lösince zengin tekrar motifinin (LRR) 10 kopyasını içerir. LRRs, ligant tanınmasında ve sinyal iletiminde görevli çeşitli proteinlerde bulunmaktadır (Juan ve ark., 1995a). CD14' ün LRR bölgesinin dışında bulunan tanımlanmış rezidülerin LPS bağlanması için gerekli olduğu belirlenmiştir (Juan ve ark., 1995b).

Myeloid differansiyasyon proteini-2 (MD-2), transmembran bölgesi içermeyen küçük bir proteindir ve TLR4' ün hücre dışı bölgesi ile birleştiği belirlenmiştir. Tek başına TLR4 ekspresse eden hücrelerde MD-2 ekspresyonunun LPS' ye yanıt sergilemesi, MD-2' nin LPS reseptör kompleksinin bir başka bileşeni olduğunu ortaya koymuştur (Shimazu ve ark., 1999).

LPS' ye yanıt için MD-2' ye fizyolojik olarak ihtiyaç duyulup duyulmadığını belirlemek üzere MD-2 taşımayan farelerde in vivo çalışma yapılmıştır (Nagai ve ark., 2002). MD-2 taşımayan farelerdeki kemik iliği kökenli makrofajlarının, LPS' ye inflammatuvar sitokinleri oluşturarak yanıt vermediği belirlenmiştir. (Nagai ve ark., 2002).

NF-kB (Nükleer faktör kappa B), inflamasyon, immünite, hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi bir dizi hücresel olayda hayatsal role sahip bir transkripsiyon faktörüdür. Dinlenme halinde, NF-kB, IkB' ler adı verilen inhibitör proteinlere sıkı bağlı halde hücrenin sitoplazmasında bulunurken, LPS gibi indükleyici sinyallerle stimulasyon sonrasında IkB proteinlerinin hızla fosforillenmesi ve proteozom tarafından parçalanması, NF-kB' nin nukleusa doğru hareket ederek pek çok hedef genin ekspresyonunu regule etmesine yol açar (Şekil 1.13).



Şekil 1.13**.** NFkB aktivasyonunun şematik gösterimi (Gloire ve ark., 2006).

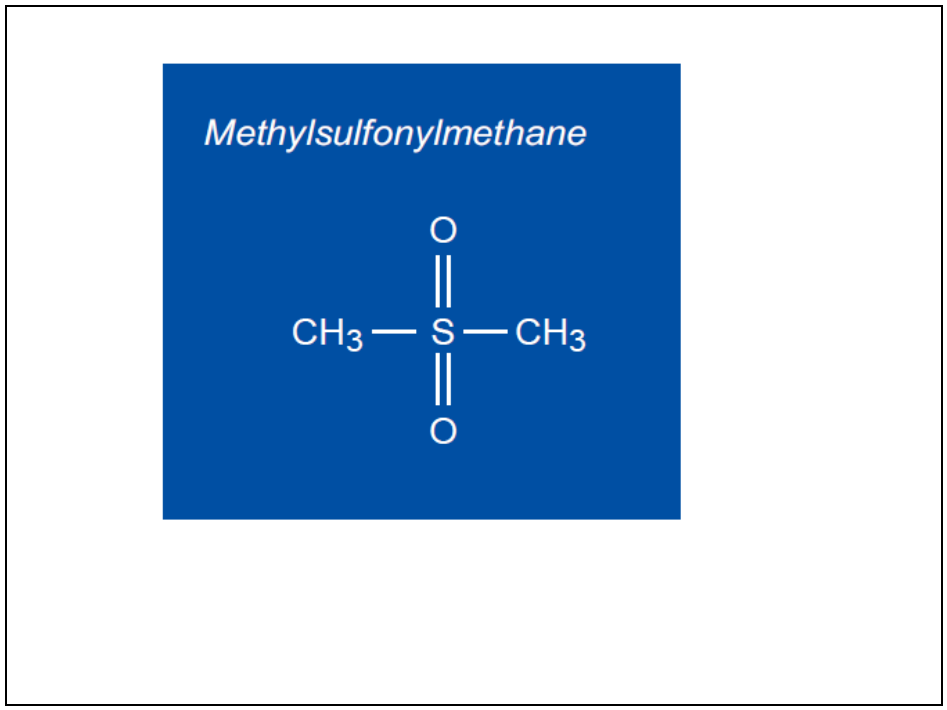
Klasik NF-kB aktive edici yolak, doğuştan gelen ve adaptif immunitenin farklı aracıları olan pro-inflamatuvar sitokinler, Toll benzeri reseptörler, antijen reseptörleri ile gerçekleşir. NF- kB nukleusta, sitokinler, kimokinler, adhezyon molekülleri ve apoptozun inhibitörlerine ilişkin çeşitli hedef genlerin ve iNOS gibi inflammatuvar yolakta yer alan genlerin de transkripsiyonunu aktive eder (Gloire ve ark., 2006).

iNOS aktivasyonu sonucunda sentezlenen NO' nun sitotoksik bir aracı olarak görev yaptığı inflammatuvar durumlarda NO düzeylerini düşürerek apoptozu inhibe etmeye yönelik tedavi seçenekleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu bağlamda, iNOS

proteini ile etkileşerek ya da doğrudan NO üzerine etki göstererek inflammatuvar ve apoptotik yanıtta değişikliğe yol açacak biyoaktif moleküllerin belirlenmesi ve çeşitli patolojilerin tedavisinde kullanılmaları önem kazanmaktadır. Son yıllarda, hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde, doğal kaynaklı ya da kimyasal olarak sentezlenen diyet destek preparatları yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu destek preparatları arasında; insan sağlığını iyileştirme ve interstisyel sistit, alerjik rinit, skleroderma gibi hastalıkların tedavisinde kullanımının yanısıra özellikle artritik ve romatizmal ağrıyı azaltma potansiyeli nedeniyle yaygın olarak kullanılan MSM ve MSM ile pek çok kombine preparatları bulunan GA ve CS de yer almaktadır (Leffler ve ark, 1999).

1.8 Metilsülfonilmetan (MSM)

Dimetilsülfon ($DMSO_2$) ve metil sülfon olarak da bilinen MSM, çeşitli meyvelerde, sebzelerde, tahıllarda, ve hayvanlarda doğal olarak bulunan organik bir kükürt bileşiğidir. Beyaz, kokusuz, hafif acı tatta, kristal yapıdaki bu bileşiğin % 34' ünü element halindeki kükürt oluşturmaktadır (Şekil 1.14)**.** İnek sütü, 3.3 ppm ile MSM' nin en yoğun olarak bulunduğu kaynaktır. MSM' yi içeren diğer yiyecekler arasında kahve (1.6 ppm), domates (eser düzeyden 0.86 ppm' e kadar), çay (0.3 ppm), bira (0.18 ppm) ve mısır (0.11 ppm' e kadar) yer almaktadır (Pearson ve ark., 1981).



Şekil 1.14. Metilsülfonilmetanın kimyasal yapısı (MSM, Monograph, 2003).

MSM' nin, organizmaya alınmasından sonra izlediği emilim, dağılım ve atılım mekanizmalarına ilişkin sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır, bu çalışmalar arasında en dikkat çekici olanlardan bir tanesi 2007 yılında Magnuson ve ark. tarafından yapılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, MSM' nin vücutta hızla emilerek, iyi bir şekilde dağıldığını, ve tamamen vücuttan atıldığını göstermektedir (Magnuson ve ark., 2007).

MSM, oral olarak alındıktan sonra beyinde birikmektedir. MSM' nin beyindeki gri ve beyaz cevher bölgelerinde eşit konsantrasyonlarda dağılım gösterdiği de ifade edilmektedir (Lin ve ark., 2001). MSM' nin kan beyin bariyerini geçtiği başka çalışmalarla da doğrulanmıştır (Cecil ve ark., 2002; Rose ve ark., 2000).

1.8.1 MSM' nin etki mekanizması

MSM' nin etki mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar 1980' li yılların başına dayanmaktadır. Bu çalışmalarda, MSM' nin olası antioksidan,

antiinflamatuvar ve kanser önleyici etkilerine aracılık eden mekanizmalar açıklığa kavuşturulmaya çalışılmıştır. Cox ve ark., 1982 yılında yaptıkları çalışmada, MSM ve DMSO gibi polar çözücülerin, tümör hücrelerinin konak immün yanıtı ile interaksiyonunu etkileyen kemopreventif bir mekanizmaya aracılık ettiğini bildirmişlerdir (Cox ve ark., 1982). Aynı yıl içinde yapılan bir başka çalışmada ise, MSM' nin kültür fibroblastlar tarafından düşük densiteli lipoproteinlerin bağlanmasını, alımını ve degredasyonunu azalttığı ve kolesterol düşürücü etkisine bu mekanizmaların aracılık ettiği gösterilmiştir (Alam ve Layman, 1982).

İnsan nötrofillerinin hidrojen peroksit, süperoksit ve hipokloröz asit gibi oksidatif bileşikler üretmek üzere yapay olarak uyarıldıkları *in vitro* bir çalışmada (Beilke ve ark., 1987) MSM' nin anti-inflamatuvar ve antioksidan mekanizmalar gösterdiği, hücre serilerinin MSM ile muamelesi sonucunda serbest radikal ürünlerinde azalma gözlendiği bildirilmiştir. MSM' nin hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise aortik düz kas ve endoteliyal hücrelerin büyümesini ve proliferasyonunu doz-bağımlı olarak baskıladığı ortaya konulmuştur (Layman, 1987).

Berardesca ve ark., MSM' nin, yüzün merkezi bölümlerini (örneğin yanaklar, burun ve alnın orta kısmı) etkileyen, immün bir patoloji olduğu düşünülen kronik cilt hastalığı rozacea hastalığının eritematöz ve kapiller gevşemenin görüldüğü evresinde, eritemi ve kapiller gevşeme ağını kontrol altına alarak inflamasyon ve kızarıklığı azalttığını göstermiştir. Araştırıcılar, bu etkinin, MSM/silimarin kombinasyonunun proinflammatuvar sitokinleri, büyüme faktörlerinin oluşumu üzerinde düzenleyici etki göstermesinden kaynaklandığına işaret etmektedirler (Berardesca ve ark., 2008).

MSM kronik mesane inflamasyonu interstisyel sistit tedavisi için önerilmiştir. 1978 yılında, FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) interstisyel sistit tedavisinde MSM' nin belirli dozda kullanımını uygun bularak belirlemiştir. İnterstisyel sistit hastalığında MSM ile tedaviyi başlatmış, hastaların MSM' yi DMSO' dan çok daha iyi tolere ettiklerini ve inflamasyon ve ağrıda azalma görüldüğünü bildirmiştir.

Sezonsal alerjik rinit hastası kişilerde ise MSM kullanımı ile üst ve alt solunumsal semptomların hafiflediği ve 14. günden itibaren ise enerji düzeylerinin anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir (Barrager, 2002).

MSM' nin, tümörün büyümesini ve ilerlemesini önleyici etkileri de araştırılmıştır. Günümüzde, MSM' nin de aralarında bulunduğu çeşitli kimyasallar potansiyel differansiye edici (farklılaşmayı uyarıcı) ajanlar olarak araştırılmaktadır. 1980' li yılların sonlarında yapılan iki araştırmada MSM' nin kanser üzerindeki etkileri araştırılmış, MSM ile tedavi edilen sıçanlarda tümör oluşumunun geciktiği ortaya konulmuştur (O'Dwyer ve ark., 1988; McCabe ve ark., 1986). MSM ve aspirinin kullanıldığı *in vitro* bir çalışmada ise, her iki ajanın da COX-bağımsız mekanizmalar aracılığı ile terminal farklılaşmayı uyardığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, aspirin düşük bir dozda kullanılmış, MSM ise, daha yüksek derecede bir farklılaşma elde etmek üzere aspirine kıyasla daha yüksek bir dozda uygulanmıştır. MSM' nin aracılık ettiği COX-bağımsız bu reaksiyonun, farklılaşmaya yol açan ve böylece proliferasyon için gerekli hücresel kapasiteyi bozan genlerin fonksiyonlarının aktivasyonunu indükleyerek gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Ebisuzaki, 2003).

Spontan otoimmün lenfoproliferatif hastalığa sahip sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada oral MSM uygulamasının etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmada uygun dozla tedavi, sıçanlarda hastalık henüz belirgin değilken başlamış ve DMSO ve MSM içme suyuna karıştırılarak verilmiştir. Tedavi sonrasında, tedavili deneklerde lenfoid organ büyümesinde (dalak, timus, lenf nodu ağırlığı) anlamlı azalma belirlenmiştir. Lenfadenopati, 43 haftalık tedavili hayvanlarda hemen hemen tamamen ortadan kalkmıştır (Morton ve Siegel, 1986).

MSM' nin etkilerinin ve bu etkilere aracılık eden mekanizmaların belirlenmesine yönelik çalışmalar 2000' li yıllarda da yoğun olarak devam etmektedir. Yarış atları üzerinde yapılan bir çalışmada, yarışla birlikte strese bağlı olarak lipid peroksidasyonu, nitrik oksit ve karbonmonoksit düzeylerinde artış ve antioksidan enzim düzeyleri ve glutatyonda düşüş meydana geldiği, MSM tedavisinin ise bu değişiklikleri stres öncesi durumuna getirdiği belirlenmiştir. MSM' nin egzersizle

indüklenen oksidatif ve inflamatuvar hasara karşı da koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Maranon ve ark., 2008).

MSM' nin, bakteri toksini lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücre serisi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı in vitro bir çalışmada MSM' nin nitrik oksit ve prostaglandin E_2 salımını inhibe ettiği belirlenmiştir. MSM' nin, bu etkisini indüklenebilen nitrik oksit sentaz ve siklooksijenaz-2'nin ekspresyonunu azaltarak gerçekleştirdiği belirlenmiştir. İnflamatuvar hastalıklarda inhibisyonu hedeflenen transkripsiyon faktörü nükleer faktör kappa B aktivitesinin de MSM tedavisiyle inhibe olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada, MSM' nin *in vivo* etkileri de test edilmiş ve 500-1250 μg/kulak dozdaki yüzeysel MSM uygulamasının, 12-O-tetradekanoylphorbol 13-asetat ile indüklenen fare kulak ödeminde benzer inhibitör aktiviteler gösterdiği belirlenmiştir (Kim ve ark., 2009).

2010 yılında yapılmış olan bir çalışmada ise, MSM' nin, yüksek düzeyde agressif ve metastatik karaktere sahip Cloudman S-91 fare melanoma hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Söz konusu çalışmada MSM'nin 600 mM' lık dozunun melanoma hücrelerini apoptoza indüklediği belirlenmiş, hücre ölümüne yol açmayan dozlarının ise melanoma hücrelerinin ekstraselüler matriks boyunca göçünü inhibe ettiği ve kontakt inhibisyona yol açtığı belirlenmiştir (Caron ve ark., 2010). MSM' nin AGS, HepG2 ve KAYSE-30 gastrointestinal kanser hücre serilerindeki sitotoksisitesinin değerlendirildiği bir başka çalışmada ise apoptotik etkiler sergilediği ortaya konulmuştur (Jafari ve ark., 2011).

1980' li yılların başından günümüze kadar yapılmış olan tüm bu çalışmalar, MSM' nin etki mekanizmasında antioksidan kimliğinin yanı sıra farklılaşma, proliferasyon ve inflamasyon gibi süreçlerdeki rolünün de önemli fonksiyon gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ancak MSM' nin biyolojik yolaklardaki etkilerinin araştırıldığı bu çalışmaların hiçbirinde MSM' nin apoptotik etki mekanizmaları belirlenmemiştir.

1.8.2 MSM' nin klinik kullanımı

MSM' nin klinik kullanılabilirliğine ilişkin bulgular, yayınlanmış insan ve hayvan çalışmalarına dayanmaktadır. Bu çalışmalarda, MSM' nin osteoartrit tedavisi başta olmak üzere temelinde immün sistemdeki bozuklukların rol oynadığı rozacea, interstisyel sistit, alerjik rinit gibi pekçok hastalıkta yarar sağlayabileceği öne sürülmektedir (Brent ve Bauer, 2011).

MSM' nin diyet desteği olarak en yaygın kullanıldığı patoloji olan osteoartrit tedavisinde kullanılmak üzere, MSM' nin tek başına veya farklı bileşenlerle kombine preparatları mevcuttur. Kullanımı gittikçe artan bir diyet takviyesi, MSM'nin GA ve CS ile kombinasyonudur (Brien, 2008). MSM' nin klinik etkilerinin incelendiği çalışmaların çok büyük bir bölümü osteoartrit hastaları üzerinde yapılmıştır. MSM' nin klinik etkilerinin incelendiği bir çalışmada, MSM tek başına ve GA ile kombine olarak osteoartrit hastalarına uygulanmış ve MSM' nin ağrı ve şişkinliği orta derecede azalttığı, ancak eklem kırılganlığını azaltmadığı belirlenmiştir (Barrager, 2002).

MSM kronik mesane inflamasyonu interstisyel sistit tedavisi için önerilmiştir (Morton ve Siegel, 1986). 1978 yılında, FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) interstisyel sistit tedavisinde MSM' nin belirli dozda kullanımını uygun bularak belirlemiştir. İnterstisyel sistit hastalığında MSM ile tedaviyi başlatmış, hastaların MSM' yi DMSO' dan çok daha iyi tolere ettiklerini ve inflamasyon ve ağrıda azalma görüldüğünü bildirmiştir (Herschler, 1985).

1.8.3 MSM' nin toksisitesi

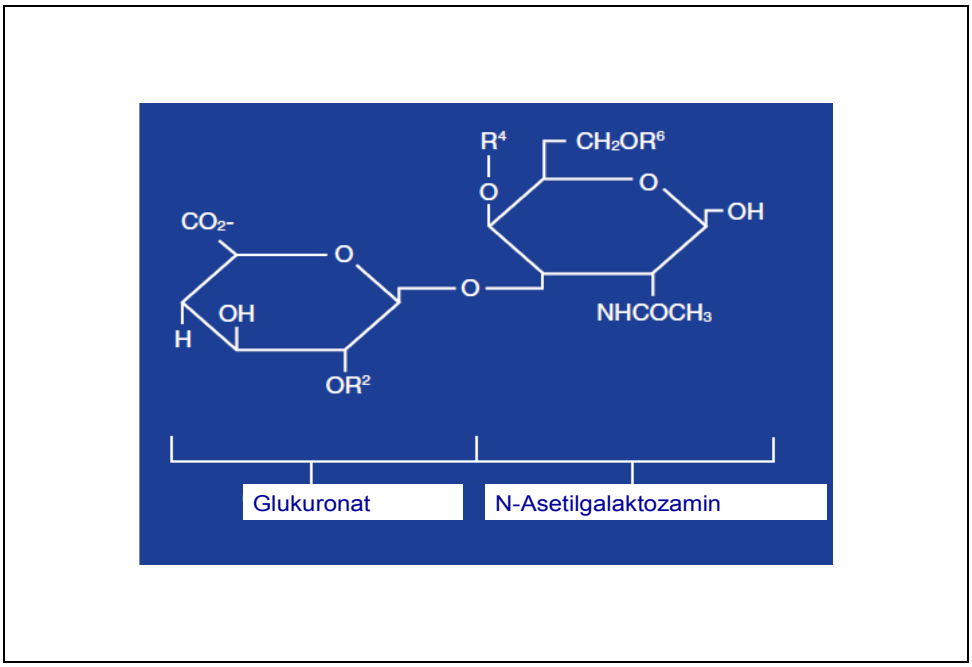
MSM' nin insanlar için diyet desteği olarak tavsiye edilen dozu günde 1000 ile 6000 mg arasında değişmektedir, ancak bazı hekimler, kg başına 300 mg/ güne karşılık gelen 20 g/ gün' e kadar olan MSM dozlarını tavsiye etmişlerdir. MSM' nin toksikolojisine ilişkin olarak yayınlanmış az sayıda çalışma bulunmaktadır. 2002

yılında yayınlanmış olan bir çalışmada 2g/kg olarak tek dozda uygulanan MSM' nin erkek ve dişi sıçanlar tarafından iyi tolere edildiği ve her iki cinsiyette de yan etkilerin ya da toksisitenin klinik bulgularının gözlenmediği belirlenmiştir .

Oral MSM maruziyetinin gelişimsel etkisini araştırmak üzere 2007 yılında sıçanlar üzerinde yapılan bir yapılan bir çalışmada MSM' nin, major organ ve doku oluşumu sürecinde gelişimsel toksisitesi değerlendirilmiş ve hamile sıçanlarda oral olarak uygulanan MSM' nin 50, 500, veya 1000 mg/kg/ gün' lük dozlarının, gestasyonun 6-20. günlerinde (organojenez ve histojenez sürecinde) major organ ve doku oluşumu üzerinde ve fetal veya maternal vücut ağırlıklarında anlamlı değişikliklere yol açmadığı ve yapısal bozukluklar veya fetal anomaliler oluşturmadığı bildirilmiştir.

1.9 Kondroitin sülfat (CS)

CS' ler, vücutta D-glukuronik asit ve N-asetilgalaktozaminin sülfatlanmış ve/veya sülfatlanmamış rezidülerinden oluşarak disakkarit yapısını oluştururlar. Bu disakkaritlerin dizileri polisakkarit zincirlerine dönüşürler. Eklem dokusundaki en yaygın disakkaritler CS A (kondroitin-4-sülfat) ve kondroitin sülfat C (kondroitin-6-sülfat)' dir Sülfat grubu R2, R4 veya R6 veya bunların herhangi kombinasyonu şeklinde yerleşebilir. CS A, (SO3-) grubunu R4' da taşımaktadır ve kondroitin-4-sülfat olarak isimlendirilir. CS C (SO3-) grubunu R6' da taşımaktadır ve kondroitin-6-sülfat olarak adlandırılır. CSın bir polisakkarit zinciri bu disakkarit molekülünün değişken R grupları ile tekrarlayan üniteler içerir. (Chondroitin sulfates, Monograph, 2006). (Şekil 1.15).



Şekil 1.15. Kondroitin sülfatın şematik gösterimi. (Chondroitin sulfates, Monograph, 2006).

CS ilk kez 1960 lı yıllarda ekstrakte ve pürifiye edilmiş (Telser ve ark., 1965), ve günümüzde ticari olarak bulunan takivyeleri köpek balığı kartilajı veya sığır trakesinden elde edilmektedir. CS' ler normal papillar dermiste yüksek düzeylerde ve retikular dermiste daha az düzeyde bulunurlar. Versican, ciltte bulunan başlıca CS' dır ve cilt elastisitesi, hücre proliferasyonu ve dokunun tekrar modellenmesi ile ilişkilidir (Zimmermann ve ark., 1994).

CS' ler, eklem kartilajının yapısında bulunan proteoglikanların oluşumu için gerekli olan glukozaminoglikanlar sınıfında yer almaktadırlar. CS'lerin, eklem glukozaminoglikanlarının enzimatik yıkımını önleyerek ve endojen sentezini arttırarak eklem fonksiyonlarını iyileştirdikleri düşünülmektedir. Dejeneratif eklem hastalığı için oral CS'lerin kullanımının semptomları yavaşça azalttığı ve nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlara (NSAIDs) olan ihtiyacı azalttığını destekleyen çalışmalar bulunmaktadır. CS, psoriyazis semptomlarını azaltmakta da yarar sağlayabilmektedir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar, CS' nin inflammatuvar

barsak hastalığı ve cerrahi sonrası adhezyonların önlenmesinde de yarar sağlayabileceğini göstermektedir (Chondroitin sulfates, Monograph, 2006).

Oral olarak alınan CS' nin büyük bir bölümü sindirim işlemi sırasında monosakkaritlere parçalanmaktadır. Daha düşük düzeylerdeki di-, oligo- ve polisakkaritler ise sindirim işlemini etkilenmeden tamamlar. Absorblanan bir dozun büyük bir bölümü monosakkaritler D-glukuronik asit ve N-asetilgalaktozamin formundadır. Daha az miktarlardaki di-, oligo- ve polisakkaritler ve intakt kondrotin sülfatlar da oral dozun ardından kanda ve dokularda bulunmaktadır (Ronca ve ark., 1998).

Absorbsiyondan sonra, CS hidrolizinin ürünleri, ince barsak, karaciğer ve böbreklerde (bileşiğin absorbsiyonu, metabolizması, parçalanması ve eliminasyonundan sorumlu dokular) konsantre olmaktadır. Eklemler için olan yönelim de belirtilmektedir çünkü CS bileşenlerinin yüksek düzeyleri, eklem kartilajı, sinoviyal sıvı ve trake gibi aminoşekerleri kullanan dokularda yoğunlaşmaktadır (Ronca ve ark., 1998; Morrison, 1977; Conte ve ark., 1995).

1.9.1 CS' nin etki mekanizması

CS' nin başlıca etki mekanizması, artmış eklem glukozaminoglikan konsantrasyonu ve bunu izleyen sinoviyal sıvı viskozitesi artışıdır. Eklem yapısındaki ve fonksiyonundaki iyileşme (Telser ve ark., 1965), CS'lerden artmış endojen hyaluronik asit ve sülfatlanmış GAoglikanların sentezine ve (Conte ve ark., 1995) eklem GAoglikanların azalmış yıkımı ve varolan eklem GAoglikanlarını yıkmaktan sorumlu olan enzimlerin inhibisyonuna bağlı olarak gerçekleşmektedir (Ronca ve ark., 1998; Glade, 1990; Johnson ve ark., 2001; Lippiello ve ark., 2000).

CS' nin ve/veya sülfatlı disakkaritlerin sinoviyal membranda ve kondrositlerde antiinflammatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir. CS ve/veya sülfatlı disakkaritler inflammatuvar reaksiyonu olasılıkla NFkB translokasyonunu inhibe ederek

gerçekleştirmektedirler. Kondrositlerde, bu etki p38 MAPK fosforilasyonu ve daha az düzeyde ise ERK1/2 fosforilasyonu aracılığı ile gerçekleşmektedir (Iovu ve ark., 2008).

Kondroitin 4-sülfatın, sıçanlarda caerulein ile indüklenen akut pankreatit üzerine etkilerinin incelenmiş ve lipid peroksidasyonunu azalttığı, NFkB translokasyonunu ve sitoplazmik IkBα protein yıkımını inhibe ettiği, TNF-α, IL-6 ve kaspaz gen ekspresyonunu azalttığı, endojen antioksidanların tükenmesini ve doku hasarını sınırladığı belirlenmiştir (Campo ve ark., 2008). CS' nin oksidatif strese maruz bırakılan SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde apoptozu konsantrasyona bağımlı olarak önleyerek hidrojen peroksitle indüklenen toksisiteye karşı koruma sağladığı ve bu etkilerini protein kinaz C aktivasyonu sonucunda fosfotidilinositol 3-kinaz/Akt aracılığı ile hem oksijenaz-1' in sentezini uyararak gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Canas ve ark., 2007).

CS' nin aterosklerozu ve komplikasyonlarını önlemek ve insidansını azaltmak için de kullanılabileceğine ilişkin deneysel (Herrero-Beaumont ve ark., 2008; Murata, 1962) ve klinik veriler bulunmaktadır (Morrison, 1969; Morrison ve ark., 1973).

CS' nin, sıçan kondrosit kültürlerinde IL-1β ile indüklenmiş NFkB nükleer translokasyonunu, IL-1β ile indüklenen Erk1/2 fosforilasyonunu azalttığı ve p38MAPK fosforilasyonunu bozduğu, ancak IL-1β ile indüklenen nitrit artışını engellemediği belirlenmiştir (Jomphe ve ark, 2008). CS' nin CCl_4 ile indüklenen akut karaciğer hasarını önleyici etkisini, NFkB ve kaspaz aktivasyonunu inhibe ederek gösterdiği belirlenmiştir (Campo ve ark., 2008). CS' nin, deri fibroblast kültüründe demir sülfat ve askorbatla indüklenen hücre hasarını önlediği, NFkB-DNA bağlanmasını azalttığı ve kaspaz aktivasyonunu mRNA ve protein düzeyinde azalttığı belirlenmiştir (Campo ve ark., 2008).

CS' nin, lizozomal katepsinler tarafından uyarılan mitokondriyal ölüm yolağının aktive olduğu cilt fibroblastlarında lizozomu membran yıkımından koruduğu, sitokrom c salımını, hücre içi reaktif oksijen türlerini azalttığı ve kaspaz-9 ve

kaspaz-3 aktivasyonlarını apoptozun dışsal yolağını etkilemeksizin inhibe ettiği belirlenmiştir (Yue ve ark., 2009).

1.9.2 CS' nin klinik kullanımı

Günümüzde elde edilen bulgular, oral CS kullanımının osteoartrit semptomlarını ve NSAIDs için olan ihtiyacı azalttığını göstermektedir (Morreale ve ark., 1996; Mazieres ve ark., 1992; Leeb ve ark., 1996; Rovetta ve ark., 2002). Yapılan çalışmalarda, oral CS kullanımının dizlerin ve ellerin osteoartritinde plaseboya üstünlük sağladığı belirlenmiştir. Ağrı, yürüme süresi ve eklem mobilitesi gibi parametrelerin dikkate alındığında CS kullanımıyla %50 gelişme saptanmıştır. En az 1-2 ay CS kullanımı ile olumlu değişiklikler saptanmış, bu değişikliklerin doz ve zaman bağımlı olarak gerçekleştikleri ve daha uzun süre kullanım ile daha etkili sonuçlar alındığı belirlenmiştir. Psoriyazis' li kişilerin cildinde CS değişiklikleri gözlenmektedir (Smetsers ve ark., 2004) ve bu kişilerde gözlenen dermatan sülfat ve CS' nin atılımı idrarla atılımındaki artış, bu bileşenlerin turnoverındaki artışı göstermektedir (Paulsen ve Cramers, 1982). Günde 800 mg' lık oral olarak uygulanan CS dozunun psoriazisle ilişkili olan kızarıklık, kabarma ve kaşıntı anlamlı azalma sağladığı belirlenmiştir (Verges ve ark., 2005).

1.9.3 CS' nin toksistesi

CS' ler, oral dozu izleyen süreçte oldukça iyi tolere edilmekte ve sistemik toksisite belirtisi veya semptomu gözlenmemektedir (Conte ve ark., 1995). Bir yıllık tedavi sonrasında uzun süreli tolerans deneklerin %90' ından fazlasında yan etki oluşturmamıştır. CS uygulanmasından sonra, deneklerin %3' üne yakınında en sıklıkla görülen yan etkiler dispepsi veya mide bulantısıdır (Canrozier, 1998).

1.10 Glukozamin (GA)

GA, insan vücudunun konnektif dokularında yüksek konsantrasyonda, kartilajda ise en yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. İnsanlarda GA sülfatın bir oral dozda alımından sonra GA' nın yaklaşık %90' ı absorbe olur ve hızla artikular kartilaja katılırlar (Setnikar ve ark., 1993) GA, sülfat, hidroklorür, N-asetil-GA veya klorohidrat tuzu gibi pek çok formda bulunabilir. Hangi formun en yüksek etkinlik gösterdiğine ilişkin tartışmalar devam etmektedir. Spesifik bir GA sülfat ürününün kullanıldığı çalışmalardan elde edilmiş bulgular sülfat formülasyonunun osteoartritik ağrıyı azaltırken diğer fomülasyonların azaltmadığını göstermiştir (Towheed ve ark., 2005). Çinde yapılan bir başka çalışmada ise GA hidroklorürün GA sülfatla eşit derecede etkin olduğu belirlenmiştir (Qiu ve ark., 2005).

GA'nın sülfat tuzu formu, osteoartritli hastalarda keratan sülfatın disakkarit alt ünitesinin yarısını oluşturmaktadır. Artikular kartilaj ve sinoviyal sıvıda bulunan hyaluronik asit ise glukuronik asit ve N-asetilglukozaminin tekrar eden dimerik ünitelerinden oluşmaktadır (Leffler ve ark., 1999).

1.10.1 GA' nın etki mekanizması

GA' nın kondrositleri koruyucu etkisinin olası mekanizmaları arasında kondrositlerin uyarılması, sülfürün kartilaj yapısına katılması ve vücutta değişen gen ekspresyonu sonucunda gerçekleşen yıkım yolaklarından korumanın yer aldığı bildirilmiş (Setnikar ve ark., 1993), GA sülfatın (GS) in vitro prostaglandin E2 (PGE2) üretimini azalttığı ve kondrositlerde ve sinoviyal hücrelerde NFkB DNA bağlanmasını etkilediği gösterilmiştir (Largo ve ark., 2003).

GA in vitro OA kartilajının gen ekspresyonunu azaltmaktadır (van Osch ve ark., 2006). GA'nın anabolik ve katabolik genleri inhibe ettiği ve terapötik etkilerinin anabolik aktivitelerden çok anti-katabolik aktivitelerden kaynaklandığı öne sürülmektedir (Altman ve ark., 2006).

D-GA' nın antitümör aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada ise D-GA hidroklorürün insan hepatoma SMMC-7721 hücrelerinin büyümesini doz bağımlı olarak azalttığı belirlenmiştir. D-GA hidroklorürün hücreleri apoptoza indüklediği ve Kunning farelerde Sarcoma 180' e karşı antitümör etki gösterdiği belirlenmiştir (Zhang ve ark., 2006).

Akciğerin inflammatuvar yanıtında bakteri infeksiyonu tarafından IL-6 ve IL-8 gibi inflammatuvar sitokinlerin uyarıldığı ve GA' nın bu iki sitokinin sekresyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada GA' nın LPS ile indüklenen inflammatuvar sitokin ekspresyonunu, kısmen MAPK aktivasyonunun azaltılması aracılığı ile güçlü bir şekilde baskılayabildiği de bildirilmiştir. (Wu ve ark., 2010).

GA sülfatın K562 lösemik hücre serisinde katepsin D translokasyonunu, sitozole sitokrom c salımını ve kaspaz-3 aktivasyonunu uyardığı ve hücre proliferasyonunu azaltarak apoptozu mitokondriyal yolak üzerinden uyardığı belirlenmiştir (Wang ve ark., 2006).

İnsan DU145 prostat kanser hücrelerinde GA' nın etkilerinin incelendiği bir çalışmada ise, GA' nın doz bağımlı olarak proliferasyonu azalttığı ve apoptozu arttırdığı, ve bu anti-proliferatif etkilerinin STAT3 yolağı üzerinden gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Söz konusu çalışmada, hücre döngüsü ve apoptozu kontrol eden p21, p27 ve survivin genlerinin ekspresyonlarının GA tedavisi ile değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Chesnokov ve ark., 2009).

