

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HUVEC HÜCRE HATLARINDA ETANERSEPTİN  
HÜCRE ÇOĞALMASI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

**Arda KEBAPCI**

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Biyoloji Programı için Öngördüğü  
BİLİM UZMANLIĞI  
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ  
2018

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HUVEC HÜCRE HATLARINDA ETANERSEPT' İN  
HÜCRE ÇOĞALMASI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

**Arda KEBAPCI**

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Biyoloji Programı için Öngördüğü  
BİLİM UZMANLIĞI  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Emel ERGÜL

Bu çalışma, Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje no: 2017/94

KOCAELİ  
2018

## TEZ ONAYI

### SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

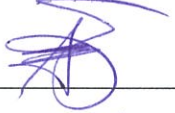


Tez Adı: HUVEC HÜCRE HATLARINDA ETANERSEPTİN  
HÜCRE ÇOĞALMASI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Tez yazarı: Arda KEBAPCI

Tez savunma tarihi:

Tez Danışmanı: Doc. Dr. Emel ERGÜL

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında BİLİM  
UZMANLIĞI TEZİ olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN	Prof. Dr. Ali Sazcı	
ÜYE(DANIŞMAN)	Doc. Dr. Emel Ergül	
ÜYE	Doc. Dr. Sema Sırma Eknekeci	
ÜYE		
ÜYE		

### Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.... /01 /2018

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### **Amaç:**

Tümör nekroz faktörü (TNF) birçok hücre tipi tarafından salgılanan bir sitokindir. Son yıllarda, anti- TNF ilaçlar, TNF- $\alpha$ 'nın biyolojik etkilerini antagonize ederek romatizmal hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Etanersept, TNF inhibitörü olarak rol oynayarak Tümör nekroz faktör (TNF) ile birleşerek, otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Bu çalışmada HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) hücre hatlarında, etanerseptin, doza ve zamana bağlı olarak hücre çoğalması ve olası hücre malignitesi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

### **Yöntem:**

Çalışmada, 24 ve 48 saatlik HUVEC hücre indeksi üzerine etkileri xCELLigence sistemiyle, etanersept için etken dozlar belirlenmiştir. Etanerseptin FGF1, MYC 204; NFKB1, VEGF, CDK4 genlerinin ekspresyonu üzerindeki etkisi kantitatif PCR ile analiz edilmiştir.

### **Bulgular:**

Bu tez çalışmasında etanerseptin HUVEC hücre hattı üzerine etkileri araştırılmıştır. Etanerseptin belirlenen genlerinin ekspresyonu üzerinde etkisi analiz edilmiştir. Elde edilen bulgularda; farklı genlerde, farklı zaman ve dozlardaki ekspresyon seviyelerindeki artışlar dikkati çekmiş ve bu artışların, tablolarla ve şekillerle detaylı analizi sağlanmıştır.

### **Sonuç:**

Bu çalışmada; anjiogenezi uyaran en önemli faktörler olan FGF ve VEGF ile hücre çoğalması ve büyümesi üzerine etkili olan CDK4, NF-kB ve MYC gen ekspresyon seviyelerinde etanersept dozuna ve zamana bağlı olarak artış olduğu gösterilmiştir. Sonuçlarımız anti-TNF etkili etanerseptin farklı dozlarda ve zaman dilimlerinde; hücre çoğalmasını indükleyebileceğini ve uzun süreli kullanımına bağlı tümöral yapılar ve malignite oluşumuna sebebiyet verebileceğini düşündürmektedir. HUVEC hücrelerinde Etanerseptin etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada elde edilen veriler öncü veriler olarak değerlendirilerek, sonraki araştırmaların planlanmasına zemin hazırlanmaktadır.

**Anahtar Kelimeler :** Etanersept, TNF- $\alpha$ , anti-TNF, RA, hücre çoğalması

## ABSTRACT

### **Aim:**

Tumor necrosis factor (TNF), which is secreted by many cell types is a proinflammatory cytokine. In recent years, anti-TNF drugs have begun to be used in the treatment of rheumatic diseases providing with antagonizing the biological effects of TNF- $\alpha$ . Etanercept is a medicine that treats autoimmune diseases by acting as a TNF inhibitor and combining with TNF. In this study, it was aimed to investigate effects of etanercept on proliferation and potential malignency of cells depending on dose and time on HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) cell lines.

### **Methods:**

In the study, etanercept determinant doses were identified in order to study its' effect on 24 and 48 hours HUVEC cell index using with xCELLigence system. The effect of Etanercept on expression levels of FGF1, MYC 204; NFKB1, VEGF, CDK4 genes were evaluated by quantitative PCR.

### **Results:**

In this study, effects of etanercept on HUVEC cell lines were investigated. The effect of etanercept on expression of genes was analyzed. In the results, it was remarkable that there were increases in different genes, times and doses and the detailed results regarding the increases were provided with tables and figures.

### **Conclusion:**

In the study, it was found that there were dose and time dependent increases in expression levels of CDK4, NF- $\kappa$ B and MYC genes, which are effective on FGF and VEGF, the most important factors stimulating angiogenesis, and cell proliferation and growth. Results shows that etanercept, which has anti-TNF effect, may induce cell proliferation and may lead to formations of tumors and malignancy due to prolonged use. The data obtained from this study, in which the effects of etanerceptin were investigated, are evaluated as a pioneer results and the groundwork for the planning future researches are preparing.

**Key words :** Etanercept, TNF- $\alpha$ , anti-TNF, RA, cell proliferation

## İTHAF

Annem'e ithaf ediyorum...



## TEŞEKKÜR SAYFASI

Lisans üstü eğitimimin başlamasında büyük desteğini gördüğüm ve devamında hep yanımda olan, bilgilerini benimle paylaşan, fikir ve tecrübelerinden her zaman yararlandığım, bu alanı farklı bir bakış açısıyla görmemi sağlayan saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Emel Ergül'e,

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi, deneyim ve tecrübelerini benimle paylaşan ve sürekli destek veren saygıdeğer hocam Doç. Dr. Sema Sırma Ekmekçi'ye,

Tez çalışmam sürecinde deneyimlerini benimle paylaşan ve sürekli destek verip motivasyonumu arttıran saygıdeğer hocam Doç. Dr. Neslihan Abacı'ya,

Tezimin teknik ve deneysel kısımlarında yardımlarını esirgemeyen laboratuvardaki meslektaşlarım ve arkadaşlarım Dr. Aris Çakiris, Dr. Zeliha Emrence, Msc. Melda Sarıman'a;

Tezimin hazırlanma sürecinde her an koşulsuz desteğini benden esirgemeyen kardeşim Dr. Ayda Kebapçı'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam süresince emeği geçen ve adını unutmuş olabileceğim tüm dostlarıma sonsuz teşekkürler.

## TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları kullanılarak verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.



...../ 01/ 2018

Arda KEBAPÇI



## İÇİNDEKİLER

<b>TEZ ONAYI</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>İTHAF</b> .....	<b>vi</b>
<b>TEŞEKKÜR SAYFASI</b> .....	<b>vii</b>
<b>TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xv</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Genel Bilgiler.....	1
1.2. Hücre Çoğalması ve Proliferasyonu .....	1
1.3. Sitokinler.....	2
1.3.1. Proinflamatuvar Etkili Sitokinler .....	3
1.3.1.1. İnterlökin-1 $\beta$ .....	3
1.3.1.2. Tümör Nekrozis Faktör (TNF- $\alpha$ ).....	3
1.3.1.2.1.Hücrede TNF Moleküler Sinyal İletimi.....	4
1.3.1.2.2.Fizyolojik Süreçte TNF- $\alpha$ Etkisi.....	7
1.3.1.2.3.TNF' nin İnflamatuvar Yanıttaki Rölü .....	8
1.4. Anti-TNF Etkili İlaçlar .....	9
1.4.1. Etanersept .....	9
1.4.2. Golimumab (GLM) .....	10
1.4.3. Adalimumab .....	10
1.4.4. İnfliksimab .....	10
1.5. Romatolojik Hastalıklar .....	10
1.5.1. Romatoid Artrit (RA).....	10
1.5.2. Psöratik Artrit (PsA) .....	11
1.5.3. Juvenil Romatoid Artrit.....	11
1.6. Gen Bilgisi .....	12
1.6.1. Nükleer Faktör Kappa-B (NF-kB) .....	12
1.6.2. Vasküler Endotel Büyüme Faktör (VEGF).....	12
1.6.3. MYC Geni.....	13

1.6.4. Fibroblast Büyüme Faktör (FGF).....	13
1.6.5. Siklin Bağımlı Kinaz 4 (CDK-4) .....	14
<b>2. AMAÇ.....</b>	<b>15</b>
<b>3. YÖNTEM .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. Gereç .....</b>	<b>17</b>
3.1.1. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler .....	17
<b>3.2. Uygulanan Yöntem .....</b>	<b>18</b>
3.2.1. HUVEC Hücre Hattı .....	18
3.2.2. HUVEC Hücre Kültürü.....	19
3.2.3. HUVEC Hücre Hatının Uyarılması.....	19
3.2.4. HUVEC Hücrelerinin Toplanması.....	20
3.2.5. Total RNA izolasyonu.....	20
3.2.6. cDNA(Komplementer DNA) Sentezi .....	20
3.2.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) (Real time PCR).....	21
3.2.1. xCELLigence Sistemi (Gerçek zamanlı, hücre indeksi analizi) .....	22
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>25</b>
4.1. Etanersept Konsantrasyonlarının HUVEC Hücre Soyu Üzerindeki Etkisi .....	25
4.2. Etanerseptin Genlerin mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi .....	28
4.2.1. Farklı Konsantrasyonlardaki Etanersept Düzeylerinin FGF mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi .....	28
4.2.2. Farklı Konsantrasyonlardaki Etanersept Düzeylerinin VEGF mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi .....	30
4.2.3. Farklı Konsantrasyonlardaki Etanersept Düzeylerinin CDK 4 mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi .....	32
4.2.4. Farklı Konsantrasyonlardaki Etanersept Düzeylerinin MYC mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi .....	34
4.2.5. Farklı Konsantrasyonlardaki Etanersept Düzeylerinin NF-kB mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi .....	36
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>41</b>
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>47</b>
<b>7. KAYNAKLAR DİZİNİ.....</b>	<b>48</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>56</b>
<b>9. EKLER .....</b>	<b>58</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DNA	: deoksiribonukleik asit
M	: mitoz
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz; SBK
TNF- $\alpha$	: Tümör Nekrotizan Faktör
IL 1	: İnterlökin 1
LT- $\alpha$	: Lenfotoksin- $\alpha$
Kda	: Kilo Dalton
NF-kB	: Nukleer FaKtor Kappa B
TNFR	: TNF reseptörü
FADD	: Fas Assosiyasyon Ölüm Domaini
TRAF-2-	: TNF reseptör assosiyasyon faktör 2
sTNF-R2-	: Soluble TNF reseptör faktör 2
TACE-	: TNF- $\alpha$ Converting Enzim
ASK-1-	: Apoptotik Sinyal Kinaz
JNK- C-	: jun N-Terminal kinazları
LT- $\alpha$	: Lenfotoksin-a
ICAM-1-	: Hücreler Arası Adezyon Molekülü -1
VCAM-1	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1
GLM	: Golimumab
RA	: Romatoid Artrit
PsA	: Psöratik Artrit

HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells

IL-8- : Interlökin 8

MCP-1- : Monocyte Chemoattractant Protein 1

LPS - : Lipopolisakkarit

IP-10- : Induced Protein 10

FGF : Fibroblast Growth Faktör



## ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. Hücrenin yaşamsal döngüsü .....	1
Çizim 1.2. Hücrenin Evrenlenmiş Yaşam Döngüsü.....	2
Çizim 1.3. TNF Sinyal Yolağı.....	5
Çizim 1.4. TNFR1 Yolağı üzerinden NF-kB Aktivasyonu .....	6
Çizim 1.5. TNFR1 yolağında P38- MAPK ve JNK aktivasyonu.....	7
Çizim 1.6. Membran Bağımlı TNF (Mem) ve Çözülebilir (sTNF).....	9
Çizim 1.7. VEGF Döngüsü .....	13
Çizim 3.1 Viacell Hücre Canlılık Analizi .....	20
Çizim 3.2. xCELLigence sistemi.....	22
Çizim 3.3. Hücrelerin elektrik empedansının ölçümünün şematik gösterimi .....	24
Çizim 4.1. RTCA Xcelligence Cihazı Etken Doz Belirleme Çalışması.....	25
Çizim 4.2. Etanersept 1ug/µl Doz Çalışması.....	26
Çizim 4.3. Etanersept 5ug/µl Doz Çalışması.....	26
Çizim 4.4. Etanersept 10ug/µl Doz Çalışması.....	27
Çizim 4.5. Etanersept 50ug/µl Doz Çalışması.....	27
Çizim 4.6. Etanersept 100ug/µl Doz Çalışması.....	28
Çizim 4.7. FGF Gen Ekspresyon Seviyeleri (24 ve 48 saat).....	29
Çizim 4.8. FGF Tm Eğrisi .....	30
Çizim 4.9. VEGF Gen Ekspresyon Seviyeleri (24 Saat).....	31
Çizim 4.10. VEGF Gen Ekspresyon Seviyeleri (48 Saat).....	32
Çizim 4.11. CDK 4 Gen Ekspresyon Seviyeleri (24 Saat).....	33
Çizim 4.12. CDK 4 Gen Ekspresyon Seviyeleri (48 Saat).....	34

Çizim 4.13. MYC Gen Ekspresyon Seviyeleri (24 Saat) .....	35
Çizim 4.14. MYC Gen Ekspresyon Seviyeleri (48 Saat) .....	36
Çizim 4.15. (NF-kB Gen Ekspresyon Seviyeleri) (24 Saat).....	37
Çizim 4.16. (NF-kB Gen Ekspresyon Seviyeleri) (48 Saat).....	38
Çizim 4.17. VEGF, MYC, NF-kB ve CDK4 Tm Eğrileri.....	39
Çizim 4.18. VEGF, MYC, NF-kB, FGF ve CDK4 Amplikasyon Eğrileri .....	40



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Mitoz Bölünme Evreleri .....	1
Çizelge 1.2. JİA tedavisinde kullanılan Anti-TNF ilaçlar ve Etki Mekanizmaları.....	12
Çizelge 3.1. Çalışma Tasarımı ve Kullanılan Uyarıların Miktarları.....	18
Çizelge 3.2. Genlere Özgü Primer Dizileri.....	21







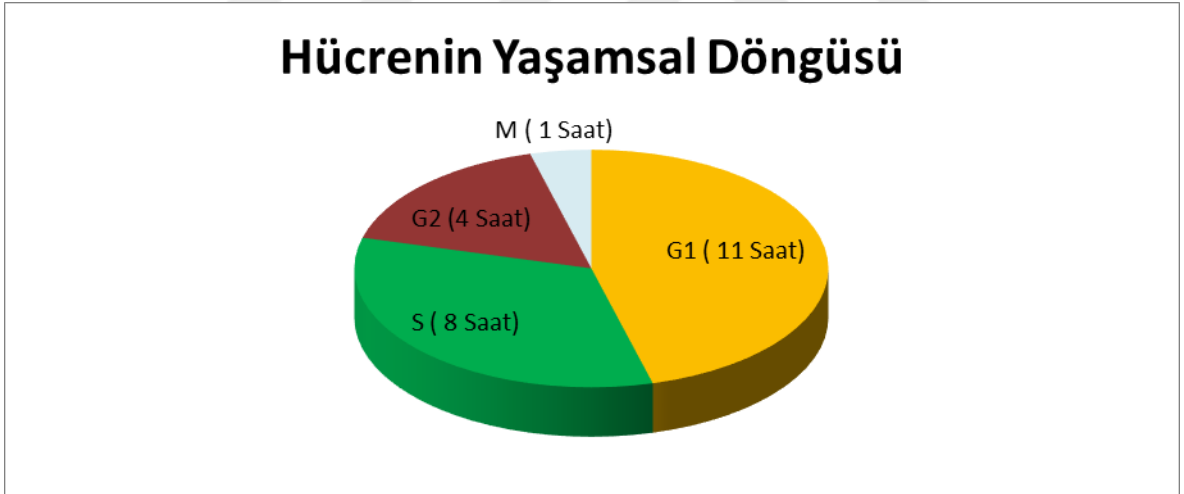
# 1. GİRİŞ

## 1.1. Genel Bilgiler

## 1.2. Hücre Çoğalması ve Proliferasyonu

Hücre çoğalması, hücre döngüsü adı verilen ve G1, S, G2 ve M olmak üzere 4 farklı evreden meydana gelen bir süreçtir. Hücre döngüsü, iki hücrenin oluşması için birbirini izleyen iki mitozun arasında gerçekleşen süreci ifade etmektedir. (Çizim1.1.). Hücre döngüsü bu evrelerinin çeşitli noktalarında kontrol edilmektedir. S evresinde deoksiribonukleik asit (DNA) replikasyon öncesi DNA yapı bütünlüğünü, G2 evresinde ise S evresinde replikasyona uğrayan DNA'nın doğruluğunu, M evresinde ise kromozomların mitotik fazda yeni hücrelere doğru bir şekilde dağılmasını kontrol edilmektedir. Bir hücre, bu süreç içerisinde S evresine girmediği takdirde Go (G Sıfır) denene ve tekrar hücre döngüsü sürecine girmeden bekleme ve dinlenme sürecine girmektedir (Cho ve diğ. 1985, Cooper ve Hausman 2003, Longo 2010) (Çizelge.1.1.).

**Çizim 1.1.** Hücrenin yaşamsal döngüsü

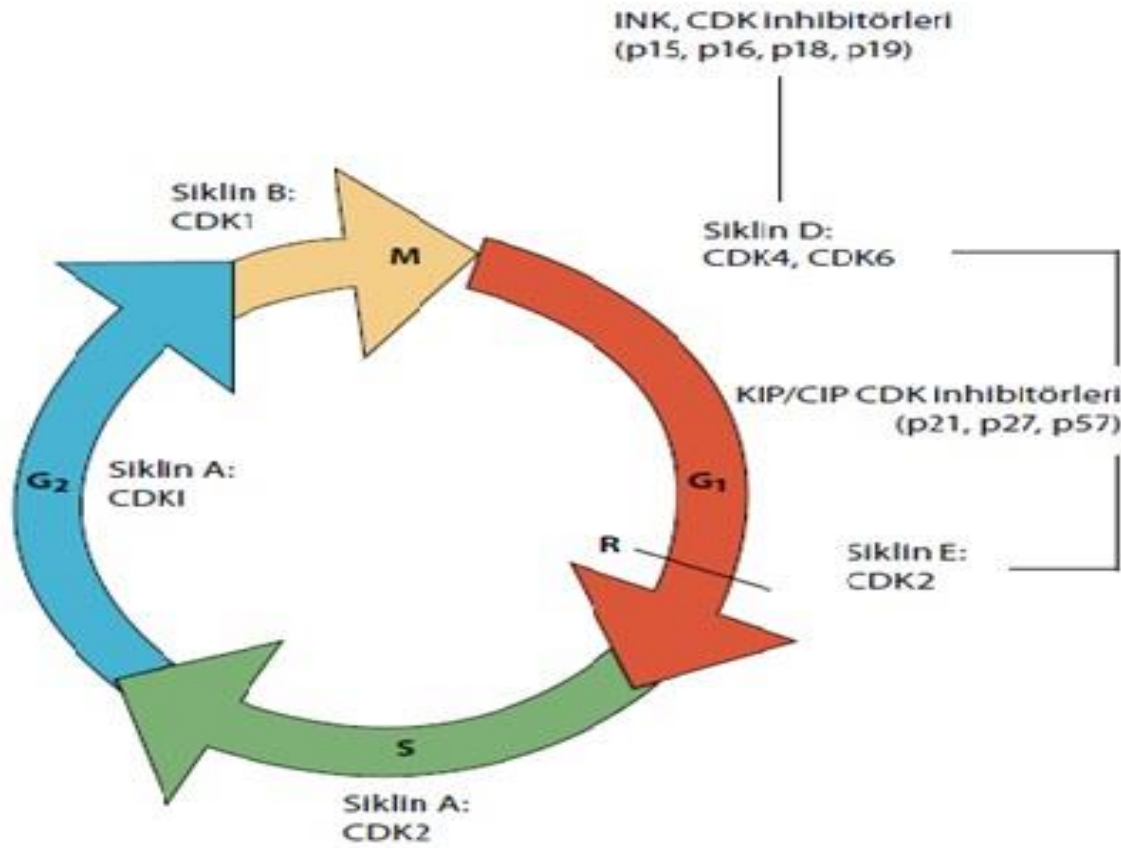


**Çizelge 1.1.** Mitoz Bölünme Evreleri (Cooper ve Hausman 2003)

Mitoz Bölünme Evreleri	
G1 Evresi	Hücrenin hacimce büyüdüğü evredir.
S Evresi	DNA replikasyonu gerçekleşir.
G2 Evresi	Mitoz için gerekli olan hücre büyümesi ve gerekli proteinlerin sentezi gerçekleşir.
M Evresi	Hücre bölünmesi sonrası iki yeni yavru hücre oluşum evresidir.
Go Evresi	Metabolik aktivite vardır. Ancak bölünme olmaz

Hücrenin bir sonraki evreye sistemli bir şekilde geçebilmesi siklin ve sikline bağlı kinazlar tarafından kontrol edilmektedir. Ayrıca sikline bağlı kinaz inhibitörleri de bu süreçte etkin rol oynamaktadır. CDK (siklin bağlı kinaz, SBK)'lar bir sonraki evre için gerekli olan protein fosforilasyon işlemini gerçekleştirerek, hücre döngüsünün devamlılığını sağlamaktadır (Sherr 2000, Senderowicz ve Sausville 2000, Golias 2004, Joyce ve diğ. 2001, Tyagi ve diğ. 2002). (Çizim 1.2.)

**Çizim 1.2.** Hücrenin Evrenmiş Yaşam Döngüsü (Dehay ve Kennedy 2007)



### 1.3. Sitokinler

Sitokinler; hücreler arasında gerçekleşen sinyal iletiminde rol oynayan, glikoprotein ve peptid yapıda moleküllerdir. Molekül ağırlıkları, 20-30Kda (Kilodalton) arasında değişmektedir. Organizmada çok çeşitli hücreler tarafından sentezlenerek, immun ve inflamatuvar olaylarda etkili olan hücrelerin yönlendirilmesinde etkili rol oynarlar. (Openheim ve diğ. 1991, Durum ve Openheim 1993; Bellanti ve diğ. 1994). Lenfokinler lenfositler tarafından, monokinler ise monosit ve makrofajlar tarafından sentezlenmektedir (Durum ve Openheim 1993). TNF (Tümör Nekrozis Faktör), interlökinler ve hematopoetik

büyüme faktörleri, sitokinler olarak adlandırılmaktadır (Duff 1988, Bellanti ve diğ. 1994). Sitokinler; hücre gelişimi, olgunlaşması ve fonksiyonlarını etkileyen, çok düşük konsantrasyonlarda bile aktif olabilen glikoprotein yapıda moleküller olup, spesifik hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak etki göstermektedir (Suzuki ve diğ. 1993). Spesifik bağlanma sonrasında reseptörde konformasyonel değişiklik gerçekleşir. Bu değişiklik mRNA transkripsiyonu ve protein sentezi ile sonuçlanmaktadır (Poole 1993, Suzuki ve diğ. 1993).