2008 yılında yapılan bir çalışmada, osteoartritin ve kartilaj degredasyonunun ortaya çıkmasında önemli rol oynayan kondrosit ölümü üzerinde GA' nın etkileri incelenmiştir. Çalışmanın sonuçları GA' nın lipofilik bir türevi olan Glu5' in, darbeyle indüklenen kondrosit apoptozunu mitokondriyal depolarizasyonu azaltarak önlediğini ortaya koymaktadır (Huser ve Davies, 2008). Bir başka çalışmada ise, GA' nın, iskemi ve reperfüzyon sonrasında kardiyomyosit apoptozunu önlediği belirlenmiştir (Champattanachai ve ark., 2006).

1.10.2 GA'nın klinik kullanımı

Oral GA ağrıyı azaltmaya yardımcı olduğu ve osteoartrite bağlı hareket kaybını giderdiği gerekçesiyle Avrupa ve Amerika' da yaygın olarak kullanılmaktadır ve Amerika' da satılan diyet destek preparatlarının pek çoğunda GA yer almaktadır. Kartilajdaki yapısal ve eklemler için lubrikant özellikler sergilemesi nedeni ile atletik amaçla kullanımı da oldukça talep görmektedir (Block ve ark., 2010). Bunun yanında, GA' nın inflammatuvar barsak hastalığı (Kupferschmidt ve ark., 1996), migren ve viral infeksiyonlar gibi hastalıkların tedavisinde klinik olarak yarar sağladığı öne sürülmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Kullanılan Cihazlar

Spektrofotometre (Spectramax), santirifüj (Beckman Coulter), steril kabin (Holten Lamin Air), CO_2 İnkübatörü (Sanyo), otomatik pipetler (Gilson), su banyosu (Mettler), magnetik karıştırıcı (Velp Scientifica), pH metre (Sesa 1400), -20 ºC ve -80 ºC derin dondurucular (Heto, Sanyo, Bosch), buzdolabı (Arçelik), vorteks (Heidolph), elektronik terazi (Mettler Toledo), çalkalayıcı (Labnet İnternational), inverted mikroskop (Leica), floresan mikroskop (Olympus), spektroflorometre (Perkin-Elmer), akım sitometri (Accuri C6) kullanıldı.

2.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

RPMI 1640 medium, fetal bovine serum, penisilin/streptomisin, L-glutamin, PAA firmasından, sülfanilamid, naftiletilen diamine, BSA, glisin, PBS, thiazol blue tetrazolium bromide (MTT), DMSO, aminoguanidine hydrochloride, rhodamine 123 Sigma'dan, annexin V, propidium iodide BD Biosciences' dan, kaspaz-3, kaspaz-9 substratları Alexis Biochemicals, Bradford ajanı Thermo firmasından, GA hidroklorür Sigma' dan, CS, MSM Aldrich firmasından temin edildi.

2.3 Kullanılan Hücre Serisi

Çalışmalarımızda University of Complutense Department of Pharmacology, Madrid, Prof. Dr. Beatris de Las Heras Polo tarafından hediye edilen RAW 264.7 makrofaj hücre serisi kullanıldı.

2.4 İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri StatistiXL istatistik programı ile One way Anova Varyans Analizi Testi kullanılarak yapıldı. Birbirinden bağımsız en az üç denemeden elde edilen 3 tekrarlı sonuçlar kullanıldı.

2.5 Kullanılan Yöntemler

2.5.1 Hücre Kültürü

RAW 264.7 makrofaj hücreleri, 75cm^2'lik flasklarda, 37°C'de, %5 CO_2 ile doyurulmuş havada, %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin antibiyotikleri ve fetal sığır serumu (%10) içeren RPMI 1640 hücre kültür besiyerinde çoğaltıldı. Steril fetal bovin serumu, RPMI 1640 besiyeri içine eklenmeden önce, 60°C su banyosunda 30 dakika ısı ile inaktive edildi. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştıklarında kazıyıcı ile kazınarak pasaj yapıldı.

2.5.2 Hücre Sayımı ve Canlı Hücrelerin Belirlenmesi

Deneylerimiz sırasında, 6'lı, 24'lü ya da 96'lı plaklara ekim yapılmadan önce, her kuyuya eşit sayıda canlı hücre ekmek amacıyla trypan mavisi kullanılarak neubauer lamında hücre sayımı yapıldı. Neubauer lamı, iki özdeş bölmeye sahip ve sayma bölmesinin derinliği 0,1mm, alanı 1mm^2, hacmi 0,1mm^3 olan bir lamdır. Trypan mavisi ise sadece hücre membran geçirgenliğinin bozulduğu durumlarda membrandan geçebilen bir boyadır. Böylelikle hücrelerin trypan mavisi ile muamelesi sonucunda, canlı hücreler boyanmazken ölü hücreler maviye boyanır ve mikroskopta canlı hücrelerin sayımı yapılır (Strober, 2001). Çalışmamızda, bu

amaçla, 20 µl hücre süspansiyonu eşit hacimde trypan mavisi çözeltisi ile karıştırıldı ve canlı hücre sayısı aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

1ml ($1cm^3$)'teki hücre sayısı = $0,1mm^3$'teki hücre sayısı x dilusyon faktörü x 10^4

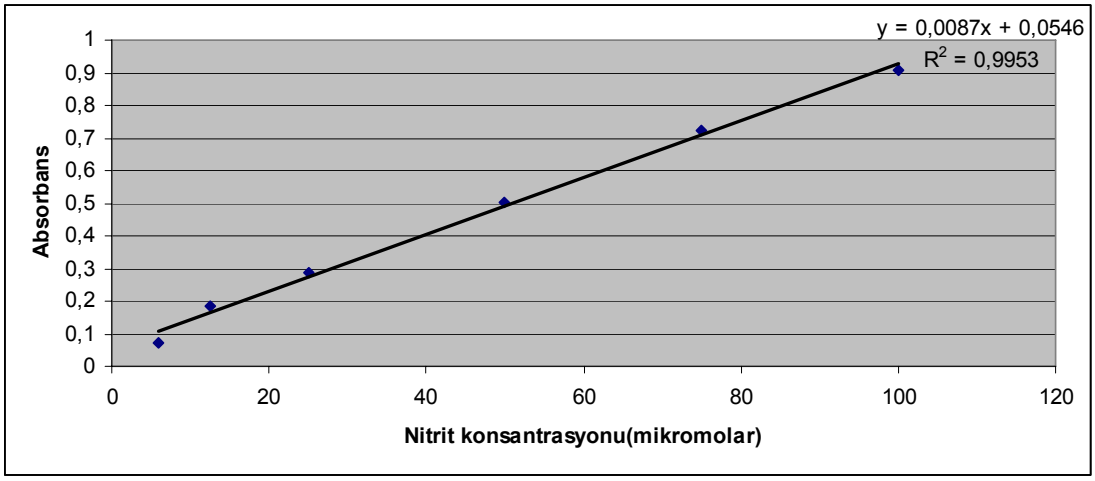
2.5.3 Hücre Canlılık Testi

Çalışmalarımız sırasında, hücrelerin canlılığının belirlenmesi amacıyla 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrozolium bromide (MTT) testi yapıldı. Bu test, tetrazolyum boyasının, canlı hücrelerdeki mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrogenazla verdiği tepkimeler sonucunda indirgenmesiyle oluşan, formazan maddesinin spektrofotometrik ölçümü esasına dayanır. MTT, hücrelere aktif olarak absorbe olan sarı renkli bir boyadır. Canlı hücrelerde mitokondri tarafından bu boyanın tetrozolyum halkası parçalandığında, mavi-mor renkli suda çözünmeyen formazan kristalleri oluşur. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak kabul edilir ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu, canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterir (Mosmann, 1983).

Çalışmamızda, MTT boyası, final konsantrasyonu 2mg/ml olacak şekilde RPMI 1640 besiyerinde çözüldü. Hücrelerin üzerindeki besiyeri atıldıktan sonra, 96'lık plakta her kuyuya 20µl MTT çözeltisi ve 100µl besiyeri eklenerek 37°C'de, CO_2 inkübatöründe 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri-MTT karışımı atıldı ve canlı hücrelerde oluşan formazan kristallerinin, 100 µl DMSO eklenerek çözünmesi sağlandı. Birkaç dakika içinde 550 ve 690nm'de spektrofotometrede absorbans ölçüldü. Yapılan denemeye bağlı olarak, LPS uygulanan grupta ya da kontrol (uyarılmamış) grubunda ölçülen absorbans değeri %100 canlılık olarak kabul edildi ve diğer hücre gruplarındaki canlılık da bu değerden hareketle yüzde olarak hesaplandı.

2.5.4 Nitrit Ölçümü

Hücre dışı süpernatanlarında nitrit düzeyleri Griess yöntemine göre belirlendi. Griess reaktifi, %5 fosforik asit içinde hazırlanmış %1 sülfanilamid ve 0.1 % naftiletilendiaminin eşit hacimlerde karıştırılması ile hazırlandı. RAW 264.7 hücrelerinin süpernatanları eşit hacimde Griess reaktifi ile karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyonun ardından oluşan rengin 550 nm'de verdiği absorbans mikroplaka okuyucuda ölçüldü (Griess, 1879). Süpernatanlardaki nitrit konsantrasyonları, şekil 2.1'de gösterilen sodyum nitrit standart eğrisi kullanılarak µM olarak belirlendi.



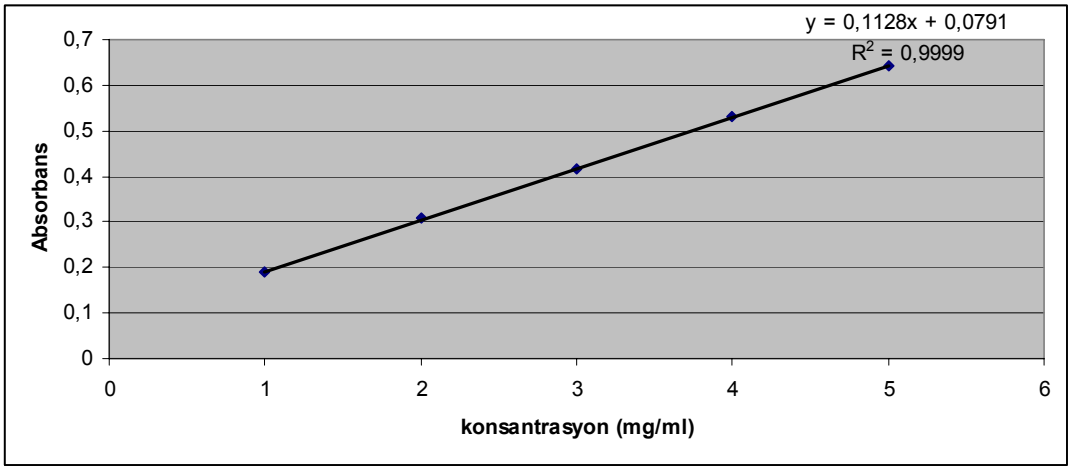
Şekil 2.1. Nitrit Standart Grafiği

2.5.5 Protein Miktar Tayini

Çalışmamızda kaspaz aktivite tayininde verilerin mg protein başına hesaplanmalarını sağlamak üzere Bradford metoduna göre protein tayini yapıldı (Bradford, 1976).

Bu amaçla, 96'lı plaklarda her kuyuya, 3µl örnek ve 100µl Bradford ayıracı konuldu. Karanlıkta, 5 dakika, oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 595 nm'de absorbans ölçüldü. 10 mg/ml BSA stok çözeltisinden hareketle gerekli seyreltmeler yapılarak

standart çözeltiler hazırlandı. Şekil 2.4'de görülen standart grafiğe göre örneklerin protein miktar tayini yapıldı.



Şekil 2.2. Bradford Standart Grafiği

2.5.6 Mitokondri membran potansiyelinin belirlenmesi

Çalışmamızda, apoptozun mitokondriyal içsel yolağında ortaya çıkan mitokondriyal membran potansiyel değişimi spektroflorometrik olarak belirlendi. Bu amaçla, hücreler trypan blue ile sayıldıktan sonra 6'lık plaklara ekim yapılarak bir gecelik inkübasyona bırakıldılar. Ertesi gün hücreler, etkileri belirlenecek olan kimyasallarla bir saatlik ön inkübasyonun ardından LPS/IFN-gamma ile 24 saatlik inkübasyona bırakıldılar. Bu son inkübasyonun ardından kuyulardaki hücreler PBS ile 1000 rpm' de iki kez santrifüj edilerek yıkandıktan sonra PBS-rhodamine 123 ile 37^0C'de 15 dakika inkübe edildiler. İnkübasyonun ardından hücreler, hücre içine alınmayan boyayı uzaklaştırmak üzere 3 kez 2000 rpm' de PBS ile santrifüj edilerek yıkandı ve süpernatanları uzaklaştırıldı. Kalan hücre pelleti PBS ile tekrar süspanse edilerek 490 nm eksitasyon ve 525 nm emisyon dalga boylarında spektroflorometrik olarak ölçüm yapıldı (Yang ve ark., 2004). Ölçülen floresan şiddeti (Rh 123 alımı) her örneğin içerdiği mg protein miktarına oranlandı (Floresan şiddeti/mg protein). Yapılan Kontrol (uyarılmamış) grubunun Rh 123 alımı %100 olarak kabul edildi ve diğer hücre gruplarındaki Rh 123 alımı bu değerden hareketle yüzde olarak hesaplandı.

2.5.7 Kaspaz-3 Aktivitesi Tayini

Hücreler trypan blue ile sayıldıktan sonra 6'lık plaklara ekim yapılarak bir gecelik inkübasyona bırakıldılar. Ertesi gün hücreler, MSM, GA ve CS ile bir saatlik ön inkübasyonun ardından LPS/IFN-gamma ile 24 saatlik inkübasyona bırakıldılar. Bu son inkübasyonun ardından kuyulardaki hücreler PBS ile iki kez yıkandıktan sonra liziz tamponu ile muamele edilerek sitozolik ekstreleri hazırlandı.

Elde edilen lizat ependorflara alındıktan sonra buz üzerinde 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından 10µl triton X 100 (%10) eklendi, 8 saniye vorteks ve 13.000 rpm'de 4ºC'de 30 saniye santrifüj yapıldı (Heras ve ark., 2008). Elde edilen süpernatan sitozolik ekstre olarak kullanıldı ve sitozolik ekstrede daha önce de belirtildiği şekilde Bradford yöntemine göre protein tayini yapıldı.

Elde edilen lizatların 10 µL' si kaspaz-3'ün substratı ile 96'lık plakta 1 saatlik inkübasyona bırakıldıktan sonra oluşan florojenik ürünün floresan şiddeti 340 nm eksitasyon ve 460 nm emisyon dalgaboylarında ölçüldü. Ölçülen floresan şiddeti her örneğin 10 µL' sinde içerdiği mg protein miktarına oranlandı (Floresan şiddeti/mg protein).

2.5.8 Annexin V ve Propidyum iyodür ile apoptoz tayini

FITC Annexin V, negatif yüklü fosfolipid yüzeylerine bağlanan, diğer fosfolipidlere göre fosfotidilserine en yüksek affiniteyi gösteren ve apoptotik hücreleri belirlemek için kullanılan hassas bir boyadır. FITC Annexin V bağlanması kalsiyum bağımlıdır ve Annexin V boyama protokolünde tanımlanmış olan optimal boyanma için gerekli kalsiyum ve tuz konsantrasyonlarında gerçekleşmektedir.

Hücreler 6'lık plaklara ekim yapılarak bir gecelik inkübasyona bırakıldılar. Ertesi gün etkileri belirlenecek olan kimyasallarla bir saatlik ön inkübasyonun ardından LPS/IFN-gamma ile 24 saatlik inkübasyona bırakıldılar. Bu son inkübasyonun

ardından kuyulardaki hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandıktan sonra trypsin-EDTA ile muamele edilerek appendorflara alındılar. 1000 g' de santrifüj edilerek tripsin-EDTA uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile tekrar yıkanan hücreler, daha sonra ml' de 10^6 hücre olacak şekilde 1x bağlama tamponunda tekrar süspanse edildiler. Bu solusyondan 100 µl alınarak üzerine 5 µl FITC Annexin V ve 5 µl propidyum iyodür eklendi. Hücreler çok hafifçe vortexlenerek 15 dakika oda ısısında inkübe edildiler. İnkübasyonun ardından hücrelerin üzerine 400 µl 1xbağlama tamponu eklendi ve 1 saat içinde akım sitometride ölçüm gerçekleştirildi (Heras ve ark, 2008). Akım sitometri ölçüm sonuçlarına göre Annexin V-FITC ile boyanan hücreler FL1A'da ve PI ile boyanan hücreler ise FL3A' da ışıma yaparak sayıldılar ve her iki boya ile ışıma yapan hücreler ileri apoptotik olarak belirlendiler. Akım sitometri cihazında her örnek için Ann V ve PI ile boyanan hücre sayısının, hücre sayısının tamamının % kaçı olduğu analiz edildi.

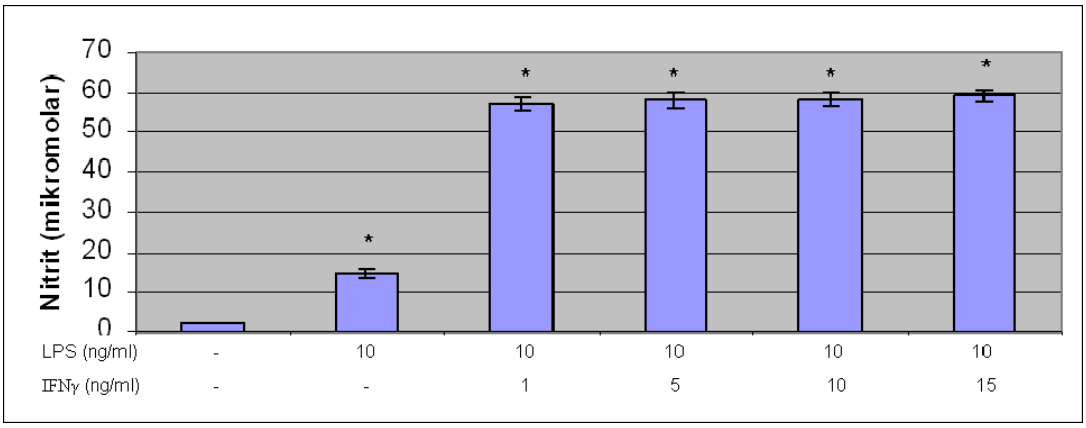
3. BULGULAR

3.1 Lipopolisakkarit (LPS)/İnterferon gamma (IFN-γ)'nın Nitrik Oksit Düzeyleri ve Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Zamana Bağlı Değişimi

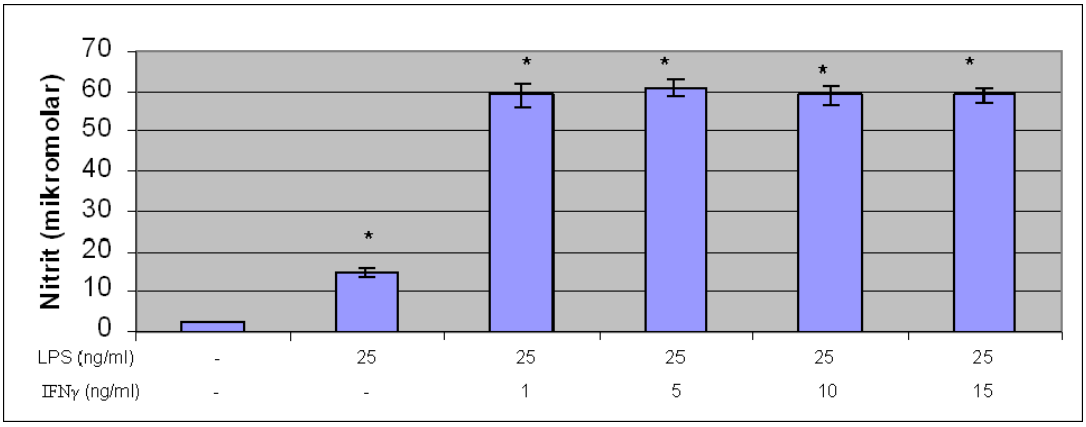
MSM, GA ve CS' nin LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde apoptoz üzerine olan etkilerinin saptanmasını amaçlayan çalışmamızda öncelikle RAW 264.7 makrofaj hücrelerini apoptoza indükleyecek olan LPS ve IFNγ kombinasyon dozu belirlendi. Bilindiği gibi RAW 264.7 makrofaj hücreleri LPS ve IFNγ ile uyarıldıklarında aralarında nitrik oksitin de bulunduğu çeşitli biyolojik aracı molekülleri salmaktadırlar. Sentezlenen nitrik oksit, doza va zamana bağlı olarak makrofaj hücrelerini apoptoza götürmektedir. Çalışmamızda MSM, CS ve GA' nin aktive makrofajların apoptoz üzerine etkilerini saptamak üzere öncelikle RAW 264.7 makrofaj hücreleri, 96, 24 ve 6 kuyucuklu plaklara 10^6 hücre/1 ml konsantrasyonda ekildi. Bir gecelik inkübasyonun ardından hücrelerin kullanmış oldukları besiyeri atılarak taze besiyeri ile değiştirildi ve farklı dozlarda LPS/IFNγ varlığında ve yokluğunda inkübe edildi. Adherent karakterde hücreler olan RAW 264.7 makrofajlarının besiyeri, NO tayini için kullanıldı. Hücrelerde, prensibi canlı hücrelerin mitokondriyal süksinil dehidrogenaz enzimi tarafından renkli formazan yapısının oluşumuna ve kolorimetrik ölçüme dayanan MTT canlılık testi, kaspaz aktivitesi ve morfolojik analizler yapıldı. Bu denemlerden elde edilen sonuçlar ile hücrelerin aktivasyonunda kullanılacak olan uygun LPS/IFNγ dozu belirlendi.

Elde etmiş olduğumuz sonuçlar, LPS/IFNγ' nın uygulanan tüm dozlarda kombine olarak uygulandığında RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit düzeylerini uyarılmamış gruba göre anlamlı olarak arttırdığını göstermiştir ($p<0.001$). LPS/IFNγ' nın sırası ile 10 ng/ml+1 ng/ml' lik (uygulanan en düşük doz) ve 250 ng/ml+15 ng/ml' lik (uygulanan en yüksek doz) dozlarda uygulandığında ise makrofajların nitrit üretimi arasında anlamlı bir fark yaratmadığı belirlendi (Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4,

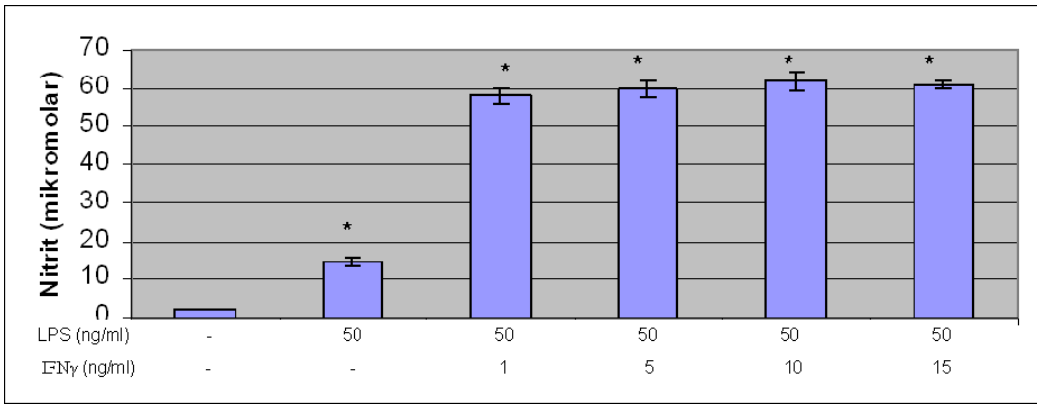
3.5) ve bu optimizasyonun ardından inkübasyon süresinin değerlendirilmesine geçildi.



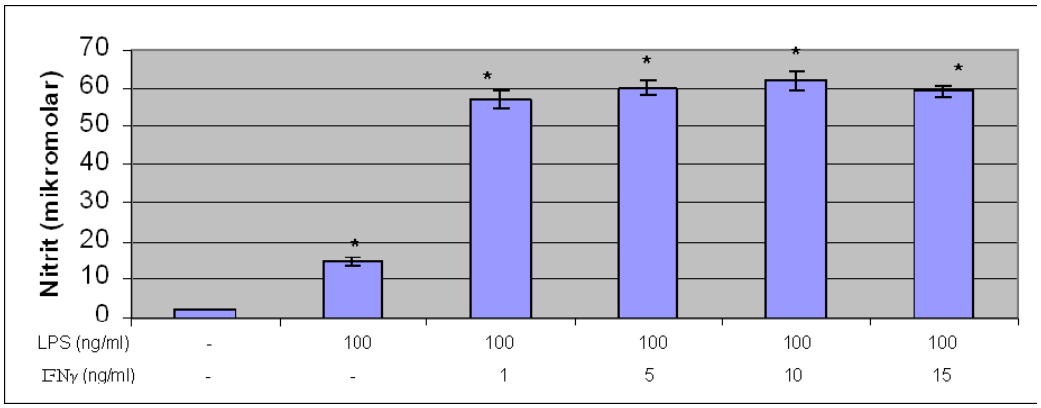
Şekil 3.1. LPS (10 ng/ml) ve LPS' nin (10 ng/ml) IFNγ (1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml) ile farklı dozlardaki kombinasyonlarının RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit üretimi üzerine etkisi (*)p<0,001 (Kontrol grubuna göre anlamlı, n=9).



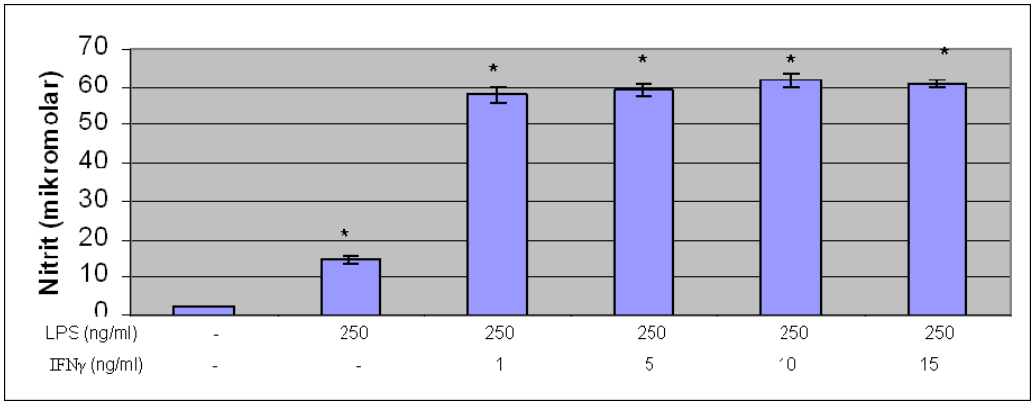
Şekil 3.2. LPS (25 ng/ml) ve LPS' nin (25 ng/ml) IFNγ (1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml) ile farklı dozlardaki kombinasyonlarının RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit üretimi üzerine etkisi. (*)p<0.001 (Kontrol grubuna göre anlamlı, n=9).



Şekil 3.3. LPS (50 ng/ml) ve LPS' nin (50 ng/ml) IFNγ (1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml) ile farklı dozlardaki kombinasyonlarının RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit üretimi üzerine etkisi. (*) p<0.001 (Kontrol grubuna göre anlamlı, n=9).

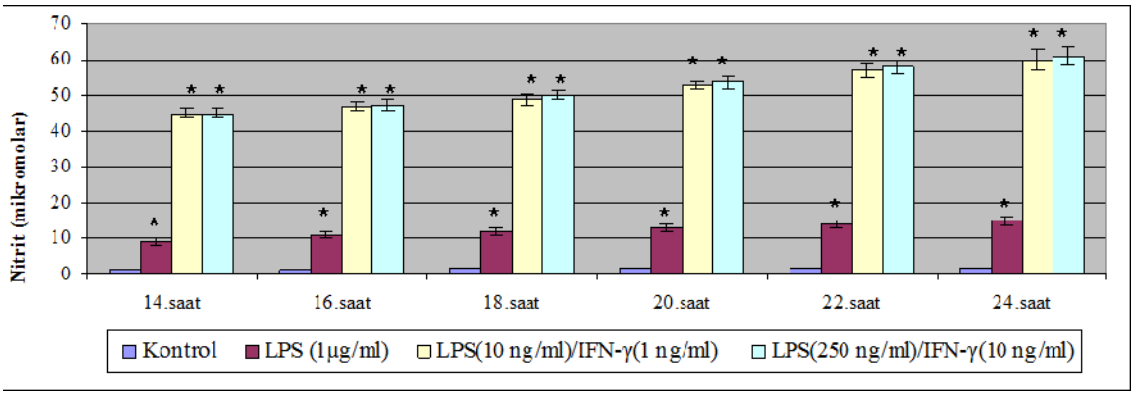


Şekil 3.4. LPS (100 ng/ml) ve LPS' nin (100 ng/ml) IFNγ (1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml) ile farklı dozlardaki kombinasyonlarının RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit üretimi üzerine etkisi. (*)p<0.001 (Kontrol grubuna göre anlamlı, n=9).

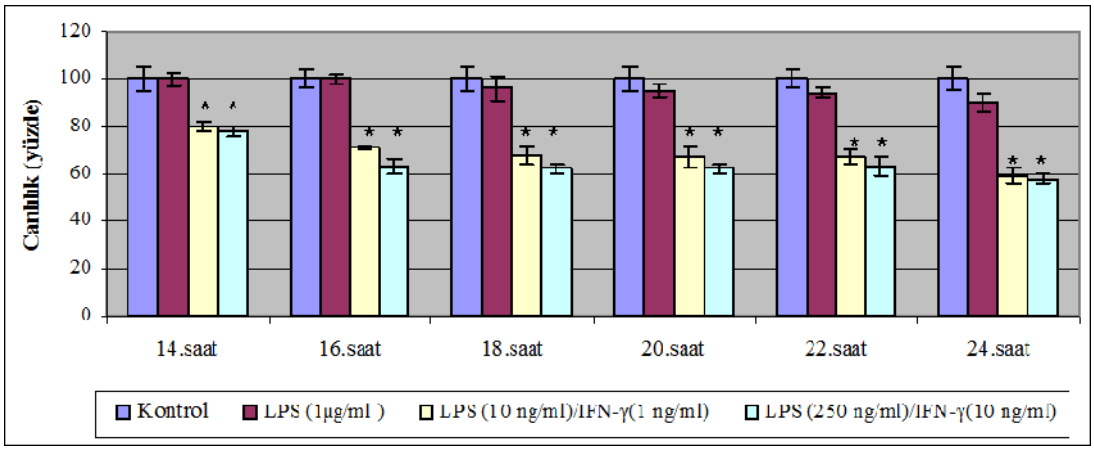


Şekil 3.5. LPS (250 ng/ml) ve LPS' nin (250 ng/ml) IFNγ (1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml) ile farklı dozlardaki kombinasyonlarının RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit üretimi üzerine etkisi. (*)p<0.001 (Kontol grubuna göre anlamlı, n=9).

LPS/IFNγ' nın RAW 264.7 makrofaj hücreleri ile inkübasyon sürelerinin optimizasyonu amacı ile, makrofaj hücreleri LPS/ IFNγ' nın bir önceki denemede seçilmiş olan en düşük ve yüksek dozları ile 14, 16, 18, 20, 22 ve 24 saat süre ile inkübe edildi. Elde etmiş olduğumuz sonuçlar, LPS/IFNγ' nın 10 ng/ml+1 ng/ml' lik (uygulanan en düşük doz) ve 250 ng/ml+15 ng/ml' lik (uygulanan en yüksek doz) dozlarda RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde 14.saatten itibaren nitrit düzeyini anlamlı olarak arttırdığı ve hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı belirlendi (Şekil 3.6 ve 3.7). LPS tek başına uygulandığında ise hücre canlılığında sadece 24. saatte azalmaya yol açtığı belirlendi ($p<0.05$). LPS/IFNγ' nın 10 ng/ml+1 ng/ml' lik dozda nitrit düzeyini anlamlı olarak arttırması, hücre canlılığını anlamlı olarak azaltması ($p<0.001$) ve bu dozun üzerindeki diğer dozlarda yanıtın anlamlı olarak değişmemesi nedeni ile bundan sonraki çalışmalarda RAW 264.7 makrofajlarının uyarılması ve nitrik oksit bağımlı apoptotik bir model oluşturulması için 10 ng/ml LPS+1 ng/ml' lik IFNγ dozunun seçilmesine karar verildi.



Şekil 3.6. LPS ve LPS' nin IFNγ ile kombinasyonlarının RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin nitrit düzeyleri üzerine etkisi.
(*): $p<0.001$ (Uyarılmamış hücre grubuna göre anlamlı, n=9).



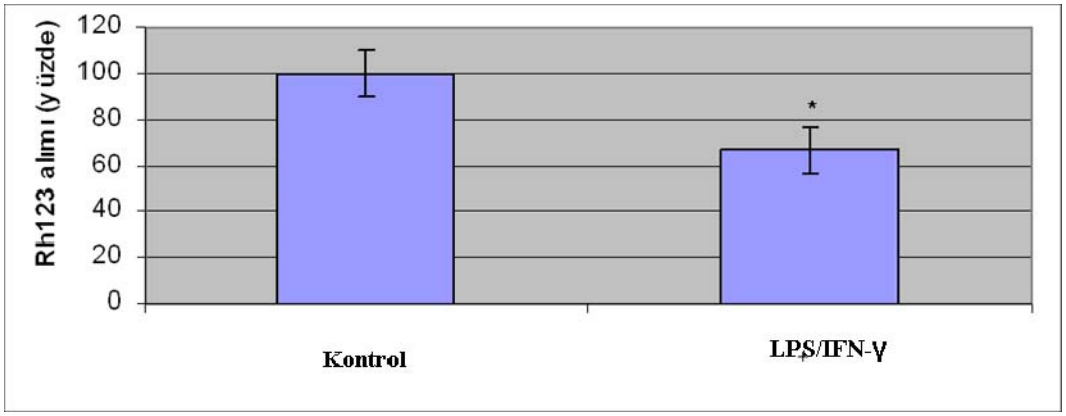
Şekil 3.7. LPS ve LPS' nin IFNγ ile kombinasyonlarının RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

(*): $p<0.001$ (Uyarılmamış hücre grubuna göre anlamlı, n=9).

3.2 Lipopolisakkarit (LPS)/İnterferon gamma (IFN-γ)'nın mitokondri membran potansiyeli ve kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri

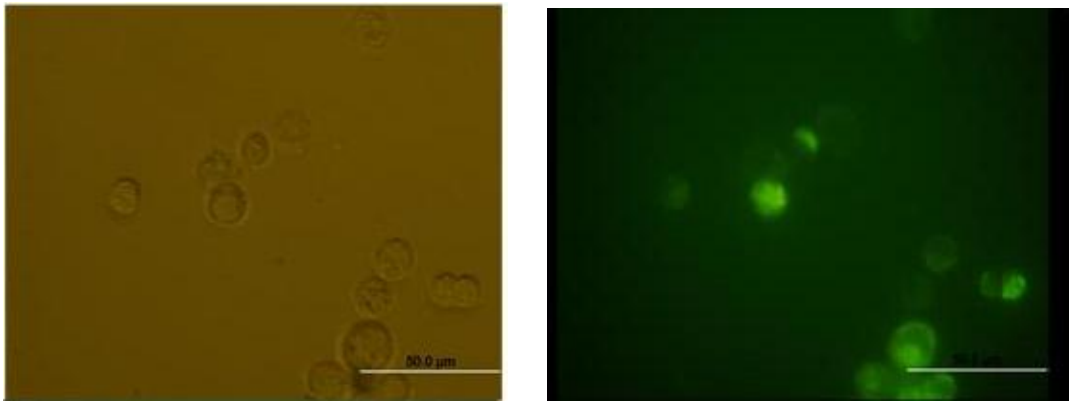
Bu aşamaya kadar yapmış olduğumuz çalışmalarda LPS(10 ng/ml)/IFNγ(1 ng/ml) kombinasyonunun 24 saatlik inkübasyonunun RAW 264.7 makrofajlarında hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığını belirledik. Canlılıktaki azalmanın apoptoza bağlı olarak gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak üzere RAW 264.7 makrofajlar 6 kuyucuklu plaklara 10^6 hücre/1 ml konsantrasyonda ekildi. Bir gecelik inkübasyonun ardından besiyeri taze besiyeri ile değiştirildi ve LPS (10 ng/ml)/IFNγ (1 ng/ml) varlığında ve yokluğunda inkübe edildi. Daha sonra hücreler PBS ile yıkanarak mitokondriyal bir katyonik boya olan Rh123 ile inkübe edilerek membran potansiyelleri spektroflorometrik olarak ölçüldü ve floresan mikroskopta görüntüleme yapıldı. Sağlıklı hücrelerin mitokondrileri tarafından Rhodamine 123 alınırken, apoptotik hücrelerin mitokondrilerinin Rhodamine 123'ü tutamadıkları belirlendi.

Elde ettiğimiz sonuçlar LPS/IFNγ ile uyarılan hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelinde kayıp ($p<0.001$)olduğunu gösterdi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Kontrol grubu ile LPS/IFN-γ grubu arasında mitokondriyal membran potansiyelinin değişimi.
(*): ($p<0.001$) Uyarılmamış hücre grubuna göre anlamlı, n=9.

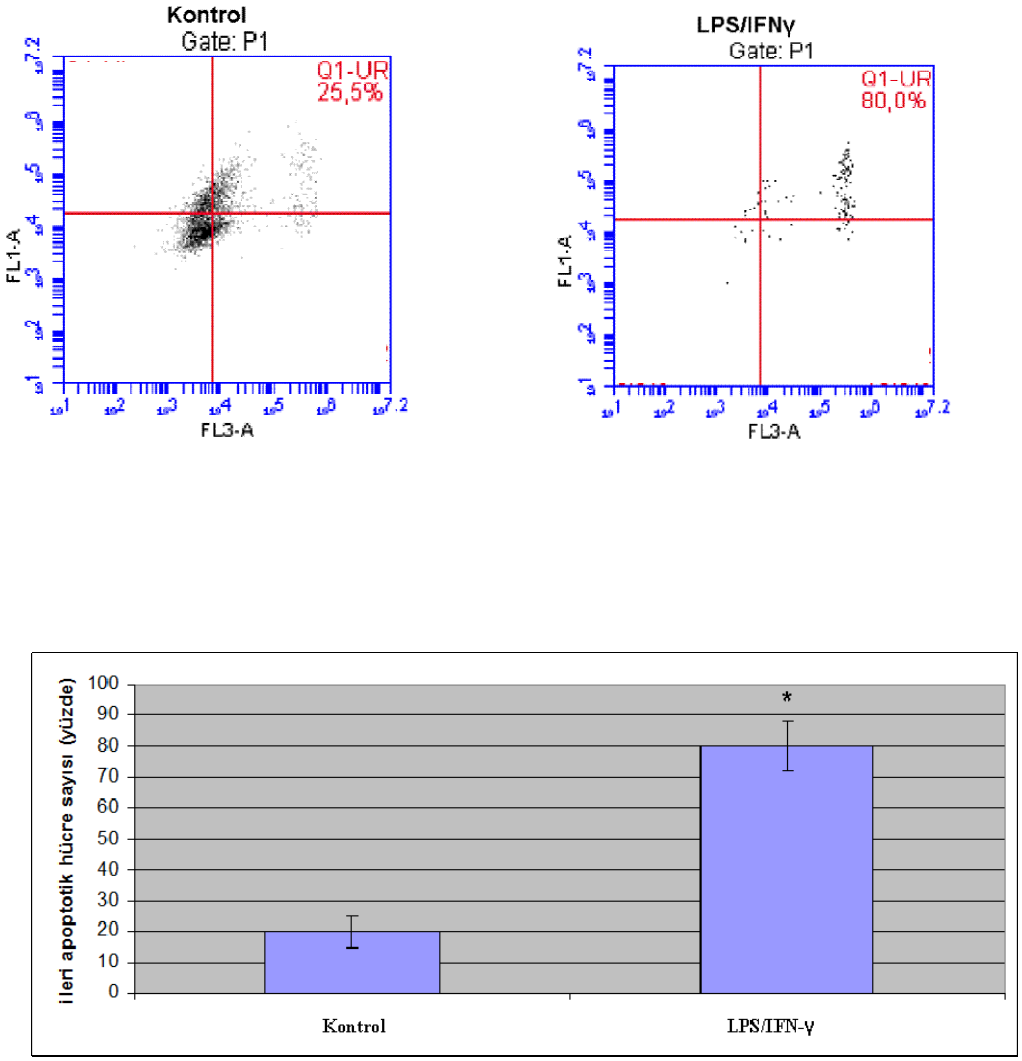
Sağlıklı hücreler ve apoptotik hücreler Rh123 ile boyandıktan sonra ışık ve floresan mikroskobunda da görüntülendiler (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. LPS/IFNγ ile uyarılan makrofaj hücrelerinde Rh123 ile boyanan apoptotik hücrelerin sırasıyla ışık mikroskobunda ve floresan mikroskobundaki görüntüleri.

Aynı inkübasyon protokolü izlenerek hücreler liziz tamponu kullanılarak liziz edildiklerinde ve sitozolik ekstrelerinde protein ve kaspaz-3 aktivite tayini yapıldığında da LPS/IFNγ ile uyarılan hücrelerde uyarılmayan hücrelere kıyasla mg protein başına kaspaz-3 enzim aktivitesinin anlamlı olarak arttığı belirlendi ($p<0.001$). LPS/IFNγ ile uyarım sonrasında AnnV-PI ile boyanarak hücreler akım sitometrik olarak incelendi ve aktive edilen hücre grubunda apoptotik hücre sayısının anlamlı olarak arttığı belirlendi (Şekil 3.10). Böylece LPS/IFNγ uyarımı ile ortaya

çıkan hücre ölümünün apoptotik yolaklar aracılığı ile gerçekleştiği belirlendi ve apoptotik hücre modelinin optimizasyonu sağlandı.

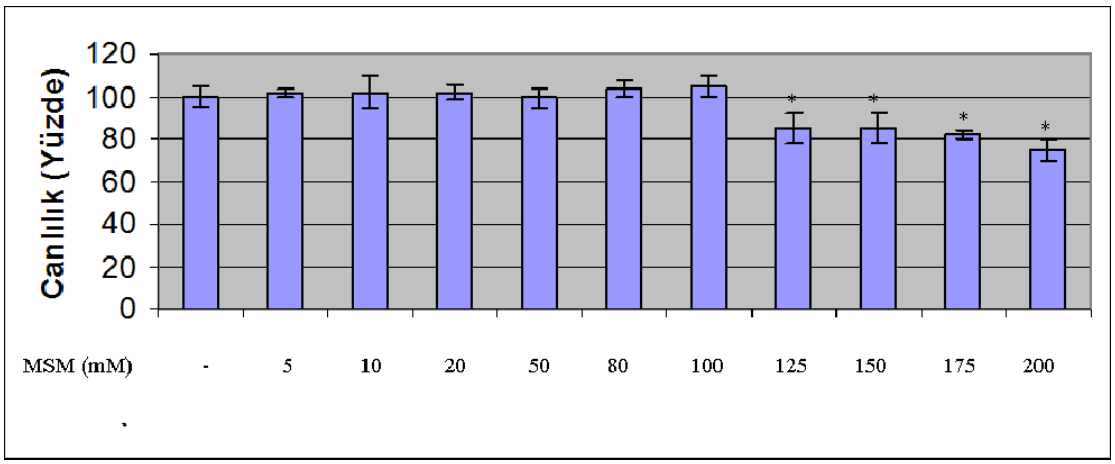


Şekil 3.10**.** LPS /IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin Annexin V-PI ile akım sitometrik analizi (Tek bir denemenin sonuçları simgesel olarak gösterilmektedir) ve grafik halinde gösterimi.
(*):Uyarılmamış (kontrol) hücre grubuna göre anlamlı ($p<0.001$, $n=9$).

3.3 MSM, GA ve CS' nin RAW 264.7 makrofaj hücreleri üzerindeki sitotoksik doz aralığının belirlenmesi

MSM, GA ve kondroitin sülfatın LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde apoptoz üzerine olan etkilerini saptamadan önce bu üç kimyasalın tek başına uygulandıklarında RAW 264.7 makrofajlarının canlılığı üzerindeki etkilerinin saptanması amacı ile, RAW 264.7 makrofajlar, 96 kuyucuklu plaklara 10^6 hücre/1 ml konsantrasyonda ekildi. Bir gecelik inkübasyonun ardından besiyeri taze besiyeri ile değiştirildi ve farklı dozlarda CS, MSM ve GA varlığında ve yokluğunda 25 saat inkübe edildi. MSM, GA ve CS' nin hücreler üzerinde test edilecek konsantrasyon aralığı literatür bilgilerinin ışığında belirlendi (Campo ve ark, 2009; Kim ve ark.i 2009; Rafi ve ark.,2007). Hücre canlılığının belirlenmesi için MTT testi yapıldı.

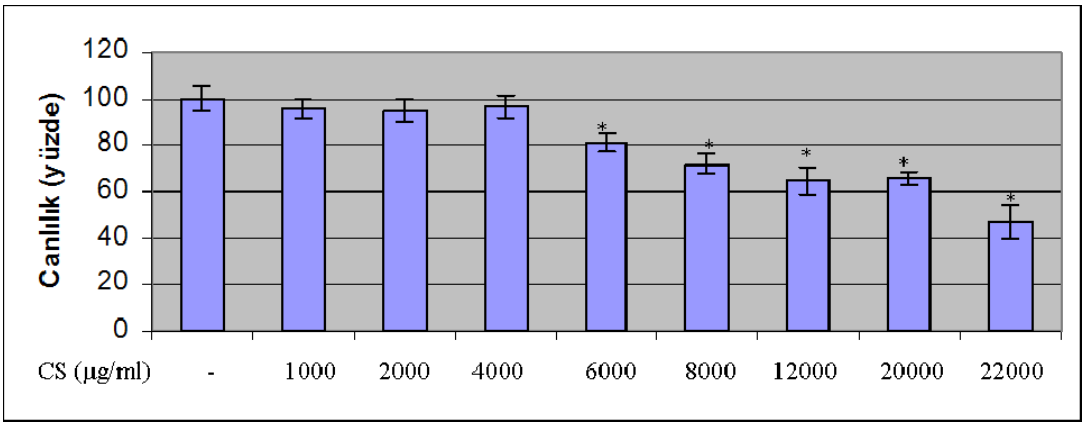
MSM' nin 5 mM ile 100 mM arasındaki konsantrasyonlarda hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir değişiklik yaratmadığı belirlendi ($p>0.05$). MSM' nin 125 mM ve üzerindeki dozlarının RAW 264.7 makrofaj hücreleri üzerinde toksik etki gösterdiği ($p<0.001$) belirlendi (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. MSM'nin makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi. (Makrofaj hücreleri farklı konsantrasyonlarda MSM ile 24 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığı MTT testi ile analiz edildi. Kontrol grubunun canlılığı %100 olarak verilmektedir).
(*): $p<0.001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, n=9).

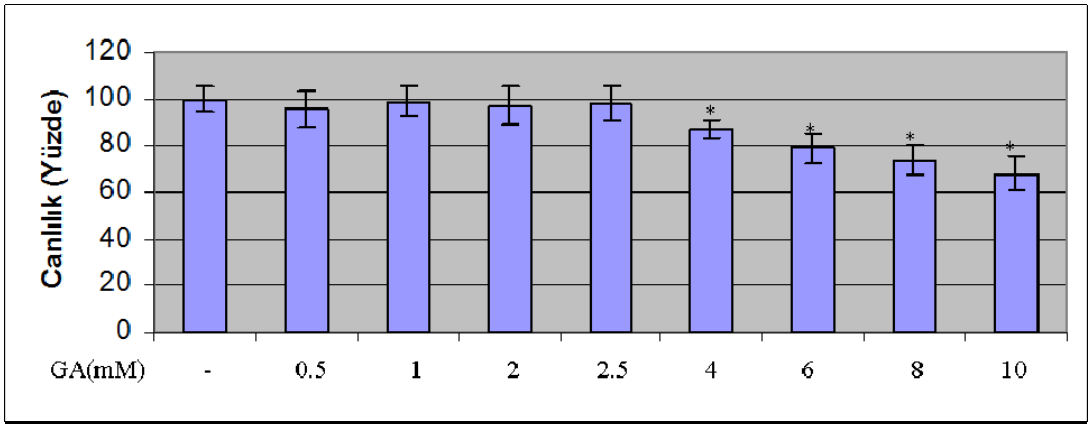
CS' nin 1000 µg/ml ile 4000 µg/ ml arasındaki konsantrasyonlarda hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir etki göstermediği ($p>0.05$), 6000 µg/ ml ve üzerindeki

konsantrasyonlarda ise hücre canlılığını anlamlı ($p<0.001$) olarak azalttığı belirlendi (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. CS' nin makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi. (Makrofaj hücreleri farklı konsantrasyonlarda CS ile 24 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığı MTT testi ile analiz edildi. Kontrol grubunun canlılığı %100 olarak verilmektedir. (*): $p<0.001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, n=9).

GA' nın 0.5 mM -2.5 mM arasındaki konsantrasyonlarda hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir değişiklik yaratmadığı ($p>0.05$), 4 mM' ın üzerindeki konsantrasyonlarda ise RAW 264.7 makrofaj hücreleri üzerinde toksik etki gösterdiği ($p<0.001$) belirlendi (Şekil 3.13).

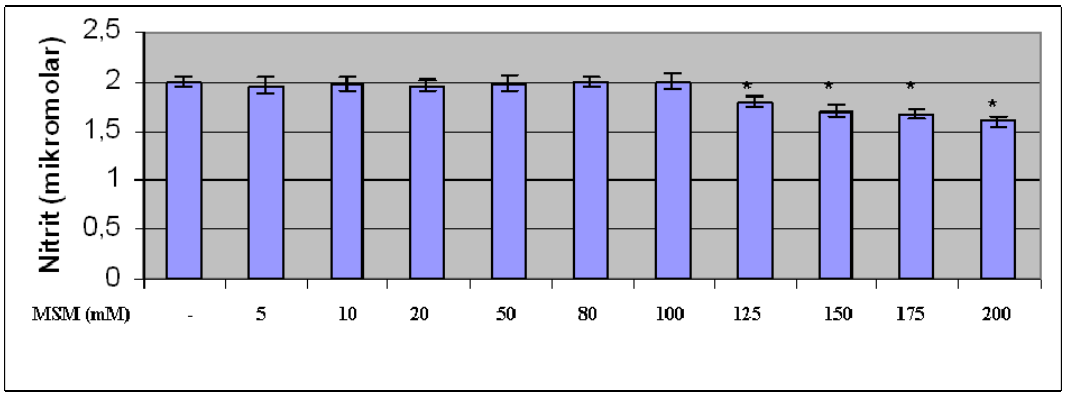


Şekil 3.13. GA'nın makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi. (Makrofaj hücreleri farklı konsantrasyonlarda GA ile 24 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığı MTT testi ile analiz edildi. Kontrol grubunun canlılığı %100 olarak verilmektedir). (*): $p<0.001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, n=9).

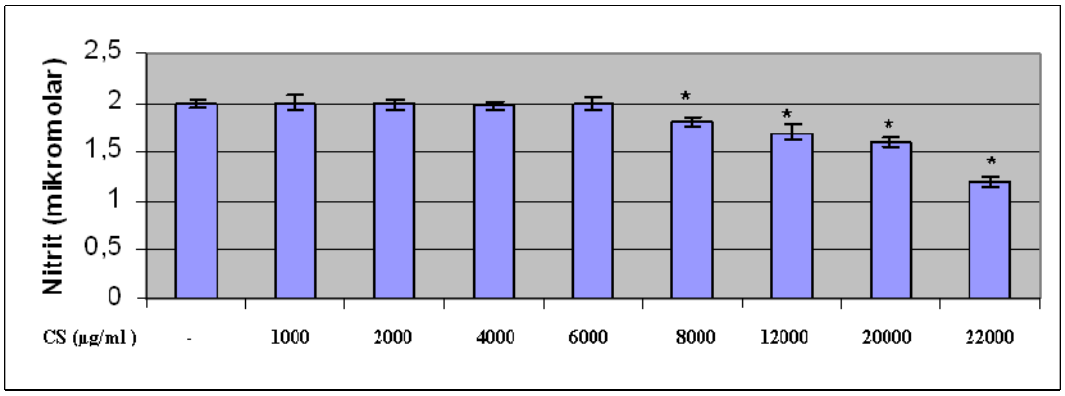
3.4 MSM, GA ve CS' nin RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde bazal nitrit düzeyleri üzerine etkilerinin belirlenmesi

RAW 264.7 makrofajlar, 96 kuyucuklu plaklara 10^6 hücre/1 ml konsantrasyonda ekildi. Bir gecelik inkübasyonun ardından besiyeri taze besiyeri ile değiştirildi ve farklı dozlarda CS, MSM ve GA varlığında ve yokluğunda inkübe edildi. Süpernatanlar nitrit tayini için kullanıldı. Elde ettiğimiz sonuçlar, MSM ve CS' nin yukarıda hücre canlılığı için etkilerinin de belirlendiği toksisite göstermeyen dozlarında hücrelerin bazal nitrit düzeylerini anlamlı olarak etkilemedikleri belirlenmiştir. MSM' nin, 125 mM-200 mM arasındaki konsantrasyonlarda nitrit düzeylerini anlamlı olarak azalttığı belirlendi ($p<0.001$). CS' nin ise 8000-22000 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda nitrit düzeyini anlamlı ($p<0.001$) olarak azalttığı belirlendi (Şekil 3.14, Şekil 3.15).

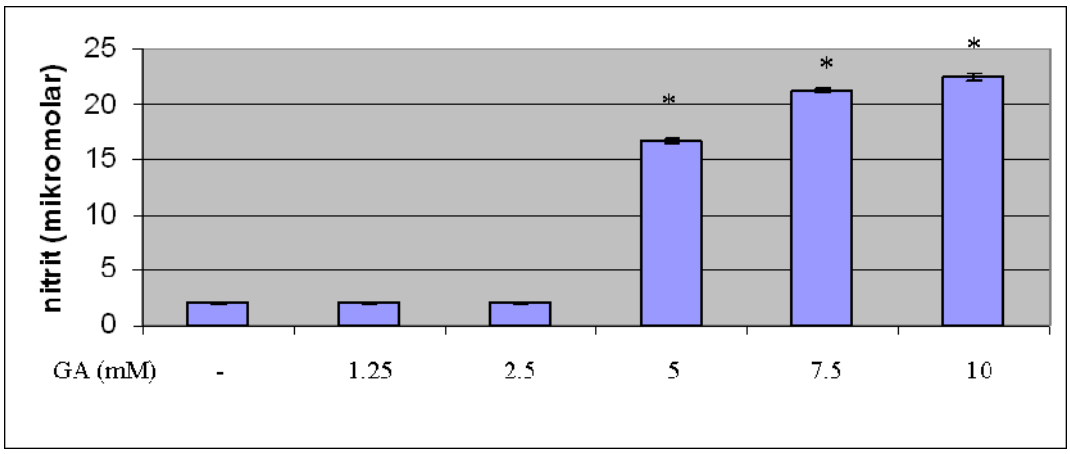
MSM ve CS' nin bu dozlarda nitrit düzeylerini azaltıcı etkilerinin canlılığı azaltıcı etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak, GA 4 mM ve üzerindeki dozlarda RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde bazal nitrit düzeylerini anlamlı ($p<0.001$) olarak arttırmıştır (Şekil 3.16).



Şekil 3.14. MSM'nin makrofaj hücrelerinin nitrit düzeyleri üzerine etkisi.
(*): $p<0.001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, n=9).



Şekil 3.15**.** CS'nin makrofaj hücrelerinin nitrit düzeyleri üzerine etkisi.
(*): p<0.001 (Kontrol grubuna göre anlamlı, n=9).

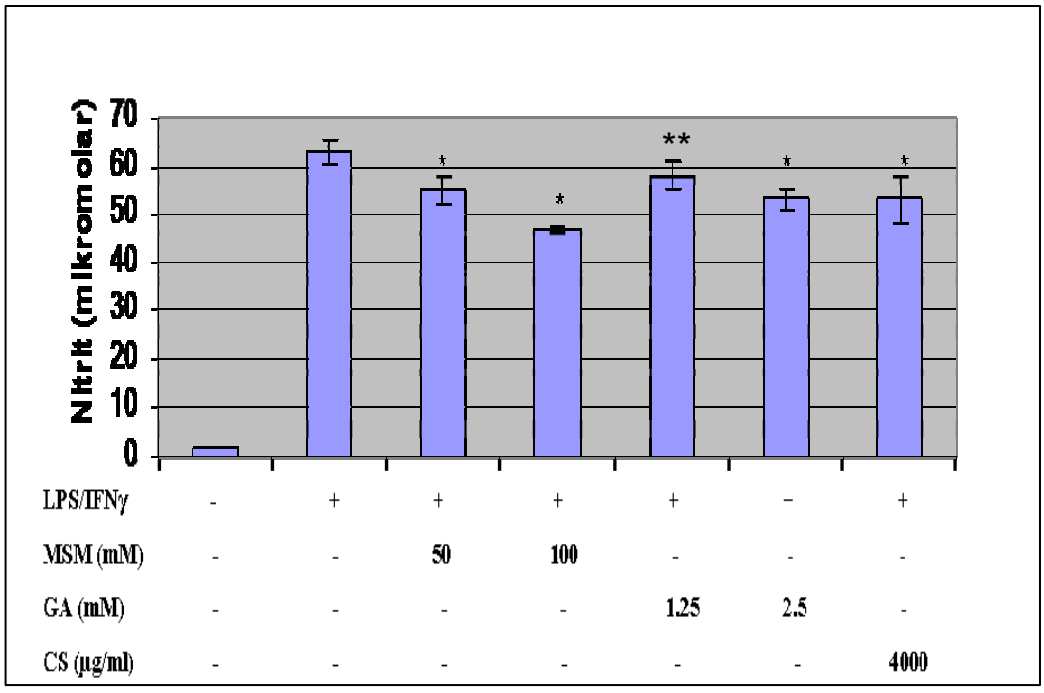


Şekil 3.16**.** GA'nın makrofaj hücrelerinin nitrit düzeyleri üzerine etkisi.
(*): p<0.001 (Kontrol grubuna göre anlamlı, n=9).

Bu verilerden hareketle, MSM, GA ve CS' nin RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde toksik olmayan ve nitrit düzeylerini etkilemeyen dozları MSM için 125 mM' ın altındaki, GA için 4 mM'ın altındaki ve CS için 4000 µg/ml' nin altındaki dozlar olarak belirlenmiştir.

3.5 MSM, GA ve CS' nin tek başına, LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit düzeyleri üzerine etkileri

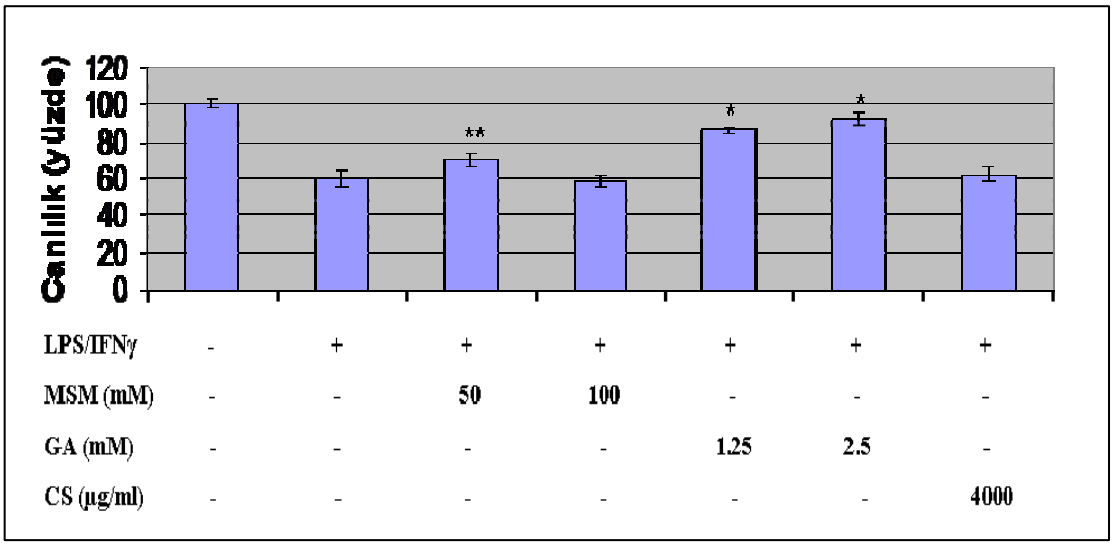
RAW 264.7 makrofajlar, 96 kuyucuklu plaklara 10^6 hücre/1 ml konsantrasyonda ekildi. Bir gecelik inkübasyonun ardından besiyeri taze besiyeri ile değiştirildi ve farklı dozlarda CS, MSM ve GA varlığında ve/veya yokluğunda 1 saatlik ön-inkübasyonun ardından 24 saat LPS/IFNγ ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda süpernatandaki nitrit düzeyi ölçüldü. Elde edilen sonuçlarla 50 mM MSM ($p<0.001$), 100 mM MSM ($p<0.001$) , 1.25 mM GA ($p<0.05$), 2.5 mM GA ($p<0.001$) ve 4000 µg/ml CS ($p<0.001$)' nin tek başlarına uygulandıklarında uyarılmış hücrelerde nitrit düzeylerini anlamlı olarak düşürdükleri saptandı (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. MSM, GA ve CS' nin tek başına uygulandıklarında LPS/IFN-γ ile uyarılan makrofaj hücrelerinin nitrit düzeyleri üzerine etkisi.
(*): $p<0.001$ (**): $p<0,05$ (LPS/IFNγ grubuna göre anlamlı, n=9).

3.6 MSM, GA ve CS' nin tek başına, LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri

MSM, GA ve CS' nin LPS/IFNγ ile uyarılan makrofajlarda hücre canlılığı üzerine olan etkileri incelendiğinde 1.25 mM ve 2.5 mM GA ($p<0.001$) ve 50 mM MSM ($p<0.05$)' nin LPS/IFNγ ile azalan makrofaj hücre canlılığını anlamlı olarak arttırdığı belirlendi (Şekil 3.18).

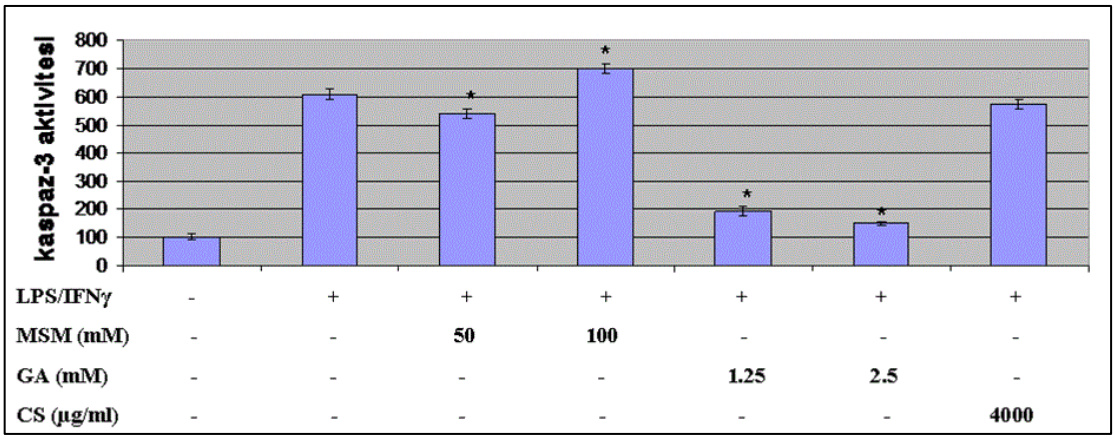


Şekil 3.18. MSM, GA ve CS' nin tek başına uygulandıklarında LPS/IFNγ ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücre canlılığı üzerine etkileri.
(*) $p<0.001$ (LPS/IFNγ grubuna göre anlamlı). (**) $p<0.05$ (LPS/IFNγ grubuna göre anlamlı, n=9).

3.7 MSM, GA ve CS' nin tek başına uygulanıklarında LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri

MSM, GA ve CS' nin tek başına uygulandıklarında LPS/IFNγ ile uyarılan makrofajlarda kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine olan etkileri incelendiğinde LPS/IFNγ uyarımının kaspaz-3 enzim aktivitesini anlamlı olarak arttırdığı ($p<0.001$), 1.25 mM GA, 2.5 mM GA ve 50 mM MSM' nin tek başına uygulanmasının ise

kaspaz-3 aktivitesini anlamlı ($p<0.001$) olarak azalttığı belirlenmiştir. CS tek başına uygulandığında kaspaz-3 enzim aktivitesinde anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır. MSM' nin 100 mM konsantrasyonu ise kaspaz-3 aktivitesinde anlamlı ($p<0.001$) bir artışa yol açtığı belirlenmiştir (Şekil 3.19).

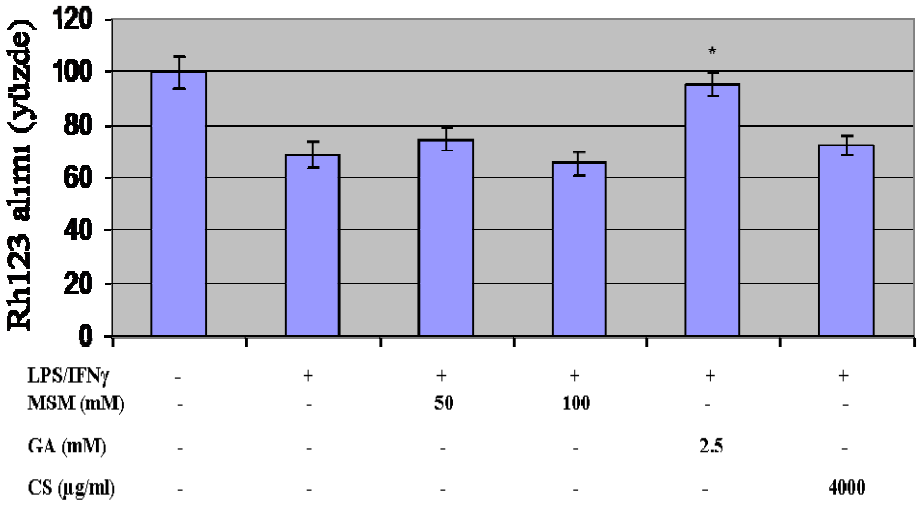


Şekil 3.19**.** MSM, GA ve CS' nin tek başına LPS/IFNγ ile uyarılmış makrofajlarda kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkileri.
(*)$p<0.001$ (LPS/IFNγ grubuna göre anlamlı, n=9).