### **1.3.1. Proinflamatuvar Etkili Sitokinler**

#### **1.3.1.1. İnterlökin-1 $\beta$**

İnterlökin 1 (IL-1) , primer olarak makrofajlar olmak üzere tüm çekirdekli hücrelerden salgılanır (Davis 2005). IL-1, akut ve kronik inflamasyonun hem lokal hem de sistemik özelliklerinde rol oynar (Bal ve diğ. 2007). Aynı genler tarafından kodlanan iki ayrı moleküler formu vardır; IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ . Aynı reseptöre aynı afinite ile bağlanırlar. Biyolojik aktiviteleri ve güçleri aynıdır. İkisi arasında sadece %26 aminoasit sırası benzerliği vardır. Monositler esas olarak IL-1 $\beta$  yapar. Dolaşımdaki IL-1 aktivitesinin çoğunluğu IL-1 $\beta$ 'ya aittir (Kabasakal 2003). Matür IL-1 $\beta$  ekstrasellüler olarak salgılanır ve IL-1'in proinflamatuvar etkilerinden sorumlu olduğuna inanılır (Davis 2005).

#### **1.3.1.2. Tümör Nekrozis Faktör (TNF- $\alpha$ )**

TNF-  $\alpha$  ilk kez 1975 yılında farelere uyarlanmış sarkomların hemorajik nekrozuna neden olan bir glikoprotein olarak tanımlanmıştır. TNF- $\alpha$  üzerine yapılan araştırmalar sonucunda, pek çok inflamatuvar, enfektif ve malign reaksiyonlarda rol aldığı ortaya konulmuştur (Bradley 2008, Popa ve diğ. 2007). İlerleyen yıllarda anti-TNF- $\alpha$  antikolar ile TNF reseptörler üretilerek pek çok inflamatuvar hastalığın tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Pennica ve diğ. 1985). TNF homeostaz başta olmak üzere, özellikle immün yanıtın oluşumunda rol oynayan önemli bir sitokindir. Birçok otoimmün hastalıkta, inflamasyonun başlamasında kilit rol üstlenmektedir. Gerek plazmada gerekse hücre zarında bulunabilmektedir (Sánchez ve diğ. 2013). Sonrasında yapılan çalışmalar sonucunda, çözünebilen TNF reseptörleri ve anti-TNF- $\alpha$  antikoları üretilerek pek çok inflamatuvar hastalığın tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Sánchez ve diğ. 2013, Bradley 2008).

TNF- $\alpha$  ve LT-a (Lenfotoksin-a), bazı hücre tiplerinde lizise sebep oldukları ve gerek lenfosit gerek makrofajlardan salgılandığı gösterilmiştir. Bu iki faktörü kodlayan genler araştırıldığında aynı süper aileye ait gen aileleri oldukları ve peptid mediyatör ailesinin üyeleri oldukları ortaya konulmuştur (Locksley ve diğ. 2001, Bradley 2008). Bu ailenin üyeleri arasında; LT-a, Fas Ligand ve CD40 ligandı yer almaktadır. TNF-  $\alpha$  doğal ve kazanılmış immünite, hücre proliferasyonu ve apoptozisde rol oynayan önemli proinflamtuvar özelliklere sahip bir sitokindir. Özellikle monosit ve makrofajların yanı sıra, T hücreleri, düz kas hücreleri ve fibroblastlar tarafından salgılanmaktadır (Bradley 2008).

TNF-  $\alpha$  hücre içinde yer alan transmembranöz bir proteindir. 26 kDA ağırlığında olan molekül pro-TNF-  $\alpha$  olarak plazma membranında yerleşiktir. TNF-  $\alpha$  converting enzimi(TACE) tarafından 17 kDa molekül ağırlığındaki çözülebilir formuna dönüşmektedir. Bu iki form trimerik durumda aktiftir ancak biyolojik aktiviteleri birbirinden tamamen bağımsız ve farklıdır (Bradley 2008 ve Popa ve diğ. 2007).

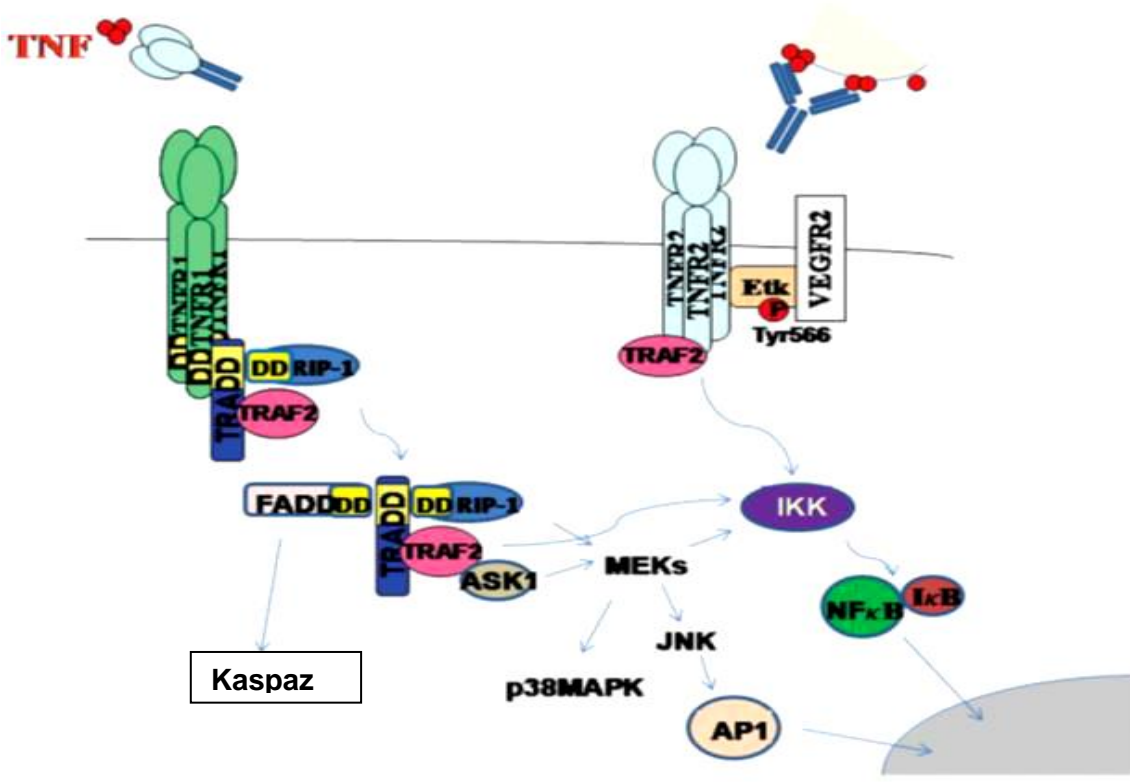
TNF, sağlıklı kişilerde genelde bulunmamaktadır. Enfektif ve inflamtuvar durumlarda serum ve doku seviyelerinde artış gözlenmektedir (Bradley 2008). Özellikle monosit ve makrofajlardan salgılandığı bilinen TNF-  $\alpha$  inflamatuvar hastalık durumlarında mast hücresi, T hücreler, B hücreleri, düz ve kalp kas hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastlar, nötrofiller ve osteoklastlar gibi hücrelerden TNF- $\alpha$  salgılayabilen hücreler bulunmaktadır (Bradley 2008).

TNF-  $\alpha$  sinyal iletimindeki en önemli faktörlerden biri NF-kB (Nükleer Faktor Kappa B) olarak adlandırılan transkripsiyon faktörüdür (Bouwmeester ve diğ. 2004).

#### 1.3.1.2.1. Hücrede TNF Moleküler Sinyal İletimi

TNF sinyal iletimi oldukça karmaşık bir yoldur. Bu karmaşık süreçte NF-kB transkripsiyon faktörü kritik bir rol oynamakla birlikte, bu yolağı kontrol eden 300'e yakın moleküler bağlantı mevcuttur (Bradley 2008, Bouwmeester ve diğ. 2004) (Çizim 1.3).

Çizim 1.3- TNF Sinyal Yolağı (Bradley 2008)

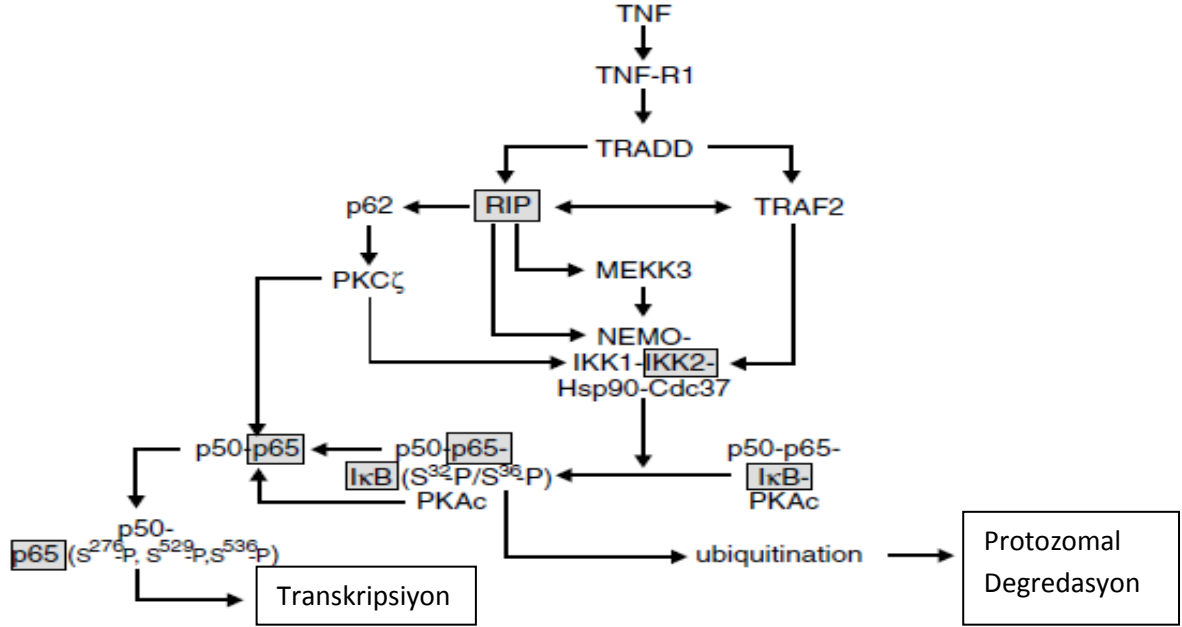


TNF- $\alpha$  biyolojik aktivitesini 2 reseptör üzerinden gerçekleştirmektedir. Bu reseptörler, tip 1 TNF reseptörü (TNFR1) ve tip 2 TNF (TNFR2)' dir. TNFR1; TNFRSF1A, cd120AP55 olarak da bilinir. TNFR2; TNFRSF1B, cd120AP75 olarak da bilinmektedir. TNF aktivasyonu sonucu gerçekleşen proinflamuar yollar, programlanmış hücre ölümü ve doku hasarı ile ilişkili sinyal iletiminde çoğunlukla TNFR1 görev almaktadır. TNFR1, eritrositler hariç neredeyse her hücre tipinde bulunmaktadır ve ligandı çözülebilir TNF- $\alpha$  dır. TNFR2 hematopoetik hücrelerde eksprese olmaktadır. Doku tamiri ve anjiogenezden sorumludur (Bradley 2008). TNF reseptörlerinin ekspresyon seviyeleri, hücre tipine, doku tipine, hastalık ve normal duruma göre farklılık göstermektedir. TNF reseptörleri, hücre membranında bulunmakla birlikte TACE enzimi tarafından çözülmüş şekliyle de bulunabilmektedir (Bradley 2008, Tracey ve diğ. 2008).

TNFR1, TNFR ile ilişkisi olan domaini bağlantılı ölüm domaini (TRADD) proteini ile gerçekleşir. Bu molekülün bağlanması sonucu iki farklı süreç uyarılabilir. Bunlardan ilki ya Fasla Bağlantılı Ölüm Domaini (FADD) proteini ile apoptozis indüklenebilir ya da TNF reseptör bağlantılı faktör 2 (TRAF-2) yolağı uyarılarak, proinflamutvar yanıt NF- $\kappa$ B aktivasyonunu izleyen bir süreç başlatılır (Bradley 2008, Popa ve diğ. 2007) (Çizim 1.4.).

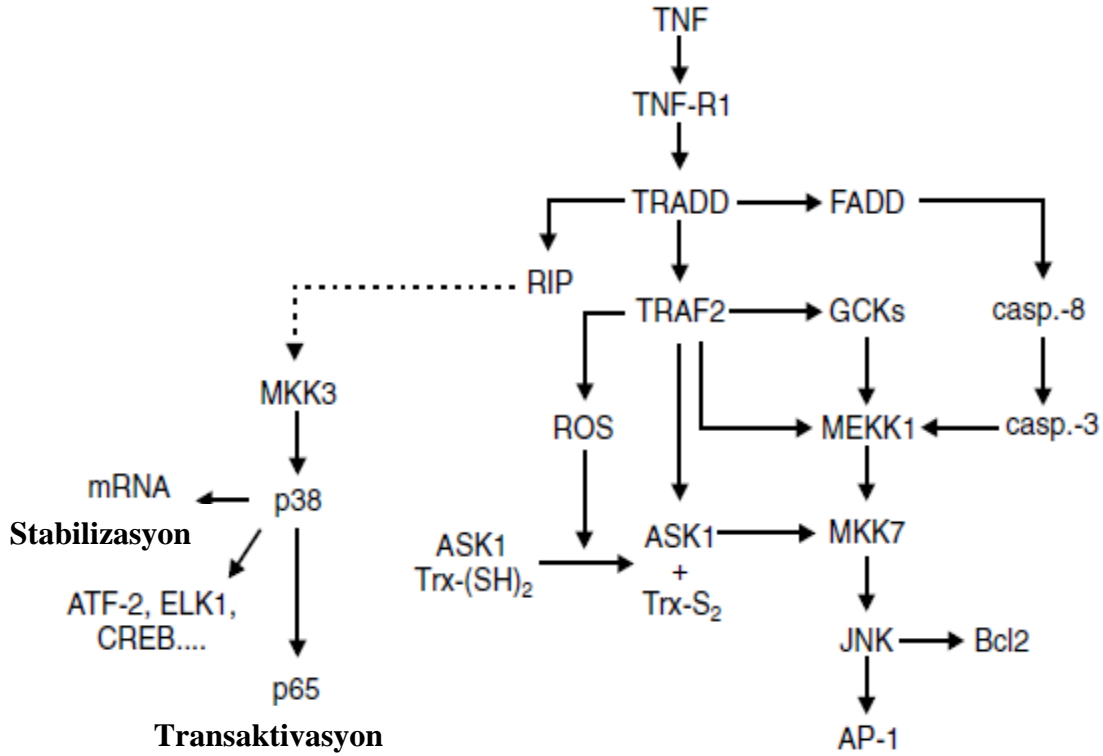
Sinyal iletiminde TRADD iki ek protein üzerinden işlevini gerçekleştirmektedir. Bunlardan ilki reseptörle etkileşen protein-1 (RIP-1) ve TRADD' ye kendi DD'sinden bağlanabilen bir serin/treonin kinaz, bir E3 ubikitin ligaz olan DD içermeyen TNFR bağımlı faktör-2 (TRAF-2) sayesinde kompleks kurulur. Çok kısa süre içinde TRADD-RIP-1-TRAF2 kompleksi TNRF1 üzerinden serbestlenir (Bradley 2008).

**Çizim 1.4.** TNFR1 Yolağı üzerinden NF-kB Aktivasyonu (Wajant ve diğ. 2003)



Sinyal yolağında sonraki süreçler farklı protein kinazların (MAP3Ks) aktivasyonu sonucu gerçekleşmektedir. Sitolitik inhibitör Kb (IκB) proteinleri, NF-kB ailesi transkripsiyon faktörleri ile kompleks oluşturup oluşan cevabı gizlemektedir. IκB'nin yıkılması NF-kB'nin gen ekspresyonunun başlamasına olanak sağlamaktadır (Bradley 2008). TRAdd-RIP1-TRAF2 kompleksi; MAP3K' lar üzerinden apoptotik sinyal kinaz olan (ASK-1)'i, etkilemektedir. Bunun sonucunda MEK-4 ve MEK-6 dahil olmak üzere Mapk2'ler aktive edilmektedir. Aktive olan MEK'ler C-jun N-Terminal kinazları (JNK) ile p38 Mapk'ların fosforilasyonu sağlayıp onları aktive etmektedir. Fosforilasyon sonucu bu proteinin cAMP yanıtı sonrasında gen transkripsiyonu gerçekleşmiş olur. JNK aktivasyonu kaspaz bağımlı veya kaspaz bağımsız olabilmektedir. Bu aktivasyon TRAF2 tarafından regülasyonu sağlanmaktadır (Wajant ve diğ. 2003).

**Çizim 1.5.** - TNRF1 yolağında P38- MAPK ve JNK aktivasyonu (Bradley 2008)



NF- $\kappa$ B ve AP-1 üzerinden hücrenin sağ kalımı veya proinflatuar yanıtın başlamasına dair sinyal iletimi organize edilmektedir. Bununla birlikte TNRF1 hücre ölümü sinyallerini pek çok yolak üzerinden başlatmakla birlikte; bu sinyaller DD proteinin (FADD) TRADD ile bağlanması ve oluşan kompleksin prokaspaz 8 aktivasyonu ile katalitik aktivasyon sonucu aktifleşen kaspaz 8'in aktivasyonu sonucunda pro-kaspaz 3'ün oluşumu ve apoptoz aktivasyonu ile sonuçlanan bir süreci başlatmaktadır (Bradley 2008) (Çizim 1.5).

TNRF1 ve TNRF2 farklı sinyal mekanizmalarını kullanabilme yeteneğine sahiptir. Bu yetenek sinyal mekanizmalarına verdikleri farklı yanıtlarla açıklanabilmektedir. Proinflatuar ve sitotoksik TNF yanıtlarına TNRF1 ligasyonu yeterli olurken, TNFR2 hücre aktivasyonu, göçü ve çoğalması üzerine etki göstermektedir (Bradley 2008).

#### 1.3.1.2.2. Fizyolojik Süreçte TNF- $\alpha$ Etkisi

TNF- $\alpha$  ekspresyonu sağlıklı normal insanların dokularında ve serumlarında gerçekleşmemektedir. Bununla birlikte organizmada oluşan olası inflamatuvar ve enfeksiyon tablosunda, organizmada TNF- $\alpha$  üretimi başlamaktadır (Bouwmeester ve diğ.

2004). TNF-  $\alpha$  özellikle bakteriyel, viral ve paraziter enfeksiyonlara karşı organizmanın savunmasında büyük rol oynamaktadır. Bu immün cevabın oluşmasında TNF-  $\alpha$  ve TNFR1 önemli rol oynamaktadır. TNF- $\alpha$  doğal immün yanıtı başlatırken; TNFR1 T hücre aktivasyonunda etkili bir stimülatör olup aktif T hücreleri tarafında ekspresyonu gerçekleştirmektedir (Bouwmeester ve diğ. 2004). TNF, IL-1, IL-10 ve doku plaziminojen aktivatörlerinin uyarısıyla TNFR2 ekspresyonun arttığı, buna rağmen TNFR1'in bu uyarılarına cevabının aşağı yönde olduğu görülmüştür (Bradley 2008). Bu fark özellikle reseptörlerin promotor bölge farklılığından ortaya çıkmaktadır. TNFR1 5' ucu referans gen özellik göstermektedir.

TNFR2'nin indüklenebilir olmasının altında yatan etken ise; promotor bölgesinde cAMP'ye yanıt verebilen ve AP-1, IRF-1, NF-kB ve GAS dahil bazı transkripsiyonel faktörleri içeren promotor bölgesine sahip olmasından kaynaklanmaktadır. NF-kB ve toll-like reseptörler, bakteriyel patojenlerle mücadelede TNF- $\alpha$  üretiminden sorumludur. Artan TNF- $\alpha$  miktarı sitokin ve kemokin inflamatuvar kaskadı tetiklenmektedir. Bu sayede makrofaj, nötrofil, lenfosit aktivasyonu ve adezyon molekül aktivasyonu gerçekleşmektedir. TNF-  $\alpha$  ayrıca NF-kB' yi aktive ederek GM-CSF'i IL-8 gibi sitokinlerin salınımını artırarak inflamatuvar yanıtın oluşmasına katkıda bulunmaktadır. İnflamatuvar yanıtının etkili olabilmesi için; TNF-  $\alpha$ ' nın doğru zamanda ve doğru yerde yeterli miktarda sentezlenmesi gerekir. TNF-  $\alpha$  üretimi farklı zamanlarda farklı hücre grupları tarafından gerçekleştirilmektedir. Bakteriyel kaynaklı enfektif durumlarda T hücreleri ve LPS uyarımı sonucu ise monosit ve makrofajlardan TNF-  $\alpha$  sentezlenebilmektedir (Simmonds ve diğ. 2008).