3.8 MSM, GA ve CS' nin LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkileri

MSM, CS ve GA' nın LPS/IFNγ ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde hücre canlılığı, nitrit düzeyleri ve kaspaz aktivitesi üzerine olan etkileri değerlendirildiğinde özellikle 2.5 mM GA' nın tek başına ve diğer kimyasallarla kombinasyonlarının 1.25 mM GA' nın tek başına ve diğer kimyasallarla kombinasyonlarına göre daha anlamlı etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle, nitrik oksit bağımlı apoptozun içsel yolağında gerçekleşen karakter belirteçler arasında yer alan mitokondri membran potansiyeli üzerine GA' nın ve GA' nın MSM ve CS ile kombinasyonlarının etkileri incelenirken 2.5 mM' lık GA dozu test edilmiştir. MSM, GA ve CS' nin LPS/IFNγ ile uyarılan makrofajlarda mitokondri membran potansiyeli üzerine olan etkileri incelendiğinde LPS/IFNγ uyarımının

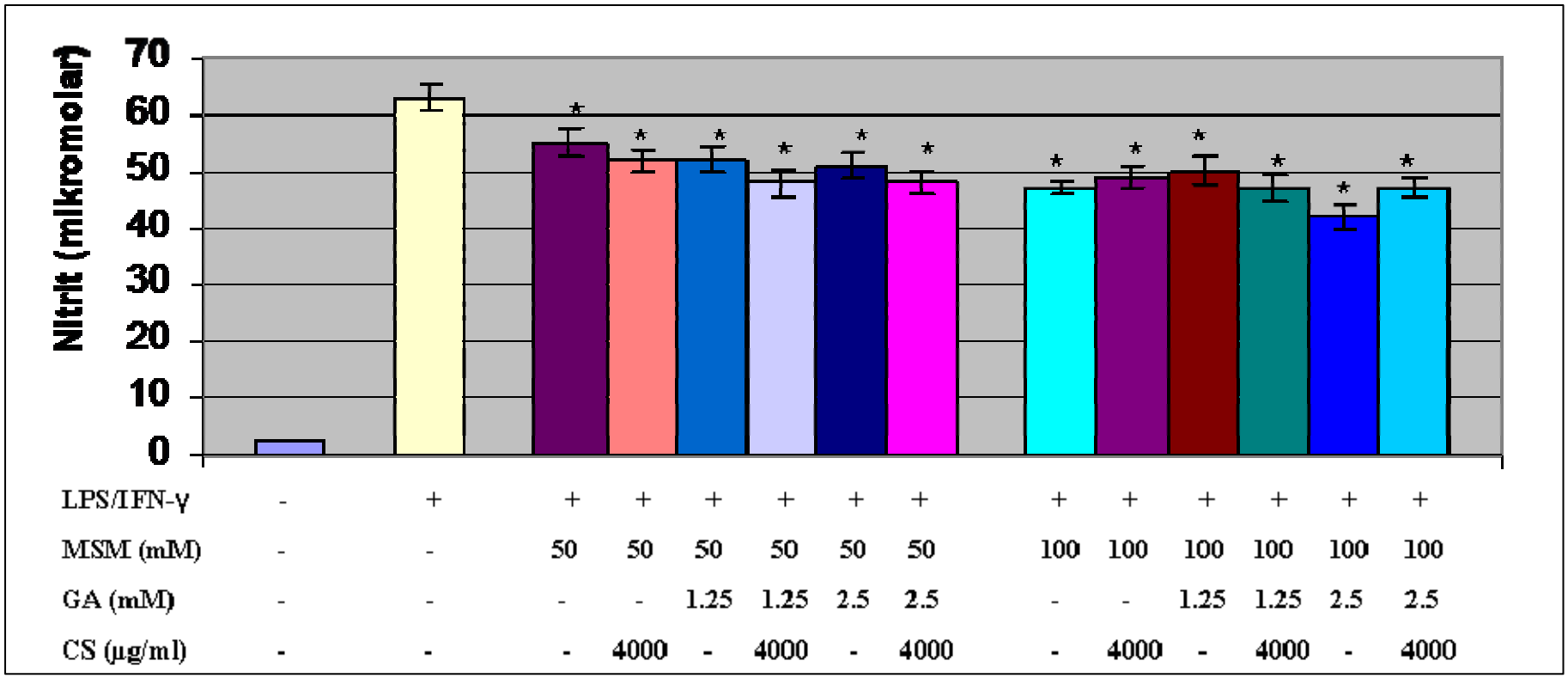
mitokondri membran potansiyelinde anlamlı olarak kayba neden olduğu, tek başına uygulanan MSM, GA ve CS kimayasalları arasında sadece GA' nın 2,5 mM konsantrasyonda mitokondri membran potansiyelini anlamlı olarak arttırdığı belirlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 3.20).



Şekil 3.20. MSM, GA ve CS' nin tek başına LPS/IFNγ ile uyarılmış makrofajlarda Rh123 alımı üzerine etkileri.
(*):LPS/IFNγ grubuna göre anlamlı ($p<0.001$, $n=9$).

3.9 Farklı konsantrasyonlarda MSM' nin farklı GA ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit düzeyleri üzerine etkileri.

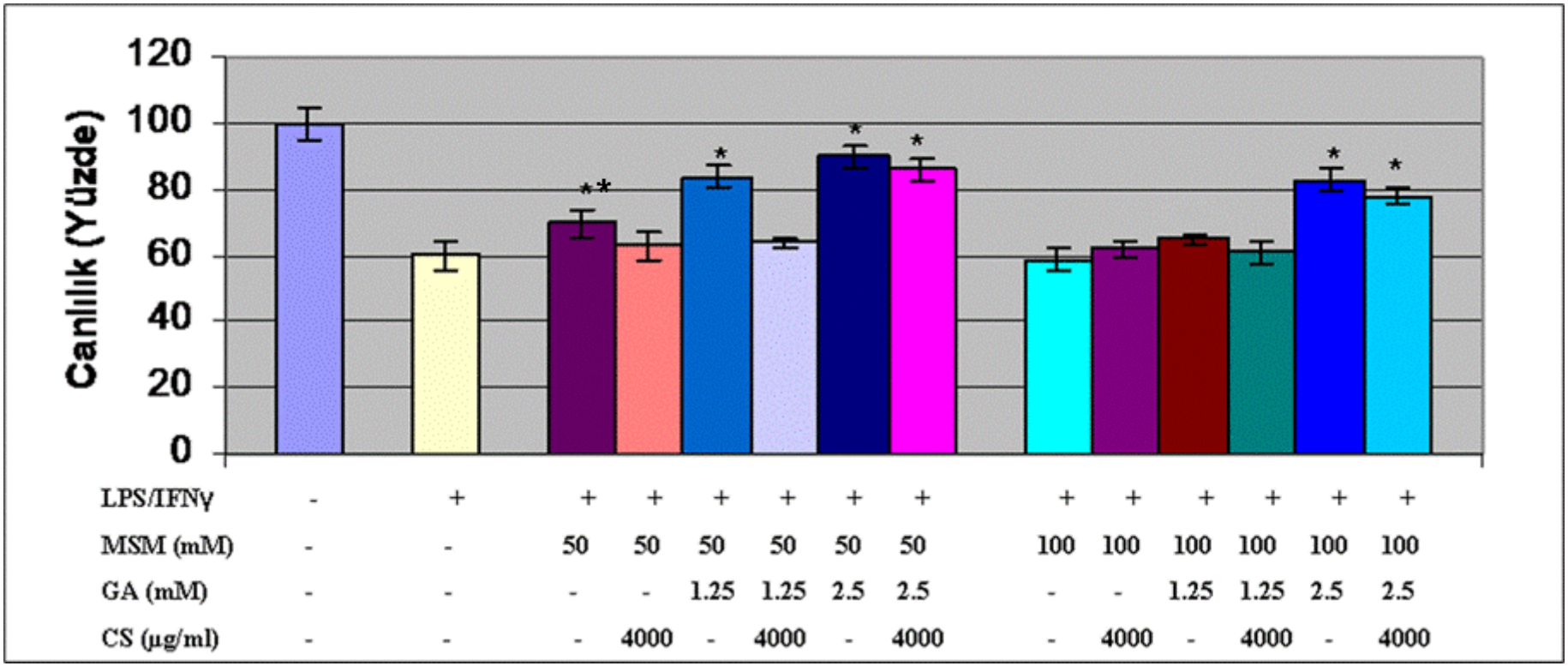
50 ve 100 mM konsantrasyonlardaki MSM' nin tek başına ve farklı konsantrasyonlardaki GA ve CS ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFNγ ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit düzeyleri üzerine olan etkileri incelendiğinde MSM' nin tek başına uygulandığında ve ikili ve üçlü kombinasyonlarının tamamında nitrit düzeylerinde anlamlı azalmaya yol açtığı belirlenmiştir ($p<0.001$). Uygulanan konsantrasyonlar ve kimyasallar arasında 100 mM konsantrasyondaki MSM' nin 2.5 mM GA ile ikili kombinasyonunun nitrit düzeyini en etkin düşüren kombinasyon olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$).(Şekil 3.21).



Şekil 3.21. Farklı konsantrasyonlarda MSM' nin, farklı GA ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit düzeyi üzerine etkileri.
(*)$p<0.001$ (LPS/IFNγ grubuna göre anlamlı, n=9).

3.10 Farklı konsantrasyonlarda MSM' nin farklı GA ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde canlılık üzerine etkileri

50 mM ve 100 mM MSM' nin 1.25 ve 2.5 mM GA ile olan ikili kombinasyonlarının tamamında hücre canlılığı LPS/IFNγ ile uyarılmış gruba göre anlamlı ($p<0.001$) olarak artış gösterdi. 50 mM MSM ($p<0.05$), 50 mM MSM/1.25 mM GA, 50 mM MSM/2.5 mM GA/4000µg/ml ve 100 mM MSM/2.5 mM GA/4000µg/ml CS kombinasyonlarının da canlılığı anlamlı ($p<0.001$) olarak arttırdığı belirlendi. 50 mM MSM/4000 µg/ml CS, 100 mM MSM, 100 mM MSM/1.25 mM GA/4000µg/ml CS, 100 mM MSM/4000 µg/ml CS ise LPS/IFN-γ ile azalan hücre canlılığını anlamlı olarak değiştirmemektedir (Şekil 3.22).

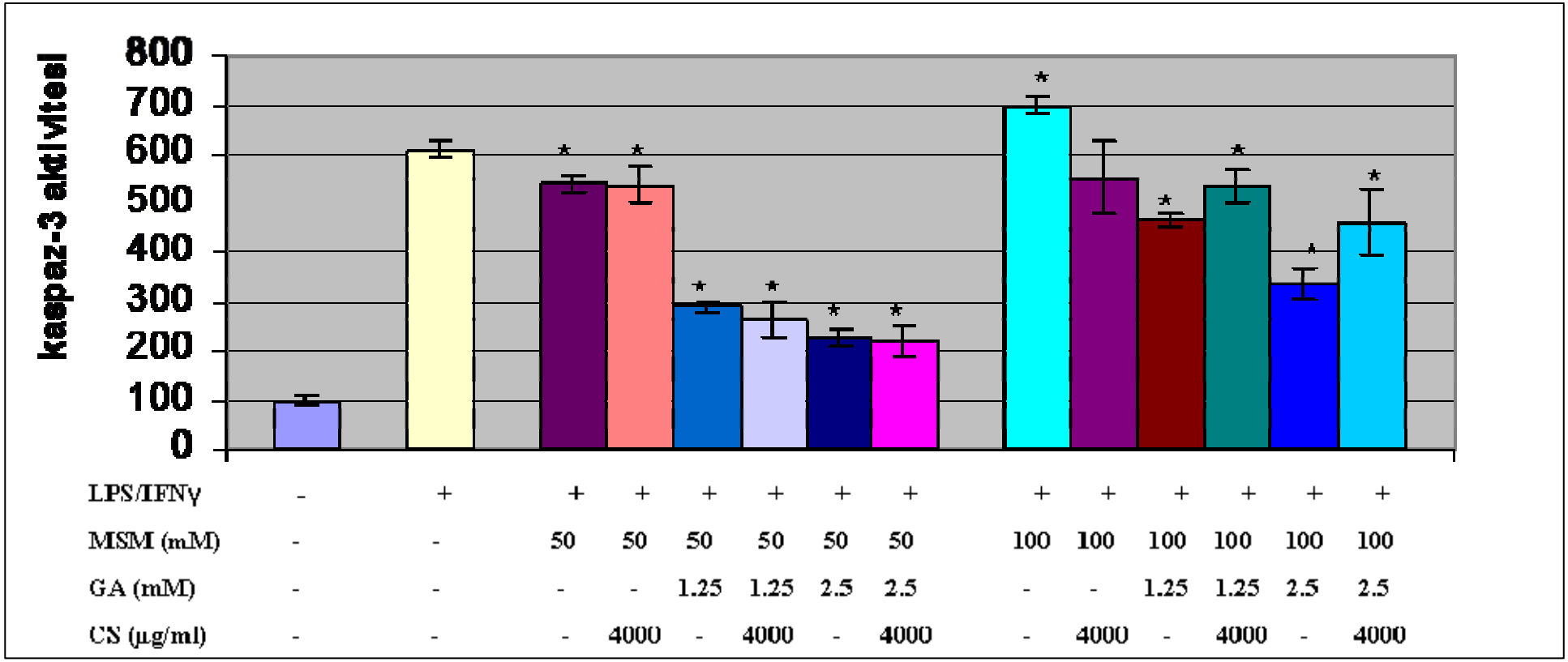


Şekil 3.22**.** Farklı konsantrasyonlarda MSM' nin, farklı GA ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde canlılık üzerine etkileri.
(*)$p<0.001$ (**)$p<0.05$ (LPS/IFNγ grubuna göre anlamlı, n=9).

3.11 Farklı konsantrasyonlarda MSM' nin farklı GA ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri

50 mM ve 100 mM' lik konsantrasyonlardaki MSM' nin 1.25 mM ve 2.5 mM GA ile ikili kombinasyonlarının kaspaz-3 enzim aktivitesini anlamlı ($p<0.001$) olarak düşürdüğü belirlendi (Şekil 3.23). 50 mM MSM/4000µg/ml CS/ 1,25 mM GA, 50 mM MSM/4000µg/ml CS/ 2,5 mM GA ve 100 mM MSM/4000µg/ml CS/ 2,5 mM GA üçlü kombinasyonlarının da LPS/IFNγ ile uyarılan hücrelere göre kaspaz-3 aktivitesini anlamlı ($p<0.001$) olarak azalttığı belirlendi (Şekil 3.23).

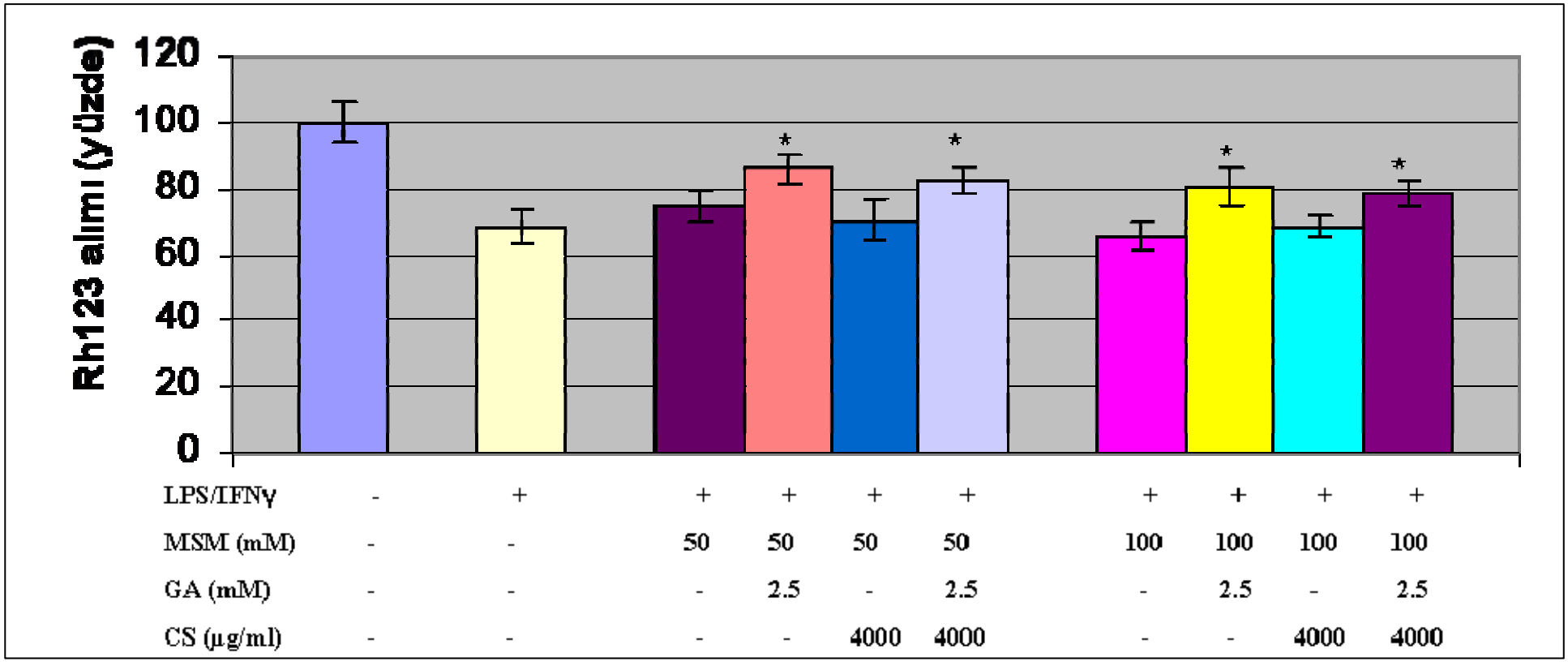
MSM' nin 50 mM ve 100 mM' lık dozunda hücrelerin sergiledikleri kaspaz-3 aktivitesinin, MSM' nin 1,25 mM ve 2,5 mM GA dozları ile kombine olarak uygulanması halinde azaldığı belirlenmiştir($p<0.001$). MSM/CS ikili kombinasyonunun kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine olan etkisi incelendiğinde ise tek başına MSM ve tek başına CS uygulanan gruplara göre bir anlamlılık bulunamamıştır (Şekil 3.23).



Şekil 3.23. Farklı konsantrasyonlarda MSM' nin, farklı GA ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri.
(*)$p<0.001$ (LPS/IFNγ grubuna göre anlamlı, n=9).

3.12 Farklı konsantrasyonlarda MSM' nin farklı GA ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli üzerine etkileri

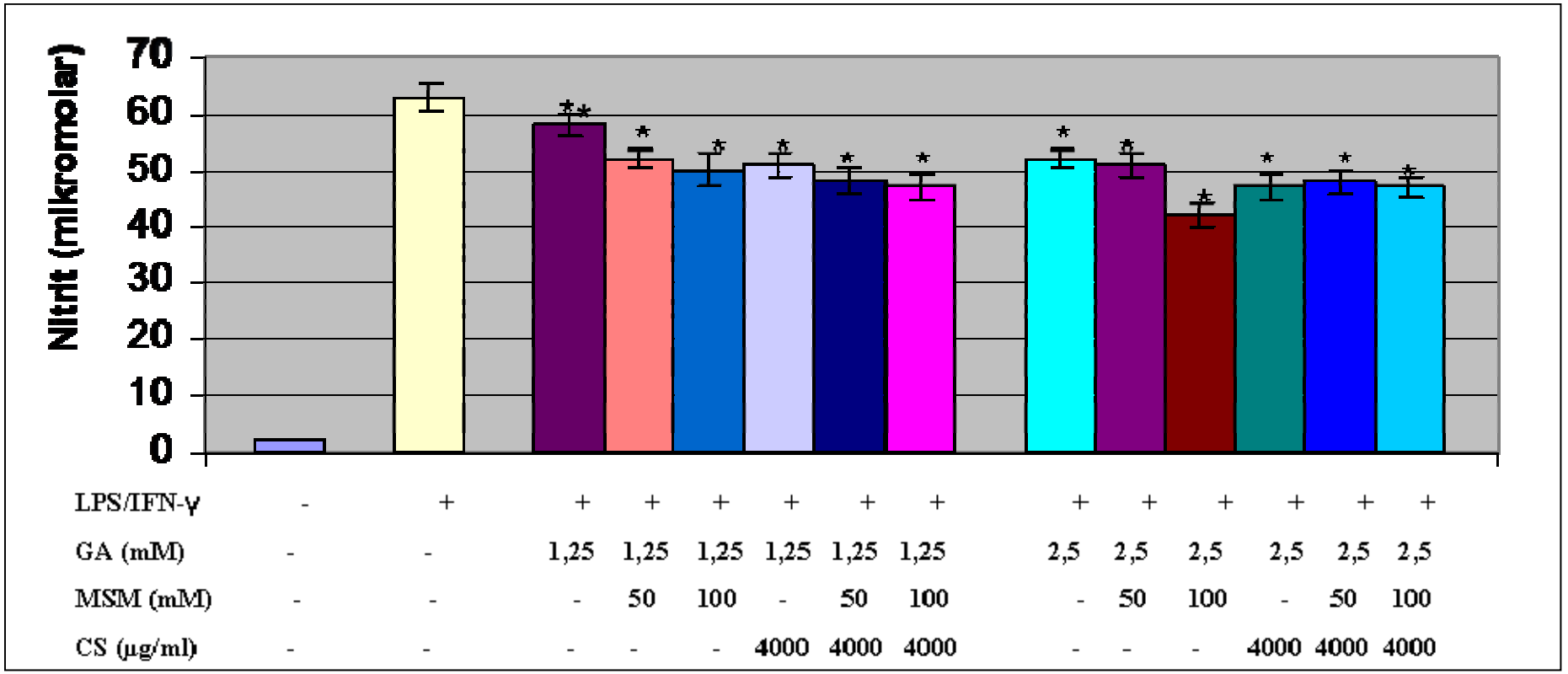
50 mM MSM/2.5 mM GA, 50 mM MSM/2.5 mM GA /4000 µg/ml CS, 100 mM MSM/2.5 mM GA, 100 mM MSM/2.5 mM GA 4000 µg/ml CS kombinasyonlarının mitokondri membran potansiyelini anlamlı ($p<0.001$) olarak arttırdığı belirlenmiştir (Şekil 3.24).



Şekil 3.24. Farklı konsantrasyonlarda MSM' nin GA ve CS ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde Rh123 alımı üzerine etkileri.
(*):LPS/IFNγ grubuna göre anlamlı ($p<0.001$, $n=9$).

3.13 Farklı konsantrasyonlarda GA' nın farklı MSM ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit düzeyleri üzerine etkileri

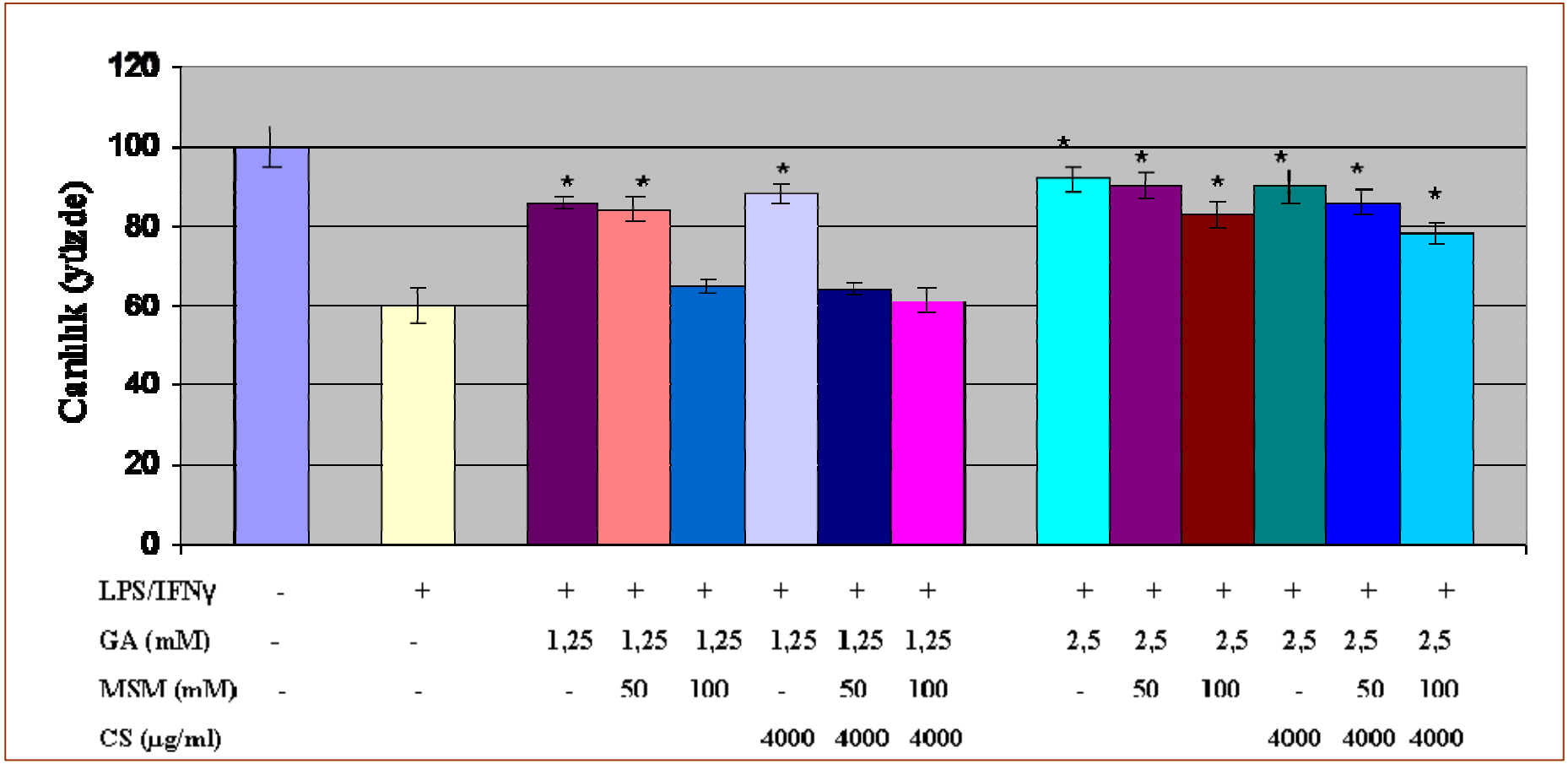
1.25 mM ve 2.5mM konsantrasyonlardaki GA' nın tek başına ve farklı konsantrasyonlardaki MSM ve kondroitin sülfat ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFNγ ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit düzeyleri üzerine olan etkileri incelendiğinde GA' nın tek başına uygulandığında ve ikili ve üçlü kombinasyonlarının tamamında nitrit düzeylerinde anlamlı azalmaya yol açtığı belirlenmiştir ($p<0.05$; $p<0.001$). Uygulanan konsantrasyonlar ve kimyasallar arasında 2.5 mM GA' nın 100 mM konsantrasyondaki MSM ile ikili kombinasyonunun nitrit düzeyini en etkin ($p<0.001$) düşüren kombinasyon olduğu belirlenmiştir(Şekil3.25)



Şekil 3.25. Farklı konsantrasyonlarda GA' nın farklı MSM ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit düzeyi üzerine etkileri.
(*)$p<0.001$ (**)$p<0.05$ (LPS/IFNγ grubuna göre anlamlı, n=9).

3.14 Farklı konsantrasyonlarda GA' nın farklı MSM ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde canlılık üzerine etkileri

GA' nın 1.25 mM ve 2.5 mM konsantrasyonlarının farklı konsantrasyonlarda MSM ve CS ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde canlılık üzerine etkileri incelendiğinde, tek başına 2.5 mM GA' nın LPS/IFNγ ile uyarım sonucunda azalan hücre canlılığını en etkin olarak arttığı belirlenmiştir ($p<0.001$). 1.25 ve 2.5 mM GA' nın 50 mM ve 100 mM MSM ile ikili kombinasyonlarının tamamında hücre canlılığı LPS/IFNγ ile uyarılmış gruba göre anlamlı ($p<0.001$) olarak artış gösterdi (Şekil 3.19). 1.25 mM ve 2.5 mM GA' nin 4000 µg/ml CS ile ikili kombinasyonları da canlılıkta anlamlı ($p<0.001$) artışa yol açtığı belirlendi (Şekil 3.26). 1.25 mM GA/ 50 mM MSM/ 4000µg/ml CS, 50 mM MSM/2.5 mM GA/4000µg/ml CS, 100 mM MSM/1.25 mM GA/4000µg/ml CS ve 100 mM MSM/2.5 mM GA/4000µg/ml CS kombinasyonlarının da canlılığı anlamlı($p<0.001$) olarak arttırdığı belirlendi (Şekil 3.26).

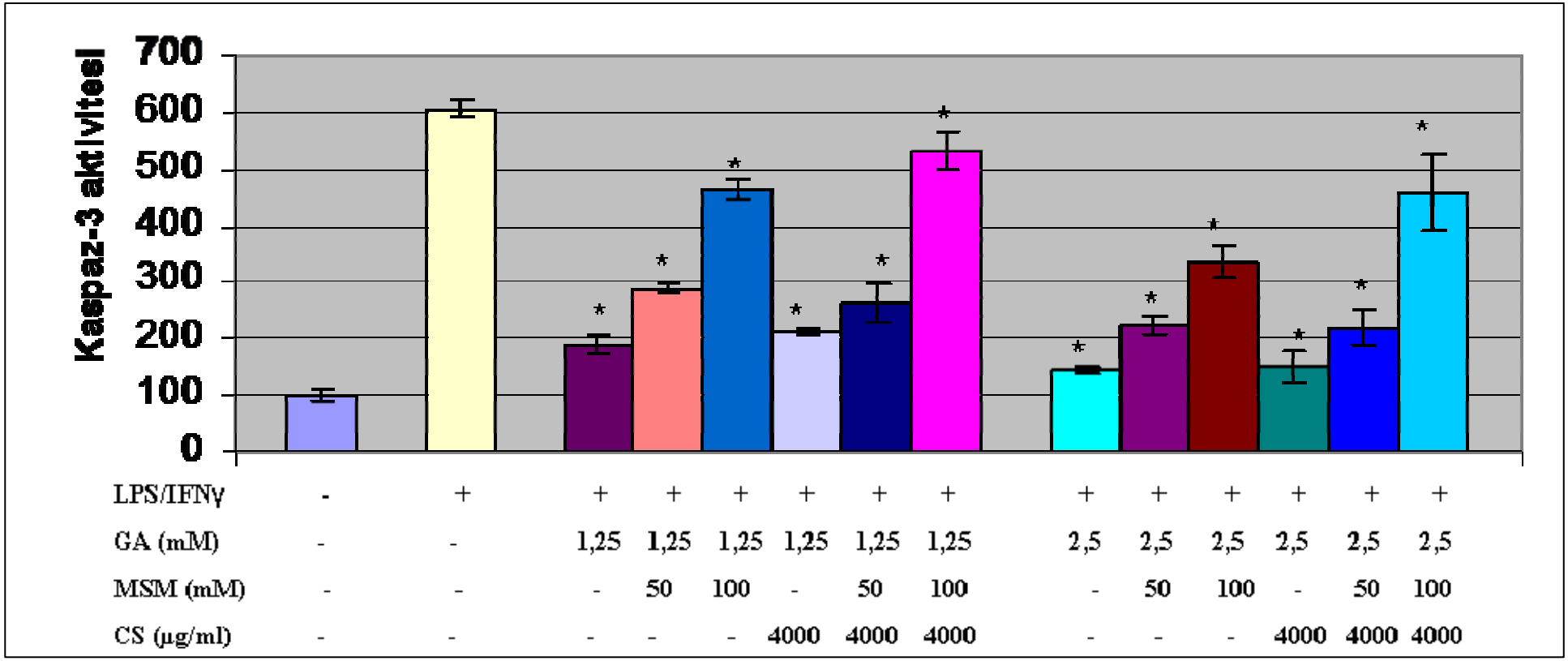


Şekil 3.26. Farklı konsantrasyonlarda GA' nın farklı MSM ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde canlılık üzerine etkileri.
(*)$p<0.001$ (LPS/IFNγ grubuna göre anlamlı, n=9).

3.15 Farklı konsantrasyonlarda GA' nın farklı MSM ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri

1.25 mM ve 2.5 mM konsantrasyonlarda uygulanan GA' nın farklı konsantrasyonlarda MSM ve CS ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının tamamının LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesini anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur ($p<0.001$).

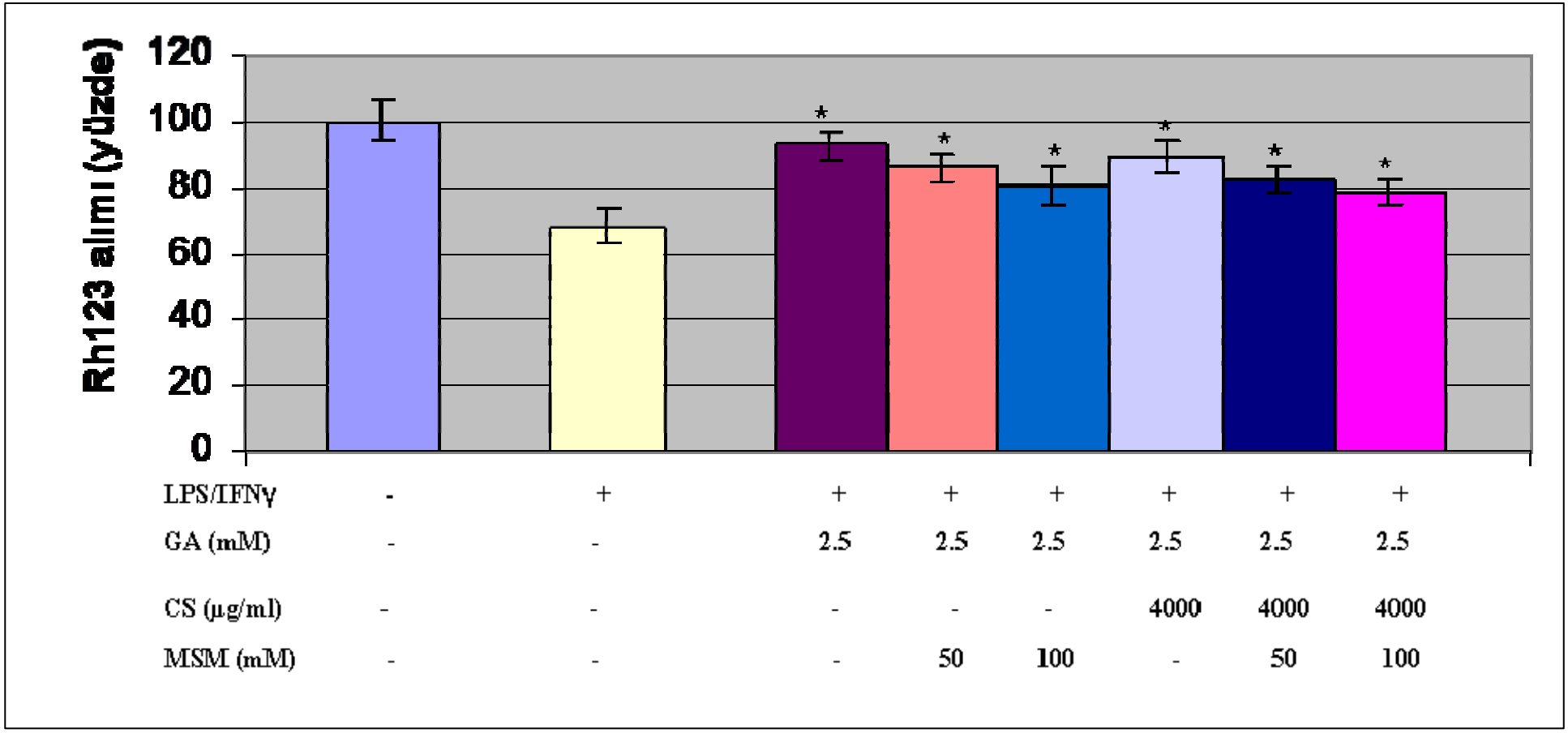
Kaspaz-3 enzim aktivitesinde en etkin azalmaya yol açan kimyasallar ve konsantrasyonları sırası ile 2.5 mM GA, 1.25 mM GA ve 2.5 mM GA/ 4000µg/ml CS olarak belirlenmiştir ($p<0.001$).(Şekil 3.27)



Şekil 3.27. Farklı konsantrasyonlarda GA' nın farklı MSM ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri.
(*)$p<0.001$ (LPS/IFNγ grubuna göre anlamlı, n=9).

3.16 GA' nın farklı MSM ve CS konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli üzerine etkileri

2.5 mM konsantrasyondaki GA' nın tek başına ve MSM ve CS ile kombine halde uygulanmasının LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli üzerine etkileri incelendiğinde, LPS/IFNγ ile uyarılan hücrelerde ortaya çıkan Rh123 alımındaki kaybın, 2.5 mM GA uygulaması ile azaldığı ve uyarılmamış grubun membran potansiyel değerine yaklaştığı belirlenmiştir. 2.5 mM GA' nın 50 mM ve 100 mM MSM ve 4000 µg/ml CS ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının tamamında LPS/IFNγ ile mitokondri Membran potansiyelinde ortaya çıkan kaybın azaldığı, en etkin azalmanın ise 2.5 mM GA, 2.5 mM GA/ 50 mM, 2.5 mM GA/ 4000 µg/ ml CS ile gerçekleştiği belirlenmiştir ($p<0.001$).(Şekil 3.28).



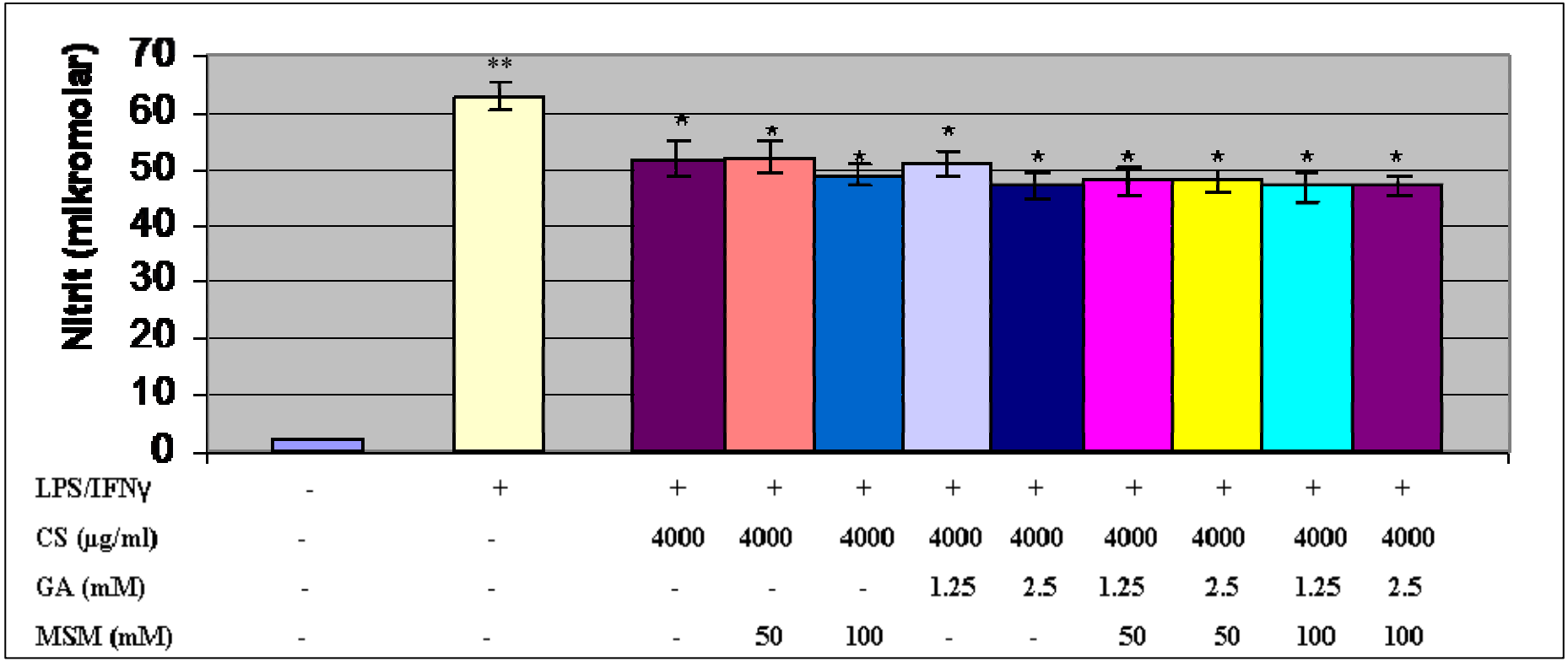
Şekil 3.28. GA' nın MSM ve CS ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde Rh123 alımı üzerine etkileri.
(*):LPS/IFNγ grubuna göre anlamlı ($p<0.001$, $n=9$).

3.17 CS' nin farklı MSM ve GA konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit düzeyleri üzerine etkileri

CS' nin 4000 µg/ml konsantrasyonda MSM ve GA ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit düzeyleri üzerine etkileri incelendiğinde, CS' nin tek başına ve uygulanan ikili ve üçlü kombinasyonların tamamında nitrit düzeylerini azalttığı belirlendi ($p<0.001$).

CS' nin uygulandığı kombinasyonlar arasında nitrit düzeylerini en etkin düşüren kombinasyonlar ise 4000 µg/ml CS/2.5 mM GA, 4000µg/ml CS /100 mM MSM/2.5 mM GA ve 4000µg/ml CS/ 100 mM MSM/1.25 mM GA kombinasyonları olarak belirlendi($p<0.001$).(Şekil 3.29).

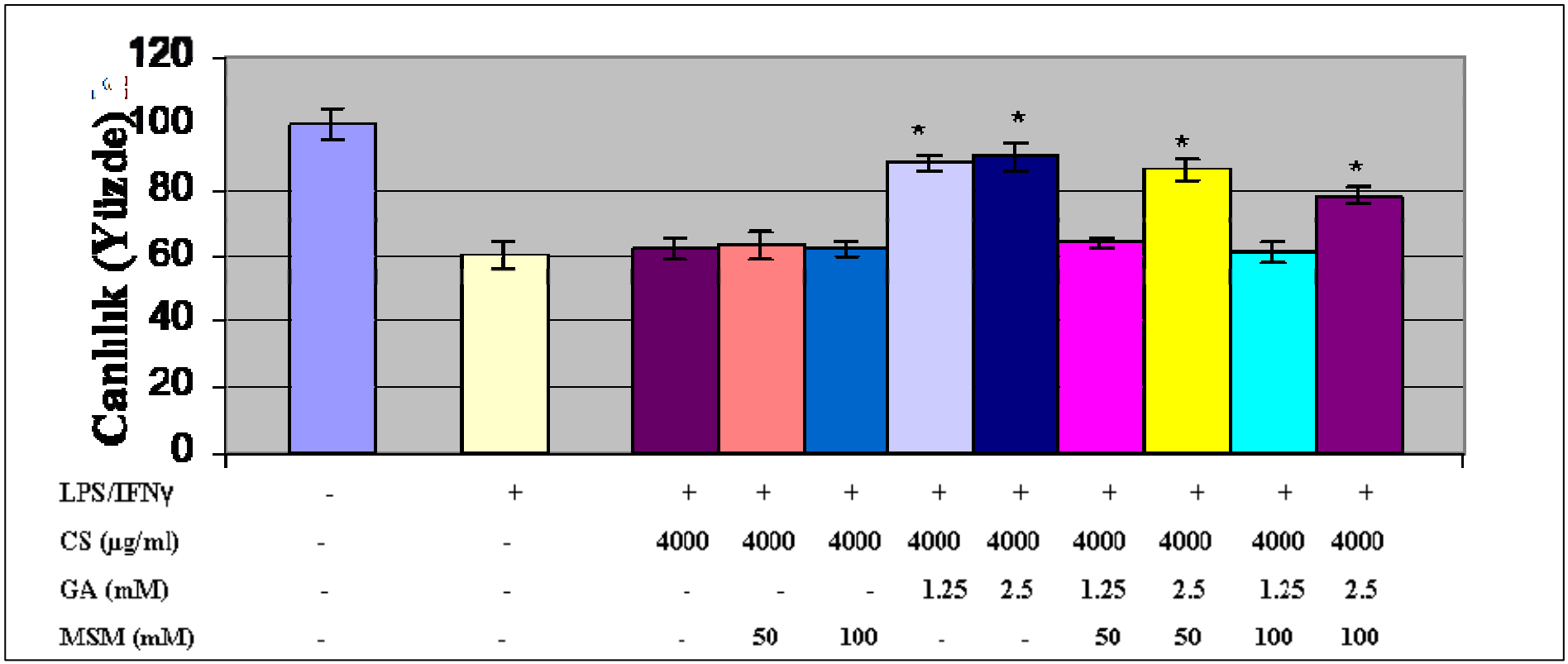
.



Şekil 3.29. CS' nin farklı MSM ve GA konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit düzeyi üzerine etkileri.
(*)$p<0.001$ (LPS/IFNγ grubuna göre anlamlı, n=9).

3.18 CS' nin farklı MSM ve GA konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde canlılık üzerine etkileri

CS' nin tek başına uygulandığında 4000 µg/ml konsantrasyonda LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde canlılık üzerine etki etmediği ancak, 1.25 mM GA ve 2.5 mM GA ile ikili kombinasyonlarının ve 1.25 mM GA /50 mM MSM, 2.5 mM GA / 50 mM MSM ve 1.25 mM GA/ 100 mM MSM ile üçlü kombinasyonlarının LPS/IFNγ ile azalan hücre canlılığını anlamlı olarak arttırdığı belirlenmiştir ($p<0.001$). (Şekil 3.30).

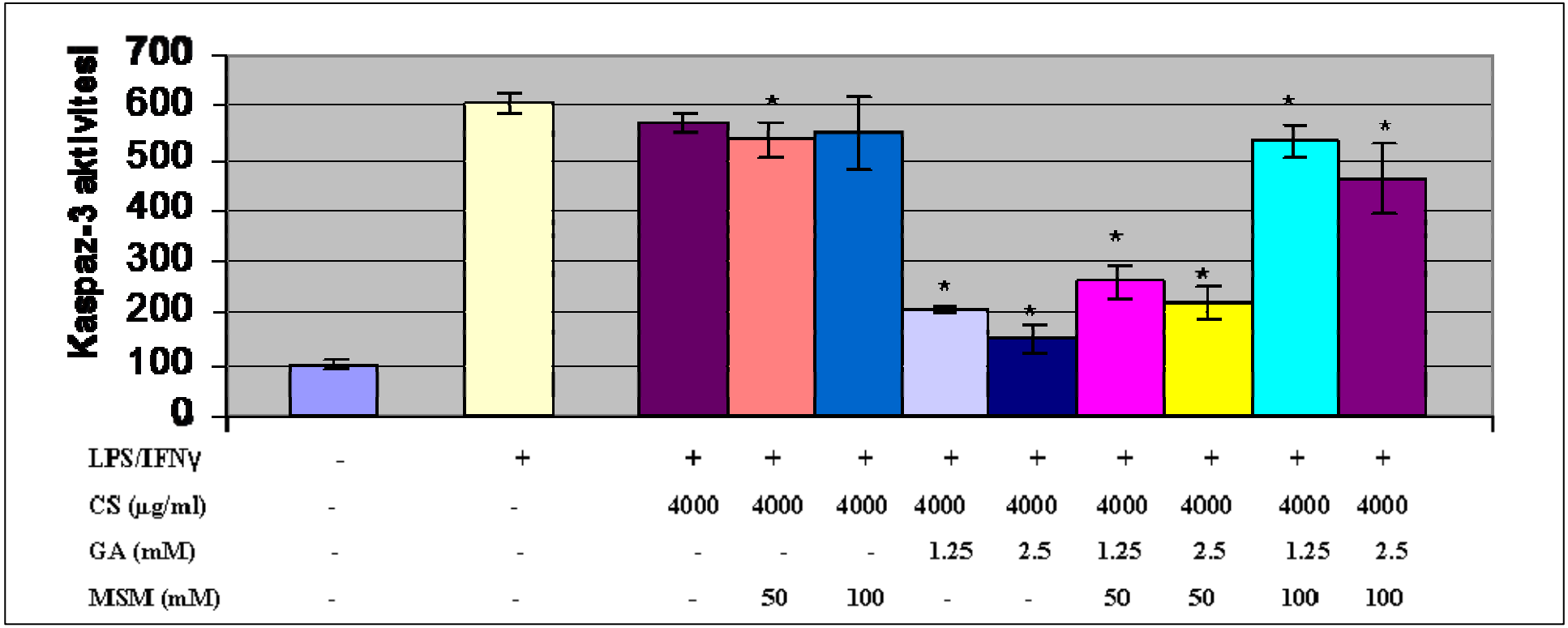


Şekil 3.30. CS' nin farklı MSM ve GA konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde canlılık üzerine etkileri.
(*) $p<0.001$ LPS/IFNγ grubuna göre anlamlı, n=9.

3.19 CS' nin farklı MSM ve GA konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri

CS' nin tek başına uygulandığında 4000 µg/ml konsantrasyonda LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine anlamlı etki göstermediği ancak, hücre canlılığında da artışa yola açan 1.25 mM GA ve 2.5 mM GA ile ikili kombinasyonlarının ve 1.25 mM GA /50 mM MSM, 2.5 mM GA / 50 mM MSM ve 1.25 mM GA/ 100 mM MSM ile üçlü kombinasyonlarının LPS/IFNγ ile artan kaspaz-3 enzim aktivitesini anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir ($p<0.001$).

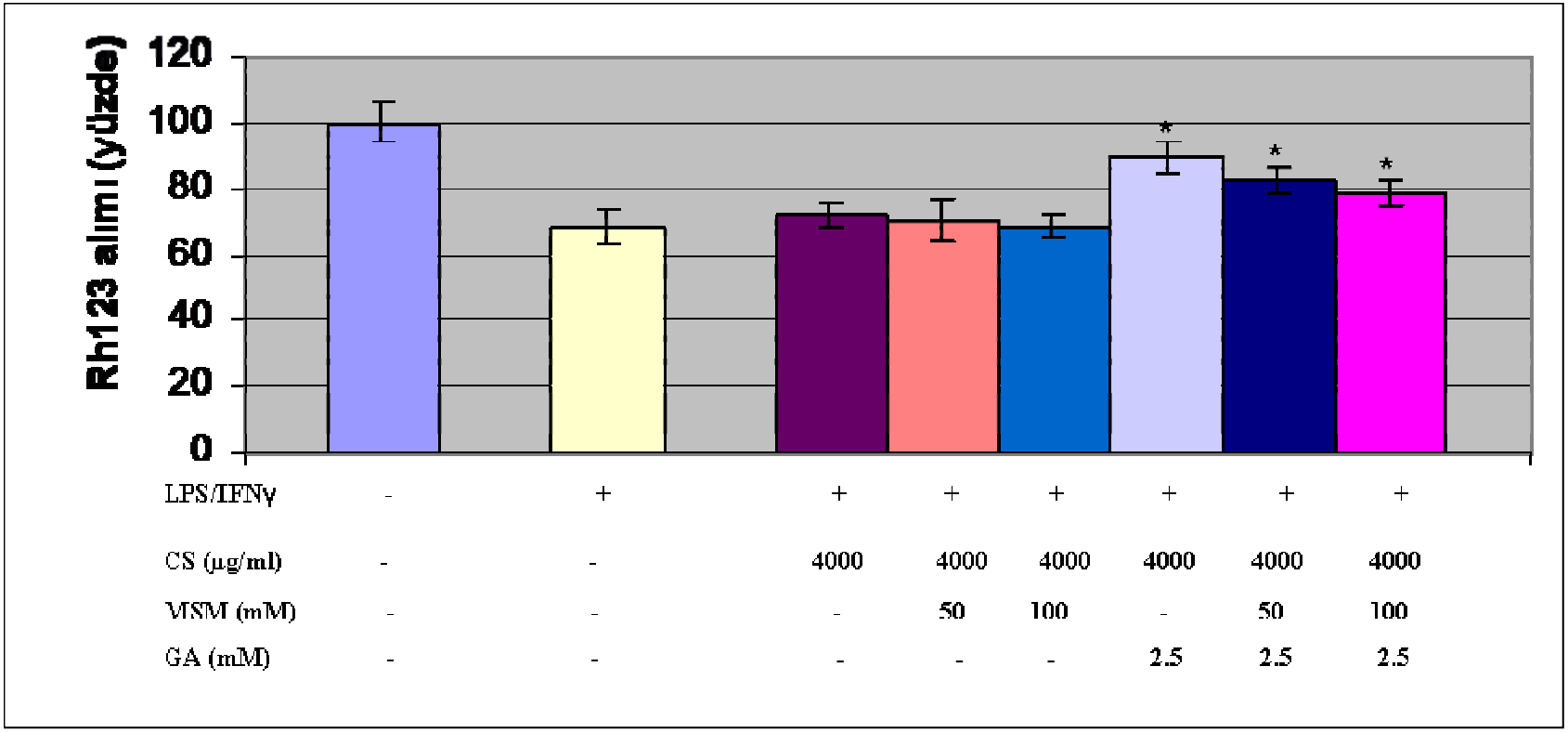
CS' nin 50 mM MSM ile ve 100 mM MSM/ 2.5 mM GA ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının da kaspaz-3 enzim aktivitesini anlamlı olarak azalttığı ($p<0.001$) belirlenmiş, ancak bu azalmanın diğer kombinasyonlarla gerçekleşen azalmaya göre daha zayıf olduğu belirlenmiştir. (Şekil 3.31).



Şekil 3.31. CS' nin farklı MSM ve GA konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri.
(*)$p<0.001$ (LPS/IFNγ grubuna göre anlamlı, n=9).

3.20 CS' nin farklı MSM ve GA konsantrasyonları ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli üzerine etkileri

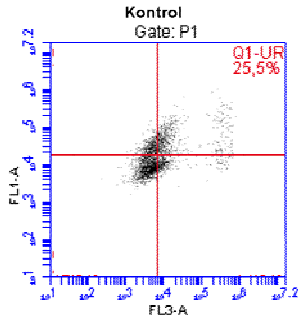
CS' nin 2.5 mM GA ile olan ikili kombinasyonunun ve 50 mM MSM/2.5 mM GA ve 100 mM MSM/2.5 mM GA ile olan üçlü kombinasyonlarının LPS/IFNγ uyarımı ile ortaya çıkan mitokondri membran potansiyel kaybını anlamlı ($p<0.001$) olarak önlediği ve membran potansiyelini uyarılmamış gruba yaklaştırdığı belirlenmiştir. CS' nin tek başına veya diğer kombinasyonlar ile uygulanması halinde membran potansiyelinde anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. (Şekil 3.32).

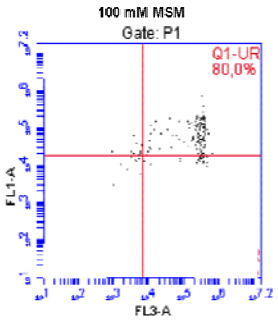


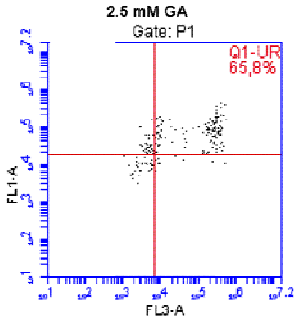
Şekil 3.32. CS' nin MSM ve GA ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının LPS/IFN-γ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde Rh123 alımı üzerine etkileri.
(*):LPS/IFNγ grubuna göre anlamlı ($p<0.001$, $n=9$).

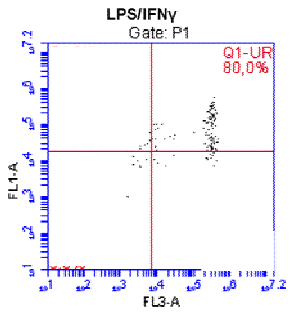
3.21 MSM, GA ve CS' nin LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde apoptoz üzerine etkilerinin akım sitometrik olarak saptanması

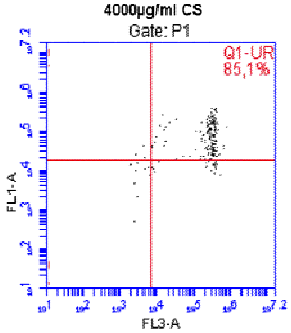
MSM, CS ve GA' nın LPS/IFNγ ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde apoptoz üzerine olan etkilerini belirlemek üzere farklı dozlarda RAW 264.7 makrofaj hücreleri MSM, GA ve CS' nin tek başına ve kombine inkübe edildikten sonra LPS/IFNγ ile 24 saat uyarıldılar. Daha sonra toplanan hücreler Annexin V-Propidium iodide ile ikili boyanarak akım sitometride analiz yapıldı. Hücre debrisi, boya gibi non-spesifik görüntülemeyi önlemek için yapılan gate alma işleminin ardından Annexin V' in eksitasyon emisyon dalga boyu olan FL1A ve propidium iodide' in eksitasyon emisyon dalga boyu FL3A' da analiz edildiler. Elde edilen bulgular 2.5 mM GA' nın apoptozu anlamlı ($p < 0.001$) olarak azalttığını, MSM ve CS uygulamasının apoptozda anlamlı bir değişime yol açmadığını, bileşiklerin kombine olarak uygulandıklarında ise 50 mM MSM/2.5 mM GA, 100 mM MSM/2.5 mM GA, 4000µg/ml CS/2.5 mM GA' nın apoptozu anlamlı ($p < 0.001$) olarak azalttıklarını göstermektedir (Şekil 3.33).

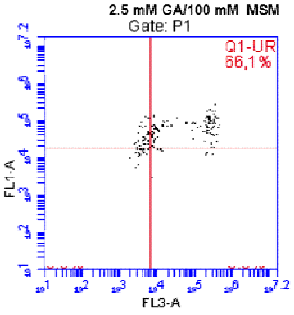

Kontrol
Gate: P1
Q1-UR
25,5%
FL1-A
FL3-A

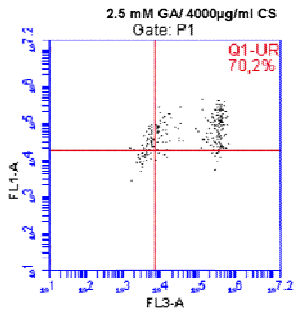

100 mM MSM
Gate: P1
Q1-UR
80,0%
FL1-A
FL3-A

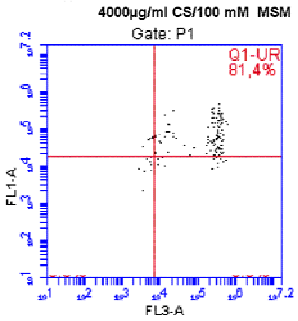

2.5 mM GA
Gate: P1
Q1-UR
65,8%
FL1-A
FL3-A

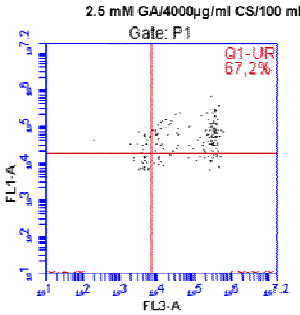

LPS/IFNγ
Gate: P1
Q1-UR
80,0%
FL1-A
FL3-A

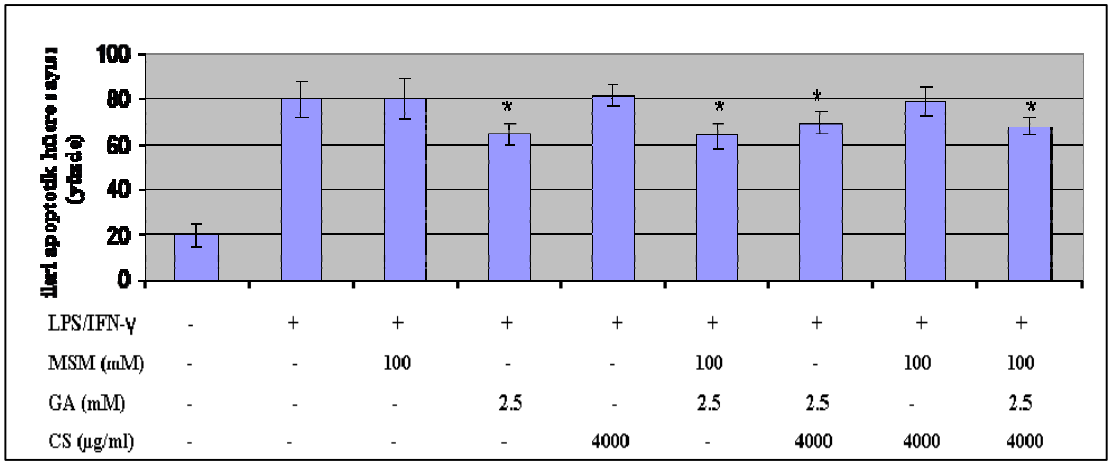

4000µg/ml CS
Gate: P1
Q1-UR
85,1%
FL1-A
FL3-A


2.5 mM GA/100 mM MSM
Gate: P1
Q1-UR
66,1%
FL1-A
FL3-A


2.5 mM GA/ 4000µg/ml CS
Gate: P1
Q1-UR
70,2%
FL1-A
FL3-A


4000µg/ml CS/100 mM MSM
Gate: P1
Q1-UR
81,4%
FL1-A
FL3-A


2.5 mM GA/4000µg/ml CS/100 mM MSM
Gate: P1
Q1-UR
67,2%
FL1-A
FL3-A



Şekil 3.33**.** Farklı dozlarda MSM, GA ve CS uygulanan LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin Annexin V-PI ile akım sitometrik analizi.
(Tek bir denemenin sonuçları simgesel olarak gösterilmektedir) (*): LPS/IFNγ grubuna göre anlamlı ($p<0.001$, $n=9$).

4. TARTIŞMA

Apoptoz, çok hücreli organizmalarda gelişim ve doku homeostazının gerçekleşmesinde rol oynayan hayatsal bir olgudur ve apoptoz regulasyonundaki bozukluklar kanser, diyabet, kardiyovasküler ve inflammatuvar patolojiler gibi çok çeşitli hastalıkların patogenezinden sorumlu olarak ortaya çıkmaktadır. Apoptotik yolaklar uyarana ve hücre tipine bağlı olarak farklılık göstermekte ve belirli enzim ve sinyal yolaklarını hedefleyen tedavi yaklaşımları patolojinin tipine göre apoptozun istenilen şekilde yönlendirilmesine olanak sağlamaktadır. (Alberts ve ark., 2008)

Apoptozun uyaranları arasında, pek çok inflammatuvar patolojide rol oynayan nitrik oksit de yer almaktadır. İmmün sistemin başlıca hücreleri olan makrofajlar çeşitli uyaranlara maruz kaldıklarında savunma mekanizması olarak nitrik oksitin de aralarında bulunduğu bir dizi biyolojik aracıyı salıverirler. RAW 264.7 makrofaj hücre serisi LPS/IFNγ kombinasyonu ile uyarıldığında yüksek düzeylerde nitrik oksit üretimi ve buna bağlı olarak apoptoz gerçekleşmektedir. Aktive olan makrofajlarda nitrik oksit üretiminden sorumlu nitrik oksit sentaz enziminin inhibitörlerinin ve bu aktive hücreler tarafından üretilen nitrik oksit yakalayıcılarının kullanımının hücre hasarını ve ölümünü bloke ettikleri gösterilmiştir. Nitrik oksit oluşumunun azaltılmasının yanı sıra nitrik oksit bağımlı hücre ölümünün inhibisyonunu hedefleyen tedavilerin büyük bir klinik sorun olan sepsis tablosunun iyileştirilmesinde yarar sağlayabileceği düşünülmektedir. Ancak romatoid artrit gibi hastalıklarda ise makrofaj apoptozunun indüksiyonunun inflamasyonun resolusyonunu arttırarak hastalık tablosunun olumlu yönde gelişimine olanak sağlayacağı da ifade edilmektedir. Bu nedenlerle, makrofaj apoptozunun klinik sonuçları hastalık tipine göre farklılık göstermektedir. (Albina ve ark., 1993; Aliprantis, ve ark., 1996; Albina ve Reichner 1998; Campo ve ark., 2009).

Bu amaçla çalışmamızda ilk olarak, RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin LPS/IFNγ kombinasyonu ile aktivasyonu ve bu aktivasyon sonucunda nitrik oksit bağımlı apoptozun gerçekleşmesi için gerekli olan LPS/IFNγ konsantrasyonlarının ve inkübasyon süresinin belirlenmesi ve buna bağlı olarak hücre kültüründe nitrit düzeylerinin ölçümü, hücre canlılığının saptanması, meydana gelen hücre ölümünün mekanizmasını ortaya koymak üzere kaspaz-3 aktivitesi ve mitokondri membran potansiyelinin saptanması, Annexin V ve PI ile apoptotik hücrelerin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

RAW 264.7 makrofajlarda nitrit oksit sentezini uyaran ve bu uyarıma bağlı olarak nitrik oksit bağımlı apoptozun gerçekleşmesini sağlayan LPS ve IFNγ konsantrasyonları ile inkübasyon süresinin optimizasyonu için literatürde yer alan çeşitli araştırmalarda gösterildiği gibi farklı LPS ve IFNγ kombinasyon dozları ve inkübasyon süreleri seçilmiştir. LPS ve IFNγ' nın RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde 12, 24 ve 36 saatlik inkübasyon sürelerinde ve 50 ng/ml-5μg/ ml ve 10 U/ml lik dozlarda nitrik oksit düzeylerini arttırdığı (Yook ve ark, 2004), 1μg/ml LPS 25 U/ml IFNγ dozunun ve18 saatlik inkübasyon süresinin optimum aktivasyon sağladığı (Ranjan ve ark., 2004) gösterilmiştir. Aynı hücre serisinde farklı araştırıcılar tarafından yapılan çeşitli çalışmalarda, LPS ve IFNγ ile aktive edilen RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde anlamlı düzeyde nitrit üretimi ve nitrik oksit bağımlı apoptozu gerçekleştiren dozlar ve inkübasyon süreleri 250 ng/ml /40 U/ml ve 24 saat (Polo ve ark, 2007), 200 ng/ml / 10 U/ml ve 24 saat (Hortelano ve ark, 1999), 100 ng/ml / 100 U/ml ve 12. saat -24. saat (Stamler ve ark, 2000) ve 200 ng/ml / 100 U/ml ve 24 saat olarak belirlenmiştir. Lakics ve Vogel yapmış oldukları çalışmada LPS/IFNγ kombinasyonu ile indüklenen hücre ölümünün hücre kültür kuyularında kullanılan besiyerine de bağlı olduğunu, makrofajların inkübe edildikleri kuyunun yüzey alanı ve besiyeri hacmine göre uyarana yanıtlarının farklılık gösterdiğini belirlemişler ve 0.1 μg/ml LPS' nin 10 ng/ml IFNγ ile kombinasyonunun 24 saatlik inkübasyon sonrasında makrofaj sitotoksisitesine yol açtığını saptamışlardır (Lakics ve Vogel, 1998). Çalışmalarımızda 10ng/ml-250ng/ml konsantrasyon aralığındaki LPS ile 1ng/ml-15ng/ml konsantrasyon aralığındaki IFNγ

kombinasyonlarının makrofajların canlılığı ve nitrit üretimi üzerine etkileri taranmış, elde edilen sonuçlarla, literatürle benzer olarak 24 saatlik LPS ve IFNγ kombinasyonunun nitrit düzeyini anlamlı olarak arttırdığı saptanmıştır. Buna dayanarak çalışmamızda veriler nitrit üretimi ve hücre canlılığı parametreleri açısından değerlendirildiğinde, aynı yanıtın alındığı uygulanan dozlar arasından en düşük doz kombinasyonu olan 10 ng/ml LPS ve 1 ng/ml IFNγ' nın RAW 264.7 makrofaj hücrelerini apoptoza uğratan doz kombinasyonu olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

Çalışmamızda nitrik oksit bağımlı hücre ölümü için kullanılacak olan LPS ve IFNγ dozlarının ve inkübasyon süresinin belirlenmesinin ardından, ortaya çıkan hücre ölümünün apoptoz aracılığı ile gerçekleşip gerçekleşmediğinin saptanması aşamasına geçilmiş ve bu amaçla hücrelerde kaspaz-3 aktivitesi, mitokondri membran potansiyeli ve Annexin V-PI boyama ile apoptozun tayini gerçekleştirilmiştir.

Makrofaj hücrelerinde LPS ve IFNγ uyarımı ile gerçekleşen hücre ölümünün apoptoz aracılığı ile gerçekleştiğinin ortaya konulduğu ilk çalışmalarda LPS veya IFNγ' nın tek başına peritoneal makrofaj hücrelerini apoptoza götürmediği, ancak kombine uygulandıklarında 24 saatlik inkübasyon sonunda apoptozun karakteristik özellikleri arasında yer alan DNA fragmentasyonuna yol açtıkları (Sarih ve ark, 1993) ve hücrelerin mikroskobik olarak incelendiğinde apoptozun belirteçleri arasında yer alan nükleer ve sitoplazmik değişikler sergiledikleri belirlenmiştir (Albina ve ark, 1993). Bu çalışmaları izleyen yıllarda nitrik oksit bağımlı makrofaj hücre apoptozunun mekanizmasının araştırıldığı çeşitli çalışmalarda, RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde LPS/IFNγ ile uyarım sonucunda sentezlenen yüksek düzeylerdeki NO aracılığı ile gerçekleşen apoptozun baskın olarak apoptozun içsel yolağı aracılığı ile gerçekleştiği ve NO' nun neden olduğu hücre stresini yansıtan tümör supressor ürünü p53'deki birikim ve hızlı artışın meydana geldiği bildirilmiştir (Ambs ve rak., 1997; Calmels ve ark., 1997, Agarwal ve ark., 1998). Nitrik oksitin p53 proteininin kontrolü üzerine olan etkilerinin yanında, DNA degredasyonunu tetikleyen mitokondriyal pro-apoptotik aracıları salarak da hücre

canlılığını düzenlediği bu apoptotik mekanizma ile ilgili olarak, büyük bir mitokondriyal membran geçişini uyardığı ve mitokondri membran potansiyelinde azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (Kroemer ve ark., 1997; Hortelano ve ark., 1997). Apoptoza uğrayan hücrelerde, mitokondriyal solunum zincirinde elektron taşıyıcısı olarak rol alan sitokrom c nin sitoplazmaya salınmasını sırası ile apoptotik enzimler olan kaspaz-9 ve kaspaz-3' ün salımı izlemektedir (Barinaga ve ark., 1998; Yang ve ark., 1997; Bossy-Wetzel ve ark., 1998). Özetle bu çalışmalarda iNOS aktivasyonu sonucunda sentezlenen yüksek düzeylerdeki nitrik oksit aracılığı ile gerçekleşen makrofaj apoptozunun mitokondriyal yolak üzerinden gerçekleştiği ve mitokondri membran potansiyeli kaybı, sitokrom c salımı ve son aşamada kaspaz-3 enzim aktivitesindeki artışla sonuçlandığı bildirilmiştir. Çalışmalarımızda seçilen LPS/IFNγ kombinasyonu ile uyarılan hücrelerin uyarılmamış hücrelere göre anlamlı düzeyde mitokondri membran potansiyel kaybı sergiledikleri ve yüksek kaspaz-3 aktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir.