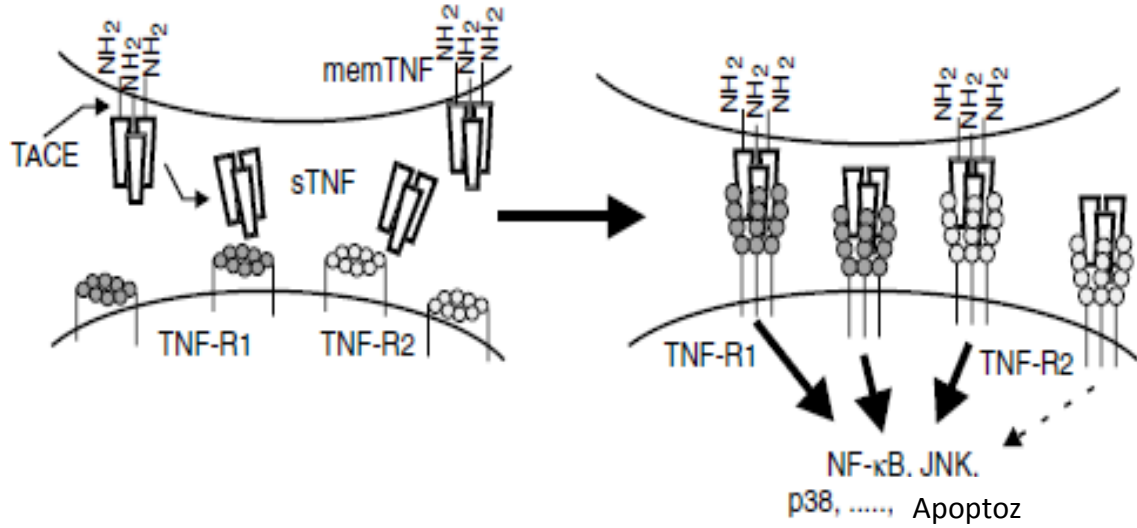
#### 1.3.1.2.3. TNF' nin İnflamatuvar Yanıttaki Rölü

TNF reseptörlerinin pek çok hücrede bulunmakla birlikte, proinflamatuvar etkisi damar endoteli ve endotel lökosit hücreleri arasındaki ilişkiye dayandırılmaktadır. Proinflamatuvar yanıtta TNF' ye cevap olarak endotel hücreleri; lökositler için E-selectin, hücreler arası adezyon molekülü -1 (ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) gibi farklı adezyon molekülleri sentezlerler (Bradley 2008). Bu süreçte salgılanan kemokinler (IL-8; MCP-1 ve IP-10) farklı lökosit popülasyonlarının uyarılmasını ve bölgeye yönlendirilmesinde önemlidir. TNF uyarısının oluşmasıyla birlikte siklooksijenaz 2 ekspresyonu sonucu PGI<sub>2</sub>'nin hücre dışı üretimi artışına bağlı olarak



vazodilatasyon gerçekleştirilir. TNF'nin sağladığı bu etki sayesinde makro molekülerin damar geçirgenliğinin artışı gerçekleştirilmiş olur (Bradley 2008).

**Çizim 1.6-** Membran Bağımlı TNF (Mem) ve Çözülebilir (sTNF) (Wajant ve diğ. 2003)



MemTNF TNRF1 ve TNRF2' ye bağlanmaktadır. sTNF genelde TNFR1'i stimüle etmektedir. TNRF' üzerindeki etkisi sınırlıdır (Wajant ve diğ. 2003) (Çizim 1.6).

#### 1.4. Anti-TNF Etkili İlaçlar

##### 1.4.1. Etanersept

Etanersept; insan TNF reseptörüne karşı üretilmiş IgG' nin Fc parçasında bağlanan dimerik, iki p75 TNF reseptörü içeren rekombinant DNA teknolojisiyle üretilmiş insan füzyon proteinidir (Lovell ve diğ. 2000, Wallis 2008, Tütüncü ve Kavanaugh 2006). Yarılanma ömrü 102 saattir (Cush ve diğ. 2008). Aynı zamanda TNF betayı da baskılama özelliği göstermektedir. TNF- $\alpha$  baskılaması sonucunda inflamatuvar sitokin oluşumunu, lökosit göçünü ve matriksteki metalloproteinlerini baskılamaktadır (Lovell ve diğ. 2000, Horneff ve diğ. 2008). Monoklonal antikorlar TNF-  $\alpha$ ' nın, sTNF-R1 (55 kDa; p55) ve sTNF-R2 (75 kDa; p75)'ye bağlanmasını önlemektedir. Etanersept sadece solubl trimerik sTNF-R2 bağlanmayı önlemektedir. Etanersept, TNF- $\alpha$ 'nın yanı sıra makrofajlar ve T hücrelerinden salgılanan lenfotoksin-  $\alpha$ 'yı (LT-  $\alpha$ ) da bağlamaktadır (Dinarello ve diğ. 2005). Etanersept, TNF trimerinin üç bölgesinden ikisine bağlanarak TNF'nin işlevini bloke ederek proinflamatuvar yanıtın oluşumunu engeller (Mohler ve diğ. 1993).

### **1.4.2. Golimumab (GLM)**

TNF- $\alpha$ , çeşitli immünolojik hastalıkların patogeneğinde etki rol oynayan pro-inflamatuar bir sitokindir. Golimumab, TNF-  $\alpha$  etkisini nötralize eden IgG1 Kappa monoklonal antikordur. Nisan 2009 yılında ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanmıştır. Golimumab 150 kilodaltonluk bir kütleyle sahip antikor molekülüdür. Romatoid Artrit ve Ankilozan Spondilit tedavisinde TNF-  $\alpha$ ' ı bloke etmek için tedaviye girmiştir (Tracey ve diğ. 2008, Helmick ve diğ. 2008, Shealy ve diğ. 2007).

### **1.4.3. Adalimumab**

Adalimumab, monoklonal Anti-TNF antikorudur ve rekombinant insan IgG1 reseptör hücrelerini baskılamaktadır (van de Putte ve diğ. 2003). TNF-  $\alpha$ 'nın solübl ve transmembran formlarına bağlanarak TNF reseptör etkileşimini önlemektedir (Tütüncü ve Kavanaugh 2006). Romatoid Artrit ve Ankilozan Spondilit tedavisinde TNF-  $\alpha$ ' ı bloke etmek için tedaviye girmiştir (Tracey D ve diğ. 2008).

### **1.4.4. İnfliksimab**

Anti TNF- $\alpha$  tedavisinde kullanılan bir diğ er monoklonal antikordur. Plazmada TNF- $\alpha$ ' ya bağlanırken aynı zamanda hücre yüzeyindeki TNF-  $\alpha$ ' ya da bağlanma özelliğ i bulunmaktadır (Saag ve diğ. 2008).

## **1.5. Romatolojik Hastalıklar**

### **1.5.1. Romatoid Artrit (RA)**

Etiyolojisi net olarak bilinmeyen, sistemik bulgularla birlikte özellikle eklem tutulumlarını takip eden süreçleri izleyen sistemik, otoimmün, inflamatuvar ve kronik bir hastalıktır. Bu süreçte, simetrik eklemlerde sinovyal hücre proliferasyonu ve inflamasyonu eşlik etmektedir (Gümüşdiş ve diğ. 1999). RA'da kemik erozyonu görülmektedir (Laan ve diğ. 1992, Güler ve diğ. 2007) ve özellikle proinflamatuvar sitokinler, TNF ligandına ait transmembran proteinlerin ekspresyonunun stimülasyonu sonucu kemik dokuda artmış kemik deformasyonları ve erozyonları görülmektedir (Arasıl ve diğ. 2005). RA patogeneğine bakıldığında; TNF-  $\alpha$ ' nın inflamasyonla yol açtığı bilinmekle birlikte osteoklast aktivitesini de artırdığı ve bu kemik kaybına yol açmaktadır (Ammann ve diğ. 1997).

### 1.5.2. Psöratik Artrit (PsA)

Romatolojik olarak görülebilecek, genelde tüm eklem tutulumlarıyla çeşitlilik gösteren kronik heterojen bir eklem hastalığıdır. Hastalığın tutulum çeşitliliğinden kaynaklı olarak tedavisi farklılık göstermektedir. PsA, omurga, periferik eklem bölgesini tutan ve psöriasizin eşlik ettiği kronik seyirlik inflamatuvar bir artrit olarak tanımlanmaktadır (Menter ve diğ. 2008, Hochberg ve diğ. 2011). Tedavide amaç; semptomları azaltarak, yaşam kalitesini yükseltebilmektir. Bunun için NSAİİ ilaçlar gibi analjezik ilaçlar kullanılmakla birlikte, inflamasyon varlığı devam ettiği süreçte son alternatif olarak TNF inhibitörleri önerilmektedir (Gossec ve diğ. 2015, Coates ve diğ. 2015).

### 1.5.3. Juvenil Romatoid Artrit

Juvenil romatoid artrit, çocukluk çağının en sık rastlanan romatizmal hastalığı olup, pek çok sistemdeki klinik bulgularla birlikte seyreden ve nedeni tam olarak bilinmeyen kronik bir hastalıktır. Hastalığın belirgin bulgularından birisi periferik eklem tutulumudur. Buna bağlı olarak hastanın hareketliliği ve yaşamsal aktivitesi ciddi anlamda kısıtlanmaktadır. Hastalığın ileri evrelerinde ciddi sakatlıklar ve ölümler ortaya çıkmaktadır (Prakken ve diğ. 2011, Makay ve diğ. 2013). Özellikle eklemlerde sinoviyada hiperplazi ve enflamasyonla karakterize, idiyopatik kronik sinovisit oluşumu görülmektedir (Lipnick ve diğ. 1991, Haris 1985). Eklemlerde bu değişikliğin sebebi kontrol altına alınması çok zor olan bir sürecin başlamış olmasıdır. Bu sürecin başlamasına sebep TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 gibi sitokinlerin salgılanmasında artışın olmasıdır (Prakken ve diğ. 2011, Makay ve diğ. 2013). Böyle bir durumda eklem kıkırdağında ve subkondral kemikte ciddi hasarlar oluşabilir. Ayrıca eklem yüzeyleri ve çevresinde oluşan hasarlarla birlikte, tendonlarda oluşabilecek zararlar kalıcı eklem deformitesi oluşturmaktadır. Tanı konulan hastalarda etkin ve hızlı bir tedavi gerçekleştirilmedi (Lipnick ve diğ. 1991, Haris 1985). Juvenil Romatoid Artrit tedavisinde yaygın olarak NSAİİ ilaçlarla birlikte, antiinflamatuvar etki gösterdiği belirlenen metotreksat gibi ilaçlar kullanılmaktadır. Romatoid artritte de olduğu gibi, TNF sitokininin JRA patogenezinde yeri önemlidir. Anti-TNF- $\alpha$  ilaçlar da JRA tedavisinde kullanılan ilaçlardır (Prakken ve diğ. 2011, Gowdie ve Tse 2012, Makay ve diğ. 2013, Kessler ve Becker 2014). Günümüzde JRA'lı hastaların tedavisinde infliximab, etanercept ve adalimumab kullanılmaktadır (Prince ve diğ. 2007, Prakken ve diğ. 2011, Makay ve diğ. 2013, Schmeling ve diğ. 2014) (Çizelge 1.2).

**Çizelge 1.2-** JİA tedavisinde kullanılan Anti-TNF ilaçlar ve Etki Mekanizmaları  
(Prakken ve diğ. 2011, Makay ve diğ. 2013, Guzman ve diğ. 2014, Gowdie ve Tse 2012)

İlaç Adı	Mekanizma
Etanersept	TNF baskılanması; Füzyon proteini. TNF reseptör baskılanması
İnfliksımab	TNF baskılanması; anti-TNF monoklonal kimerik antikor
Adalimumab	TNF baskılanması; anti-TNF monoklonal antikor

## 1.6. Gen Bilgisi

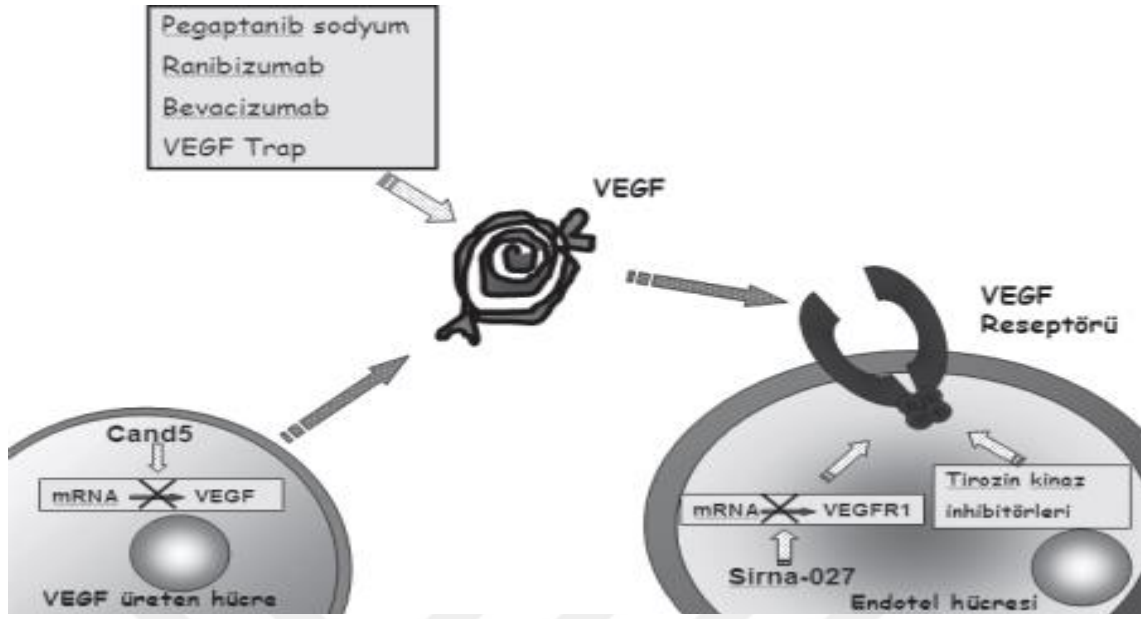
### 1.6.1. Nükleer Faktör Kappa-B (NF-kB)

NF-kB hücre canlılığı, hücre çoğalması ve aktivasyonundan ve inflamtuvar yolaktaki en önemli transkripsiyon faktörlerinden biridir (Harris ve diğ. 2006). NF-kB; B lenfositlerin çekirdeklerinde, 10 baz çiftlik DNA' ya bağlanan bir transkripsiyon faktörü olarak belirlenmiştir (Sen ve Baltimore 1986). NF-kb aktivitesindeki düzensizlikler romatoid artrit, astım, osteoartirit gibi çeşitli inflamtuvar hastalıkların patogeneğinde kilit rol üstelenmektedir. (Chen ve diğ. 1999, Marcu ve diğ. 2010, Roman-Blas, ve Jimenez 2006, Tak ve Firestein 2001). Özellikle infalamatuvar sitokinlerin ekspresyonunun artışında ve düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. NF-kb; TNF- $\alpha$ , interlökin 1 (IL-1) ve lipopolisakkarit gibi pek çok farklı uyaran tarafından aktivasyon sağlanmaktadır (Harris ve diğ. 2006, Baldwin 1996).

### 1.6.2. Vasküler Endotel Büyüme Faktör (VEGF)

VEGF geni 6p21.3 üzerinde yer alan; endotel hücrelerine özgü glikoprotein yapısında heparin bağlayabilen büyüme faktörü olarak tanımlanmaktadır (Vincenti ve diğ. 1996). VEGF geni 45 KDa ağırlığındadır (Senger ve diğ. 1983). VEGF geni üzerinde 7 VEGF üyesi tanımlanmaktadır (Byrne ve diğ. 2005). Bu üyeler genel olarak; hücre adezyonu, anjiogenez, lenfanjiogenez, damar geçirgenliğinin düzenlenmesi, hücre dışında gerçekleşen matriks degradasyonu ve yarar iyileşmesi gibi çeşitli görevleri bulunmaktadır. (Byrne ve diğ. 2005, Kaiser 2006, Bhisitkul 2006) (Çizim 1.7).

**Çizim 1.7-** VEGF Döngüsü(Kaiser 2006)



### 1.6.3. MYC Geni

Myc geni; hücre döngüsünün ilerlemesi, apoptoz, hücre transformasyonu gibi pek çok düzenleyici süreçle rol alan önemli bir transkripsiyon faktörüdür (Finver ve diğ. 1988). Myc insan genomunda 8. Kromozom üzerinde yer almaktadır (Gearhart ve diğ. 2007). Mutasyona uğramış formu bir çok kanserde yer almaktadır. Myc genindeki mutasyonlar, Burkitt lenfoma, serviks kolon, göğüs akciğer ve mide karsinomlarında görülmektedir (Finver ve diğ. 1988, Begley 2013).

### 1.6.4. Fibroblast Büyüme Faktör (FGF)

FGF; 17kDa ile 34 kDa arasında değişen moleküler ağırlığa sahip, 24 üyeli bir aileden oluşmaktadır (Friedewald ve diğ. 1972; Presta ve diğ 2005; Kashiwakura ve diğ 2005) FGF heparan sülfata yüksek afinite gösterir ve FGF reseptör aktivasyonu için heparan sülfata ihtiyaç duymaktadır (Ornitz ve Itoh 2001). FGF embriyonik süreçte hücre proliferasyonu, hücre migrasyonu ve diferansiyasyonu gibi değişik fonksiyonlara sahiptir. FGF ayrıca homostatik faktör olarak da bilinmektedir (Ornitz ve Itoh 2001). Bununla birlikte FGF; yara iyileşmesi, angiogenesis, gelişme, mitozis, bazı hormonal yapıların fonksiyonlarının belirlenmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. (Kharitonov 2005, Ornitz ve Itoh 2001)

#### 1.6.5. Siklin Bağımlı Kinaz 4 (CDK-4)

CDK-4 geni tarafından kodlanan protein; serin/Tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir. 12. Kromozom üzerinde yer almaktadır. Hücre döngüsünün G1 Evresinin ilerlemesi için önemli katalitik alt birim olarak görev almaktadır. Hücre döngüsünde G1-S evresi; D-tipi siklinler ve p16 (CDK inhibitörü) alt birimler tarafından kontrol edilmektedir ve CDK 4 aktivitesinin bu moleküler tarafından kontrol etmekte sınırlandırılmaktadır. (Stepanova ve diğ. 1996, Taules ve diğ. 1998, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1019>).



## 2. AMAÇ

Hücre çoğalması veya hücre döngüsü G1, S, G2 olarak tanımlanan interfaz ve Mitoz (M) olarak tanımlanan iki aşamadan oluşmaktadır. Tümör nekrozu faktörü (TNF) ise birçok hücre tipi tarafından sentezlenen, özellikle proinflamatuvar yanıtta ve pek çok otoimmün hastalığın patogeneğinde rol oynayan etkili bir sitokindir. Özellikle son yıllarda gerçekleştirilen yeni çalışmalarla, yeni tedavi seçenekleri oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu tedavi yöntemlerinden biri de özellikle TNF etkisinin baskılamayı amaçlayan anti-TNF ilaçlar tedavilerde kullanılmaya başlanmasıdır. Anti-TNF ilaçlar, TNF' nin biyolojik etkisini baskılayıp antagonize ederek, özellikle romatizmal hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Ülkemizde bu amaçla kullanılan; *infliksimab*, *etanersept*, *adalimumab*, ve *golimumab* gibi anti-TNF etkili ajanlar kullanılmaktadır. Çalışmamızda bu ajanlardan biri olan Etanersept'in, belirlenen 5 farklı dozda, HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) hücre hattı hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkilerinin araştırılması planlanmıştır. Etanersept; anti-TNF etkili ve TNF ile birleşerek otoimmün hastalıkları tedavi eden bir ilaçtır. Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiş bir füzyon proteini olarak tanımlanmaktadır. Etanersept özellikle, romatoid artrit, juvenil romatoid artrit, Ankilozan spondilit ve Psoriatik Artrit gibi hastalıkların tedavisinde etkin olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, etanerseptinin HUVEC hücre hatlarında, hücre çoğalması üzerine etkilerinin araştırılması xCELLigence sistemi belirlenen 5 farklı dozdaki etanersept; LPS ile uyarılan HUVEC hücre hattına uygulanarak; etanerseptin 24 ve 48 saatlik etkileri araştırılmıştır. Etanersept'in HUVEC hücre hattı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için hücre çoğalması, doku onarımı vb. üzerine etkili olduğu bilinen FGF1, MYC 204, NFKB1, VEGF ve CDK4 olarak 5 farklı gen belirlenmiştir.

Belirlenen bu genlerin, hücre büyümesi, geniş mitojenik ve embriyonik gelişim, morfogenez, doku onarımı ve tümör büyümesi gibi etkileri olduğu bilinmektedir. HUVEC hücre hattı LPS ile uyarılarak, belirlenen 5 farklı etanersept dozunun 24 ve 48 saatlik etkileri incelenmiş, HUVEC hücre hattındaki hücrelerden RNA izolasyonu sonucunda elde edilen mRNA'lar cDNA'ya çevrilmiştir. Elde edilen cDNA'lar ile belirtilen genlere özgü primerlerle kantitatif PZR yöntemiyle genlere ait ekspresyon seviyelerine incelenmiştir.

Bu çalışmada; LPS ile uyarılmış olan hücrelerin belirlenen farklı doz aralıklarında; 24 ve 48 saatlik zaman dilimlerindeki anti-TNF inhibitörü olarak kullanılan etanerseptin HUVEC hücrelerinde, hücre çoğalması, hücre farklılaşması doku onarımı ve tümör büyümesi, kanser oluşumu vb. fonksiyonların gerçekleştirilmesine etkili olan 5 farklı gene ait ekspresyon seviyeleri değerlendirilerek, anti- TNF etkili ajan olarak kullanılan etanerseptin; HUVEC hücre hattı üzerinden elde edilecek gen ekspresyon verileriyle, özellikle etanersept tedavisi gören hastalarda; tedavi süreçlerinde yüksek doza ve uzun süreli kullanıma bağlı oluşabilecek; hücre farklılaşması ve kanser oluşumuna ilişkin süreçlerinin incelenmesi ve bu kapsamda elde edilen çalışma verilerinin ortaya konarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.





### 3. YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

Bu çalışmada, TNF inhibitörü olarak rol oynayan; etanerseptinin huvec hücre hatlarında hücre çoğalması üzerine etkilerinin araştırılması için LPS ile uyarılmış hücrelere, belirlenen 5 farklı dozda etanersept verilerek 24 ve 48 saatlik etkiler araştırılmıştır. Çalışmada özellikle etanerseptin hücre çoğalması üzerin etkilerini araştırmak üzere FGF1, MYC 204, NFKB1, VEGF, CDK4 gen ekspresyonu üzerindeki etkileri araştırmak için aşağıdaki teknik ve yöntemler kullanılmıştır.

Bu amaçla, HUVEC hücre hattı LPS ile uyarılıp; uyarıp MYC 204; NFKB1, VEGF ve CDK4 genlerinin ifadesi mRNA düzeyinde, kantitatif PZR yöntemi kullanılarak aşağıdaki şekilde incelenerek değerlendirildi.

Bu çalışmada HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, ATCC cat no: CRL-1730) kullanıldı.

#### 3.1.1. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Fosfat Tuz Tamponu (PBS): 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 800 mL dH<sub>2</sub>O da çözüldü. Son hacim 1 L olacak şekilde dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı. Hazırlanan tampon çözelti otoklav ile steril edildikten sonra +4 °C’de muhafaza edildi.

RNAse (DNAse free): 10 mg RNAse A (pankreatik), 10 mL, 10 mM Tris (pH 7.5), 15 mM NaCl çözeltüsünde çözüldü. Hazırlanan çözelti 100°C’de 15 dakika sterillendikten sonra oda sıcaklığında soğutularak -20°C’ de muhafaza edildi.

#### Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı ve derin dondurucu	(+4 ve -20°C)
CCD kamera-bilgisayar donanımı	(Mitsubishi-Macintosh)
Çalkalamalı su banyosu	(Memmert)
Çeker ocak	(Kermanlar)
Derin dondurucu	(-80° C Memmert)
Masaüstü mini santrifüj	(Hettich-Eppendorf)

Masaüstü santrifüj +4°C	(Heraeus)
Otoklav	(Kermanlar)
Otomatik pipetler	(Glison- Eppendorf)
Gerçek zamanlı PZR cihazı	(Light-Cycler-480-Roche)
Spektrofotometre	(Nano-Drop)
Gerçek Zamanlı Hücre Analizörü	(RTCA Xcelligence Roche)
İnvert Flöresan Mikroskop	(Olympus)
Hücre Canlılığı Analizörü	(Vi-Cell Beckman Coulter)

### 3.2. Uygulanan Yöntem

LPS ile HUVEC hücre hattı hücreleri uyarılarak, xCELLigence sistemi ile belirlenen farklı dozlardaki etanerseptin 24. ve 48. saatlerdeki etkileri in vitro ortamda test edilmesi için HUVEC hücre kültürü yapılmış, çalışma tasarımı Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Çalışma Tasarımı ve Kullanılan Uyanların Miktarları

Stimulasyon	Madde miktarı	Saat
LPS	500ng/µl	24, 48
ETANERSEPT	1u/µl; 5u/µl; 10u/µl; 50u/µl;100u/µl	24, 48

LPS (SIGMA from Escherichia Coli, L 8274, USA), Gram (-) bakterilerin hücre duvarında yer alan bir moleküldür. LPS 500 ng/µl dozunda kullanılmıştır.

Etanersept, TNF inhibitörü olarak rol oynayan; rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiş bir füzyon proteindir. Etanersept 1 ug/µl; 5 ug/µl, 10 ug/µl, 50 ug/µl, 100 ug/µl dozlarında uygulanmıştır.

#### 3.2.1. HUVEC Hücre Hattı

Bu çalışmada etanercpetin hücre çoğalması üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla HUVEC hücre hattı kullanılmıştır. HUVEC hücrelerinin 2 katına çıkma süresi

yaklaşık 36 saattir. HUVEC hücreleri insan göbek kordonundaki venlerin endotel hücrelerinden kökenlenen hücre hatlarıdır. Endotel hücre fonksiyonların tanımlanmasında en sık kullanılan hücre hatlarıdır. HUVEC hücre hattı için, RPMI 1640 stabil Glutamin (Biosera LM-R1639/500) içerecek şekilde hazırlanmış medyum içerisinde çoğaltılmıştır.

### **3.2.2. HUVEC Hücre Kültürü**

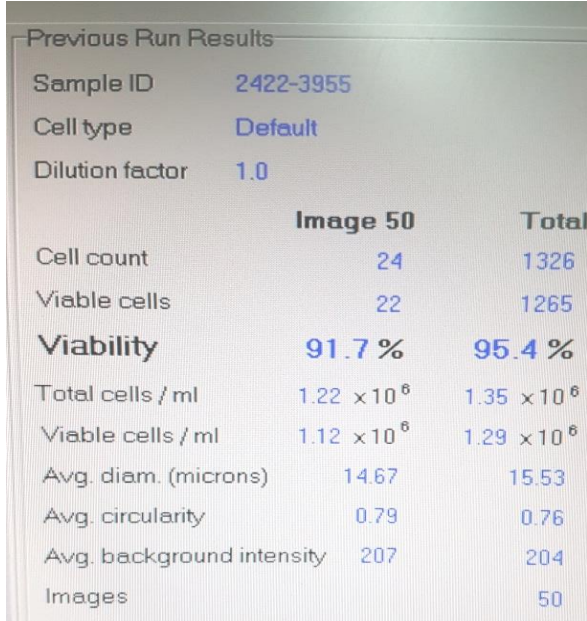
HUVEC hücre hattı, kriyo tüpler içinde sıvı azotta saklanmaktadır. HUVEC hücre hattı sıvı azottan çıkarılan kriyo tüpler, 37°C'deki su banyosunda eritilip 15 ml'lik falkon tüplere aktarılmış, 6 ml'lik kültür medyumunu eklendikten sonra 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrasında eklenen medyum uzaklaştırılmış ve %10 serum ihtiva eden yeni medyuma  $1 \times 10^6$  hücre içerecek şekilde 25cm<sup>2</sup>'lik flasklara dağılım sağlanmıştır. Yapılan işlem sonrasında hücre hatları 37 °C' de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde; kültüre edilmesi adına yerleştirilmiştir.

Hücreler her gün ışık mikroskopunda incelenerek; %75 konfluensiye ulaşması beklenmiş, ulaşan hücreler pasajlanmıştır. Çalışmanın öncesinde 37° C'de su banyosunda 5 ml PBS ısıtılmıştır. Flaskların üzerindeki medyum çekilerek, PBS ile yıkanarak; yapışkan özelliğe sahip hücrelerin flaskın yüzeyinden ayrılması için tripsinizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında, daha önceden 37°C'de su banyosunda ısıtılmış olan medyumdan 6 ml eklenerek 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonrasında süpernatant atılarak hücrelerin üzerine 10 ml medyum eklenmiştir. Homojen dağılım için karıştırıldıktan sonra hücre sayımı cihazına (Vi-cell XR cell viability analyzer (Beckman Coulter inc. BREA, CA, USA) yüklenerek sayım işlemi gerçekleştirilmiştir. Sayım sonrasında  $1 \times 10^6$  hücre hesaplanıp, RPMI 1640 medyum eklenerek 25cm<sup>2</sup>'lik flasklara dağılımı gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.3. HUVEC Hücre Hattının Uyarılması**

HUVEC hücre hattındaki hücreler stimulyondan önce 4-6 pasajlamayı geçmeden, Viacell hücre sayım cihazında canlı hücre oranı % 95.4 olarak belirlenmiştir (Çizim 3.1.) 100 mm' lik petrilere; her bir petride  $2 \times 10^5$  hücre olacak şekilde dağıtılmıştır.

### Çizim 3.1- Viacell Hücre Canlılık Analizi



Previous Run Results		
Sample ID	2422-3955	
Cell type	Default	
Dilution factor	1.0	
	Image 50	Total
Cell count	24	1326
Viable cells	22	1265
<b>Viability</b>	<b>91.7 %</b>	<b>95.4 %</b>
Total cells / ml	$1.22 \times 10^6$	$1.35 \times 10^6$
Viable cells / ml	$1.12 \times 10^6$	$1.29 \times 10^6$
Avg. diam. (microns)	14.67	15.53
Avg. circularity	0.79	0.76
Avg. background intensity	207	204
Images	50	

#### 3.2.4. HUVEC Hücrelerinin Toplanması

Yapılan çalışmada, hücrelerin üzerindeki süpernatant toplanarak kültürdeki dokular petripler üzerinde soğuk PBS eklenerek, sonrasında PBS çekilmiştir. İşlem sonrasında hücreler buz üzerinde bırakıldı.

RNA örneklerini toplamak için; 100mm hücre kültür petriplerine 600 µl b-merkaptotanol içeren lizis tamponu eklenmiştir.

Örnekler -80 °C deki derin dondurucuda saklanır.

#### 3.2.5. Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu için PureLink RNA Mini Kit (Cat. No.12183018A, İNVİTROGEN) protokolü uygulanarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, elde edilen RNA'lar Nano-drop spektrofotometrede 260/ 280 nm dalga boyundaki konsantrasyon ölçümüyle RNA kalitesi kontrol edilmiştir. RNA'lar daha sonra - 80°C' de saklanmıştır.

#### 3.2.6. cDNA(Komplementer DNA) Sentezi

cDNA Sentezi ( Komplementer DNA)

cDNA sentezi ( Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche Cat. No. 050912840 01) kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

RNA	: 1 µg toplam RNA
Random Primer	: 2 µl (600 pmol/µl),
Su	: 13 µl tamamlayacak kadar su
Toplam:	: 13 µl

Karışım 65°C’de 10 dakika inkübe edildikten sonra buza konuldu. Beklerken her bir örnek başına aşağıdaki miktarlarda bir karışım hazırlandı.

5x Ters Transkriptaz tamponu (5x)	: 4 µl,
dNTP karışımı (her biri 10 mM )	: 2 µl,
RNaz inhibitör (40 U/µl)	: 0.5 µl,
Ters Transkriptaz M-MuLV (20 U/µl)	: 0.5 µl.
Toplam	: 20 µl

Sırayla her bir örnek için ayrı olmak üzere toplamı 20 µl’ye tamamlayacak kadar buzda beklemekte olan karışımdan 7 µl eklendi. Daha sonra PCR makinasında önce 25°C’de 10 dakika ve daha sonra 55°C’de 30 dakika inkübe edildi. Son olarak reaksiyonu durdurmak için 85°C’de 5 dakika ve 5 dakikanın sonunda örnekler buza konuldu. Daha sonra cDNA örnekleri -20°C’ye kaldırıldı.

### 3.2.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) (*Real time PCR*)

Gerçek zamanlı PZR deneyleri *LightCycler 480 (Roche Diagnostics, GmbH, Germany)* cihazı kullanılarak yapılmıştır. GZ-PZR reaksiyonunda gerekli primer finder yazılımı ile ([www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com)) tasarlanmıştır. Burada gene özgü spesifik primerler kombine edilerek verilmektedir. Gene özgü spesifik primerler Çizelge 3.2’deki gibidir.

**Çizelge 3.2-** Genlere Özgü Primer Dizileri

GEN	PRİMER	TM	%GC	PRİMER DİZİSİ
<b>MYC 204</b> (Amplikon 117 bç)	Forward	59,93	21	5'- CCGTCCTCGGATTCTCTGC -3'
	Reverse	59,40	100	5'- TTGTTCTCCTCAGAGTCGC -3'
<b>VEGFA</b> (Amplikon 163 bç)	Forward	58,82	140	5'- GGCCTCCGAAACCATGAAC -3'

	Reverse	60,25	265	5'- GCTGCGCTGATAGACATCCA-3'
<b>CDK4</b> (Amplikon 150 bç)	Forward	59,46	178	5'- ACACCCGTGGTTGTTACT-3'
	Reverse	58,85	289	5'- GTCGGCTTCAGAGTTCCAC-3'
<b>NFKB1</b> (Amplikon 92 bç)	Forward	58,81	142	5'- CTGGAACCCGTGGTATCAGA-3'
	Reverse	60,06	194	5'- CATCCAGCTGTCCTGTCCATT-3'
<b>FGF 1</b> (Amplikon 150 bç)	Forward	60,04	153	5'-CTTTTATACGGCTCACAGACACC-3'
	Reverse	59,82	264	5'-CTCCCATTCTTCTTGAGGCCAA-3'

### 3.2.1. xCELLigence Sistemi (Gerçek zamanlı, hücre indeksi analizi)

Hüresel biyolojik olaylar, sistem tarafından hiçbir işaretleme yapılmadan empedans tabanlı gerçek zamanlı hücre analizi ile tespit edilebilmektedir. Elektrodlu plakaların (E-plaka) zeminine yerleştirilmiş mikro-elektrodlar sayesinde elektriksel empedans ölçümü gerçekleştirilmektedir (Çizim 3.2). Empedans ölçümü sayesinde; hücre canlılığı, hücre morfolojisi, hücre sayısı, ve hareketiyle ilgili hücrenin çeşitli biyolojik durumu hakkında kantitatif bilgi elde edilmektedir (Ke ve ark., 2011).

**Çizim 3.2.** xCELLigence sistemi (Roche, 2008).



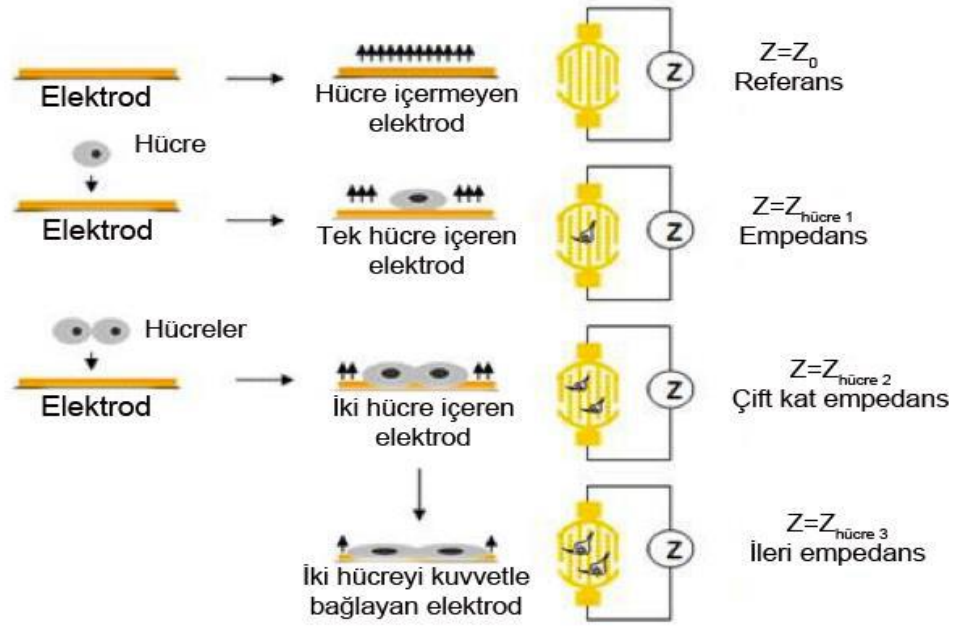
xCELLigence (Roche Applied Science, Mannheim, Almanya ve ACEA Biosciences, San Diego, CA) sistemi; empedans tabanlı gerçek zamanlı hücre analizörü, RTCA tek plaka yapısı, entegre yazılım programını içinde barındıran RTCA bilgisayarı ve tek kullanımlık 96'lık E-plaka olmak üzere 4 ana bileşenden oluşmaktadır (Roche, 2008; Ke ve diğ, 2011).

RTCA sistemi, yapışkan hücrelerin özel E-plakalardaki her bir kuyunun altında bulunan mikroelektrod sensörleriye etkileşim göstererek yapışmasını ve bu kuyularda gerçekleşen empedans değişikliklerinin ölçümünü temel almaktadır. Sistem; hücre çoğalması, hücre ölümü hücre yapışması ve diğer morfolojik değişiklikler hakkında uzun dönemli ve gerçek zamanlı bilgiler verebilmektedir (Kustermann ve diğ. 2013). (Çizim 3.3.)

Sistemin temelini, gerçek zamanlı hücre empedansını ölçmek üzere tasarlanmış; tek kullanımlık 96 kuyucuklu E-plaka oluşturmaktadır. Her kuyucuk altında yerleşmiş olan mikroelektrod sensör ile yapışan hücrelerin empedans ölçümü gerçekleşmektedir. Kuyucuklarda yer alan hücrelerle ilgili, hücrelerin elektrodlarla olan etkileşimi potansiyeli, hücre sayısı ve hücre morfolojisiyle ilişkilidir ve bu açıdan önem arz eden faktörler arasında sayılmaktadır (Urcan ve diğ, 2010).

1 $\mu$ A kadar alternatif akım uygulanmasıyla hücreler ile mikroelektrodlar arasında elektriksel bir alanın oluşmasını sağlar. Hücreler elektrodlar üzerine yerleştikleri andan itibaren, sistemden geçen akım hücrelerin elektrik empedansına eşit olur. Sistem tarafından sürekli empedans ölçümü yapılır, empedans verileri bilgisayara gönderilir ve yazılım tarafından analizi gerçekleştirir (Ke ve diğ. 2011).

**Çizim 3.3.** Hücrelerin elektrik empedansının ölçümünün şematik gösterimi (Roche 2008)



Yapılan çalışmalarda, ortamda elektroda yapışmış bir hücre olmadığı durumlarda, elektrodun empedansı, elektrod çözeltisinin ve kuyucuktaki boş çözeltinin etrafındaki iyonik çevrenin empedansına göre belirlenir. Ortamdaki hücre varlığında elektrodun sensör yüzeyinde yapışmış hücreler, bir yalıtkan gibi davranıp; elektrod çözeltisinin yüzeyindeki iyonik çevrede değişikliğe neden olup empedansta bir artışa sebep olur. Elektrod üzerindeki çoğalan hücre sayısı ile; alınan empedans değeri aynı paralelde olup; hücre sayısının artışıyla alınan empedans değeri de o oranda artış göstermektedir. Elde edilen bu değer empedans değeri “hücre indeksi” olarak adlandırılan bir parametre ile ölçülmektedir. Üretici firmanın önerdiği hücre indeksi en az 0,5 ideal olarak ise 1 ya da daha yüksek değer kabul edilir. Bununla birlikte, kullanılacak hücre sayısı, hücre indeksi/hücre sayısı lineer aralığında olması gerekmektedir (Roche, 2008; Martinez-Serra ve ark., 2014).

Xcelligence sistemi; kanser, toksikoloji, ilaç geliştirme, tıbbi mikrobiyoloji ve viroloji gibi pek çok farklı alanda çeşitli araştırmalarda çeşitli uygulamaların bir arada yapılabilmesi için gerçek zamanlı, işaretleme yapılmaksızın hücre analizinin gerçekleşmesini sağlayan hücre bazlı mikroelektronik bir empedans ölçümüne dayalı hücre biyosensör sistemi olarak tanımlanmaktadır (Ke ve ark., 2011).



## 4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında etanerseptin HUVEC hücre hattı üzerine etkileri araştırıldı. Moleküler yöntemlerle 5 farklı etanersept dozu HUVEC hücre hattına uygulanmıştır. Belirlenen bu dozların 24 ve 48 saat etkileri, belirlenen FGF, MYC, VEGF, CDK4 ve NF-kB genlerinin ekspresyon seviye analizleriyle ortaya konulmuştur.

### 4.1. Etanersept Konsantrasyonlarının HUVEC Hücre Soyü Üzerindeki Etkisi

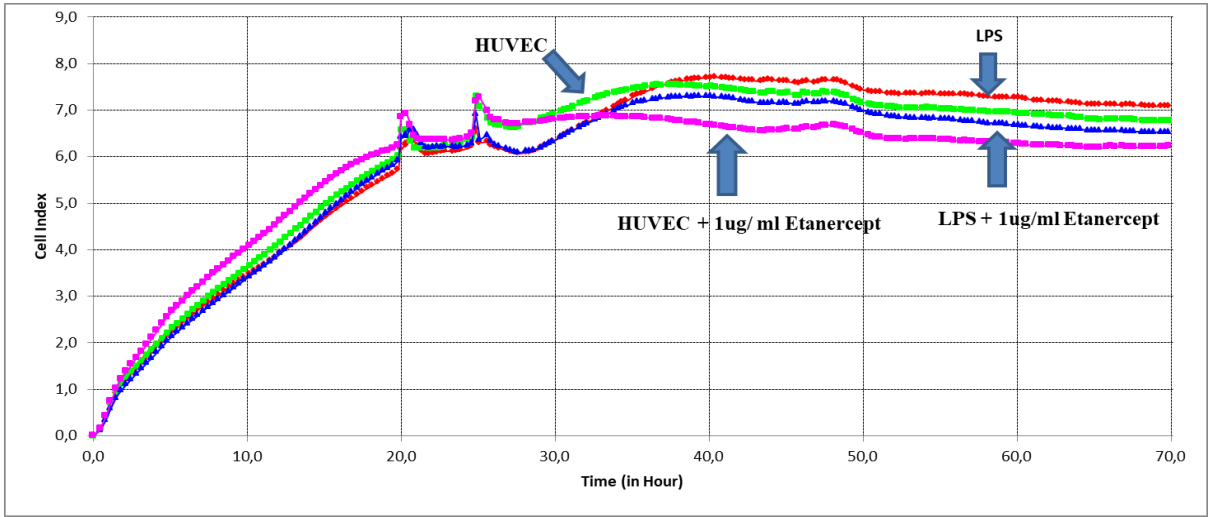
Çalışma için uygun olan dozların belirlenebilmesi için gerçek zamanlı hücre analizörü (RTCA) Xcelligence cihazında belirlenen Etanersept dozları HUVEC hücre hattına uygulanmıştır. Çalışma öncesinde hücreler LPS ile uyarılmış, sonrasında belirlenen konsantrasyonlarda etanersept uygulaması yapılmıştır. (Çizim 4.1.)