LPS/IFNγ kombinasyonu ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücreleri Annexin V-FITC ve PI ile boyanarak, apoptotik hücrelerin akım sitometrik olarak analizi gerçekleştirilmiştir. Annexin V, apoptotik hücrelerde hücre yüzeyine doğru transloke olan fosfotidil serine (PS) bağlanan bir proteindir. Canlı hücrelerde plazma membranındaki PS dağılımı asimetriktir ve PS grupları hücrenin içine doğru yerleşim göstermektedirler. Apoptoz sırasında bu asimetri kaybolur ve PS grupları hücre membranının dışına yönelirler. Bu nedenle PS ile annexin V' in bağlanması apoptozun biyokimyasal bir belirteci olarak kabul edilmektedir (Tsi ve ark., 2002). Apoptotik hücrelerde, aynı zamanda DNA fragmentasyonu ve bunu izleyen nükleer DNA içeriğinin kaybı da gözlenmektedir. PI, DNA' ya bağlanma ve onu işaretleme yeteneğine sahip, hücresel DNA içeriğinin belirlenmesinde kullanılan floresan bir boyadır (Riccardi ve Nicoletti, 2006). Çalışmamızda, LPS/IFNγ kombinasyonu ile uyarılan hücre grubunda ileri apoptozun belirteçleri arasında yer alan Annexin V-FITC ve PI ile boyanan hücre sayısının uyarılmayan gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır.

Elde edilen bu bulgular, LPS/IFNγ ile aktive edilmiş RAW 264.7 hücre serisi modelinde iNOS aktivasyonu sonucunda sentezlenen yüksek düzeylerdeki NO' nun aracılık ettiği hücre ölümünün apoptoz aracılığı ile gerçekleştiğini, apoptozun içsel yolağının hücre ölümünde rol oynadığını ve bu konuda yapılan çalışmalarla paralellik gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Günümüzde, kardiyovasküler, inflammatuvar patolojiler, diyabet ve kanser gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde besin desteği olarak kullanılmak üzere pek çok ticari preparat bulunmaktadır. Bu preparatlar arasında, özellikle temelinde inflammatuvar bozuklukların yattığı artrit ve romatoid artit gibi hastalıkların tedavisinde yarar sağladığı öne sürülen MSM, GA ve CS' nin tek başına ve/veya kombine formları da yer almaktadır. GA ve CS' nin farklı hücre tiplerinde farklı yolaklar aracılığıyla gerçekleşen apoptoz ve apoptotik ölüm mekanizmaları üzerine olan etkileri ile ilgili olarak çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Ancak, özellikle MSM' nin apoptoz üzerine olan etkilerini hangi mekanizmalar aracılığı ile gerçekleştirdiğine ilişkin bir çalışmaya literatürde rastlanmamaktadır. Bu üç kimyasalın klinikte kullanımına yönelik kombine preparatlarının piyasada bulunması, tek başına olan etkilerinin yanı sıra ikili veya üçlü kombinasyon olarak uygulanmaları durumundaki etkilerinin aydınlatılmasını da önemli kılmaktadır. Bu çalışma ile MSM, GA ve CS' nin tek başlarına, ikili ve üçlü kombinasyon olarak uygulandıklarında apoptotik yolaklar üzerindeki etkileri ilk kez ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Bu amaçla, öncelikle MSM, GA ve CS' nin tek başına uygulandıklarında uyarılmamış RAW 264.7 makrofaj hücreleri üzerinde toksisite göstermeyen konsantrasyonları belirlenmiştir.

Farklı hücre serilerinde MSM' nin biyolojik etki mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu sınırlı sayıdaki araştırma arasında yer alan ve 2009 yılında Kim ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada MSM en yüksek olarak 106 mM' a karşılık gelen 10 mg/ml'lik konsantrasyonda RAW 264.7 makrofaj

hücrelerine uygulanmış ve toksik etkiler göstermediği, ancak bu konsantrasyonun üzerinde sitotoksisite sergilediği belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bulgular Kim ve ark.' nın bu konuda yapmış oldukları çalışma ile paralellik göstermektedir ve MSM' nin 125 mM' nin üzerindeki konsantrasyonlarda RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde sitotoksik etkilere yol açtığını ortaya koymaktadır. 2011 yılının mayıs ayında yapılmış bir başka çalışmada ise, MSM' nin AGS, HepG2 hepatosit, ve KYSE-30 kolon kanser hücre serilerinde 10 mg/ml (106 mM) ile 50 mg/ml (530 mM) arasında değişen konsantrasyonları uygulanmış ve sitotoksik etkiler gösterdiği belirlenmiştir (Jafari ve ark, 2011). Çalışmamızda MSM' nin makrofajlar üzerinde toksik etkiler sergilediği konsantrasyon kanser hücrelerine göre daha düşük olarak saptanmıştır ve deneylerimizde kullanılacak olan sitotoksik olmayan MSM konsantrasyonları 50 mM ve 100 mM olarak belirlenmiştir.

MSM' nin aksine, GA' nın farklı hücre serilerinde farklı biyokimyasal yolaklar üzerine etkilerinin araştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar arasında yer alan ve 2009 yılında Chesnokov ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada GA' nın DU145 prostat kanser hücrelerinde 1 mM konsantrasyonda proliferasyonu baskıladığı ve hücre ölümünü indüklediği, HepG2 hepatosit hücre serisinde ise 3 mM konsantrasyondaki GA' nın hücre canlılığını azalttığı bildirilmiştir (Haas ve ark., 2004). RAW 264.7 makrofaj hücre serisinde ise GA' nın 10 mM' ın üzerindeki dozlarda toksik etkiler sergilediği bildirilmiştir (Rafi ve ark., 2004). Yapmış olduğumuz denemeler sonucunda Haas ve ark' nın bulgularına benzer sonuçlar elde edilmiş, GA'nın 4 mM' nin üzerindeki konsantrasyonlarının makrofaj hücreleri üzerinde toksik etkiler gösterdiği belirlenmiştir ve bu nedenle çalışmalarımızda 4 mM' dan düşük GA konsantrasyonları kullanılmıştır. GA'nın RAW 264.7 makrofaj hücrelerine toksisite gösterdiği konsantrasyon aralığının, Rafi ve ark' nın belirlemiş olduğu toksisite aralığından daha düşük olarak saptanmasının nedeninin hücre sayısı, besiyeri hacmi gibi deneysel farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

CS' nin farklı hücre tiplerinde farklı biyolojik yolaklar üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmalarda CS' nin toksik etki göstermeyen dozları sırası ile SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde 10-60 μM (Canas ve ark., 2007), sıçan astrositlerinde 10 μM, (Campo, 2009), tavşan kondrositlerinde 200 μg/ ml (Jomphe ve ark, 2008), deri fibroblastlarında 1.5-3 mg/ml olarak bildirilmiştir. CS' nin LPS ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde ise 0.1- 100 μg/ml konsantrasyon aralığında nitrit düzeyi üzerine anlamlı etki göstermediği bildirilmiştir. Ancak bu çalışmada, CS' nin hücrelere tek başına toksisite gösterdiği konsantrasyonla ilgili bir veri bulunmamaktadır (Habara ve ark, 2002). Bu nedenlerle çalışmalarımızda CS' nin konsantrasyon aralığını belirlemek üzere geniş bir konsantrasyon aralığında tarama yapılmış, 6000 μg/ml ve üzerindeki CS konsantrasyonlarının makrofaj hücrelerine toksisite gösterdiği belirlenmiş ve toksisite göstermeyen en yüksek doz olan 4000 μg/ml CS' nin kullanılmasına karar verilmiştir.

-MSM, GA ve CS' nin makrofaj hücrelerine toksisite göstermeyen dozlarının seçilmesinin ardından bu üç kimyasalın tek başına ve/veya kombine uygulanmaları durumunda LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde apoptoz üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Öncelikle MSM, GA ve CS' nin tek başına uygulandıklarında LPS/IFNγ ile uyarılan makrofajlarda iNOS' a bağlı olarak gerçekleşen nitrit sentezi üzerine olan etkileri belirlenmiştir. MSM' nin RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde LPS ile indüklenen NO, PGE2, IL-6 ve TNF-α salımını inhibe ettiği, MSM' nin bu etkilerini LPS ile indüklenen Ik-Bα yıkımını bloke ederek NFkB p65' in nükleer translokasyonunu inhibe etmesi aracılığı ile gerçekleştirdiği de ifade edilmektedir (Kim ve ark, 2009). Yapmış olduğumuz denemelerde MSM'nin 50 mM ve 100 mM konsantrasyonlarında nitrit düzeylerini anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir.

GA'nın iNOS bağımlı nitrik oksit sentezi üzerine olan etkilerinin incelendiği in vitro ve in vivo çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda GA'nın in vitro sitokinle strese maruz bırakılan kartilaj eksplantlarında iNOS transkripsiyonunda ve böylece NO salımında azalmaya yol açtığı (Orth ve ark, 2002), RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde iNOS bağımlı NO üretimini baskıladığı (Hwang ve ark, 2000) ve bu etkisini p38 fosforilasyonunu ve transkripsiyon faktörü NFkB aktivasyonunun inhibisyonu aracılığı ile gerçekleştirdiği (Rafi ve ark, 2007; Rajapakse ve ark, 2007) , osteoartritik kondrositlerde IL-1β ile uyarılan iNOS ekspresyonunu azalttığı (Valvason ve ark, 2008), in vivo sıçan modelinde iNOS ekspresyonunu baskıladığı (Meininger ve ark, 2000), Lewis sıçanlarında endotoksin ile indüklenen uveiti NFkB aktivasyonunu ve iNOS ekspresyonunu baskılayarak inhibe ettiği yönünde çeşitli varsayımlar öne sürülmektedir. Yapmış olduğumuz çalışmalarda yukarıda sözü edilen çeşitli literatürlerle de benzer olarak GA'nın LPS/IFNγ ile aktive edilmiş RAW 264.7 makrofajlarda iNOS bağımlı nitrik oksit sentezini anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir.

CS' nin iNOS bağımlı nitrik oksit üretimi üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalar ise genellikle eklem kartilajı, kondrositler gibi eklem doku hücreleri üzerinde veya astrositler, mikroglia, hipokampal hücreler gibi sinir sitemi hücrelerinde yoğunlaşmaktadır. CS' nin JB6 fare epidermal hücre serisinde TNF-α ile indüklenen iNOS ekspresyonunu, NFkB aktivasyonunu ve aktivasyonu izleyen inflamatuvar yolakları Akt/NFkB sinyalini bloke ederek inhibe ettiği (C-X. Xu ve ark, 2008), sıçan astrosit hücre kültüründe LPS ile indüklenen iNOS indüksiyonunu TLR-4 inhibisyonu aracılığı ile gerçekleşen NFkB ve TNF-α indüksiyonunun inhibisyonu aracılığı ile azalttığı (Canas ve ark, 2010), IL-1β ile uyarılan kondrositlerde iNOS mRNA düzeylerini azalttığı (Legendre ve ark, 2008), iskemi/reperfüzyon benzeri koşullar altındaki sıçan hipokampal hücrelerinde p38 MAPK, NFkB ve iNOS inhibisyonuna yol açtığı (Saavedra ve ark, 2011) bildirilmiştir. Çalışmamızda CS' nin 4000 µg/ml konsantrasyonda LPS/IFNγ ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit üretimini anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak yukarıda sözü edilen pek çok literatürle paralellik gösteren şekilde, ele aldığımız her üç kimyasal maddenin de nitrit düzeyleri üzerindeki inhbitör etkilerinin NFkB transkripsiyon faktörü üzerindeki baskılayıcı etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

MSM, GA ve CS' nin LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrit düzeyleri üzerine olan etkilerinin belirlenmesinin ardından bu üç kimyasalın bu modelde tek başına uygulandıklarında hücre canlılığı üzerine olan etkileri analiz edilmiştir.

MSM' nin 50 mM konsantrasyonda, RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde LPS/IFNγ uyarımı sonucunda hücre canlılığında meydana gelen azalmayı anlamlı olarak inhibe ettiği belirlenmiştir. Ancak MSM' nin hücre canlılığını arttırıcı etkisi hücreleri uyarılmamış hücrelerin canlılık seviyesine çıkaracak kadar güçlü bulunmamıştır. MSM' nin canlılık üzerindeki etkilerinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmakta, bu çalışmalarda MSM' nin in vitro vasküler düz kas hücrelerinde ve endoteliyal hücrelerde büyümeyi inhibe edici etkiler sergilediği (Layman, 1987), yüksek dozda (600 mM) metastatik melanoma hücrelerinde (Caron ve ark, 2010) ve AGS insan gastrik karsinoma, HepG2 insan hepatik karsinoma ve KYSE-30 insan özofagos skamöz karsinoma hücre serilerinde apoptotik etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Jafari ve ark, 2011). Bu çalışmalarda farklı hücre tiplerinin kullanılmasının ve uygulanan MSM dozunun çalışmamızda uyguladığımız doza göre oldukça yüksek olmasının MSM' nin hücre canlılığına farklı etkiler göstermesinin yol açabildiği düşünülmektedir. Çalışmamızda GA' nın ise 1.25 mM ve 2.5 mM konsantrasyonlarda LPS/IFNγ uyarımı ile meydana gelen hücre canlılığındaki azalmayı anlamlı olarak inhibe ettiği belirlenmiştir. GA' nın hücre canlılığı üzerine olan etkilerinin araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde hücre tipine ve etkilediği biyolojik yolağa göre proliferatif ya da antiproliferatif etkiler sergileyebildiği ortaya çıkmaktadır. GA' nın in vivo sıçan orta serebral arter okluzyon modelinde, in vitro mikroglia ve makrofaj hücrelerinde LPS ile indüklenen proinflamatuvar aracıların sentezini inhibe ederek nöroprotektif etkiler gösterdiği (Hwang ve ark, 2010), kardiyomyositleri iskemi-reperfüzyon hasarına karşı

koruduğu (Champattanachai,ve ark, 2008) bildirilmiştir. Ancak, GA' nın insan glioma hücrelerinde ER stresi arttırarak otofajik hücre ölümünü indüklediği (Hwang ve Baek, 2010), retinal pigment epiteliyal hücrelerinde epidermal büyüme faktörü ile indüklenen proliferasyonu azalttığı (Liang ve ark, 2010), artan konsantrasyonla kondrositlerde antiproliferatif etkiler sergilediği (Varghese, 2007) de çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmamızda GA' nın 1.25 mM ve 2.5 mM konsantrasyonlarda ve MSM' nin 50 mM konsantrasyonda makrofaj hücrelerinde LPS/IFNγ ile azalan hücre canlılığını inhibe edici etkilerini, Hwang ve Champattanachi' nin de çalışmalarında bildirdiği üzere antiinflammatuvar etkileri aracılığı ile gerçekleştirdiği düşünülmektedir. CS ise LPS/IFNγ ile azalan hücre canlılığı üzerine anlamlı etki göstermemiştir.

MSM, GA ve CS' nin LPS/IFNγ ile uyarılan makrofaj hücrelerinin nitrit düzeyleri ve canlılığı üzerine olan etkilerinin incelenmesinin ardından bu üç kimyasalın tek başına uygulandıklarında kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine olan etkileri saptanmıştır.

MSM' nin 50 mM dozda tek başına uygulanmasının uyarılmış hücrelerde kaspaz-3 aktivitesini anlamlı olarak azalttığı, 100 mM dozda ise anlamlı olarak arttırdığı, doza bağımlı olarak apoptotik ya da antiapoptotik etkiler gösterdiği belirlenmiştir. MSM' nin yüksek dozda (600 mM) metastatik melanoma hücrelerinde (Caron ve ark, 2010) ve AGS insan gastrik, HepG2 insan hepatik ve KYSE-30 insan özofagos skamöz karsinoma hücre serilerinde apoptotik etkiler gösterdiği bildirilmiş (Jafari ve ark, 2011), ancak bu çalışmalarda apoptoz mekanizmaları üzerine olan etkileri araştırılmamıştır. Çalışmamızda 100 mM konsantrasyonda uygulanan MSM' nin kaspaz-3 enzim aktivitesini arttırdığı ve böylece sözü geçen literatürlerle uyumlu olarak apoptotik karakterdeki hücreleri arttırdığı belirlenmiştir. GA ise uygulanan her iki dozda da (1.25 mM, 2.5 mM) hücre canlılığını arttırıcı etkilerini apoptozun inhibisyonu aracılığı ile gerçekleştirmektedir. GA' nın hücre canlılığı ve apoptoz üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalarda GA' nın hücre tipine ve o hücre tipinde aktif olan biyolojik yolağa ve patolojiye göre apoptozu baskılayıcı veya indükleyici etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Hwang ve ark, 2010; Champattanachai, ve ark, 2008; Hwang ve Baek, 2010; Liang ve

ark, 2010; Varghese, 2007). CS' nin ise LPS/IFNγ ile uyarılan makrofaj hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerinde anlamlı etki göstermediği belirlenmiştir, bu bulgu CS' nin hücre canlılığı üzerine de anlamlı etki göstermediği bulgusu ile uyumlu görülmektedir.

CS, kaspaz-3 enzim aktivitesinde bir değişikliğe yol açmaması nedeni ile bir tarafta bırakılarak MSM ve GA' nın kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkileri karşılaştırıldığında GA' nın MSM' ye göre çok daha güçlü bir şekilde kaspaz-3 enzim aktivitesini azalttığı görülmektedir, GA' nın kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerindeki bu etkilerinin büyük oranda canlılığa da yansıdığı görülmektedir. Nitekim, MSM' nin 50 mM dozda aktive hücrelerde canlılığı arttırıcı etkisinin GA' nın her iki dozuna göre düşük olduğu görülmektedir. MSM' nin 50 mM dozda ve GA' nın 1.25 ve 2.5 mM dozlarda kaspaz-3 enzim aktivitesini azaltıcı ve hücre canlılığını arttırıcı etkilerine antiinflamatuvar ve hücre içindeki nitrik oksit bağımlı stres yolakları üzerindeki inhibitör etkilerinin aracılık ettiği düşünülmektedir.

MSM, GA ve CS' nin LPS/IFNγ ile uyarılan makrofaj hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine olan etkilerinin saptanmasının ardından bu üç kimyasalın, nitrik oksit bağımlı apoptozun karakteristik belirteçleri arasında yer alan mitokondri membran potansiyeli üzerine olan etkilerinin analizi gerçekleştirilmiştir.

MSM' nin 100 mM dozda LPS/IFNγ ile uyarılan makrofaj hücrelerinde mitokondri membran potansiyelini düşürdüğü ve 50 mM dozda ise arttırdığı belirlenmiş ancak bu değişiklikler anlamlı bulunmamıştır. MSM' nin uygulanan 50 ve 100 mM' lık dozlarda mitokondri membran potansiyeli üzerine anlamlı etki sergilememesinin, hücre canlılığı ve kaspaz-3 enzim aktivitesi gibi parametreler üzerinde de zayıf etki göstermesi ile açıklanabileceği düşünülmektedir.

Literatürde, GA sülfatın K562 lösemik hücre serisinde katepsin D translokasyonunu, sitozole sitokrom c salımını ve kaspaz-3 aktivasyonunu uyardığı ve hücre proliferasyonunu azaltarak apoptozu mitokondriyal yolak üzerinden uyardığı belirlenmiştir (Wang ve ark., 2006). İnsan DU145 prostat kanser hücrelerinde GA'nın etkilerinin incelendiği bir çalışmada ise, GA'nın doz bağımlı olarak proliferasyonu azalttığı ve apoptozu arttırdığı, ve bu anti-proliferatif etkilerinin STAT3 yolağı üzerinden gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Chesnokov ve ark., 2009). 2006 ve 2007 yıllarında yapılan farklı çalışmalarda GA'nın kondrosit ölümü üzerindeki etkileri araştırılmış ve GA'nın lipofilik bir türevi olan Glu5' in, darbeyle indüklenen kondrosit apoptozunu mitokondriyal depolarizasyonu azaltarak önlediği, iskemi ve reperfüzyon sonrasında kardiyomyosit apoptozunu önlediği belirlenmiştir (Champattanachai ve ark., 2006; Huser ve ark., 2007). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar LPS/IFNγ ile uyarılan makrofaj hücrelerinde GA uygulamasının azalan mitokondri membran potansiyelini Champattanachi ve ark.' nın bildirdiği sonuçlara benzer şekilde arttırdığını ortaya koymuştur. Böylece çalışmamızda elde edilen bulgular, GA'nın apoptozun mitokondriyal yolağına etki ederek engellediğini ortaya koymaktadır. Çalışmamızda CS'nin ise uyarılmış makrofajlarda mitokondri membran potansiyeli üzerine etki göstermediği belirlenmiştir.

MSM, GA ve CS' nin tek başına uygulandıklarında LPS/IFNγ ile uyarılan makrofaj hücreleri üzerine olan etkilerinin incelenmesinden sonra çalışmanın son basamağında bu üç kimyasalın ikili ve üçlü kombinasyonlarının etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızda MSM' nin GA ve CS ile ikili ve üçlü kombinasyonlarının tamamının LPS/IFNγ ile uyarılan makrofajlarda nitrit düzeylerini azalttığı, nitrit düzeyi üzerindeki en etkin inhibisyonun ise 100 mM MSM/2.5 mM GA kombinasyonu ile gerçekleştiği belirlenmiştir. MSM/GA kombinasyonunun osteoartrit tedavisinde kullanımına ilişkin sınırlı sayıda çalışma bulunmakta, bu çalışmaların tamamına yakınını klinik çalışmalar oluşturmaktadır. Günümüzde üzüm polifenolleri, quercetin, resveratrol, genistein ve BBI (bowman birk inhibitörü) gibi farklı antioksidan ve antiinflamatuvar ajanların iNOS

bağımlı nitrik oksit sentezi üzerine sinerjik inhibitör etkiler gösterdiklerine ilişkin çalışmalar bulunmaktadır (Dia ve ark, 2008; Chan ve ark, 2000). Çalışmamızda elde edilen bulgular bu literatürlere benzer şekilde MSM ve GA' nın ikili kombinasyonunun nitrit düzeyi üzerine sinerjik inhibitör etkiler sergilediğini ortaya koymaktadır.

MSM' nin GA ve CS ile kombinasyonlarının LPS/IFNγ ile uyarılan makrofaj hücrelerinde canlılık üzerine olan etkileri incelendiğinde 50 mM MSM/2.5 mM GA ve 50 mM MSM/2.5 mM GA/4000 µg/ml CS kombinasyonlarının hücre canlılığını en fazla arttıran kombinasyonlar oldukları ve canlılığı uyarılmamış hücre grubunun canlılık düzeyine yaklaştırdığı belirlenmiştir. MSM' nin GA ve CS ile kombinasyonlarının LPS/IFNγ ile uyarılan makrofaj hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesi ve mitokondri membran potansiyeli üzerine olan etkileri incelendiğinde, 50 mM MSM/2.5 mM GA ve 50 mM MSM/2.5 mM GA/4000 µg/ml CS kombinasyonlarının hücre canlılığını arttırıcı etkilerine paralel olarak kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerinde de güçlü inhibitör etkiler gösterdikleri ve mitokondri membran potansiyel kaybını azalttıkları belirlenmiştir.

Çalışmamızda MSM ve kombinasyonlarına ilişkin elde edilen bu bulgular hücre canlılığında artışa yol açan kombinasyonların bu etkilerinde özellikle GA' nin önemli rol oynadığını göstermektedir. Nitekim GA' nin hücre canlılığı, kaspaz-3 enzim aktivitesi ve mitokondri membran potansiyeli üzerine olan etkileri göz önünde bulundurulduğunda MSM ve CS' ye göre hücre canlılığını arttırıcı etkilerinin daha güçlü olduğu gözlenmektedir. MSM ise 50 mM konsantrasyonda hücre canlılığında zayıf da olsa yükseltici bir etki göstermekte ancak 100 mM konsantrasyonda kaspaz-3 enzim aktivitesini arttırmaktadır. Bu nedenle 100 mM MSM' nin, yer aldığı GA ve CS kombinasyonlarında MSM' nin hücrelerde apoptotik profili uyardığı gözlenmektedir. 100 mM MSM/1.25 mM GA kombinasyonunun 50 mM MSM/1.25 mM GA kombinasyonuna göre hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı gözlenmektedir, bu azalma da MSM' nin yüksek dozda hücre canlılığını azaltıcı etkileri ile açıklanabilir.

Çalışmamızda GA' nın MSM ve CS ile kombinasyonlarının LPS/IFNγ ile uyarılan makrofajlarda canlılık üzerine etkileri incelenmiş ve tek başına 2.5 mM GA ve 2.5 mM GA/50 mM MSM kombinasyonunun canlılık düzeyinde en etkin artışa neden oldukları belirlenmiştir. GA' nın tek başına ve kombine uygulandığında kaspaz-3 enzim aktivitesi ve mitokondri membran potansiyeli üzerine olan etkileri de canlılık üzerine olan etkileri ile paralellik göstermektedir ve kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerinde en etkin inhibisyonu ve mitokondri membran potansiyel kaybının geri döndürülmesini 2.5 mM GA, 2.5 mM GA/50 mM MSM ve 2.5 mM GA/4000 µg/ml CS kombinasyonunun gerçekleştirdiği saptanmıştır.

CS' nin MSM ve GA ile kombinasyonlarının etkileri analiz edildiğinde nitrit düzeylerini CS' nin uygulanan tüm kombinasyonlarının düşürdüğü, hücre canlılığındaki en anlamlı artışın ve mitokondri membran potansiyelindeki kaybın geri döndürülmesinin 2.5 mM GA/4000 µg/ml CS ve 50 mM MSM/2.5 mM GA/4000 µg/ml kombinasyonları ile gerçekleştiği belirlenmiştir. CS' nin tek başına uyarılmış hücrelerde canlılık üzerine anlamlı etki göstermeyişi, söz konusu kombinasyonlarda sergilediği canlılık arttırıcı etkilerinde GA' nın önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır.

Özetle, MSM, GA ve CS' nin ikili ve üçlü kombine şekillerinin LPS/IFNγ ile uyarılan makrofajlarda canlılıkla ilişkili parametreler üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde MSM' nin 50 mM dozda anlamlı olarak hücre canlılığını arttırdığı, 100 mM' da ise apoptotik hücre profilini uyarıcı etkiler sergilediği, GA' nin uygulanan her iki dozunda da (1.25 mM, 2.5 mM) hücre canlılığını arttırarak apoptozu inhibe ettiği, CS' nin ise ugulanan dozda (4000 µg/ml) hücre canlılığı ve apoptoz üzerinde anlamlı etkiler sergilememediği belirlenmiştir.

Çalışmamızın en son aşamasında MSM, GA ve CS' nin uyarılmış makrofajlarda apoptoz üzerine olan etkilerini saptamak üzere, hücreler Annexin V-PI ile boyanarak akım sitometrik analizleri gerçekleştirilmiştir. 2.5 mM GA'nin tek başına uygulanması ve 2.5

mM GA/100 mM MSM, 2.5 mM GA/4000µg CS, 2.5 mM/4000µg CS/100 mM kombinasyonlarının uygulanmaları halinde AnnV-PI ile boyanan hücre sayısının (ileri apoptotik) LPS/ IFNγ ile uyarılan hücre grubundaki apoptotik hücre sayısına göre anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Bu da elde etmiş olduğumuz hücre canlılığı, kaspaz-3 aktivitesi ve mitokondri membran potansiyeli verileri ile paralellik göstermektedir ve özellikle GA' nın 2.5 mM konsantrasyonda tek başına ve kombine olarak uygulanması durumunda antiapoptotik etkiler sergilediğini ortaya koymaktadır.

Günümüzde, çok çeşitli etkin maddelerin, LPS/IFN-γ ile aktive edilmiş makrofaj hücre modelinde apoptozdan koruma sağladığı veya bunun tersine apoptozu uyardıkları bilinmektedir. Bu maddelerin makrofajların ölüm yolakları üzerinde aktive veya inhibe edici etkileri patolojinin tipine göre avantaj veya dezavantaj sağlamaktadır.

Pek çok inflamatuvar durumda başlıca sitotoksik aracı olan nitrik oksit bağımlı apoptozun baskılanması önemli bir klinik sorun olan sepsis tablosunun iyileştirilmesinde yarar sağlamakta ve immün sistemin baskılandığı durumlarda immüniteye katkı sağlayacağı düşünülmekte ise de artrit gibi patolojilerde ise makrofaj apoptozunun uyarılmasının tedavi açısından avantaj yaratacağı öne sürülmektedir.

Çalışmamızda elde edilen bulgularla MSM, GA ve CS' nin her üçü de makrofajlarda nitrik oksit üretimini azaltıcı etkiler sergilemiştir. MSM' nin toksik olmayan dozlarından 50 mM' da hücre canlılığını düşük derecede arttırdığı, 100 mM' da ise hücre canlılığına etki etmeksizin kaspaz-3 enzim aktivitesini arttırarak hücreleri apoptotik karaktere dönüştürdüğü belirlenmiştir. MSM' nin GA ve CS ile kombine formlarının etkileri incelendiğinde ise, özellikle 100 mM konsantrasyonda uygulanması durumunda MSM' nin, GA' nın hücre canlılığını arttırıcı etkisini tersine çevirdiği ve hücre canlılığını azalttığı görülmektedir. GA' nın ise kaspaz-3 aktivitesi üzerinde güçlü inhibitör ve dolayısıyla güçlü antiapoptotik etkiler gösterdiği belirlenmiştir. GA' nın NO bağımlı apoptozun karakteristik belirteçleri arasında yer alan LPS/IFN-γ uyarımı ile azalan

mitokondri membran potansiyelini arttırıcı etkiler göstermesi, antiapoptotik etkilerine kısmen nitrit sentezi üzerine olan etkilerinin aracılık ettiğini ortaya koymaktadır. Ancak, GA' nın nitrit üretimi üzerindeki etkileri az olduğu için, başka bir deyişle aktive hücrelerde nitrit düzeylerinde yarattığı inhibisyon çok güçlü olmadığı için antiapoptotik etkilerinde nitrik oksit bağımlı olmayan yolakların da görev yaptığı düşünülmektedir. MSM ve GA' nın nitrit üretimi üzerinde inhibitör etkiler sergilerken hücre canlılığı ve apoptoz üzerine birbirine zıt etkiler göstermeleri ise makrofajlarda LPS/IFNγ uyarımı ile aktive olan çok sayıda biyolojik sinyal yolağının bulunması ve sözü geçen kimyasalların olasılıkla farklı sinyal yolaklarına etkileri ile açıklanabilir. Bu nedenle MSM, GA ve CS' nin spesifik yolaklar üzerine olan etkilerini aydınlatmak üzere mekanizmaya yönelik daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1) Çalışmamızda RAW 264.7 makrofaj hücreleri LPS/IFNγ kombinasyonu ile 24 saat aktive edilmiş ve bu aktivasyon sonucunda hücre canlılığında anlamlı olarak azalma ile birlikte nitrik oksit bağımlı apoptozun belirteçleri arasında yer alan mitokondri membran potansiyelinde kayıp ve kaspaz-3 enzim aktivitesinde artış saptanarak apoptotik modelin standardizasyonu gerçekleştirilmiştir.
2) Farklı konsantrasyonlardaki MSM, GA ve CS, LPS/IFNγ ile aktive edilen makrofajlarda nitrit düzeylerini azaltıcı etki göstermişler ancak bu kimyasal maddelerin hiçbiri nitrit düzeylerini uyarılmamış hücrelerin nitrit düzeyine ulaştıramamıştır. Nitrit düzeylerindeki en etkin azalmayı 100 mM konsantrasyondaki MSM gerçekleştirmiştir.
3) MSM, GA ve CS' nin aktivasyon sonucunda apoptoza uğrayan makrofajlarda canlılık üzerine etkileri incelendiğinde 50 mM MSM, 1.25 ve 2.5 mM GA' nın canlılığı anlamlı olarak arttırdığı, 100 mM MSM ve CS' nin ise canlılığa etki etmediği belirlenmiştir. Canlılık üzerinde en etkin artışı 2.5 mM konsantrasyonda GA gerçekleştirmiştir.
4) Hücre canlılığı ile ilgili elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak MSM (50 mM) ve GA' nın (1.25 mM, 2.5 mM) kaspaz-3 enzim aktivitesini azalttıkları,. MSM' nin 100 mM konsantrasyonda ise kaspaz-3 enzim aktivitesini arttırdığı ve doz bağımlı olarak apoptotik veya antiapoptotik etkiler sergilediği belirlenmiştir. Ancak hücre canlılığını arttırıcı etkileri güçlü bulunmamıştır. Üç kimyasal madde içinde kaspaz-3 enzim aktivitesini en etkin olarak inhibe eden madde 2.5 mM konsantrasyondaki GA olarak belirlenmiştir. LPS/IFN-γ uyarımı sonucunda azalan mitokondri membran potansiyeli üzerine MSM ve CS' nin etki göstermedikleri, ancak GA' nın 2.5 mM konsantrasyonda güçlü bir potansiyel arttırıcı etki gösterdiği saptanmıştır.