Çizim 4.1. RTCA Xcelligence Cihazı Etken Doz Belirleme Çalışması

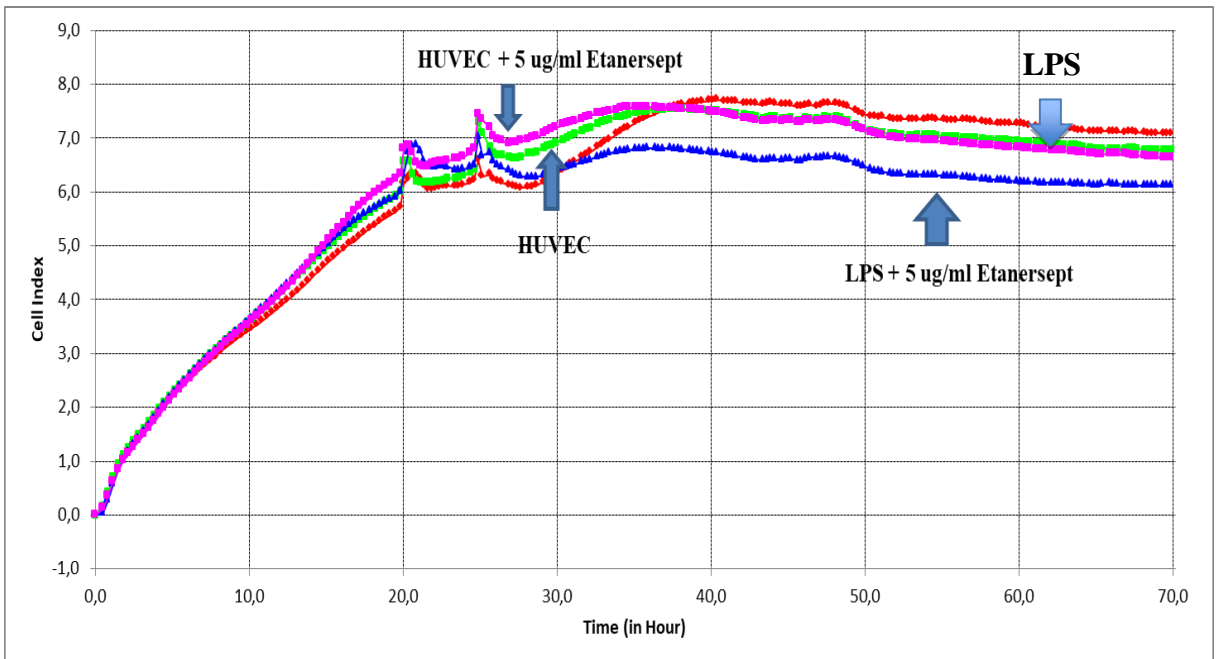
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	huvec(20000) LPS(1.00ug/ml)	huvec(20000) LPS(1.00ug/ml)	huvec(20000) LPS(1.00ug/ml)	huvec(20000) LPS(1.00ug/ml)	huvec(20000) LPS(1.00ug/ml)	huvec(20000) LPS(1.00ug/ml)	huvec(20000) 0	huvec(20000) 0	huvec(20000) 0	huvec(20000) 0	huvec(20000) 0	huvec(20000) 0
B	huvec(20000) LPS+ETA(1.00ug/ml)	huvec(20000) LPS+ETA(1.00ug/ml)	huvec(20000) LPS+ETA(1.00ug/ml)	huvec(20000) LPS+ETA(1.00ug/ml)	huvec(20000) LPS+ETA(1.00ug/ml)	huvec(20000) LPS+ETA(1.00ug/ml)	huvec(20000) LPS+ETA(5.00ug/ml)	huvec(20000) LPS+ETA(5.00ug/ml)	huvec(20000) LPS+ETA(5.00ug/ml)	huvec(20000) LPS+ETA(5.00ug/ml)	huvec(20000) LPS+ETA(5.00ug/ml)	huvec(20000) LPS+ETA(5.00ug/ml)
C	HUVEC(20000) LPS+ETA(10.00ug/ml)	HUVEC(20000) LPS+ETA(10.00ug/ml)	HUVEC(20000) LPS+ETA(10.00ug/ml)	HUVEC(20000) LPS+ETA(10.00ug/ml)	HUVEC(20000) LPS+ETA(10.00ug/ml)	HUVEC(20000) LPS+ETA(10.00ug/ml)	HUVEC(20000) LPS+ETA(50.00ug/ml)	HUVEC(20000) LPS+ETA(50.00ug/ml)	HUVEC(20000) LPS+ETA(50.00ug/ml)	HUVEC(20000) LPS+ETA(50.00ug/ml)	HUVEC(20000) LPS+ETA(50.00ug/ml)	HUVEC(20000) LPS+ETA(50.00ug/ml)
D	HUVEC(20000) LPS+ETA(100.00ug/ml)	HUVEC(20000) LPS+ETA(100.00ug/ml)	HUVEC(20000) LPS+ETA(100.00ug/ml)	HUVEC(20000) LPS+ETA(100.00ug/ml)	HUVEC(20000) LPS+ETA(100.00ug/ml)	HUVEC(20000) LPS+ETA(100.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(1.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(1.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(1.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(1.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(1.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(1.00ug/ml)
E	HUVEC(20000) ETA(5.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(5.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(5.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(5.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(5.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(5.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(10.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(10.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(10.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(10.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(10.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(10.00ug/ml)
F	HUVEC(20000) ETA(50.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(50.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(50.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(50.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(50.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(50.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(100.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(100.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(100.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(100.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(100.00ug/ml)	HUVEC(20000) ETA(100.00ug/ml)
G	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0
H	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0	HUVEC(20000) 0

Yapılan çalışma sonucunda etkin etanersept dozu; 1ug/ $\mu$ l, 5 ug/ $\mu$ l, 10ug/ $\mu$ l, 50ug/ $\mu$ l ve 100 ug/ $\mu$ ml olarak belirlenmiş ve çalışmanın bundan sonraki aşamalarında bu dozlar baz alınarak etanerseptin HUVEC hücre hattındaki hücrelerin çoğalması üzerine etkileri araştırılmıştır. LPS ile uyarılan hücrelerin etanerseptin 5 ug/ $\mu$ l ile 50 ug/ $\mu$ l uygulanan konsantrasyonlarında LPS ile tek başına uyarılan hücrelere göre az da olsa hücre proliferasyonunda düşüş gözlemlendi. Ama genel olarak bakıldığında etanerseptin farklı konsantrasyonlarının hücre proliferasyonu üzerinde bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. (Çizim 4.2.; Çizim 4.3.; Çizim 4.4.Çizim 4.5.; Çizim 4.6.)

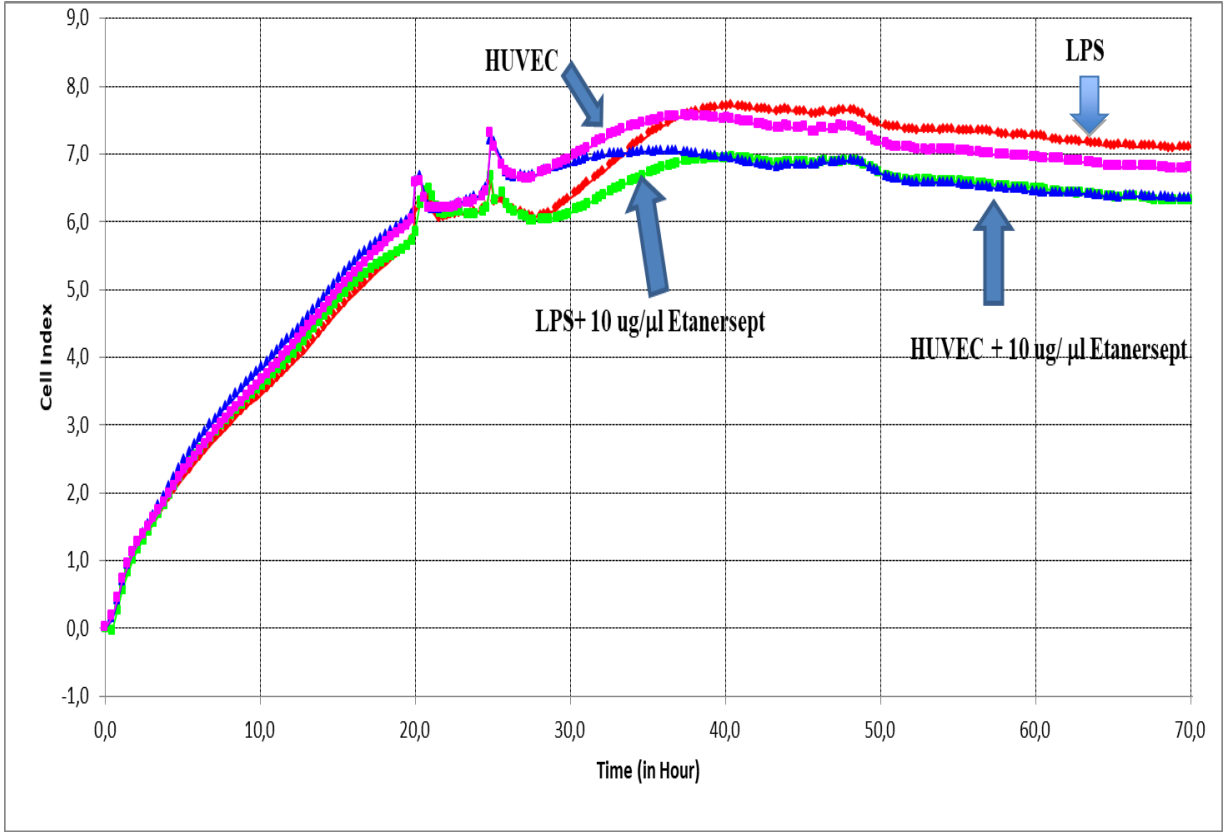
**Çizim 4.2. Etanersept 1ug/ $\mu$ l Doz Çalışması**



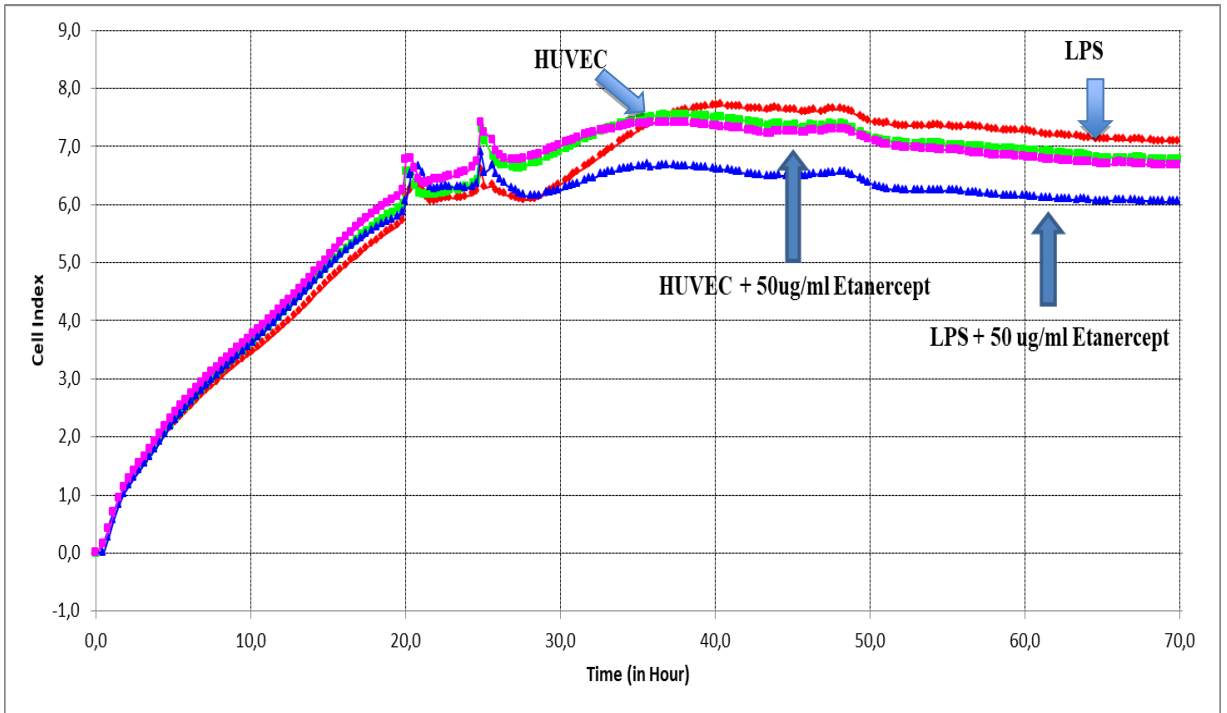
**Çizim 4.3. Etanersept 5ug/ $\mu$ l Doz Çalışması**



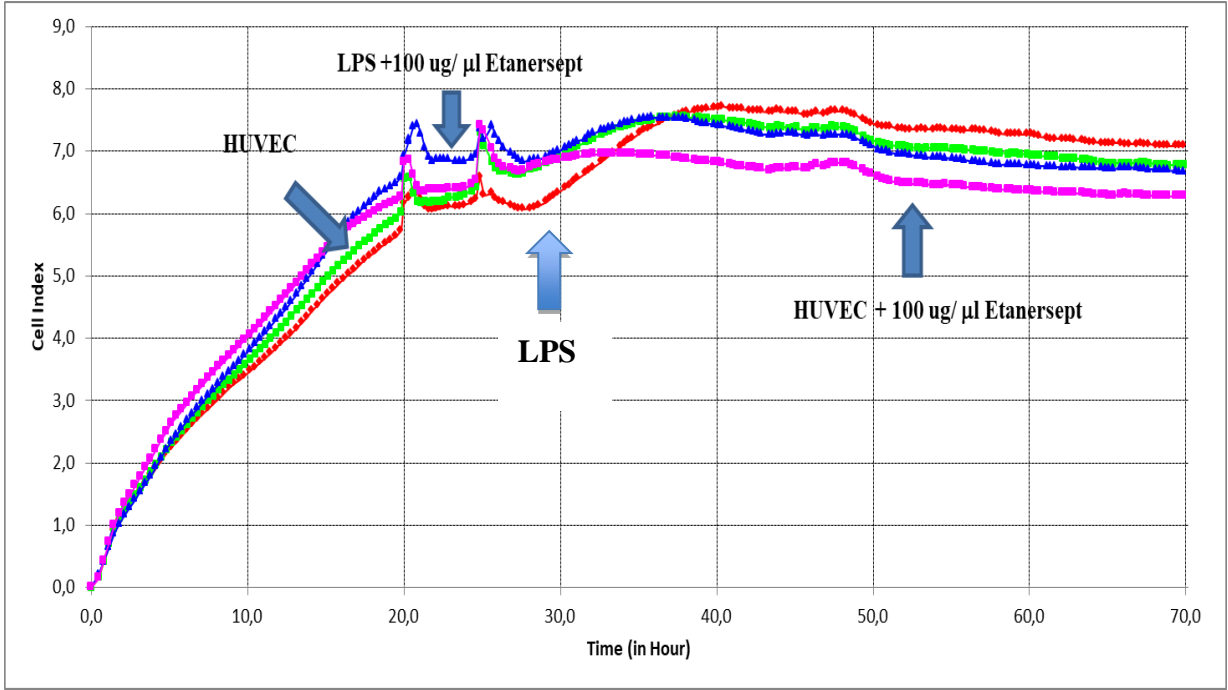
**Çizim 4.4. Etanersept 10ug/µl Doz Çalışması**



**Çizim 4.5. Etanersept 50ug/µl Doz Çalışması**



#### Çizim 4.6. Etanersept 100ug/µl Doz Çalışması



#### 4.2. Etanerseptin Genlerin mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi

HUVEC hücre soyları farklı dozlarla uyarılıp toplanan örnekler FGF, MYC, VEGF, CDK4 ve NFkB genlerine ait mRNA ekspresyonu açısından analiz edildi.

##### 4.2.1. Farklı Konsantrasyonlardaki Etanersept Düzeylerinin FGF mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi

FGF ekspresyonunu araştırmak için çoğaltılan bölge 150 bç uzunluğunda olup tasarlanan primerlerle yapılan çalışmayla genomik DNA ile amplifikasyon olasılığı dışlandı. Kantitatif PZR Analizi LC 480 cihazında yapılmış olup FGF ekspresyon düzeyi referans gen olarak alınan TBP (TATA- Binding Box) ile karşılaştırılmıştır.

Rölatif ekspresyon düzeyleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

Rölatif Ekspresyon = FGF geni ekspresyonu / TATA Binding Box gen ekspresyonu

FGF genine özgü aşağıdaki PZR protokolü yapılmıştır.

Su	1 µl
Primer F (10pmol)	1 µl
Primer R	1 µl

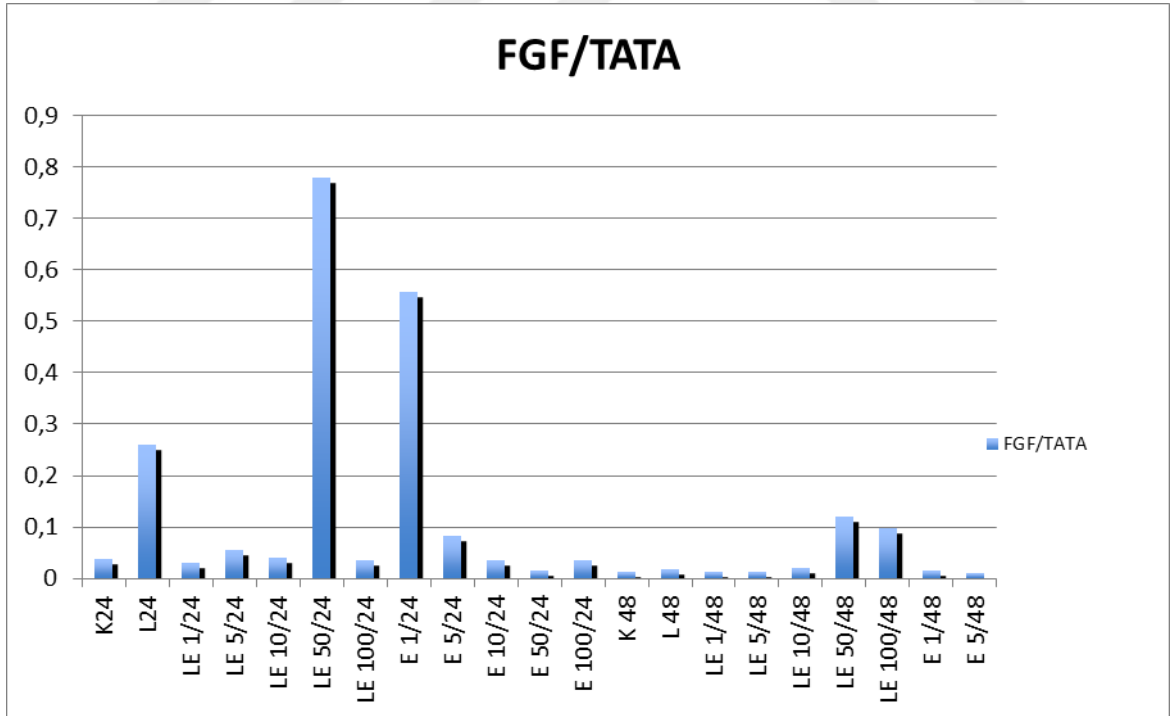
Master Mix(2x)	5 µl
cDNA	2 µl
Toplam:	10 µl

PZR kondisyonları aşağıdaki gibidir.

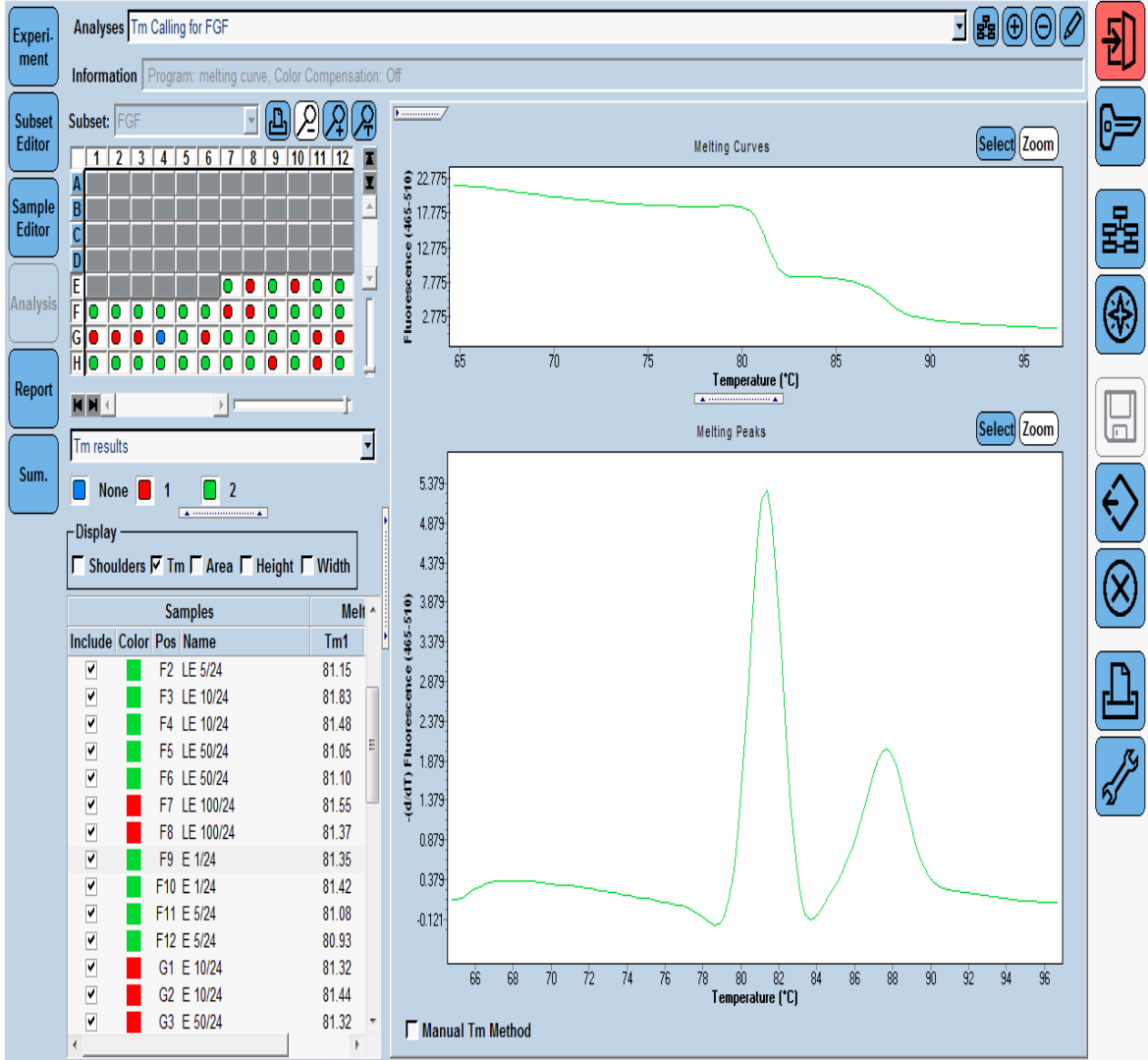
95°C	10 dk
94°C	10 sn.
68°C	20 sn 45 siklus
72°C	1 sn

LPS ile yapılan stimulyonda sonucunda; 24 saatlik dilimde 50ul/µl Etanersept dozunda; HUVEC hücre hattı FGF gen ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlenmiştir. 48 saatin sonunda etanerseptin FGF gen ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir etkisi gözlemlenmemiştir (Çizim 4.8.).

**Çizim 4.7. FGF Gen Ekspresyon Seviyeleri (24 ve 48 saat)**



## Çizim 4.8. FGF Tm Eğrisi



### 4.2.2. Farklı Konsantrasyonlardaki Etanersept Düzeylerinin VEGF mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi

VEGF ekspresyonunu araştırmak için çoğaltılan bölge 163 bp uzunluğunda olup tasarlanan primerlerle yapılan çalışmayla genomik DNA ile amplifikasyon olasılığı dışlandı. VEGF ekspresyon düzeyi referans gen olarak TBP ile karşılaştırıldı. Rölatif ekspresyon düzeyleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Rölatif Ekspresyon} = \text{VEGF geni ekspresyonu} / \text{TATA gen ekspresyonu}$$

VEGF genine özgü aşağıdaki PZR protokolü yapılmıştır.

Su 1  $\mu$ l

Primer F (10pmol) 1  $\mu$ l

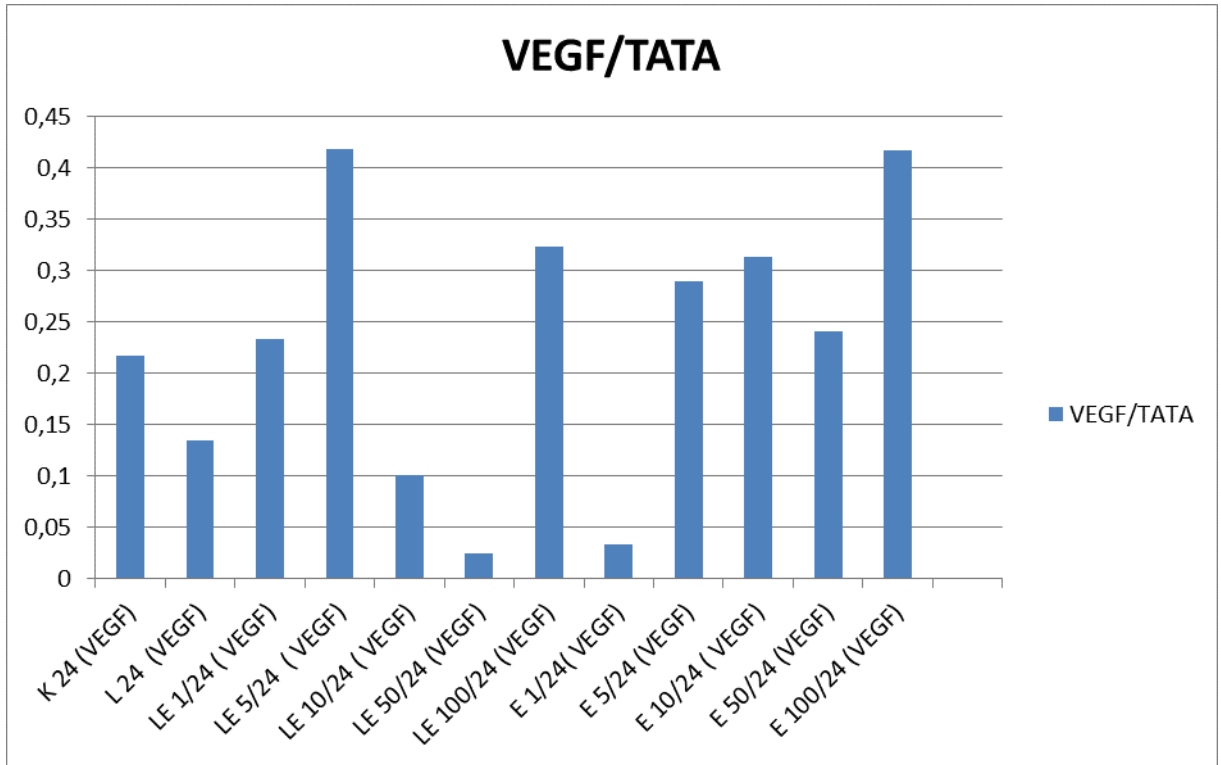
Primer R	1 µl
Master Mix(2x)	5 µl
cDNA	2 µl
Toplam:	10 µl

PZR kondisyonları aşağıdaki gibidir.

95°C	10 dk
94°C	10 sn.
62°C	20 sn 45 siklus
72°C	1 sn

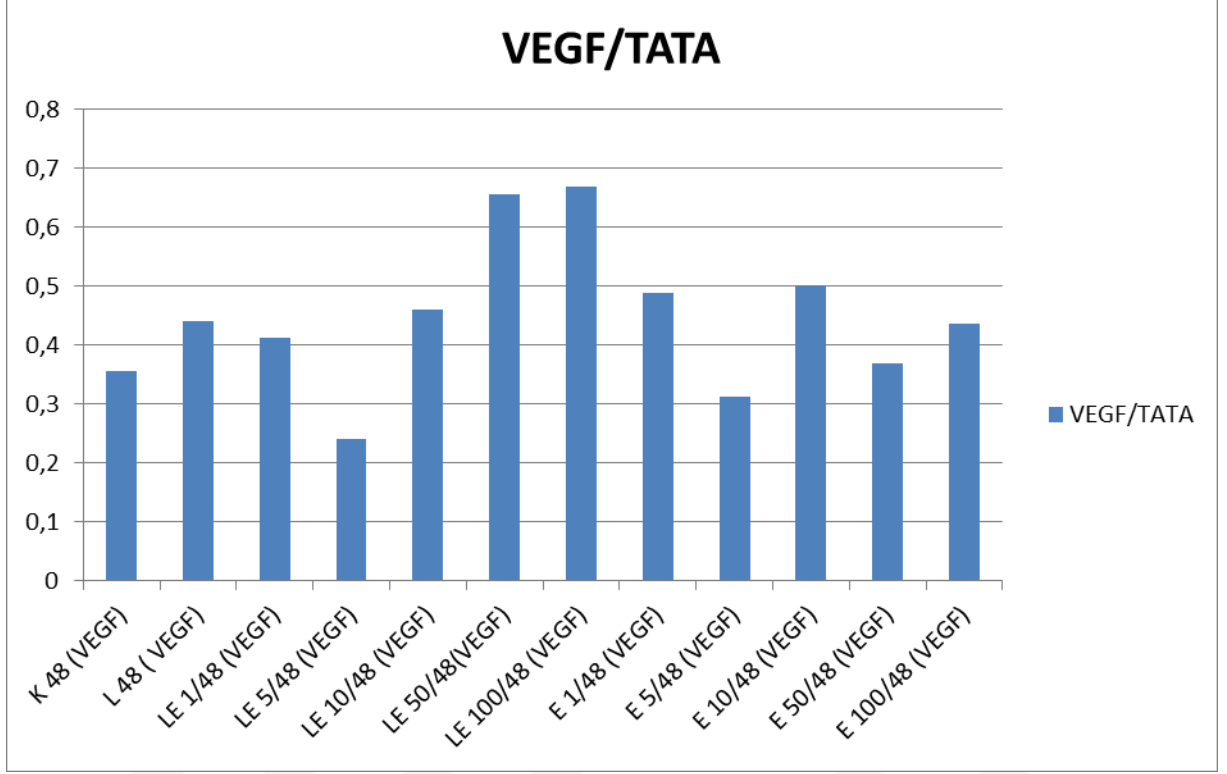
LPS ile yapılan stimulyonda sonucunda; 24 saatlik dilimde 5ul/ µl etanersept dozunda ve 100ul/ µl etanersept dozunda VEGF gen ekspresyonun artış gözlemlenirken; 10ul/ µl ve 50ul/ µl dozlarda VEGF ekspresyon seviyelerinde düşüşler dikkati çekmiştir. (Çizim 4.9.)

**Çizim 4.9. VEGF Gen Ekspresyon Seviyeleri (24 Saat)**



LPS ile yapılan stimulyasyonda sonucunda; 48 saatlik dilimin sonunda; 50ul/ µl ve 100ul/ µl etanersept dozunda VEGF gen ekspresyonunun artışı gözlemlenmiştir (Çizim 4.10).

**Çizim 4.10. VEGF Gen Ekspresyon Seviyeleri (48 Saat)**



#### 4.2.3. Farklı Konsantrasyonlardaki Etanersept Düzeylerinin CDK 4 mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi

CDK4 ekspresyonunu araştırmak için çoğaltılan bölge 150 bç uzunluğunda olup tasarlanan primerlerle yapılan çalışmayla genomik DNA ile amplifikasyon olasılığı dışlandı. CDK4 ekspresyon düzeyi referans gen olarak TBP ile karşılaştırıldı. Rölatif ekspresyon düzeyleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Rölatif Ekspresyon} = \frac{\text{CDK 4 geni ekspresyonu}}{\text{TATA gen ekspresyonu}}$$

CDK 4 genine özgü aşağıdaki PZR protokolü yapılmıştır.

Su	1 µl
Primer F (10pmol)	1 µl
Primer R	1 µl
Master Mix(2x)	5 µl



cDNA 2 µl

Toplam: 10 µl

PZR kondisyonları aşağıdaki gibidir.

95°C 10 dk

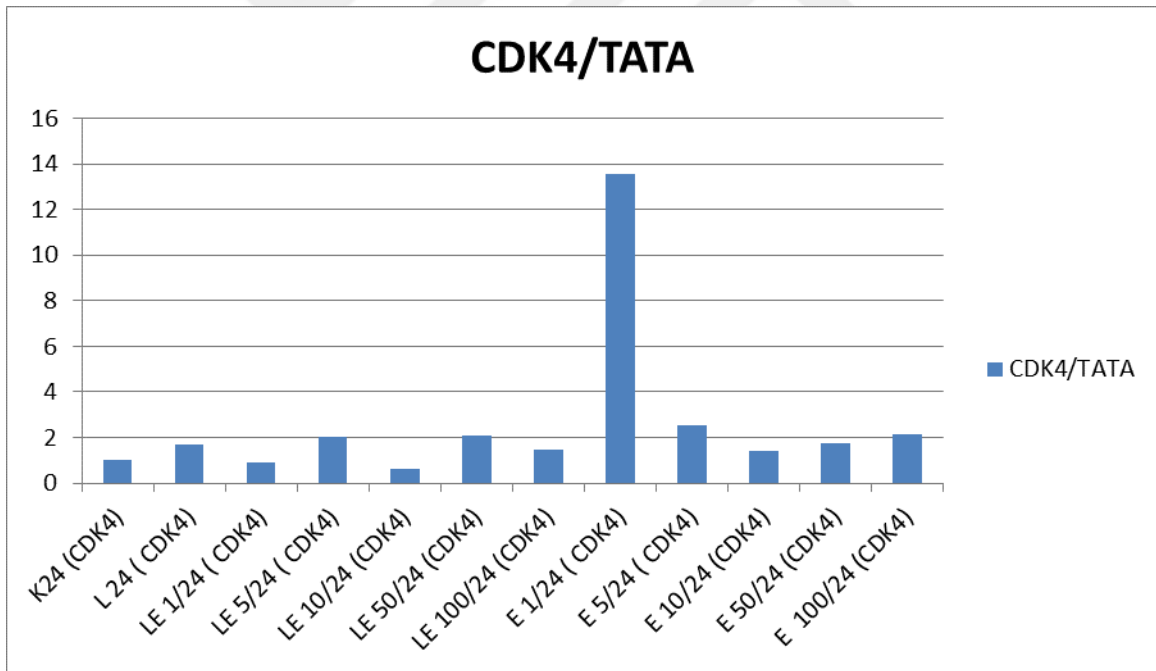
94°C 10 sn.

62°C 20 sn 45 siklus

72°C 1 sn

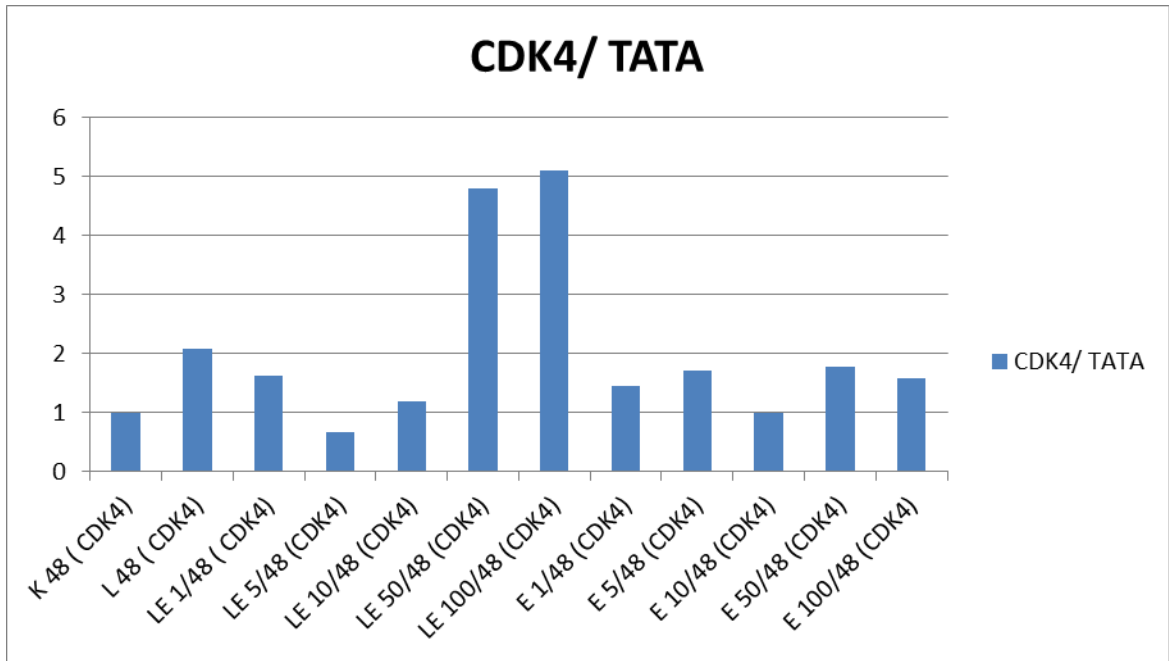
LPS ile yapılan stimulyasyonda sonucunda; 24 saatlik dilimde uygulanan etanersept dozlarında CDK 4 ekspresyon seviyeleri üzerinde anlamlı bir fark görülmemiştir. (Çizim 4.11)

**Çizim 4.11. CDK 4 Gen Ekspresyon Seviyeleri (24 Saat)**



Ancak; LPS ile yapılan stimulyasyonda sonucunda; 48 saatlik dilimin sonunda; 50ul/ µl ve 100ul/ µl etanersept dozunda CDK4 gen ekspresyon artışı gözlemlenmiştir (Çizim 4.12).

**Çizim 4.12. CDK 4 Gen Ekspresyon Seviyeleri (48 Saat)**



#### **4.2.4. Farklı Konsantrasyonlardaki Etanersept Düzeylerinin MYC mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi**

MYC ekspresyonunu araştırmak için çoğaltılan bölge 117 bp uzunluğunda olup tasarlanan primerlerle yapılan çalışmayla genomik DNA ile amplifikasyon olasılığı dışlandı. MYC ekspresyon düzeyi referans gen olarak TBP ile karşılaştırıldı Rölatif ekspresyon düzeyleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Rölatif Ekspresyon} = \frac{\text{MYC geni ekspresyonu}}{\text{TATA gen ekspresyonu}}$$

MYC genine özgü aşağıdaki PZR protokolü yapılmıştır.

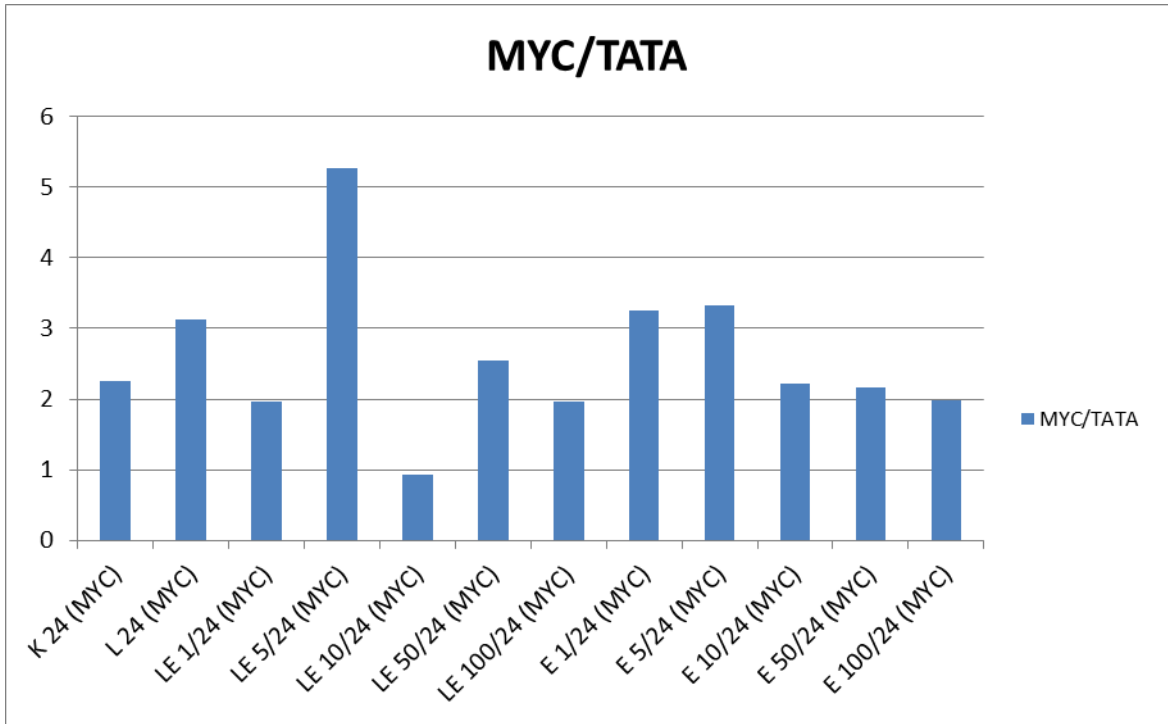
Su	1 µl
Primer F (10pmol)	1 µl
Primer R	1 µl
Master Mix(2x)	5 µl
cDNA	2 µl
Toplam:	10 µl

PZR kondisyonları aşağıdaki gibidir.

95°C	10 dk
94°C	10 sn.
65°C	20 sn 45 siklus
72°C	1 sn

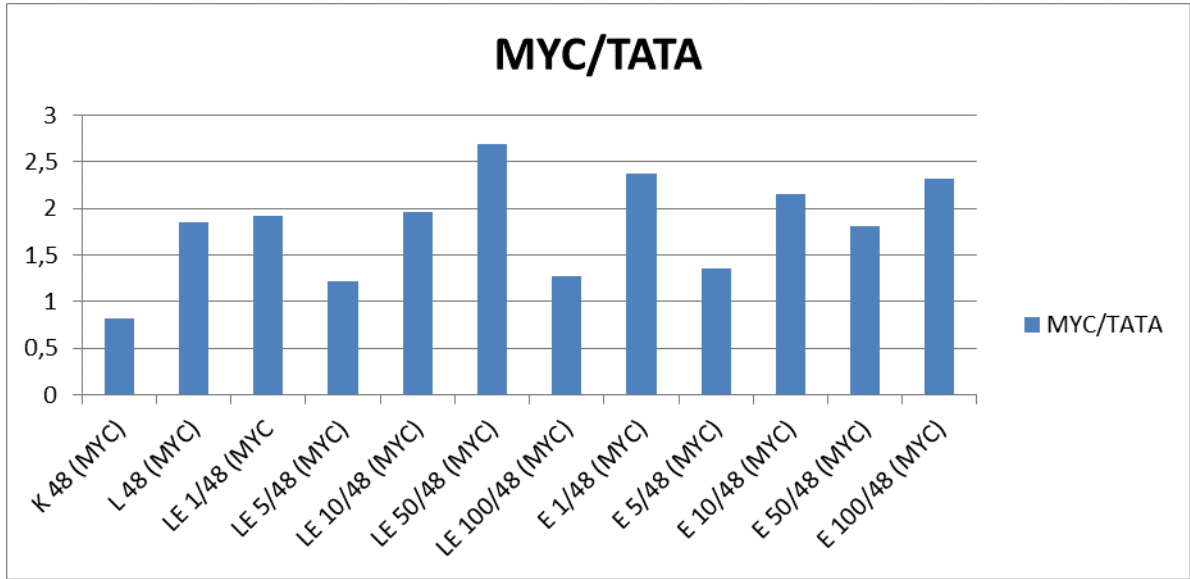
LPS ile yapılan stimulyasyonda sonucunda; 24 saatlik dilimde uygulanan etanersept dozlarında, 5ul/ml etanersept doz düzeyine myc geninde ekprseyon artışı görülmektedir. (Çizim 4.13).

**Çizim 4.13. MYC Gen Ekspresyon Seviyeleri (24 Saat)**



Yapılan çalışma sonucunda 48 saatlik dilimin sonunda ise; 1ul/ µl, 10ul/ µl ve 50ul/ µl etanersept dozlarında MYC gen ekspresyon seviyelerinde artış gözlemlenmiştir (Çizim 4.14).

**Çizim 4.14. MYC Gen Ekspresyon Seviyeleri (48 Saat)**



#### **4.2.5. Farklı Konsantrasyonlardaki Etanersept Düzeylerinin NF-kB mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi**

NFkB ekspresyonunu araştırmak için çoğaltılan bölge 92 bç uzunluğunda olup tasarlanan primerlerle yapılan çalışmayla genomik DNA ile amplifikasyon olasılığı dışlandı. NFkB ekspresyon düzeyi referans gen olarak TBP ile karşılaştırıldı. Rölatif ekspresyon düzeyleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Rölatif Ekspresyon} = \frac{\text{NF-kB geni ekspresyonu}}{\text{TATA gen ekspresyonu}}$$

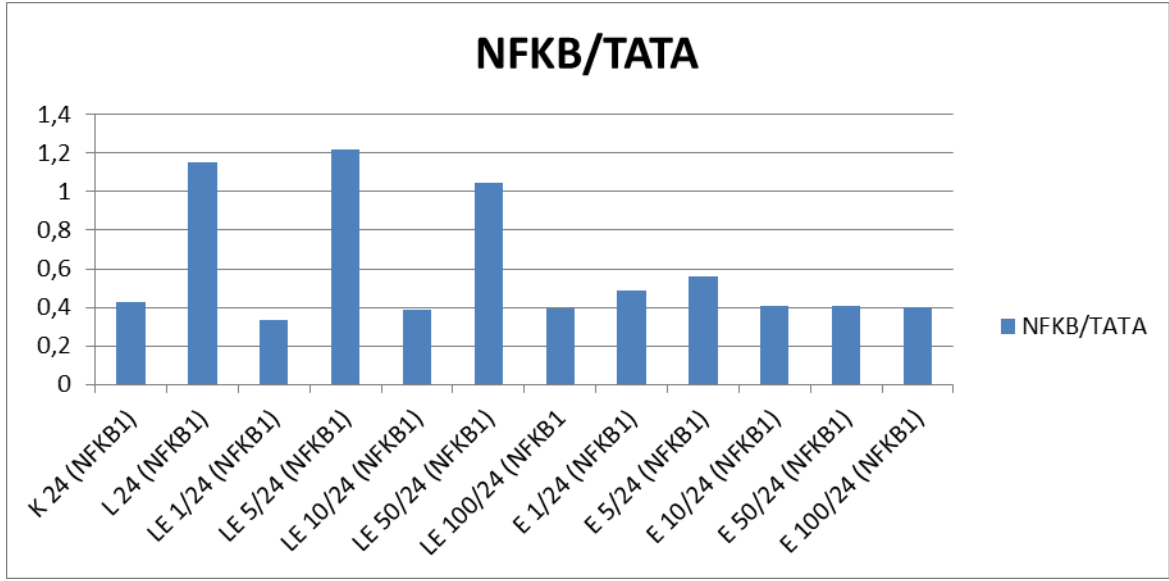
NF-kB genine özgü aşağıdaki PZR protokolü yapılmıştır.

Su	1 µl
Primer F (10pmol)	1 µl
Primer R	1 µl
Master Mix(2x)	5 µl
cDNA	2 µl
Toplam:	10 µl

PZR kondisyonları aşağıdaki gibidir.