5) MSM, GA ve CS' nin ikili ve üçlü kombine formlarının nitrit düzeyleri üzerine etkileri incelendiğinde en etkin inhibisyon 2.5 mM GA-100 mM MSM kombinasyonu ile gerçekleşmiştir. Bu kombinasyonla elde edilen inhibisyon GA ve MSM' nin bu dozlarda tek başına uygulandıklarında belirlenen etkiden daha güçlü olarak saptanmıştır ve iki kimyasal maddenin belirtilen dozlarda nitrit düzeyleri üzerinde sinerjik etkiler gösterdiğini ortaya koymaktadır.
6) Tek başına uygulanan 2.5 mM GA' nın LPS/IFN-γ ile azalan hücre canlılığını çalışmamızda kullandığımız tüm kimyasal madde kombinasyonlarından daha güçlü olarak inhibe ettiği belirlenmiştir. Aynı konsantrasyondaki GA mitokondri membran potansiyelini arttırıcı ve kaspaz-3 aktivitesini azaltıcı etkilerini de ikili ve/veya üçlü kombine formlara göre daha etkin şekilde göstermiştir ve bu nedenle GA hücre canlılığını arttırıcı etkileri en potent kimyasal madde olarak saptanmıştır.
7) CS' nin tek başına hücre canlılığı ve apoptozla ilgili belirteçler üzerine anlamlı etki göstermediği, ancak GA ve MSM ile kombine uygulanması durumunda antiapoptotik etkiler gösterdiği belirlenmiştir. CS' nin kombine formlarında gözlenen etkilerin daha çok GA ve MSM' den kaynaklandığı düşünülmektedir.
8) GA' nın aktive hücrelerde nitrit düzeylerinde yarattığı inhibisyonun çok güçlü olmaması antiapoptotik etkilerinde nitrik oksit bağımsız yolakların da görev yapabileceği düşüncesini uyandırmaktadır.
9) MSM ve GA' nın her ikisi de nitrit üretimi üzerinde inhibitör etkiler sergilemesine rağmen MSM kaspaz-3 enzim aktivitesini arttırırken GA ise uygulanan dozlarında antiapoptotik etkiler göstermektedir. MSM ve GA' nın sergiledikleri bu farklı etkilerin makrofajlarda LPS/IFNγ uyarımı ile aktive olan çok sayıda biyolojik sinyal yolağının bulunması ve bu iki kimyasal maddenin farklı sinyal yolaklarına olası etkilerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

10) MSM, GA ve CS' nin spesifik yolaklar üzerine olan etkilerini aydınlatmak üzere NO bağımlı ve bağımsız mekanizmaların her ikisine yönelik daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

ÖZET

Metilsülfonilmetan, glukozamin ve kondroitin sülfatın LPS/IFNγ ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde apoptoz üzerine etkileri

Apoptoz, doku homeostazisinin düzenlenmesi gibi normal fizyolojide ve çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde önemli rol oynayan, genetik olarak programlanmış bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptoz, içsel ve dışsal olmak üzere başlıca iki yolak aracılığı ile gerçekleşir. Birçok hücre tipinde mikrobiyal ve viral patojenlere karşı savunma mekanizması olarak iNOS enziminin aktivasyonu sonucunda sentezlenen nitrik oksit, apoptozun içsel yolak aracılı indükleyicileri arasında yer almaktadır. Nitrik oksitin kontrolsüz üretimi, apoptotik yolakların da etkin olduğu ateroskleroz, romatoid artrit, diyabet, septik şok ve multipl skleroz gibi inflammatuvar ve immün patolojilerde rol oynamaktadır. Son yıllarda, özellikle temelinde inflamatuvar bozuklukların yattığı artrit ve romatoid artrit tedavisinde yarar sağladığı öne sürülen MSM ve MSM ile kombine preparatları bulunan GA ve CS klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Literatürde MSM' nin apoptotik yolaklar üzerindeki etki mekanizmalarına ilişkin yeterli bilgi bulunmamaktadır. Ayrıca, klinikte bu üç kimyasal maddenin farklı kombine formlarının kullanılıyor oluşu, tek başına sergiledikleri etkilerin yanı sıra kombine olarak uygulanmaları durumunda sergiledikleri etkilerin belirlenmesini önemli kılmaktadır. Bu çalışmada, MSM, GA ve CS' nin farklı konsantrasyonlarda tek başına ve/veya kombine uygulandıklarında LPS/IFNγ ile aktive RAW 264.7 makrofajlarda apoptoz üzerine olan etkileri belirlenmiştir. Bu amaçla, nitrit düzeyleri ve hücre canlılığı tayin edilmiş ve apoptozun belirteçleri arasında yer alan kaspaz-3 aktivitesi, mitokondri membran potansiyeli ve Ann V-PI ile akım sitometrik analizler gerçekleştirilmiştir. Kimyasal maddelerin tamamı nitrit düzeyleri üzerinde inhibe edici etki göstermişler, en etkin inhibisyon 100 mM MSM ile gerçekleşmiştir. MSM' nin LPS/IFNγ ile aktive RAW 264.7 makrofajlarda doz bağımlı olarak apoptotik ya da antiapoptotik olarak davrandığı, GA' nın ise uygulanan bütün dozlarda mitokondri membran potansiyelini arttırdığı, kaspaz-3 enzim aktivitesini azalttığı ve antiapoptotik etkiler gösterdiği belirlenmiştir. CS, tek başına uygulanması durumunda apoptotik belirteçler üzerine etki göstermezken MSM ve GA ile kombine formları antiapoptotik etkiler göstermiştir. Kombine formlarda gözlenen antiapoptotik etkilerin büyük ölçüde GA' nın etkisinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. GA' nın aktive hücrelerde nitrit düzeylerinde yarattığı inhibisyonun çok güçlü olmaması nedeniyle antiapoptotik etkilerine kısmen nitrit sentezi üzerine olan etkilerinin aracılık ettiği, bununla birlikte nitrik oksit bağımlı olmayan yolakların da görev yaptığı düşünülmektedir. MSM ve GA' nın nitrit üretimi üzerinde inhibitör etkiler sergilerken hücre canlılığı ve apoptoz üzerine birbirinden farklı etkiler göstermeleri ise makrofajlarda LPS/IFNγ uyarımı ile aktive olan çok sayıda biyolojik sinyal yolağının bulunması ve sözü geçen kimyasal maddelerin olasılıkla farklı sinyal yolaklarına etkileri ile açıklanabilir. Bu nedenle MSM, GA ve CS' nin spesifik yolaklar üzerine olan etkilerini aydınlatmak üzere mekanizmaya yönelik daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar Sözcükler: Apoptoz, glukozamin, kondroitin sülfat, makrofaj, metilsülfonilmetan

SUMMARY

Effects of methylsulfonylmethane, glucosamine and chondroitin sulfate on apoptosis in LPS/IFNγ stimulated RAW 264.7 macrophage cells

Apoptosis is a genetically programmed cell death mechanism which plays important role in normal physiology such as tissue homeostasis regulation and pathophsiology of various diseases. Apoptosis occurs mainly via two pathways, intrinsic and extrinsic. iNOS enzyme activation and nitric oxide synthesis in various cell types as a defense mechanism against microbial and viral pathogens plays important role in inflammatory and immune pathologies such as atherosclerosis, rheumatoid arthritis, diabetes, septic shock and multiple sclerosis, highly and uncontrolled production of nitric oxide leads to cell death. Recently, MSM and GA and CS which are acclaimed to be beneficial for inflammatory disorders arthritis and romatoid arthritis are used widely clinically. There is limited information regarding the effect mechanisms of MSM on apoptotic pathways. Furthermore as these three chemical agents are widely prescript together, it is important to analyse the effects of MSM, GA and CS both alone and in combination. In this study, effects of different concentrations of MSM, GA and CS alone or in combination were tested on LPS/IFNγ activated RAW 264.7 macrophages. Fort his purpose nitrite levels, cell viability, caspase-3 activity, mitochondria membran potential and flow cytometric analysis with Annexin V-PI cell staining was performed. All of the compounds tested inhibited nitrite levels, most potent inhibition was achieved with 100 mM MSM. MSM acted as apoptotic or antiapoptotic in LPS/IFNγ activated macrophages depending on the dose tested whereas GA increased mitochondrial membrane potential, decreased caspase-3 enzyme activity and exhibited antiapoptotic effects. CS did not effect any apoptotic revealers alone, however its combination with MSM and/or GA showed antiapoptotic effects which might be largely attributed to GA. As the inhibitor effect of GA on activated cells is not potent, the antiapoptotic effects of GA is partly nitric oxide dependent however nitric oxide independent pathways are thought to be responsible. MSM and GA both inhibited NO levels but they showed opposite effects in terms of cell viability and apoptosis. This can be explained with activation of various different biological signal pathways in macrophages with LPS/IFNγ and the probable effects of the chemicals on different signaling pathways. In this regard, further elaborate studies are needed to clarify the effects of MSM, GA and CS on mechanisms in specific pathways.

Key Words: Apoptosis, chondroitin sulfate, glucosamine, macrophage, methylsulfonylmethane

KAYNAKLAR

ABRAMSON, S.L., GALLIN, J.I. (1990). IL-4 inhibits superoxide production by human mononuclear phagocytes. *J Immunol*. 144:625– 630.

AGARWAL, M.L., AGARWAL, A., TAYLOR, W.R., CHERNOVA, O., SHARMA, Y., STARK, G.R. (1998). A p53-dependent S-phase checkpoint helps to protect cells from DNA damage in response to starvation for pyrimidine nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95(25):**14775-80.

ALAM, S.S., LAYMAN, D.L. (1982). Dimethyl sulfoxide as a cholesterol-lowering agent in cultured fibroblasts exposed to low density lipoproteins in culture. *Biochim Biophys Acta*. **710:**306-313.

ALBERTS, K., JOHNSON, ALEXANDER; LEWIS, JULIAN; RAFF, MARTIN; ROBERTS; WALTER, PETER (2008). Apoptosis: Programmed Cell Death Eliminates Unwanted Cells Molecular Biology of the Cell Chapter 18.

ALBINA, J.E., CUI, S., MATEO, R.B., REICHNER, J.S. (1993). Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J Immunol.* **150(11):**5080-5.

ALBINA, J.E., REICHNER, J.S. (1998). Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer Metastasis Rev.* **17(1):**39-53.

ALEXANDER, W.S., HILTON, D.J. (2004). The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol***. 22:**503-29.

ALIPRANTIS, A.O., DIEZ-ROUX, G., MULDER, L.C., ZYCHLINSKY, A., LANG, R.A. (1996). Do macrophages kill through apoptosis? *Immunol Today.* **17(12):**573-6.

ALTMAN, R.D., ABRAMSON, S., BRUYERE, O., CLEGG, D., HERRERO-BEAUMONT, G., MAHEU, E., MOSKOWITZ, R., PAVELKA, K., REGINSTER, J.Y. (2006). Commentary: osteoarthritis of the knee and glucosamine. *Osteoarthritis Cartilage.* **14(10):**963-6.

AMBS, S., HUSSAIN, S.P., HARRIS, C.C. (1997). Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. *FASEB J.* **11(6):**443-8.

BACH, E.A., AGUET, M., SCHREIBER, R.D. (1997). The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol*. **15:**563-91.

BARINAGA, M. (1998). Death by dozens of cuts. *Science.* **280(5360):**32-4.

BARRAGER, E., VELTMANN, J.R. Jr., SCHAUSS, A.G., SCHILLER, R.N. (2002). A multicentered, open-label trial on the safety and efficacy of methylsulfonylmethane in the treatment of seasonal allergic rhinitis. *J Altern Complement Med.* **8:**167-173.

BARTON, G. M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J. Clin. Invest*. **118:**413–420.

BEILKE, M.A., COLLINS-LECH, C, SOHNLE, P.G. (1987). Effects of dimethyl sulfoxide on the oxidative function of human neutrophils. *J Lab Clin Med.* **110**: 91-96.

BERARDESCA, E., CAMELI, N., CAVALLOTTI, C., LEVY, J.L., PIÉRARD, G.E., de PAOLI AMBROSI, G. (2008). Combined effects of silymarin and methylsulfonylmethane in the management of rosacea: clinical and instrumental evaluation. *J Cosmet Dermatol.* **7(1):**8-14.

BIOL, M.C., MARTIN, A., OEHNINGER, C., LOUISOT, P., RICHARD, M. (1981). Biosynthesis of glycoproteins in the intestinal mucosa. II. Influence of diets. *Ann Nutr Metab.* **25(5):**269-80.

BLACK, C., CLAR, C., HENDERSON, R., MACEACHERN, C., MCNAMEE, P., QUAYYUM, Z., ROYLE, P., THOMAS, S. (2009). The clinical effectiveness of glucosamine and chondroitin supplements in slowing or arresting progression of osteoarthritis of the knee: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. **13(52):**1-148.

BLOCK JA, OEGEMA TR, SANDY JD, PLAAS A. (2010). The effects of oral glucosamine on joint health: is a change in research approach needed? *Osteoarthritis Cartilage.* **18(1):**5-11.

BLOCK, J.A., OEGEMA, T.R., SANDY, J.D., PLAAS, A. (2010). The effects of oral glucosamine on joint health: is a change in research approach needed? *Osteoarthritis Cartilage*. **18(1):**5-11.

BOATRIGHT, K.M., RENATUS, M., SCOTT, F.L., SPERANDIO, S., SHIN, H., PEDERSEN, I.M. et al. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* **11:**529–541.

BOATRIGHT, K.M., SALVESEN, G.S. (2003). Mechanisms of caspase activation.*Curr Opin Cell Biol.* **15(6):**725-31.

BOEHM, U., KLAMP, T., GROOT, M., HOWARD, J.C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol.* **15:**749-95.

BOGDAN, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* **2(10):**907-16.

BOSCÁ, L., HORTELANO, S. (1999). Mechanisms of nitric oxide-dependent apoptosis: involvement of mitochondrial mediators. *Cell Signal.* **11(4):**239-44.

BOSCÁ, L., ZEINI, M., TRAVÉS, P.G., HORTELANO, S. (2005). Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology.* **208(2):**249-58.

BOSSY-WETZEL, E., NEWMEYER, D.D., GREEN, D.R. (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *E9MBO J.* **17(1):**37-49.

BOVERIS, A., ALVAREZ, S., NAVARRO, A. (2002). The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radic Biol Med***. 33(9):**1186-93.

BRADFORD, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72:**248-254.

BRIEN, S., PRESCOTT, P., BASHIR, N., LEWITH, H., LEWITH, G. (2008). Systematic review of the nutritional supplements dimethyl sulfoxide (DMSO) and methylsulfonylmethane (MSM) in the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* **16(11):**1277-88.

BROOKES, P., DARLEY-USMAR, V.M. (2002). Hypothesis: the mitochondrial NO(*) signaling pathway, and the transduction of nitrosative to oxidative cell signals: an alternative function for cytochrome C oxidase. *Free Radic Biol Med*. **32(4):**370-4.

BROWN, G.C., BORUTAITE, V. (2002). Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med.* **33(11):**1440-50.

BRUNE, B., VON KNETHEN, A.J. (2002). The role of nitric oxide and cyclooxygenase-2 in attenuating apoptosis. *Environ Pathol Toxicol Oncol.* **21(2):**103-12.

BURNEY, S., CAULFIELD, J.L., NILES, J.C., WISHNOK, J.S., TANNENBAUM, S.R. (1999). The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat Res***. 424(1-2):**37-49.

CALMELS, S., HAINAUT, P., OHSHIMA, H. (1997). Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein.*Cancer Res.* **57(16):**3365-9.

CAMPO, G.M., AVENOSO, A., CAMPO, S., D'ASCOLA, A., TRAINA, P., SAMÀ, D., CALATRONI, A. (2009). Glycosaminoglycans modulate inflammation and apoptosis in LPS-treated chondrocytes. *J Cell Biochem.* **106(1):**83-92.

CAMPO, G.M., AVENOSO, A., CAMPO, S., NASTASI, G., TRAINA, P., D'ASCOLA, A., CALATRONI, A. (2008). Chondroitin-4-sulphate reduced oxidative injury in caerulein-induced pancreatitis in mice: the involvement of NF-kappaB translocation and apoptosis activation. *Exp Biol Med (Maywood).* **233(6):**741-52.

CAMPO, G.M., AVENOSO, A., CAMPO, S., NASTASI, G., TRAINA, P., D'ASCOLA, A., RUGOLO, C.A., CALATRONI, A. (2008). The antioxidant activity of chondroitin-4-sulphate, in carbon tetrachloride-induced acute hepatitis in mice, involves NF-kappaB and caspase activation. *Br J Pharmacol.* **155(6):**945-56.

CAÑAS, N., VALERO, T., VILLARROYA, M., MONTELL, E., VERGÉS, J., GARCÍA, A.G., LÓPEZ, M.G. (2007). Chondroitin sulfate protects SH-SY5Y cells from oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J Pharmacol Exp Ther.* **323(3):**946-53.

CAO, H., WOLFF, R.G., MELTZER, M.S., CRAWFORD, R.M. (1989). Differential regulation of class II MHC determinants on macrophages by IFN-gamma and IL-4. *J Immunol*. **143:**3524 –3531.

CAROFF, M., KARIBIAN, D., CAVAILLON, J.M., HAEFFNER, C.N. (2002). Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* **4(9):**915-26.

CARON, J.M., BANNON, M., ROSSHIRT, L., LUIS, J., MONTEAGUDO, L., CARON, J.M., STERNSTEIN, G.M. (2010). Methyl sulfone induces loss of metastatic properties and reemergence of normal phenotypes in a metastatic cloudman S-91 (M3) murine melanoma cell line. *PLoS One* **5(8):**e11788.

CECIL, K.M., LIN, A., ROSS, B.D., EGELHOFF, J.C. (2002). Methylsulfonylmethane observed by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy in a 5-year-old child with developmental disorder: effects of dietary supplementation. *J Comput Assist Tomogr.* **26:**818-820.

CERRETTI, D.P., KOZLOSKY, C.J., MOSLEY, B., NELSON, N., VAN NESS, K., GREENSTREET, T.A., MARCH, C.J., KRONHEIM, S.R., DRUCK, T., CANNIZZARO, L.A., et al. (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science.* **256(5053):**97-100.

CERRETTI, D.P., KOZLOSKY, C.J., MOSLEY, B., NELSON, N., VAN NESS, K., GREENSTREET, T.A. et al. (1992). Molecular cloningof the interleukin-1 beta convertingenzyme. *Science* **256:**97–100.

CHAMPATTANACHAI, V., MARCHASE, R.B., CHATHAM, J.C. (2007). Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein-associated O-GlcNAc. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292(1):C178-87.

CHAN, E.D., RICHES, D.W. (2001). IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line. *Am J Physiol Cell Physiol.* **280(3):**441-50.

CHAN, M.M., MATTIACCI, J.A., HWANG, H.S., SHAH, A., FONG, D. (2000). Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Biochem Pharmacol.* **60(10):**1539-48.

CHARLES, A., JANEWAY, J.R., RUSLAN, M.(2002). Innate ımmune recognıtıon. *Annu. Rev. Immunol.* **20(1):**197–216.

CHAWLA, A. (2010). Control of macrophage activation and function by PPARs. *Circ Res.* **106(10):**1559-69.

CHESNOKOV, V., SUN, C., ITAKURA, K. (2009). Glucosamine suppresses proliferation of human prostate carcinoma DU145 cells through inhibition of STAT3 signaling. *Cancer Cell International*. **9:**25.

CHON, S.Y., HASSANAIN, H.H., GUPTA, S.L. (1996). Cooperative role of interferon regulatory factor 1 and p91 (STAT1) response elements in interferon-gamma-inducible expression of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene. *J Biol Chem.* **271(29):**17247-52.

Chondroitin sulfates. (2006). *MonographAltern Med Rev.***1(4):**338-43.

CONROZIER, T. (1998). Anti-arthrosis treatments: efficacy and tolerance of chondroitin sulfates. *Presse Med.* **27(36):**1862-5.

CONTE, A., VOLPI, N., PALMIERI, L. (1995). Biochemical and pharmacokinetic aspects of oral treatment with chondroitin sulfate. *Arzneimittelforschung* **45:**918-925.

COSTA, N.J., DAHM, C.C., HURRELL, F., TAYLOR, E.R., MURPHY, M.P. (2003). Interactions of mitochondrial thiols with nitric oxide. *Antioxid Redox Signal.* **(3):**291-305.

COX, W.I., SPECTER, S., FRIEDMAN, H. (1982). Susceptibility of Friend erythroleukemia cells to natural cytotoxicity after in vitro treatment with dimethyl sulfoxide. *Proc Soc Exp Biol Med*. **169:**337-342.

DALTON, D.K., PITTS-MEEK, S., KESHAV, S., FIGAR I.S., BRADLEY, A., STEWART, T.A.(1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science.* **259(5102):**1739-42.

DEGTEREV, A., BOYCE, M., YUAN, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene.* **22(53):**8543-67.

DEGTEREV, A., BOYCE, M., YUAN, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene.* **22(53):**8543-67.

DIA, V.P., BERHOW, M.A., GONZALEZ, D.E. MEJIA, E. (2008). Bowman-Birk inhibitor and genistein among soy compounds that synergistically inhibit nitric oxide and prostaglandin E2 pathways in lipopolysaccharide-induced macrophages. *J Agric Food Chem.* **56(24):**11707-17.

DOBROVOLSKAIA, M.A., VOGEL, S.N. (2002). Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect*. **4(9):**903-14.

DRAYTON, D. L., LIAO, S., MOUNZER, R. H. & RUDDLE, N. H. (2006). Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nature Immunol.* **7:**344–353.

DZIEWIATKOWSKI, D.D. (1962). Intracellular synthesis of chondroitin sulfate. *J Cell Biol*. **13:**359-64.

EBISUZAKI, K. (2003). Aspirin and methylsulfonylmethane (MSM): a search for common mechanisms, with implications for cancer prevention. *Anticancer Res*. **23(1A):**453-8.

EHRT, S., SCHNAPPINGER, D., BEKIRANOV, S., DRENKOW, J., SHI, S., GINGERAS, T.R., GAASTERLAND, T., SCHOOLNIK, G., NATHAN, C. (2001). Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and Mycobacterium tuberculosis: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *J Exp Med.* **194(8):**1123-40.

EU, J.P., LIU, L., ZENG, M., STAMLER, J.S. (2000). An apoptotic model for nitrosative stress. *Biochemistry.* **39(5):**1040-7.

FADOK, V.A., BRATTON, D.L., HENSON, P.M. (2001). Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest*. **108:**957–962.

FADOK, V.A., MCDONALD, P.P., BRATTON, D.L., HENSON, P.M. (1998). Regulation of macrophage cytokine production by phagocytosis of apoptotic and post-apoptotic cells. *Biochem Soc Trans.* **26(4):**653-6.

FADOK, V.A., WARNER, M.L., BRATTON, D.L., HENSON, P.M. (1998). CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *J Immunol*. **1;161(11):**6250-7.

FAN, Z., BERESFORD, P.J., ZHANG, D., XU, Z., NOVINA, C.D., YOSHIDA, A., POMMIER, Y., LIEBERMAN, J. (2003). Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. *Nat Immunol.* **4(2):**145-53.

FAURE, E., EQUILS, O., SIELING, P.A., THOMAS, L., ZHANG, F.X., KIRSCHNING, C.J., POLENTARUTTI, N., MUZIO, M., ARDITI, M. (2000). Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem.* **275(15):**11058-63.

FELSON, D.T., MCALINDON, T.E. (2000). Glucosamine and chondroitin for osteoarthritis: to recommend or not to recommend? *Arthritis Care Res.* **13(4):**179-82.

FISCHER, U., JÄNICKE, R.U., SCHULZE-OSTHOFF, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* **10(1):**76-100.

FOSSUM, S. (2002). Nobel Prize in physiology or medicine *Tidsskr Nor Laegeforen.* **122(30):**2848.

FOSTER, M.W., MCMAHON, T.J., STAMLER, J.S. (2003). S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med.* **9(4):**160-8.

FUENTES-PRIOR, P., SALVESEN, G.S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J.* **384:**201–232.

FUJIHARA, M., CONNOLLY, N., ITO, N., SUZUKI, T. (1994). Properties of protein kinase C isoforms (beta II, epsilon, and zeta) in a macrophage cell line (J774) and their roles in LPS-induced nitric oxide production. *J Immunol.* **152(4):**1898-906.

FUJIHARA, M., MUROI, M., MUROI, Y., ITO, N., SUZUKI, T. (1993). Mechanism of lipopolysaccharide-triggered junB activation in a mouse macrophage-like cell line (J774). *J Biol Chem*. **268(20):**14898-905.

GAO, J., MORRISON, D.C., PARMELY, T.J., RUSSELL, S.W., MURPHY, W.J. (1997). An interferon-gamma-,activated site (GAS) is necessary for full expression of the mouse iNOS gene in response to interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* **272(2):**1226-30.

GAY, N.J., PACKMAN, L.C., WELDON, M.A., BARNA, J.C. (1991). A leucine-rich repeat peptide derived from the Drosophila Toll receptor forms extended filaments with a beta-sheet structure. *FEBS Lett.* **291(1):**87-91.

GLADE, M.J. (1990). Polysulfated glycosaminoglycan accelerates net synthesis of collagen and glycosaminoglycans by arthritic equine cartilage tissues and chondrocytes. *Am J Vet Res.* **51:**779-785.

GLASS, C.K., WITZTUM, J.L. (2001). Atherosclerosis. The road ahead. *Cell*. **104:**503–516.

GLOIRE, G., LEGRAND-POELS, S., PIETTE, J. (2006). NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol.* **72(11):**1493-505.

GOERDT, S., POLITZ, O., SCHLEDZEWSKI, K., BIRK, R., GRATCHEV, A., GUILLOT, P., HAKIY N, KLEMKE, C.D., DIPPEL, E., KODELJA, V., ORFANOS, C.E. (1999). Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology*. **67(5-6)**:222-6.

GOODLETT CR, HORN KH. (2001). Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. Alcohol Res Health. **25(3)**:175-84.

GORDON, S. (2003). Do macrophage innate immune receptors enhance atherogenesis? *Dev Cell.* **5(5):**666-8.

GORDON, S.(2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.*3(1):23-35.

GORDON, S., LAWSON, L., RABINOWITZ, S., CROCKER, P.R., MORRIS, L., PERRY, V.H. (1992). Antigen markers of macrophage differentiation in murine tissues. *Curr Top Microbiol Immunol.* 181:1-37.

GORDON, S., TAYLOR, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 5(12):953-64.

GORDON, S.C.R., (1992). Macrophage interactions with haemopoietic cells. *Acad Sci III*. **314(9 Suppl):**35-7.

GRATCHEV, A., GUILLOT, P., HAKIY, N., POLITZ, O., ORFANOS, C.E., SCHLEDZEWSKI, K., GOERDT, S. (2001). Alternatively activated macrophages differentially Express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3. *Scand J Immunol*. **53:**386 –392.

GREEN, D. (2011). Means To An End. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Erişim: http://celldeathbook.wordpress.com/.

GRIESS, P. (1879). Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt Ueber einige azoverbindungen. *Chem. Ber.* 12:426–8.

GUHA, M., MACKMAN, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* **13(2):**85-94.

GUPTA, V.K., MCCONNELL, I., DALZIEL, R.G., HOPKINS, J. (1996). Identification of the sheep homologue of the monocyte cell surface molecule CD14. *Vet Immunol Immunopathol*.**51(1-2):**89-99.

HAAS, M.J., WONG, N.C., MOORADIAN, A.D. (2004). Effect of glucosamine on apolipoprotein AI mRNA stabilization and expression in HepG2 cells. *Metabolism* **53(6):**766-71.

HABARA, T., NAKATSUKA, M., KONISHI, H., ASAGIRI, K., NOGUCHI, S., KUDO, T. (2002). The biological effects of antiadhesion agents on activated RAW264.7 macrophages. *J Biomed Mater Res.* **61(4):**628-33.

HAMBLETON, J., WEINSTEIN, S.L., LEM, L., DEFRANCO, A.L. (1996). Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93(7):**2774-8.

HAN, J., LEE, J.D., BIBBS, L., ULEVITCH, R.J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*. **265(5173):**808-11.

HAYES, M. P., FREEMAN, S. L., DONNELLY, R. P. (1995). IFN-g priming of monocytes enhances LPS-induced TNF production by augmenting both transcription and mRNA stability. *Cytokine.* **7:** 427–435.

HEINE, H, KIRSCHNING, C.J., LIEN, E., MONKS, B.G., ROTHE, M., GOLENBOCK, D.T. (1999). Cutting edge: cells that carry A null allele for toll-like receptor 2 are capable of responding to endotoxin. *J Immunol.* **162(12):**6971-5.

HELD, T.K., WEIHUA, X., YUAN, L., KALVAKOLANU, D.V., CROSS, A.S. (1999). Gamma interferon augments macrophage activation by lipopolysaccharide by two distinct mechanisms, at the signal transduction level and via an autocrine mechanism involving tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. *Infect Immun.* **67(1):**206-12.

HERAS B, HORTELANO S, GIRÓN N, BERMEJO P, RODRÍGUEZ B, BOSCÁ L. (2007). Kaurane diterpenes protect against apoptosis and inhibition of phagocytosis in activated macrophages. *Br J Pharmacol.* **152(2):**249-55.

HERRERA-VELIT, P., REINER, N.E. (1996). Bacterial lipopolysaccharide induces the association and coordinate activation of p53/56lyn and phosphatidylinositol 3-kinase in human monocytes. *J Immunol.* **156(3):**1157-65.

HERRERO-BEAUMONT, G., MARCOS, M.E., SÁNCHEZ-PERNAUTE, O., GRANADOS, R., ORTEGA, L., MONTELL, E., VERGÉS, J., EGIDO, J., LARGO, R. (2008). Effect of chondroitin sulphate in a rabbit model of atherosclerosis aggravated by chronic arthritis. *Br J Pharmacol.* **154(4):**843-51.

HERSCHLER, R.J.(1986). MSM: A nutrient for the horse. *Eq. Vet. Data.* **7:**268-269.

HORTELANO, S., ALVAREZ, A.M, BOSCÁ, L. (1999). Nitric oxide induces tyrosine nitration and release of cytochrome c preceding an increase of mitochondrial transmembrane potential in macrophages. *FASEB J.* **13(15):**2311-7.

HORTELANO, S., DALLAPORTA, B., ZAMZAMI, N., HIRSCH, T., SUSIN, S.A., MARZO, I., BOSCÁ, L., KROEMER, G. (1997). Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett.* **410(2-3):**373-7.

HORTELANO, S., LÓPEZ-COLLAZO, E., BOSCÁ, L. (1999). Protective effect of cyclosporin A and FK506 from nitric oxide-dependent apoptosis in activated macrophages. *Br J Pharmacol.* **126(5):**1139-46.

HORTELANO, S., TRAVÉS, P.G., ZEINI, M., ALVAREZ, A.M., BOSCÁ, L. (2003). Sustained nitric oxide delivery delays nitric oxide-dependent apoptosis in macrophages: contribution to the physiological function of activated macrophages. *J Immunol.* **171(11):**6059-64.

HOSHINO, K., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., SANJO, H., OGAWA, T., TAKEDA, Y., TAKEDA, K., AKIRA, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol.* **162(7):**3749-52.

HUANG, H., ROSE, J.L., HOYT, D.G. (2004). p38 Mitogen-activated protein kinase mediates synergistic induction of inducible nitric-oxide synthase by lipopolysaccharide and interferon-gamma through signal transducer and activator of transcription 1 Ser727 phosphorylation in murine aortic endothelial cells. *Mol Pharmacol.* **66(2):**302-11.

HUSER, C.A., DAVİES, M.E. (2008). Effect of a glucosamine derivative on impact-induced chondrocyte apoptosis in vitro. A preliminary report. Osteoarthritis Cartilage. 16(1):125-8.

HWANG, M.S., BAEK, W.K. (2010). Glucosamine induces autophagic cell death through the stimulation of ER stress in human glioma cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **399(1):**111-6.

HWANG, S.M., CHEN, C.Y., CHEN, S.S., CHEN, J.C. (2000). Chitinous materials inhibit nitric oxide production by activated RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* **271(1):**229-33.

IOVU, M., DUMAIS, G., DU SOUICH, P. (2008). Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis Cartilage.* **16 Suppl 3:**S14-8.

JAFARI, N., BOHLOOLI, S., MOHAMMADI, S., MAZANI, M. (2011). Cytotoxicity of Methylsulfonylmethane on Gastrointestinal (AGS, HepG2, and KEYSE-30) Cancer Cell Lines. *J Gastrointest Cancer.* **28.**

JAFFREY SR, ERDJUMENT-BROMAGE H, FERRIS CD, TEMPST P, SNYDER SH. 2001 Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. Nat Cell Biol. ;3(2):193-7.

JOHNSON, K.A., HULSE, D.A., HART, R.C. (2001). Effects of an orally administered mixture of chondroitin sulfate, glucosamine hydrochloride and manganese ascorbate on synovial fluid chondroitin sulfate 3B3 and 7D4 epitope in a canine cruciate ligament transection model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **9:**14-21.

JOMPHE, C., GABRIAC, M., HALE, T.M., HÉROUX, L., TRUDEAU, L.E., DEBLOIS, D., MONTELL, E., VERGÉS, J., DU SOUICH, P. (2008). Chondroitin sulfate inhibits the nuclear translocation of nuclear factor-kappaB in interleukin-1beta-stimulated chondrocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **102(1):**59-65.

JUAN, T.S., HAILMAN, E., KELLEY, M.J., WRIGHT, S.D., LICHENSTEIN, H.S. (1995). Identification of a domain in soluble CD14 essential for lipopolysaccharide (LPS) signaling but not LPS binding. *J Biol Chem.* **270(29):**17237-42.

KIM, K.M., KIM, P.K., KWON, Y.G., BAI, S.K., NAM, W.D., KIM, Y.M. (2002). Regulation of apoptosis by nitrosative stress. *J Biochem Mol Biol.* **35(1):**127-33.

KIM, Y.H., KIM, D.H., LIM, H., BAEK, D.Y., SHIN, H.K., KIM, J.K. (2009). The anti-inflammatory effects of methylsulfonylmethane on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages. *Biol Pharm Bull*. **32(4):**651-6.

KIM, Y.M., LEE, B.S., YI, K.Y., PAIK, S.G. (1997). Upstream NF-kappaB site is required for the maximal expression of mouse inducible nitric oxide synthase gene in interferon-gamma plus lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. **236(3):**655-60.

KIRSCHNING, C.J., WESCHE, H., MERRILL AYRES, T., ROTHE, M. (1998). Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med.* **188(11):**2091-7.

KROEMER G. (1997). Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. *Cell Death Differ*. **4(6):**443-56.

KUMAR, V., COTRAN, R. S. & ROBBINS, S. L. (2003). Robbins Basic Pathology (Saunders).

KUPFERSCHMID, H., LANGENEGGER, T., KRÄHENBUHL, S. (1996). Pericarditis in chronic Inflammatory bowel disease: underlying disease or side effects of therapy? Clinical problem solving. *Schweiz Med Wochenschr.* **126(50):**2184-90.

KUWANA, T., MACKEY, M.R., PERKINS, G., ELLISMAN, M.H., LATTERICH, M., SCHNEITER, R., GREEN, D.R., NEWMEYER, D.D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*. **111(3):**331-42.

LAKICS, V., VOGEL, S.N. (1998). Lipopolysaccharide and ceramide use divergent signaling pathways to induce cell death in murine macrophages. *J Immunol.* **161(5):**2490-500.

LARGO, R., ALVAREZ-SORIA, M.A., DÍEZ-ORTEGO, I., CALVO, E., SÁNCHEZ-PERNAUTE, O., EGIDO, J., HERRERO-BEAUMONT, G. (2003). Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkappaB activation in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* **11(4):**290-8.