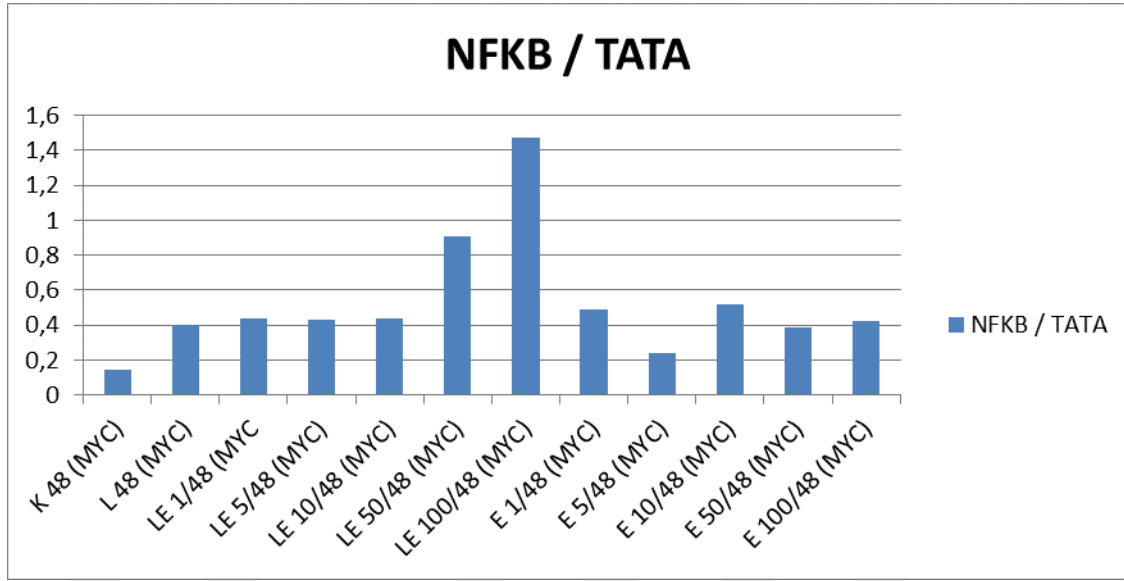
95°C	10 dk
94°C	10 sn.
65°C	20 sn 45 siklus
72°C	1 sn

**Çizim 4.15. (NF-kB Gen Ekspresyon Seviyeleri) (24 Saat)**



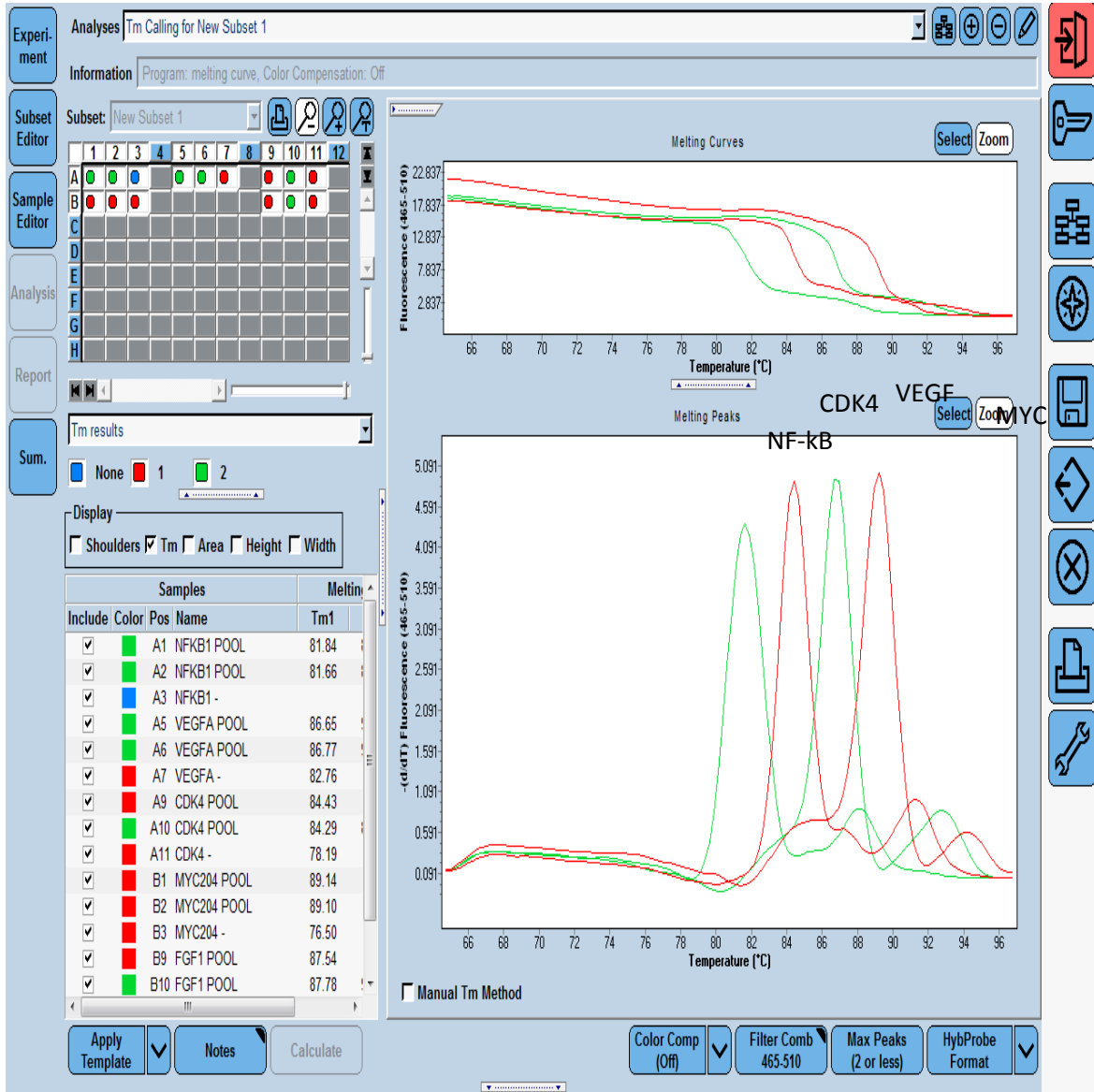
LPS ile yapılan stimulyasyonda sonucunda; 24 saatlik dilimde uygulanan etanersept dozlarında, 5ul/ µl ve 50ul/ml etanersept doz düzeylerinde kısmi ekprseyon artışı görülmektedir (Çizim 4.15).

**Çizim 4.16. (NF-kB Gen Ekspresyon Seviyeleri) (48 Saat)**

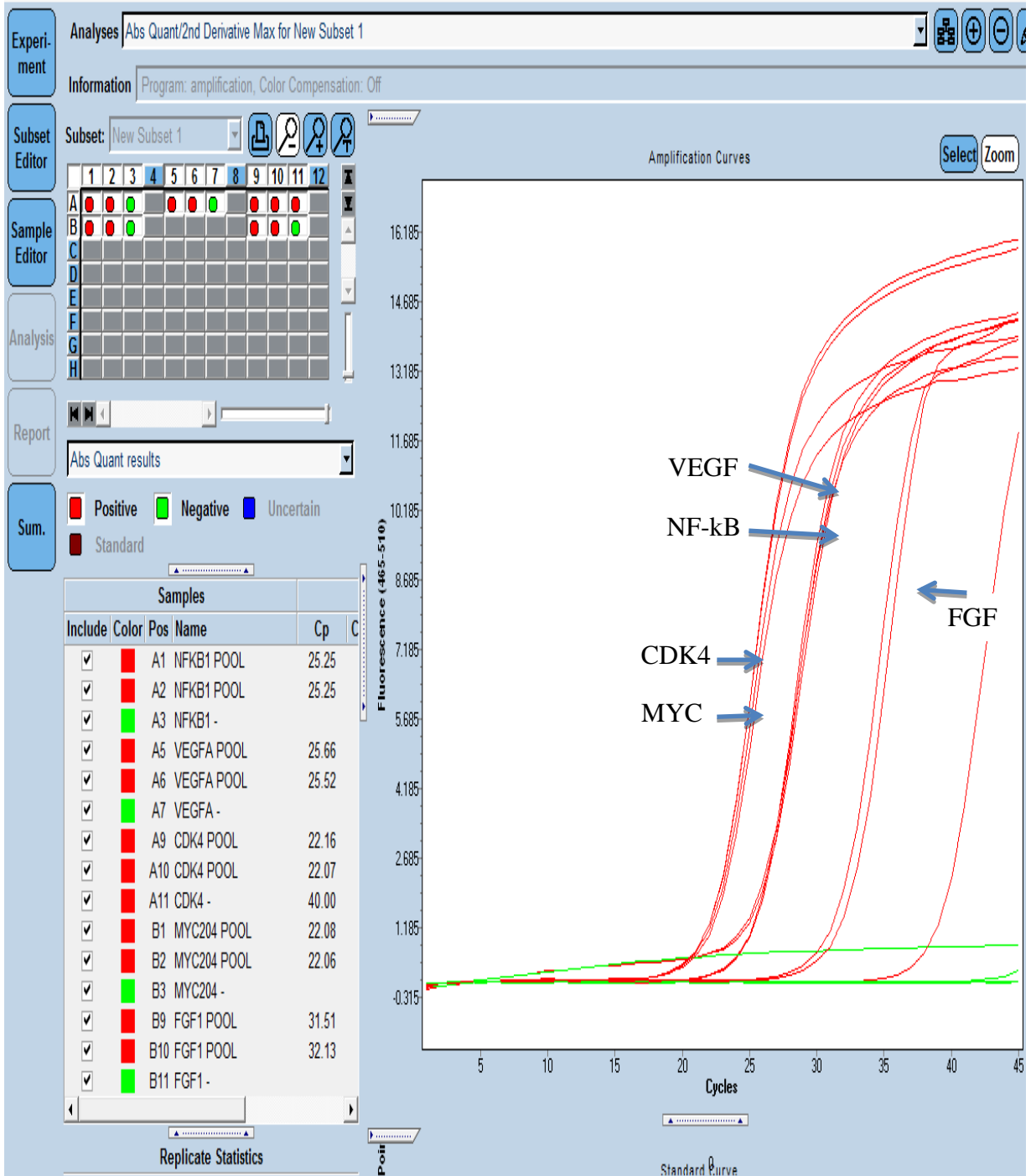


LPS stimulasyonu sonucudna 48 saatlik zaman dilimin sonucunda ise 50 ul/ µl ve 100ul/ µl etanersept dozlarında, NF-kB gen ekspresyonunda anlamlı artışlar gözlemlenmiştir. Diğer dozlarda dikkati çeken bir artış olmamıştır (Çizim 4.16).

**Çizim 4.17.** VEGF, MYC, NF-kB ve CDK4 Tm Eğrileri



**Çizim 4.18.** VEGF, MYC, NF-kB, FGF ve CDK4 Amplifikasyon Eğrileri





## 5. TARTIŞMA

Enflamatuvar hastalıklarda enfeksiyon, normal popülasyonlara göre çok daha fazla görülmektedir (Doran ve diğ. 2002). Romatoid artirit, Ankilozan Spondilit gibi enflamatuvar hastalıklarda, hastalık aktivitesi yükseldikçe; yeni dönemde kullanımı giderek artan anti-TNF tedavisi ön plana çıkmakta ve anti-TNF tedavisi gören hastalarda enfeksiyon riski artış göstermektedir. (Au. Ve diğ. 2011 ve Solovic ve diğ. 2010)

TNF pek çok inflamtuavar enfektif ve malignite reaksiyonlarında rol oynadığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Anti-TNF tedavisi özellikle son yıllarda enflamtuvar ın tedavisinde etkin olarak kullanılmaktadır. TNF- $\alpha$  immun yanıtı uyarıcı etkisiyle birlikte bir çok oto immun hastalığın tedavisinde kilit rol oynayan bir sitokin olduğundan; enflamatuvar hastalıkların tedavisinde anti-TNF etkisi, enfeksiyon artışıyla ilk etapta kendini göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada HUVEC hücre hattında anti-TNF inhibitörü olan etanersept kullandık. HUVEC hücre hattındaki hücreleri LPS ile stimülasyonunu sağlanmış, yapılan moleküler çalışmalar ışığında belirlenen 5 farklı anti-TNF etkili etanersept dozu stimüle edilmiş hücreler üzerine uygulanmış, bu dozların 24 ve 48 saat sonundaki etkileri araştırılmıştır.

Araştırmamızda kullanılan genlerden biri FGF genidir. İnsanların yaşamlarını sürdürebilme ve devamlılıklarını sağlayabilmeleri adına besin ve oksijene ihtiyaçları vardır. Bu maddeleri de dokulara damar ağlarıyla iletirler. Dokularda oluşan artık maddeleri de bu damar ağı sayesinde uzaklaştırırlar. Anjiogenezis olarak adlandırılan bu süreç damar oluşumunu tanımlamaktadır. (Folkman ve diğ. 1992) Pek çok patolojik ve fizyolojik süreçte anjiogenezis oldukça önemlidir (Folkman 1995) .Son yıllarda yapılan çalışmalarda tümörlerin progresyonunun artışlarıyla birlikte metastazlarında ve invazyonlarında anjiogenezisin rol aldığı gösterilmiştir. ( Folkman 1995) Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda hematolojik maligniteye sahip hastalarda kan damar oluşumunda ciddi artışlar gözlemlenmiştir (. Ribatti ve diğ 1996; Vacca ve diğ 1999) . Tümör dokusu progresyonunu sağlaması için yeni kan damarlarının oluşumuna ihtiyaç olduğu bilinmektedir. Tümör hücresinin çoğalması oksijen ihtiyacını karşılayıp invaze olup metastaz yapabilmesi için anjiogeneze ihtiyaç vardır. (Folkman 1990; Ferrara 2000)

Anjiogenezi uyaran en önemli faktörler FGF ve VEGF olarak kaşımıza çıkmaktadır. (Fayette ve diğ 2005; Ferrara 2000)

FGF ailesi 24 üyeli bir aile olup 17-34 KDa ağırlığa sahip tirozin kinaz aktivitesi göstermektedir. Tirozin kinaz reseptör bölgesine affinitesi çok fazladır. Yapılan çalışmalar FGFR1 ve FGFR' nin endotel hücrelerinde proanjiogenezi uyardıkları deneysel olarak gösterilmiştir (Presta ve diğ 2005; Kashiwakura ve diğ 2005) .

FGF; tirozin kinaz reseptörüne bağlanarak mitojen aktif protein kinaz (MAPK) gibi intrasellüler kinazları uyararak aktivasyon sağlar. Bu aktivasyon, transkripsiyonel faktörleri uyararak mitojenik etki uyandırmaktadır (Allouche 1995). FGF reseptörleri aynı zamanda hematopoetik hücrelerin üzerinde de oldukça fazla sayıda yer aldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. (Avraham ve diğ 1994). FGF' in sinyal iletimindeki rollerinin dışında yapılan araştırmalar; yara iyileşmesi, yeni damar yapılarının oluşması ve tümörlerinin büyümesi ve gelişmesi gibi önemli fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynadığını göstermiştir. (Kashiwakura ve diğ. 2005)

Çalışmamızda elde etmiş olduğumuz FGF geni üzerine ilişkin ekspresyon seviyelerine baktığımızda; FGF geni üzerinde 50ul/ ml dozun 24 saat içinde bu genin ekspresyonun artırdığı gözlemlenmiştir. FGF hücre proliferasyonu, hücre migrasyonu ve diferansiyasyonu gibi çok önemli fonksiyonlara sahiptir. (Ornitz ve Itoh 2001) . Elde ettiğimiz verilerle FGF gen ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde; tirozin kinaz aktivitesi gösteren FGF' in anjiogenez başta olmak üzere pek çok büyüme faaliyetini başlatabileceği gözlemlenmiştir( Ornitz ve Itoh 2001). Anjiogenez etkisiyle hücre üzerinde gerçekleşecek tirozin kinaz aktivitesi sayesinde yeni tümöral yapıların oluşabilme süreci değerlendirilmeli ve gözlemlenmelidir.

Çalışmamızda kullandığımız bir diğer gen VEGF genidir. VEGFgeninin pek çok izoformu bulunmaktadır. Özellikle bu izo-formların akciğer, karaciğer, meme, over ve böbrek kanserlerinde ekspresyon seviyelerinin arttığı bilinmektedir. VEGF' de tıpkı FGF gibi etkisini tirozin kinaz reseptörleri üzerinden göstermektedir. VEGF reseptör 1 (VEGFR1) hematopoetik, myelom ve lösemik hücreler tarafından da eksprese edildiği çalışmalarla gösterilmiştir. Yapılan prelinik çalışmalarda immün sistemin anjiogenezini destekleyen ve hayvan deneylerinde, makrofaj, mast hücreleri ve nötrofiller tarafından sentezlenen metalloproteinaz-9 (MMP-9) 'un anjiogenezi ve tümör progresyonuna destek verdiği gösterilmiştir. Ayrıca anjiogenezle bağlantılı olduğu bilinen onkogen ve tümör

supresör genler değişik g-hematolojik malignitelerde rol oynadığı bilinmektedir. Ekstrasellüler matris (ESM) enzimleri anjiogenez sürecinde önemi rol üstlenmektedir. MMP-9, ESM' ye anjiogenik faktörlerin bağlanmasını artırır. MMP ekspresyonunun artışı akut lenfoblastik lösemi (ALL), akut Myeloid lösemi (AML) ve Non-Hodgkin Lenfoma (NHL) 'nın artırdığı gösterilmiştir (Moehler ve diğ. 2003) .

VEGF geni üzerindeki etkiyi incelediğimizde 24 saatlik dilimde 5 ve 100 ul/ ml etanersept dozlarında ekspresyon seviyelerinde artış izledik. VEGF geni; hücre adezyonunda, anjiogenezde, hücre dışında gerçekleşen matris degradasyonu ve yara iyileşmesi gibi çeşitli görevleri olduğu bilinmektedir (Byrne ve diğ. 2005, Kaiser 2006, Bhisitkul 2006). Elde ettiğimiz veriler ve yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde düşük veya yüksek dozda oluşan VEGF gen ekspresyon seviyelerindeki artışlar bize hematolojik malignitelerin oluşumunda etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Komplike ankilozan spondilit hastalarında da tedaviye NSAİİ ile başlanmış, son tedavi olarak anti-TNF tedavisi etanersept uygulanmıştır. Tedavi sürecinde ve 4 ay sonunda hastada akut miyeloid lösemi gelişimi gözlemlenmiştir (Moehler ve diğ. 2003). Elde ettiğimiz bulgularda özellikle FGF, VEGF gibi mitojenik faktörlerin ekspresyon seviyelerindeki artışlar; hücredeki hücre çoğalması üzerinde kanser hücrelerine dönüştürebilme potansiyelini barındırabilir.

Çalışmamızda ekspresyon seviyesini incelediğimiz bir diğer gen CDK 4'tür. CDK 4, hücre döngüsünün kontrolü; G1/S geçiş noktasındaki denetim, CDK 4 aktivitesinin düzenlenmesi; siklinlerin sentezine, fosforilasyonuna, defosforilasyonuna, parçalanmasına ve siklin bağlı kinaz inhibitörlerinin (CDKI) sentezine bağlı olarak düzenlenmektedir. (de Cárcer ve diğ. 2007) G1/s geçiş noktasında CDK kompleksinin oluşumuyla ve bu kompleksin otofosforilasyonu sonucunda aktifleşmesi, inhibitörlerle etkisiyle hücre döngüsünde inaktivasyon işlemlerinin gerçekleşmesi şekilde gelişir. (Caldon ve diğ. 2006; Meeran ve diğ. 2008) D tipi siklinler CDK4 ve CDK6' yı aktive ederek G1 de ilerleyişi sağlarlar. Retinoblastom geni ise hücre döngüsü içerisinde tümör baskılayıcı gen olarak işlev görür. CDK kompleksi RB proteinlerini fosforileyerek onu inaktif hale gelmesini ve Rb bağlı transkripsiyon uzamafaktörü-2 (E2F) ' yi serbest bırakır. E2F' de G1/S fazına geçişi ve S evresine giriş için siklin A1 ve CDK1 gibi genlerin aktivasyonu gerçekleşir. E2F aynı zamanda DNA sentezi onarımı ve bazı tümöral oluşum mekanizmalarında etkili rol oynadığı bilinmektedir. (Belenger ve diğ. 2005)

G1 düzenleyicisi olan CDK4' ün over kanser gelişiminde önemli rol oynadığı bu konuda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. (D'Andrilli ve diğ. 2004)

Yaptığımız araştırmada CDK-4 ekspresyon seviyelerinde; özellikle 48 saatin sonundaki uygulanan yüksek dozlarda anlamlı artışlar dikkati çekmektedir. CDK-4 hücre siklusunda kritik rol oynayan bir gen olduğu bilinmektedir. CDK4 hücre döngüsünden G1 evresi üzerinde katalitik bir etki göstermekte; bu evre D- tipi siklinler ve P16 alt birimler tarafından kontrolü sağlanmaktadır. (Stepanova ve diğ. 1996, Taules ve diğ. 1998) CDK 4 ekspresyonu hücrenin kontrolsüz çoğalmasına yola açabilmektedir.

Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda doza veya uzun süreli kullanıma bağlı olarak ekspresyon seviyelerindeki artış hücreler üzerinde kontrolsüz hücre çoğalmasına, tümoral oluşum mekanizmaları üzerine aktifleştirici bir etki yapabileceğini bize düşündürmektedir.

Ankilozan spondilit tedavisi gören hastalarda; anti- TNF tedavisini takiben ortalama 9 ay sonra hastalarda, lenfoma ve solid tümör oluşumları gözlemlenmiştir (Kılıç ve diğ. 2013) .

Çalışmamızda kullandığımız bir diğer gen, NF-kB ' dir. Hücre içi sinyal iletiminde oldukça önemli kilit bir role sahiptir. Hücre içi sinyal iletiminde, cAMP, cGMP, MAP Kinaz, JAK-STAT, Ca<sup>2+</sup>- kalmoldulin, Fosfolipaz-C, NF-kb yolları bulunmaktadır. (Kierszenbaum ve diğ 2007). NF-kB hücre proliferasyonu ve transkripsiyonunda rol alan önemli bir faktördür. 50 ve 65 kDa alt birimde oluşur. (Shishodia ve diğ. 2002) yapılan çalışmalar NF-kB' nin transkripsiyon faktörü olarak hücreye yanıtı aracılık ederek, kanser kaşeksisinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. (Bossola ve diğ 2008) Çalışmada elde ettiğimiz bulgularda Nf-kB ekspresyon seviyelerine baktığımızda 24 saat içinde 5 ve 50 ul/ µl dozlarda ekspresyon seviyelerindeki artış dikkati çekmiştir. Bununla birlikte 48 saatin sonunda ise 50 ve 100 ul/ µl dozlarda ekspresyon seviyelerinde önemli artışlar elde edilmiştir. Bu sonuç yüksek doz veya uzun süreli etanersept kullanımına bağlı olarak NF-kB gen ekspresyon seviyelerinde artışlar elde edebilme potansiyelini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızdaki ekspresyon seviyesini incelediğimizde bir diğer gen myc genidir. Büyümenin kontrolüne katılan anahtar intrasellüler yollara etkili olduğu bilinmektedir. MYC gen ekspresyonu, translokasyon, mutasyon veya over ekspresyon gibi genetik tabanlı değişikliklerde B hücreli lenfomalarda artışı saptandığı çalışmalarla gösterilmiştir (Catrina

ve diğ. 2005). SEB ile aktive edilen etanersept tedavisi gören hastalarda 48 saatin sonunda herhangi bir apoptotik etki gözlenmemiş; fakat 8 haftalık tedavi sürecinin sonunda in vitro sinyalin sıvıda monosit ve makrofajlar üzerine apoptotik etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Catrina ve diğ. 2005). Yapılan çalışmalardaki sonuçlar; biyolojik ajanların makrofaj apoptozunun indüksiyonun ortaya çıkarmaktadır (Tejima ve diğ. 2013) .

Etanerseptin myc geni ekspresyonu üzerine etkileri değerlendirdiğimizde 24 saatin sonunda anlamlı sonuç bulunmamış ancak saatin sonunda 50 ul / µl ve 100 ul / µl etanersept dozunda myc geni ekspresyon seviyelerinde anlamlı artışlar dikkati çekmiştir. Bu artış daha önce yapılan çalışmalarla kıyaslandığında myc gen ekspresyon seviyelerindeki artışların olası lenfoma veya malignite oluşumunu bize düşündürmektedir.

Elde edilen yukarıdaki tüm bu veriler değerlendirildiğinde; etanerseptin, anti- TNF etkili bir ajan olarak, uzun süreli kullanıma veya yüksek doza bağlı kullanımı kanser oluşturabilme potansiyelini düşündürmektedir.

Anti-TNF- $\alpha$  tedavisi günümüzde özellikle antienflamtuvar hastalıkların tedavisinde; özellikle yanıt alınamayan hastaların tedavisinde kullanımı her geçen gün artmaktadır. Çalışmada elde ettiğimiz tüm veriler ve yapılan araştırmalardaki diğer bulgularla kıyaslandığında; anti-TNF etkili etanerseptin farklı dozlarda ve farklı zaman dilimlerinde; hücre çoğalması üzerine olumsuz etkiler oluşturabileceği, özellikle yaptığımız çalışmada belirlemiş olduğumuz genlerden; hücre siklusunda büyüme üzerine etkili olan gen ekspresyonlarındaki anlamlı artışlar; etanerseptin uzun süreli kullanımına bağlı tümörle yapılarla birlikte ve malignite oluşumuna sebebiyet verebileceği düşündürmektedir. Ayrıca anti- TNF etkili biyolojik ajanların; enflamasyonda kilit role sahip TNF molekülünün etkisini inhibe ederek immün yanıtın oluşmasını engellediği bilinmektedir.

Sonuç olarak anti- TNF etkili ajanlardan olan etanerseptin hücre çoğalması üzerine yaptığımız bu çalışmada hücre çoğalması üzerine etkili genlerin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Büyüme faktörleri ve sitokinler hücre yüzeyindeki sitokinler üzerinden etkilerini göstererek hücre içindeki sinyal iletimini gerçekleştirirler. Bu sayede hücre üzerinde pozitif veya negatif yanıtların oluşması sağlanmaktadır. Bu mekanizmaların hücrelerdeki gen ekspresyonuna bağlı olarak malign hale gelebilmesi için yeterli olmayabilir ancak hücre transformasyonuna yol açabileceği değerlendirilmelidir. Mekanizmaların çözümlenmesi hücrelerin, kontrolsüz hücre çoğalması olarak adlandırılan

kanserleşme sürecinde, tedavilerin gelişimine ışık tutacağı ve yarar sağlayacağı düşünülmektedir.



## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

TNF- $\alpha$  organizmada oluşan olası inflamatuvar ve enfeksiyon tablosunda, organizmadaki pek çok hücre tarafından üretimi gerçekleşen sitokinlerin başında gelmektedir. Önemli reaksiyonların başlamasında ve devamında etkili rol oynayan TNF- $\alpha$ , özellikle son yıllarda antiinflamatuvar hastalıkların tedavisinde etkin olarak kullanılmaya başlanmıştır. Hastalıkların tedavisinde anti-TNF- $\alpha$ 'nın etkin rol oynadığı görülse de olası yan etkilerin ortaya çıktığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Bundan sonraki süreçte anti-TNF etkili ajanların, yapılacak tedavi öncesi olası etkilerinin belirlenmesi adına doza bağımlı veya uzun süreli kullanımına bağlı, gerek hücre çoğalması, gerekse olası kanserojen etkileri bertaraf edebilecek detaylı araştırmalar yapılarak uygulanan tedavilerin daha etkin olması sağlanmalıdır. Anti-TNF- $\alpha$ 'nın doza veya uzun süreli kullanıma bağlı etkiler daha iyi araştırılarak kapsamlı moleküler çalışmaların yapılması önerilmektedir.

## 7. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Allouche M. Basic fibroblast growth factor and hematopoiesis. *Leukemia*. 1995;9(6):937-42. (Erişim: Kasım 2017)
2. Ammann P, Rizzoli R, Bonjour J-P, ve diğ. Transgenic mice expressing soluble tumor necrosis factor-receptor are protected against bone loss caused by estrogen deficiency. *Journal of Clinical Investigation*. 1997; 99: 1699. (Erişim: Aralık 2017)
3. Antoni C, Braun J. Side effects of anti-TNF therapy: current knowledge. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:S152-7. (Erişim: Kasım 2017)
4. Arasıl T, Atalay F, Biberoglu S. Osteoporoz (2. Baskı). Güneş Kitabevi, Ankara, 2005. (Erişim: Aralık 2017)
5. Au K, Reed G, Curtis JR, Kremer JM, Greenberg JD, Strand V, Fursr DE. High disease activity is associated with an increased risk of infection in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:785-91. (Erişim: Aralık 2017)
6. Avraham H, Banu N, Scadden DT, Abraham J, Groopman JE. Modulation of megakaryocytopoiesis by human basic fibroblast growth factor. *Blood*. 1994;83(8):2126-32. (Erişim: Kasım 2017)
7. Begley S "DNA pioneer James Watson takes aim at cancer establishments". (2013-01-09). (Erişim: Aralık 2017)
8. Bélanger H, Beaulieu P, Moreau C, Labuda D, Hudson TJ, Sinnett D. Functional promoter SNPs in cell cycle checkpoint genes. *Human molecular genetics*. 2005;14(18):2641-8. (Erişim: Kasım 2017)
9. Bolster MB, Silver RS. Clinical features of systemic sclerosis. Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH (Ed) *Rheumatology*. Mosby Elsevier, Philadelphia, 2011. (Erişim: Kasım 2017)
10. Bossola M, Pacelli F, Tortorelli A, Rosa F, Doglietto GB. Skeletal muscle in cancer cachexia: the ideal target of drug therapy. *Current cancer drug targets*. 2008;8(4):285-98. (Erişim: Aralık 2017)
11. Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, ve diğ. A physical and functional map of the human TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signal transduction pathway. *Nature Cell Biology*. 2004; 6: 97-105. (Erişim: Aralık 2017)
12. Bradley J. TNF- mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology*. 2008; 214: 149-60. (Erişim: Kasım 2017)



13. Braun Jv, Van Den Berg R, Baraliakos X, ve diğ. 2010 update of the ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic diseases*. 2011; 70: 896-904. (Erişim: Aralık 2017)
14. Caldon CE, Daly RJ, Sutherland RL, Musgrove EA. Cell cycle control in breast cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2006;97(2):261-74. (Erişim: Aralık 2017)
15. Catrina AI, Trollmo C, af Klint E, et al. Evidence that anti-tumor necrosis factor therapy with bothetanersept and infliximab induces apoptosis in macrophages, but not lymphocytes, in rheumatoid arthritis joints: extended report. *Arthritis Rheum*. 2005; 52: 61-72. (Erişim: Kasım 2017)
16. Cho KG, Hoshino T, Nagashima T, Murovic JA and Wilson CB. Prediction of tumor doubling time in recurrent meningiomas: cell kinetics studies with bromodeoxyuridine labeling. *Journal of Neurosurgery*. 1986; 65: 790-4. (Erişim: Aralık 2017)
17. Coates LC, Kavanaugh A, Ritchlin CT and Committee GTG. Systematic review of treatments for psoriatic arthritis: 2014 update for the GRAPPA. *The Journal of Rheumatology*. 2014; 41: 2273-6. (Erişim: Aralık 2017)
18. Cooper GM, Hausman RE. *The cell: a molecular approach* (3.baskı). Sinauer Associates, Washington, 2003. (Erişim: Kasım 2017)
19. Cush JJ, Kavanaugh A. (Ed) *TNF- $\alpha$  blocking therapies*. Hochberg MC Silman AJ Smolen JS (Ed) *Rheumatology*. Mosby Elsevier, Philadelphia, 2008. (Erişim: Aralık 2017)
20. Cush JJ. Unusual toxicities with TNF inhibition: heart failure and drug-induced lupus. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22:S141-7. (Erişim: Aralık 2017)
21. D'Andrilli G, Kumar C, Scambia G, Giordano A. Cell cycle genes in ovarian cancer. *Clinical cancer research*. 2004;10(24):8132-41. (Erişim: Aralık 2017)
22. de Cárcer G, Perez de Castro I, Malumbres M. Targeting cell cycle kinases for cancer therapy. *Current medicinal chemistry*. 2007;14(9):969-85. (Erişim: Aralık 2017)
23. Dehay C and Kennedy H. Cell-cycle control and cortical development. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007; 8: 438-50. (Erişim: Kasım 2017)
24. Dinarello CA. Differences between anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibodies and soluble TNF receptors in host defense impairment. *The Journal of Rheumatology Supplement*. 2005; 74: 40-7. (Erişim: Kasım 2017)

25. Doğanavşargil E, Gümüşdiş G, Akkoç N, ve diğ. Klinik Romatoloji. *İstanbul, Deniz Matbaası, Ege Romatoloji*. 1999: 467-74. (Erişim: Aralık 2017)
26. Doran Mf, Crowson CS, Pond GR, O'Fallon WM, Gabriel SE. Frequency of infection in patients with rheumatoid arthritis compared with controls: a population-based study. *Arthritis Rheum*. 2002;46:2287-93. (Erişim: Kasım 2017)
27. Fayette J, Soria J-C, Armand J-P. Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment. *European Journal of Cancer*. 2005;41(8):1109-16. (Erişim: Aralık 2017)
28. Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Current opinion in biotechnology*. 2000;11(6):617-24. (Erişim: Kasım 2017)
29. Finver SN, Nishikura K, Finger LR, Haluska FG, Finan J, Nowell PC, Croce CM (May 1988). "Sequence analysis of the MYC oncogene involved in the t(8;14)(q24;q11) chromosome translocation in a human leukemia T-cell line indicates that putative regulatory regions are not altered". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85 (9): 3052-6. (Erişim: Aralık 2017)
30. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267:10931-10934 (Erişim: Aralık 2017)
31. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *New England Journal of Medicine*. 1995;333(26):1757-63. (Erişim: Aralık 2017)
32. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1990;82(1):4-7. (Erişim: Aralık 2017)
33. Gearhart J, Pashos EE, Prasad MK (October 2007). "Pluripotency redux--advances in stem-cell research". *The New England Journal of Medicine*. 357 (15): 1469-72. PMID 17928593. (Erişim: Kasım 2017)
34. Golias C, Charalabopoulos A and Charalabopoulos K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *International Journal of Clinical Practice*. 2004; 58: 1134-41. (Erişim: Kasım 2017)
35. Gossec L, Smolen J, Ramiro S, ve diğ. European League Against Rheumatism (EULAR) recommendations for the management of psoriatic arthritis with pharmacological therapies: 2015 update. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2015: annrheumdis-2015-208337. (Erişim: Aralık 2017)
36. Gowdie PJ and Shirley M. Juvenile idiopathic arthritis. *Pediatric Clinics of North America*. 2012; 59: 301-27. (Erişim: Kasım 2017)

37. Güler-Yüksel M, Bijsterbosch J, Goekoop-Ruiterman Y, ve diğ. Bone mineral density in patients with recently diagnosed, active rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2007; 66: 1508-12. (Erişim: Aralık 2017)
38. Guzman J, Oen K, Tucker LB, ve diğ. The outcomes of juvenile idiopathic arthritis in children managed with contemporary treatments: results from the ReACCh-Out cohort. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2015; 74: 1854-60. (Erişim: Kasım 2017)
39. Harris Jr ED. Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. *New England Journal of Medicine*. 1990; 322: 1277-89. (Erişim: Kasım 2017)
40. Haugeberg G, Ørstavik RE, Uhlig T, Falch JA, Halse JI and Kvien TK. Bone loss in patients with rheumatoid arthritis: results from a population- based cohort of 366 patients followed up for two years. *Arthritis & Rheumatology*. 2002; 46: 1720-8.
41. Helmick CG, Felson DT, Lawrence RC, ve diğ. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States: Part I. *Arthritis & Rheumatology*. 2008; 58: 15-25. (Erişim: Kasım 2017)
42. Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH. *Rheumatology* (5. baskı). Philadelphia: Elsevier, 2011. (Erişim: Aralık 2017)
43. Horneff G, Ebert A, Fitter S, ve diğ. Safety and efficacy of once weekly etanercept 0.8 mg/kg in a multicentre 12 week trial in active polyarticular course juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology*. 2009; 48: 916-9. (Erişim: Kasım 2017)
44. Joyce D, Albanese C, Steer J, Fu M, Bouzahzah B and Pestell RG. NF-κB and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2001; 12: 73-90. (Erişim: Aralık 2017)
45. Kashiwakura I, Takahashi T. Fibroblast growth factor and ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells. *Leukemia & lymphoma*. 2005;46(3):329-33. (Erişim: Aralık 2017)
46. Kessler EA and Becker ML. Therapeutic advancements in juvenile idiopathic arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 2014; 28: 293-313. (Erişim: Aralık 2017)
47. Kierszenbaum AL, Tres L. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology E-Book*: Elsevier Health Sciences; 2015. (Erişim: Aralık 2017)
48. Kilic E, Kilic G, Akgul O, Akgol G, Ozgocmen S. The reported adverse effects related to biological agents used for the treatment of rheumatic diseases in Turkey. *Turkish Journal of Rheumatology* 2013; 28(3): 149-162 (Erişim: Aralık 2017)

49. Laan RF, Van Riel P and Van de Putte L. Bone mass in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1992; 51: 826. (Erişim: Kasım 2017)
50. Lipnick R, Tsokos G and Magilavy D. Immune abnormalities in the pathogenesis of juvenile rheumatoid arthritis. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*. 1991; 17: 843-57. (Erişim: Kasım 2017)
51. Locksley RM, Killeen N and Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001; 104: 487-501. (Erişim: Aralık 2017)
52. Longo D. *Harrison's Hematology and oncology* (1.baskı). McGrawHill Professional; Hong Kong, 2010. (Erişim: Aralık 2017)
53. Makay B, Unsal E and Kasapcopur O. Juvenile idiopathic arthritis. *World*. 2013; 3: 16-24. (Erişim: Kasım 2017)
54. Meeran SM, Katiyar SK. Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2008;13:2191. (Erişim: Aralık 2017)
55. Menter A, Gottlieb A, Feldman SR, ve diğ. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2008; 58: 826-50. (Erişim: Aralık 2017)
56. Moehler T, Ho A, Goldschmidt H, Barlogie B. Angiogenesis in hematologic malignancies. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2003;45(3):227-44. (Erişim: Aralık 2017)
57. Mohler KM, Torrance D, Smith C, ve diğ. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *The Journal of Immunology*. 1993; 151: 1548-61. (Erişim: Aralık 2017)
58. Pennica D, Hayflick JS, Bringman TS, Palladino MA and Goeddel DV. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985; 82: 6060-4. (Erişim: Aralık 2017)
59. Popa C, Netea MG, Van Riel PL, van der Meer JW and Stalenhoef AF. The role of TNF- $\alpha$  in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *Journal of Lipid Research*. 2007; 48: 751-62. (Erişim: Aralık 2017)

60. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine & growth factor reviews*. 2005;16(2):159-78. (Erişim: Kasım 2017)
61. Prince FH, Twilt M, Jansen-Wijngaarden NC and van Suijlekom-Smit LW. Effectiveness of an once weekly double dose of etanercept in patients with JIA: a clinical study. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2007. (Erişim: Kasım 2017)
62. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Fanelli M, Roncali L, Dammacco F. Angiogenesis spectrum in the stroma of B-cell non-Hodgkin's lymphomas. An immunohistochemical and ultrastructural study. *European journal of haematology*. 1996;56(1-2):45-53. (Erişim: Kasım 2017)
63. Rudwaleit M, Listing J, Brandt J, Braun J and Sieper J. Prediction of a major clinical response (BASDAI 50) to tumour necrosis factor  $\alpha$  blockers in ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2004; 63: 665-70. (Erişim: Aralık 2017)
64. Saag KG, Teng GG, Patkar NM, ve diğ. American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care & Research*. 2008; 59: 762-84. (Erişim: Aralık 2017)
65. Schmeling H, Minden K, Foeldvari I, Ganser G, Hospach T and Horneff G. Efficacy and safety of adalimumab as the first and second biologic agent in juvenile idiopathic arthritis: the German Biologics JIA Registry. *Arthritis & Rheumatology*. 2014; 66: 2580-9. (Erişim: Aralık 2017)
66. Senderowicz AM and Sausville EA. Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000; 92: 376-87. (Erişim: Aralık 2017)
67. Shealy D, Cai A, Lacy E, Nesspor T, Staquet K and Johns L. Characterization of golimumab (CNTO 148), a novel fully human monoclonal antibody specific for TNF. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2007; 66: 151. (Erişim: Aralık 2017)
68. Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Research*. 2000; 60: 3689-95. (Erişim: Kasım 2017)
69. Shishodia S, Aggarwal BB. Nuclear factor- $\kappa$ B activation: a question of life or death. *BMB Reports*. 2002;35(1):28-40. (Erişim: Kasım 2017)

70. Simmonds RE and Foxwell BM. Signalling, inflammation and arthritis: NF- $\kappa$  B and its relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology*. 2008; 47: 584-90. (Erişim: Aralık 2017)
71. Solovic I, Sester M, Gomez-Reino JJ, Rieder HL, Ehlers S, Milburn HJ, Kampmann B et al. The risk of tuberculosis related to tumour necrosis factor Antagonist therapies: a TBNET consensus statement. *Eur Respir J*. 2010;36:1185-206. (Erişim: Aralık 2017)
72. Tejima S, Tono T, Nagai T, et al. Differential in vitro effects of biological agents on cytokine production of peripheral blood mononuclear cells. *Kitasato Med J* 2013; 43: 126-32. (Erişim: Kasım 2017)
73. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG and Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics*. 2008; 117: 244-79. (Erişim: Aralık 2017)
74. Tütüncü Z, Kavanaugh A. Antisitokin Tedaviler. Arasil T (Ed). *Kelley Romatoloji*. Güneş Kitapevi, Ankara, 2006. (Erişim: Aralık 2017)
75. Tyagi AK, Singh RP, Agarwal C, Chan DC and Agarwal R. Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth Inhibition, G2-M arrest, and apoptosis. *Clinical Cancer Research*. 2002; 8: 3512-9.
76. Vacca A, Ribatti D, Fanelli M, Costantino F, Nico B, Stefano RD, et al. Expression of tenascin is related to histologic malignancy and angiogenesis in b-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia & lymphoma*. 1996;22(5-6):473-81. (Erişim: Kasım 2017)
77. Vacca A, Ribatti D, Presta M, Minischetti M, Iurlaro M, Ria R, et al. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood*. 1999;93(9):3064-73. (Erişim: Kasım 2017)
78. van de Putte LBA, Salfeld J, Kaymakcalan Z.. Adalimumab. Moreland LW, Emery P (Ed) *TNF-inhibition in the treatment of rheumatoid arthritis*. London, Martin Dunitz, 2003. (Erişim: Aralık 2017)
79. van den Berg R, Baraliakos X, Braun J and van der Heijde D. First update of the current evidence for the management of ankylosing spondylitis with non-pharmacological treatment and non-biologic drugs: a systematic literature review for the ASAS/EULAR management recommendations in ankylosing spondylitis. *Rheumatology*. 2012; 51: 1388-96. (Erişim: Aralık 2017)

80. Van Der Linden S and Van Der Heijde D. Ankylosing spondylitis: clinical features. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 1998; 24: 663-76. (Erişim: Aralık 2017)
81. Wajant H, Pfizenmaier K and Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death & Differentiation*. 2003; 10: 45-65. (Erişim: Kasım 2017)
82. Wallis RS. Tumour necrosis factor antagonists: structure, function, and tuberculosis risks. *The Lancet Infectious Diseases*. 2008; 8: 601-11. (Erişim: Aralık 2017)
83. Weisman MH RJ, Heijde D. Ankilozan Spondilit ve Spondiloartropatiler. Veri Medikal Yayıncılık, Ankara, 2008. (Erişim: Kasım 2017)
84. Weiss HA, Darby SC, Fearn T, Doll R. Leukaemia mortality after X- ray treatment for ankylosing spondylitis. *Radiat Res* 1995;142:1–11. (Erişim: Aralık 2017)
85. Zochling J, van der Heijde D, Dougados M and Braun J. Current evidence for the management of ankylosing spondylitis: a systematic literature review for the ASAS/EULAR management recommendations in ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2006; 65: 423-32. (Erişim: Kasım 2017)

## 8. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Arda	<b>Soyadı</b>	KEBAPCI
<b>Doğ.Yeri</b>	İstanbul	<b>Doğ.Tar.</b>	09/01/1983
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kim No</b>	29797922210
<b>Email</b>	arda_kebapci@yahoo.com	<b>Tel</b>	0 (533)442 33 35

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Yük.Lis.</b>		
<b>Lisans</b>	İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler	2005

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Öğretim Görevlisi	İstanbul Şişli Meslek Yüksek Okulu	2014 - Devam ediyor
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	YDS/Yökdil	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	İyi	50	

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	71,83175	71,45031	60.126
(Diğer) Puanı			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok İyi
İnternet	Çok İyi



### **Yayın / Poster Bildiri**

1. T.C. İstanbul Şişli Meslek Yüksekokulundaki Öğrencilerin Çevresel Riskler Konusundaki Duyarlılıklarının Araştırılması. Mehel Tutuk S.P., Kebapçı A., Yıldırım G., III. Ulusal Şişli Sempozyumu 5-6 Mayıs 2017, (Poster Bildiri)
2. Radyasyon onkolojisinde çalışan sağlık personelinin radyasyondan korunmaya yönelik iş sağlığı ve güvenliği açısından bilgi ve davranışlarının değerlendirilmesi. Kebapçı A., Mehel Tutuk S.P., Yıldırım G., II. Ulusal Şişli Sempozyumu 4-5 Mayıs 2016, (Poster Bildiri)



## 9. EKLER

### EK-10

Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen çizimde (yazının yönüne dikkat!) ad, program, yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun çizimde hazırlandı (kazanılan unvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü Müdürü'nün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- Ön sayfalara i, ii, iii şeklinde Roma rakamları konuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- Ana metin yazı boyutu 12 olacak biçimde basıldı.
- Dipnot yazı boyutu 10 olacak şekilde basıldı.
- Ana metin satır aralığı 1.5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar abecesel sıralamaya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.

..... / ..... / 2018

Danışman

İmza

Doç. Dr. Emel Ergül