LAUBACH, V.E., SHESELY, E.G., SMITHIES, O., SHERMAN, P.A. (1995). Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92(23):**10688-92.

LAYMAN, D.L. (1987). Growth inhibitory effects of dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone on vascular smooth muscle and endothelial cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol*. **23:** 422- 428.

LEEB, B.F., PETERA, P., NEUMANN, K. (1996). Results of a multicenter study of chondroitin sulfate (Condrosulf) use in arthroses of the finger, knee and hip joints. *Wien Med Wochenschr*. **146:**609-614.

LEFFLER, C.T., PHILIPPI, A.F., LEFFLER, S.G., MOSURE, J.C., KIM, P.D. (1999). Glucosamine, chondroitin, and manganese ascorbate for degenerative joint disease of the knee or low back: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Mil Med.* **164(2):**85-91.

LEGENDRE, F., BAUGÉ, C., ROCHE, R., SAUREL, A.S., PUJOL, J.P. (2008).Chondroitin sulfate modulation of matrix and inflammatory gene expression in IL-1beta-stimulated chondrocytes--study in hypoxic alginate bead cultures. *Osteoarthritis Cartilage.* **16(1):**105-14.

LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J.M., HOFFMANN, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell.* **86(6):**973-83.

LI, C.Y., CHOU, T.C., WONG, C.S., HO, S.T., WU, C.C., YEN, M.H., DING, Y.A. (1997). Ketamine inhibits nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated rat alveolar macrophages. *Can J Anaesth.* **44(9):**989-95.

LIANG, C.M., TAI, M.C., CHANG, Y.H., CHEN, Y.H., CHEN, C.L., CHIEN, M.W., CHEN, J.T. (2010). Glucosamine inhibits epidermal growth factor-induced proliferation and cell-cycle progression in retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis.* **16:**2559-71.

LIN, A., NGUY, C.H., SHIC, F., ROSS, BD. (2001). Accumulation of methylsulfonylmethane in the human brain: identification by multinuclear magnetic resonance spectroscopy. *Toxicol Lett.* **123(2-3):**169-77.

LIPPIELLO, L., WOODWARD, J., KARPMAN, R., HAMMAD, T.A. (2000). In vivo chondroprotection and metabolic synergy of glucosamine and chondroitin sulfate. *Clin Orthop Relat Res*. **381:**229-240.

LOKE, P., ALLISON, J.P. (2003). PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100:**5336 –5341.

LOKE, P., NAIR, M.G., PARKINSON, J., GUILIANO, D., BLAXTER, M., ALLEN, J.E. (2002). IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. *BMC Immunol*. **3:**7.

LORSBACH, R.B., MURPHY, W.J., LOWENSTEIN, C.J., SNYDER, S.H., RUSSELL, S.W. (1993). Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J Biol Chem*. **268(3):**1908-13.

LOS, C.J., BUREK, C., STROH, K., BENEDYK, H., H., MACKIEWICZ, A. (2003). Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as targets for drug design, *Drug Discov. Today* . **8**:67–77.

MACMICKING, J., XIE, Q.W., NATHAN, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* **15:**323-50.

MAGALHÃES CR, SOCODATO RE, PAES-DE-CARVALHO R. (2006). Nitric oxide regulates the proliferation of chick embryo retina cells by a cyclic GMP-independent mechanism. *Int J Dev Neurosci.* 24(1):53-60.

MAGNUSON, B.A., APPLETON, J., AMES, G.B. (2007). Pharmacokinetics and distribution of [35S] methylsulfonylmethane following oral administration to rats. *J Agric Food Chem.* **55(3):**1033-8.

MAJNO, G., JORIS, I. (*2004).* Cells, Tissues and Disease. Oxford Univ. Press.

MANDERSCHEID, M., MESSMER, U.K., FRANZEN, R., PFEILSCHIFTER, J. (2001). Regulation of inhibitor of apoptosis expression by nitric oxide and cytokines relation to apoptosis induction in rat mesangial cells and RAW 264.7 macrophages. *J Am Soc Nephrol.* **12(6):**1151-63.

MANNICK, J.B., SCHONHOFF, C., PAPETA, N., GHAFOURIFAR, P., SZIBOR, M., FANG, K., GASTON, B. (2001). S-Nitrosylation of mitochondrial caspases. *J Cell Biol.* **154(6):**1111-6.

MANTOVANI, A, SICA, A, SOZZANI, S, ALLAVENA, P, VECCHI, A, LOCATI, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 25(12): 677-86.

MARAÑÓN, G., MUÑOZ-ESCASSI, B., MANLEY, W., GARCÍA, C., CAYADO, P., SÁNCHEZ DE LA, M. M., OLÁBARRI, B., LEÓN, R., ELENA, V. (2008). The effect of methyl sulphonyl methane supplementation on biomarkers of oxidative stress in sport horses following jumping exercise. Acta Veterinaria Scandinavica. 50: 45.

MARTİNEZ, F., SICA, A., MANTOVANI, A., LOCATI, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.*13:453-61.

MARTINEZ, F.O., GORDON, S., LOCATI, M., MANTOVANI, A. (2006). Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol*. **177:**7303–7311.

MATSUMOTO, N., MANABE, H., OCHIAI, J., FUJITA, N., TAKAGI, T., UEMURA, M., NAITO, Y., YOSHIDA, N., OKA, S., YOSHIKAWA, T. (2003). An AT1-receptor antagonist and an angiotensin-converting enzyme inhibitor protect against hypoxia-induced apoptosis in human aortic endothelial cells through upregulation of endothelial cell nitric oxide synthase activity. *Shock.* **19(6):**547-52.

MAZIERES, B., LOYAU, G., MENKES, C.J. (1992). Chondroitin sulfate in the treatment of gonarthrosis and coxarthrosis. 5-months result of a multicenter double-blind controlled prospective study using placebo. *Rev Rhum Mal Osteoartic*. **59:**466-472.

MCALINDON, T.E, LAVALLEY, M.P., GULIN, J.P., FELSON, D.T. (2000). Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis: a systematic quality assessment and meta-analysis. *JAMA*. **283(11):**1469-75.

MCCABE, D., O'DWYER, P., SICKLE-SANTANELLO, B. (1986). Polar solvents in the chemoprevention of dimethylbenzanthracene-induced rat mammary cancer. *Arch Surg*. **121:** 1455-1459.

MEDZHITOV, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* **454(7203):**428-35.

MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P., JANEWAY, C.A. JR. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* **388(6640):**394-7.

MENINGER, C.J., KELLY, K.A., LI, H., HAYNES, T.E., WU, G. (2000). Glucosamine inhibits inducible nitric oxide synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* **279(1):**234-9.

MONCADA, S. (1993). The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. **28:**97-9.

MONCADA, S. (1999).Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med*. **92(4):**164-9.

MONCADA, S., HIGGS, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* **329(27):**2002-12.

MONCADA, S., PALMER, R.M., HIGGS, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* **43(2):**109-42.

MORREALE, P., MANOPULO, R., GALATI, M., BOCCANERA, L., SAPONATI, G., BOCCHI, L.(1996). Comparison of the antiinflammatory efficacy of chondroitin sulfate and diclofenac sodium in patients with knee osteoarthritis. *J Rheumatol.* **23(8):**1385-91.

MORRISON, L.M. (1969). Response of ischemic heart disease to chondroitin sulfate-A. *J Am Geriatr Soc.***17(10):**913-23.

MORRISON, L.M., BRANWOOD, A.W., ERSHOFF, B.H., MURATA, K., QUILLIGAN, J.J.J.R., SCHJEIDE, O.A., PATEK, P., BERNICK, S., FREEMAN, L., DUNN, O.J., RUCKER, P. (1969). The prevention of coronary arteriosclerotic heart disease with chondroitin sulfate A: preliminary report. *Exp Med Surg*. **27(3):**278-89.

MORRISON, L.M., ENRICK, N. (1973). Coronary heart disease: reduction of death rate by chondroitin sulfate A. *Angiology.* **24(5):**269-87.

MORRISON, M. (1977). Therapeutic applications of chondroitin-4-sulfate, appraisal of biological properties. *Folia Angiol*. **25:**225-232.

MORTON, J.I. and SIEGEL, B.V. (1986). Effects of Oral Dimethylsufoxide (DMSO) and Dimethylsulfone (MSM) on Murine Autoimmune Lymphoproliferative Disease. Proc. Of the Soc. for Exper. Bio. and Med. 183: 227-230.

MORTON, J.I. AND SIEGEL, B.V. (1986). Effects of Oral Dimethylsufoxide (DMSO) and Dimethylsulfone (MSM) on Murine Autoimmune Lymphoproliferative Disease. Proc. Of the Soc. for Exper. Bio. and Med. 183:227-230.

MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65(1-2):**55-63.

MOSSER DM. (2003). The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*. 73(2):209-12.

MOSSER, D.M., EDWARDS, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* **8:**958 –969.

MURATA, K. (1962). Infra-red spectroscopic evidence of chondroitin polysulphate and its relation to anticoagulant activity. *Nature.* **193:**578-9.

MUROI, M., MUROI, Y., YAMAMOTO, K., SUZUKI, T. (1993) Influence of 3' half-site sequence of NF-kappa B motifs on the binding of lipopolysaccharide-activatable macrophage NF-kappa B proteins. *J Biol Chem.* **268(26):**19534-9.

MUROI, M., SUZUKI, T. (1993). Role of protein kinase A in LPS-induced activation of NF-kappa B proteins of a mouse macrophage-like cell line, J774. *Cell Signal.* **5(3):**289-98.

NAGAI, Y., AKASHI, S., NAGAFUKU, M., OGATA, M., IWAKURA, Y., AKIRA, S., KITAMURA, T., KOSUGI, A., KIMOTO, M., MIYAKE, K. (2002). Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol*. **3(7):**667-72.

NAIR, M.G., GALLAGHER, I.J., TAYLOR, M.D., LOKE, P., COULSON, P.S., WILSON, R.A., MAIZELS, R.M., ALLEN, J.E. (2005). Chitinase and Fizz family members are a generalized feature of nematode infection with selective upregulation of Ym1 and Fizz1 by antigen-presenting cells. *Infect Immun*. **73:**385–394.

NATHAN, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6(12):**3051-64.

NATHAN, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature* **420:**846–852.

NATHAN, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Rev. Immunol*. **6:**173–182.

NEISH, A.S., READ, M.A., THANOS, D., PINE, R., MANIATIS, T., COLLINS, T. (1995). Endothelial interferon regulatory factor 1 cooperates with NF-kB as a transcriptional activator of vascular cell adhesion molecule 1. *Mol. Cell. Biol.* **15:**2558–2569.

NGUYEN, T., BRUNSON, D., CRESPI, C.L., PENMAN, B.W., WISHNOK, J.S., TANNENBAUM, S.R. (1992). DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89(7):**3030-4.

NICHOLSON, D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **6(11):**1028-42.

O'DWYER, P.J., MCCABE, D.P., SICKLE-SANTANELLO, B.J. (1988). Use of polar solvents in chemoprevention of 1,2-dimethylhydrazineinduced colon cancer. *Cancer*. **62:**944- 948.

ODEGAARD, J.I., CHAWLA, A. (2008). Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. **4(11):**619-26.

ODEGAARD, J.I., RICARDO-GONZALEZ, R.R., RED EAGLE, A., VATS, D., MOREL, C.R., GOFORTH, M.H., SUBRAMANIAN, V., MUKUNDAN, L., FERRANTE, A.W., CHAWLA, A. (2008). Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab*. **7(6):**496-507.

OLDREIVE, C., ZHAO, K., PAGANGA, G., HALLIWELL, B., RICE-EVANS, C. (1998). Inhibition of nitrous acid-dependent tyrosine nitration and DNA base deamination by flavonoids and other phenolic compounds. *Chem Res Toxicol.* **11(12):**1574-9.

OLSON, S.Y., GARBÁN, H.J. (2008). Regulation of apoptosis-related genes by nitric oxide in cancer. *Nitric Oxide*. **19(2):**170-6.

ORRENIUS, S., GOGVADZE, V., and ZHIVOTOVSKY, B. (2007). Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. **47:**143–183.

ORRENIUS, S., ZHIVOTOVSKY, B., NICOTERA, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **4(7):**552-65.

ORTH, M.W., PETERS, T.L., HAWKINS, J.N. (2002). Inhibition of articular cartilage degradation by glucosamine-HCl and chondroitin sulphate. *Equine Vet J.* **Suppl(34):**224-9.

PALUDAN, S.R. (2000). Synergistic action of pro-inflammatory agents: cellular and molecular aspects. *J Leukoc Biol.* **67(1):**18-25.

PAVELKÁ, K., GATTEROVÁ, J., OLEJAROVÁ, M., MACHACEK, S., GIACOVELLI, G., ROVATI, L.C. (2002). Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Arch Intern Med.* **162(18):**2113-23.

PEARSON, T.W., DAWSON, H.J., LACKEY, H.B. (1981) Natural occurring levels of dimethyl sulfoxide in selected fruits, vegetables, grains, and beverages. *J Agric Food Chem*. **29(5):**1089-91.

PETIT, P.X., GOUBERN, M., DIOLEZ, P., SUSIN, S.A., ZAMZAMI, N., KROEMER, G. (1998). Disruption of the outer mitochondrial membrane as a result of large amplitude swelling: the impact of irreversible permeability transition. *FEBS Lett.* **426(1):**111-6.

PHILIP, M., ROWLEY, D.A., SCHREIBER, H. (2004). Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin Cancer Biol.* **14(6):**433-9.

POBER, J. S. & SESSA, W. C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Rev. Immunol*. **7:**803–815.

POLTORAK, A., SMIRNOVA, I., HE, X., LIU, M.Y., VAN HUFFEL, C., MCNALLY, O., BIRDWELL, D., ALEJOS, E., SILVA, M., DU, X., THOMPSON, P., CHAN, E.K., LEDESMA, J., ROE, B., CLIFTON, S., VOGEL, S.N., BEUTLER, B. (1999). Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis.* **24(3):**340-5.

POULSEN, J.H., CRAMERS, M.K. (1982). Dermatan sulfate in urine reflects the extent of skin affection in psoriasis. *Clin Chim Acta*. **126:**119-126.

PUGIN, J., HEUMANN, I.D., TOMASZ, A., KRAVCHENKO, V.V., AKAMATSU, Y., NISHIJIMA, M., GLAUSER, M.P., TOBIAS, P.S., ULEVITCH, R.J. (1994). CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity*. **1(6):**509-16.

QIU, G.X., WENG, X.S., ZHANG, K., ZHOU, Y.X., LOU, S.Q., WANG, Y.P., LI, W., ZHANG, H., LIU, Y. (2005). A multi-central, randomized, controlled clinical trial of glucosamine hydrochloride/sulfate in the treatment of knee osteoarthritis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* **85(43):**3067-70.

QURESHI, S.T., GROS, P., MALO, D. (1999). The Lps locus: genetic regulation of host responses to bacterial lipopolysaccharide. *Inflamm Res.* **48(12):**613-20.

RADI, R., CASSINA, A., HODARA, R., QUIJANO, C., CASTRO, L. (2002). Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med.* **33(11):**1451-64.

RAES, G., BRYS, L., DAHAL, B.K., BRANDT, J., GROOTEN, J., BROMBACHER, F., VANHAM, G., NOEL, W., BOGAERT, P., BOONEFAES, T., KINDT, A., VAN DEN BERGH, R., LEENEN, P.J., DE BAETSELIER, P., GHASSABEH, G.H. (2005). Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol*. **77:**321–327.

RAES, G., DE BAETSELIER, P., NOEL, W., BESCHIN, A., BROMBACHER, F., HASSANZADEH, G.H.G. (2002). Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J Leukoc Biol*. **71:**597– 602.

RAFI, M.M., YADAV, P.N., ROSSI, A.O. (2007). Glucosamine inhibits LPS-induced COX-2 and iNOS expression in mouse macrophage cells (RAW 264.7) by inhibition of p38-MAP kinase and transcription factor NF-kappaB. *Mol Nutr Food Res.* **2051(5):**587-93.

RAJAPAKSE, N., MENDIS, E., KIM, M.M., KIM, S.K. (2007). Sulfated glucosamine inhibits MMP-2 and MMP-9 expressions in human fibrosarcoma cells. *Bioorg Med Chem.* **15(14):**4891-6.

RANJAN, P., SHRIVASTAVA, P., SINGH, S.M., SODHI, A., HEINTZ, N.H. (2004). Baculovirus P35 inhibits NO-induced apoptosis in activated macrophages by inhibiting cytochrome c release. *J Cell Sci.* **117(Pt 14):**3031-9.

RHEE, S.H., HWANG, D. (2000). Murine TOLL-like receptor 4 confers lipopolysaccharide responsiveness as determined by activation of NF kappa B and expression of the inducible cyclooxygenase. *J Biol Chem.* **275(44):**34035-40.

RICCARDI, C., NICOLETTI, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc.* **1(3):**1458-61.

RICHY, F., BRUYERE, O., ETHGEN, O., CUCHERAT, M., HENROTIN, Y., REGINSTER, J.Y. (2003). Structural and symptomatic efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis: a comprehensive meta-analysis. *Arch Intern Med.* **14;163(13):**1514-22.

RONCA, F., PALMIERI, L., PANICUCCI, P., RONCA, G. (1998). Antiinflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis Cartilage*. **6:**S14-S21.

ROSE, S.E., CHALK, J.B., GALLOWAY, G.J., DODDRELL, D.M. (2000). Detection of dimethyl sulfone in the human brain by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Imaging.* **18:** 95-98.

ROVETTA, G., MONTEFORTE, P., MOLFETTA, G., BALESTRA, V. (2002). Chondroitin sulfate in erosive osteoarthritis of the hands. *Int J Tissue React*. **24:**29-32.

RUNKEL, D.R., CUPP, M.J. (1999). Glucosamine sulfate use in osteoarthritis. *Am J Health Syst Pharm*. **56(3):**267-9.

SAAVEDRA, J.M., BENICKY, J., ZHOU, J. (2006). Mechanisms of the Anti-Ischemic Effect of Angiotensin II AT (1) Receptor Antagonists in the Brain. *Cell Mol Neurobiol.* **26(7-8):**1099-111.

SALVESEN, G.S., ABRAMS, J.M. (2004). Caspase activation: stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene* **23:**2774–2784.

SALVESEN, G.S., DIXIT, V.M. (1999). Caspase activation: the inducedproximity model. *Proc Natl Acad Sci USA*. **96:**10964–10967.

SARIH, M., SOUVANNAVONG, V., ADAM, A. (1993). Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* **191(2):**503-8.

SAVILL, J., DRANSFIELD, I., GREGORY, C., HASLETT, C. (2002). A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol.* **(12):**965-75.

SCHUMANN, R.R., LEONG, S.R., FLAGGS, G.W., GRAY, P.W., WRIGHT, S.D., MATHISON, J.C., TOBIAS, P.S., ULEVITCH, R.J. (1990). Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science.* **249(4975):**1429-31.

SERHAN, C. N., SAVILL, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunol*. **6:**1191–1197.

SERHAN, C.N., SAVILL, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* **6(12):**1191-7.

SETNIKAR, I., PALUMBO, R., CANALI, S., ZANOLO, G. (1993). Pharmacokinetics of glucosamine in man. *Rzneimittelforschung*. **43(10):**1109-13.

SHI, Y. (2002). Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure***. 10(3):**285-8.

SHI, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* **9:**459–470.

SHI, Y. (2004). Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell* **117:**855–858.

SHIMAZU, R., AKASHI, S., OGATA, H., NAGAI, Y., FUKUDOME, K., MIYAKE, K., KIMOTO, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med.* **189(11):**1777-82.

SIMMONS, M.L., MURPHY, S. (1992). Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *J Neurochem*. **59(3):**897-905.

SINGH, S., EVANS, T.W. (1997). Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *Eur Respir J.* **10(3):**699-707.

SMETSERS, T.F., VAN DE WESTERLO, E.M., TEN DAM ,G.B. (2004). Human single-chain antibodies reactive with native chondroitin sulfate detect chondroitin sulfate alterations in melanoma and psoriasis. *J Invest Dermatol*. **122:**707-716.

SNYDER, S.H., BREDT, D.S. (1992). Biological roles of nitric oxide. *Sci Am.* **266(5):**68-71, 74-7.

STAMLER, J.S., TOONE, E.J. (2002). The decomposition of thionitrites.*Curr Opin Chem Biol*.**6(6):**779-85.

STANDIFORD, T.J., STRIETER, R.M., CHENSUE, S.W., WESTWICK, J., KASAHARA, K., KUNKEL, S.L. (1990). IL-4 inhibits the expression of IL-8 from stimulated human monocytes. *J Immunol.* **145:**1435–1439.

STEIN, M., KESHAV, S., HARRIS, N., GORDON, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*. **176:**287–292.

STOUT, R.D., SUTTLES, J. (2004). Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol.* **76(3):**509-13.

STROBER, W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.* Appendix 3:Appendix 3B.

STUBER, K., SAJKO, S., KRISTMANSON, K. (2011). Efficacy of glucosamine, chondroitin, and methylsulfonylmethane for spinal degenerative joint disease and degenerative disc disease: a systematic review. *J Can Chiropr Assoc.* **55(1):**47-55.

SUNDERKÖTTER, C., NIKOLIC, T., DILLON, M.J., VAN ROOIJEN, N., STEHLING, M., DREVETS, D.A., LEENEN, P.J. (2004). Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol.* **172(7):**4410-7.

TAKEUCHI, O., HOSHINO, K., KAWAI, T., SANJO, H., TAKADA, H., OGAWA, T., TAKEDA, K., AKIRA, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* **11(4):**443-51.

TAMIR, S., TANNENBAUM, S.R. (1996). The role of nitric oxide (NO.) in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta.* **1288(2):**F31-6.

TELSER, A., ROBINSON, H.C., DORFMAN, A. (1965). The biosynthesis of chondroitin-sulfate protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **54:**912-919.

THORNBERRY, N.A., BULL, H.G., CALAYCAY, J.R., CHAPMAN, K.T., HOWARD, A.D., KOSTURA, M.J., MILLER, D.K., MOLINEAUX, S.M., WEIDNER, J.R., AUNINS, J. et al. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature.* **356(6372):**768-74.

THORNBERRY, N.A., BULL, H.G., CALAYCAY, J.R., CHAPMAN, K.T., HOWARD, A.D., KOSTURA, M.J. et al. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processingin monocytes. *Nature* **356:**768–774.

THORNBERRY, N.A., LAZEBNIK, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science.* **281(5381):**1312-6.

TOROK, N.J., HIGUCHI, H., BRONK, S., GORES, G.J. (2002). Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome C release by nitrosylating caspase 9. Cancer Res. 62(6):1648-53.

TOWHEED, T.E., MAXWELL, L., ANASTASSIADES, T.P., SHEA, B., HOUPT, J., ROBINSON, V., HOCHBERG, M.C., WELLS, G. (2005). Glucosamine therapy for treating osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev.* **18(2):**CD002946.

UITTERLINDEN, E.J., JAHR, H., KOEVOET, J.L., JENNISKENS, Y.M., BIERMA-ZEINSTRA, S.M., DEGROOT, J., VERHAAR, J.A., WEINANS, H., VAN OSCH, G.J. (2006). Glucosamine decreases expression of anabolic and catabolic genes in human osteoarthritic cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage.* **14(3):**250-7.

UNDERHILL, D.M., OZINSKY, A., SMITH, K.D., ADEREM, A. (1999). Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96(25):**14459-63.

VALVASON, C., MUSACCHIO, E., POZZUOLI, A., RAMONDA, R., ALDEGHERI, R., PUNZI, L. (2008). Influence of glucosamine sulphate on oxidative stress in human osteoarthritic chondrocytes: effects on HO-1, p22(Phox) and iNOS expression. *Rheumatology (Oxford).* **47(1):**31-5.

VARGHESE, S., THEPRUNGSIRIKUL, P., SAHANI, S., HWANG, N., YAREMA, K.J., ELISSEEFF, J.H. (2007). Glucosamine modulates chondrocyte proliferation, matrix synthesis, and gene expression. *Osteoarthritis Cartilage*. **15(1):**59-68.

VELASCO, M., DÍAZ-GUERRA, M.J., DÍAZ-ACHIRICA, P., ANDREU, D., RIVAS, L., BOSCÁ, L. (1997). Macrophage triggering with cecropin A and melittin-derived peptides induces type II nitric oxide synthase expression. *J Immunol.* **158(9):**4437-43.

VERGES, J., MONTELL, E., HERRERO, M. (2005). Clinical and histopathological improvement of psoriasis with oral chondroitin sulfate: a serendipitous finding. *Dermatol Online J*. **11:**31.

VOLL, R.E., HERRMANN, M., ROTH, E.A., STACH, C., KALDEN, J.R., GIRKONTAITE, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*. **390:**350–351.

VON KNETHEN, A., ABTS, H., KUBE, D., DIEHL, V., TESCH, H. (1997). Expression of p56lck in B-cell neoplasias. *Leuk Lymphoma.* **26(5-6):**551-62.

WANG, C.Y., MAYO, M.W., KORNELUK, R.G., GOEDDEL, D.V., BALDWIN, A.S. J.R. (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science.* **281(5383):**1680-3.

WANG, Z., LIANG, R., HUANG, G.S., PIAO, Y., ZHANG, Y.Q., WANG, A.Q., DONG, B.X., FENG, J.L., YANG, G.R., GUO, Y. (2006). Glucosamine sulfate-induced apoptosis in chronic myelogenous leukemia K562 cells is associated with translocation of cathepsin D and downregulation of Bcl-xL. *Apoptosis.* **11(10):**1851-60.

WEINSTEIN, S.L., SANGHERA, J.S., LEMKE, K., DEFRANCO, A.L., PELECH, S.L. (1992). Bacterial lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in macrophages. *J Biol Chem.* **267(21):**14955-62.

WRIGHT, S.D., RAMOS, R.A., TOBIAS, P.S., ULEVITCH, R.J., MATHISON, J.C. (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* **249(4975):**1431-3.

WU, Y.L., KOU, Y.R., OU, H.L., CHIEN, H.Y., CHUANG, K.H., LIU, H.H., LEE, T.S., TSAI, C.Y., LU, M.L. (2010). Glucosamine regulation of LPS-mediated inflammation in human bronchial epithelial cells. *Eur J Pharmacol.* **635(1-3):**219-26.

XU, C.X., JIN, H., CHUNG, Y.S., SHIN, J.Y., WOO, M.A., LEE, K.H., PALMOS, G.N., CHOI, B.D., CHO, M.H. (2008). Chondroitin sulfate extracted from the Styela clava tunic suppresses TNF-

alpha-induced expression of inflammatory factors, VCAM-1 and iNOS by blocking Akt/NF-kappaB signal in JB6 cells. *Cancer Lett.* **264(1):**93-100.

YANG, J., LIU, X., BHALLA, K., KIM, C.N., IBRADO, A.M., CAI, J., PENG, T.I., JONES, D.P., WANG, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* **275(5303):**1129-32.

YANG, R.B., MARK, M.R., GRAY, A., HUANG, A., XIE, M.H., ZHANG, M., GODDARD, A., WOOD, W.I., GURNEY, A.L., GODOWSKI, P.J. (1998). Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature.* **395(6699):**284-8.

YANG YM, LIU GT. (2004). Damaging effect of cigarette smoke extract on primary cultured human umbilical vein endothelial cells and its mechanism. *Biomed Environ Sci.* **17(2)** :121-34.

YIGONG, S. (2004). Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view *Protein Science* . **13:**1979–1987.

YUE, X.L., LEHRI, S., LI, P., BARBIER-CHASSEFIÈRE, V., PETIT, E., HUANG, Q.F., ALBANESE, P., BARRITAULT, D., CARUELLE, J.P., PAPY-GARCIA, D., MORIN, C. (2009). Insights on a new path of pre-mitochondrial apoptosis regulation by a glycosaminoglycan mimetic. *Cell Death Differ*. **16(5):**770-81.

ZECH, B, WILM M, VAN ELDIK R, BRÜNE B. 1999Mass spectrometric analysis of nitric oxide-modified caspase-3. J Biol Chem 274(30):20931-6.

ZECH, B., KÖHL, R., VON KNETHEN, A., BRUNE, B. (2003). Nitric oxide donors inhibit formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome and activation of caspases. *Biochem J.* **371(Pt 3):**1055-64.

ZHANG, L, LIU, W.S., HAN, B.Q., PENG, Y.F., WANG, D.F. (2006). Antitumor activities of D-glucosamine and its derivatives. *J Zhejiang Univ Sci B.* 7**(8):**608-14.

ZHANG, L., LIU, W.S., HAN, B.Q., PENG, Y.F., WANG, D.F. (2006). Antitumor activities of D-glucosamine and its derivatives. *J Zhejiang Univ Sci B.* **7(8):**608-14.

ZIMMERMANN, D.R., DOURS-ZIMMERMANN, M.T., SCHUBERT, M., BRUCKNER-TUDERMAN, L. (1994).Versican is expressed in the proliferating zone in the epidermis and in association with the elastic network of the dermis. *J Cell Biol*. **124:**817-825.

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Arzu Zeynep Karabay
Doğum yeri ve tarihi : Konya, 29.12.1979
İletişim Adresi : Emek 2164. Cad. Çankaya/ Ankara
Telefonu :
E-mail : zeynepkarabay@yahoo.com

II- Eğitimi

2005 – 2011 : Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora

2002 – 2005 : Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans

1997- 2001 : Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

1990 – 1997 : Meram Anadolu Lisesi

Yabancı dili : İngilizce

III-Ünvanları

2004 : Bilim Uzmanı

2001 : Eczacı

IV-Mesleki Deneyimi

2002- Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi

V- Üye Olduğu Kuruluşlar

Türk Biyokimya Derneği

VI- Bilimsel Çalışmaları

SCI, SCI-Expanded, SSCI ve AHCI kapsamındaki dergilerdeki yayınlar:

Gurkan AS, **Karabay A**, Buyukbingol Z, Adejare A, Buyukbingol E. Syntheses of novel indole lipoic acid derivatives and their antioxidant effects on lipid peroxidation.Arch Pharm (Weinheim). 2005 Mar;338(2-3):67-73.

Gurkan AS, **Karabay AZ**, Buyukbingol Z, Buyukbingol E. Synthesis and effects of some novel tetrahydronaphthalene derivatives on proliferation and nitric oxide production in lipopolysaccharide activated Raw 264.7 macrophages. Eur J Med Chem. 2011 Feb;46(2):468-79. Epub 2010 Nov 26.

Kongrelerde sunulan ve SCI, SCI-Expanded, SSCI ve AHCI kapsamındaki dergi özel sayılarında veya aynı kapsamdaki kongre kitaplarında özeti yayınlanan bildiriler:

Karabay, A.Z, Ozkan, T, Koc, A, Karadag, A., Altinok, B., Buyukbingol, Z., Sunguroglu, A. Effect of wnt3a or lithium chloride preconditioning on nitric oxide production in RAW264.7 macrophages and K562 leukemic cell line 35th Congress of

the Federation-of-European-Biochemical-Societies, June 26-July1, 2010, Gothenburg, Sweeden. The FEBS Journal. 277**:**147-148.

Koc, A., Ozkan, T., **Karabay, A.Z.,** Sunguroğlu, A., Aktan, F. Effect of L-Carnitine on NF-kB Activity in lipopolysaccharide stimulated RAW264.7 macrophage cell line. 35th Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies, June 26-July 1, 2010, Gothenburg, Sweeden. The FEBS Journal. 277:146

Karabay, A.Z., Ozkan, T., Koc, A., Sunguroglu, A., Buyukbingol, Z. Effect of methylsulfonylmethane on LPS-IFN-gamma induced RAW 264.7 macrophage apoptosis. 35th Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies**,** June 26-July1, 2010, Gothenburg, SWEDEN. The FEBS Journal. 277:57-57.

Ozkan, T., Karadag, A., Altinok, B., Karadag, A., **Karabay, A. Z.,** Koc, A., Bozkurt, S., Aydos S., Sunguroglu, A. NF-kappaB activation and complex control of NOS2 gene promoter in K562 imatinib mesylate resistant CML cell line. 35th Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies**,** June 26-July1, 2010, Gothenburg, SWEDEN. The FEBS Journal. 277**:**147.

Karabay, A.Z., Akinci, A., Ozkan, T., Sunguroglu, A., Aktan, F., Buyukbingol, Z. Effect of methylsulfonylmethane on proliferation and nitric oxide production in LPS activated RAW 264.7 cells. 34th Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies, July 4 - 9, 2009*,* Prague, CZECH REPUBLIC. The FEBS Journal. 276:316.

Ozkan, T., Bakar, F., **Karabay, A.Z.,** Akinci, A., Altinok, B., Karadag, A., Aydos, S., Sunguroglu, A. Wheatgrass extract effects lipid peroxidation levels in human promyelocytic leukemia cell line HL-60. 34th Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies, July 4-9, 2009*,* Prague, CZECH REPUBLIC. The FEBS Journal. 276:334.

Akinci, A., **Karabay, A.Z.,** Ozkan, T., Sunguroglu, A., Aktan, F. The effect of LPS incubation periods on nitric oxide levels in RAW 264.7 macrophage cell line. 34th Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies, July 4 - 9, 2009, Prague, CZECH REPUBLIC. The FEBS Journal. 276:297.

Karabay, A.Z., Ozkan T , Koc, A., Buyukbingol, Z, Sunguroglu, A. Effects of MSM (methylsulfonylmethane) on SNP (sodium nitroprusside) and H2O2 (hydrogen peroxide) induced RAW 264.7 macrophages. International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Geneva(CICG) 16-20 August 2009.

Aktan, F., Koc, A., **Karabay, A.Z.** Effects of L-carnitine in SNP induced RAW 264.7 macrophages. Human Proteome World Congress Sydney. 19-23 September 2010.

Ozkan, T., **Karabay, A.Z.,** Koc, A., Karadag, A., Aydos, S., Calıskan, E., Oztürk, G., Ilgaz, S.N., Yükselen, I., Sunguroglu, A. Wheatgrass extract increases proliferation of RAW 264.7 macrophages induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) or lipopolysaccharide (LPS). International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Geneva (CICG) 16-20 August 2009.

Verdiği Seminerler:

Apoptozun moleküler regülasyonu ve diyabet patogenezindeki rolü (Ankara Ünv. Eczacılık Fakültesi Biyokimya A.B.D.)

HDL modifikasyonunun biyolojik ve fizyopatolojik sonuçları ve aterosklerozdaki rolü (Ankara Ünv. Eczacılık Fakültesi Biyokimya A.B.D.).