T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ
ANABİLİM DALI

İNTESTİNAL EPİTEL HÜCRELERİNDE TROKSERUTİN UYGULAMASININ *SALMONELLA* MARUZİYETİNDE İNFLAMMAZOM MEKANİZMALARI ÜZERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hazırlayan
Neriman LÖKER

Danışman
Doç. Dr. Serhat AL

Yüksek Lisans Tezi

Ocak 2026
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ
ANABİLİM DALI

İNTESTİNAL EPİTEL HÜCRELERİNDE TROKSERUTİN UYGULAMASININ *SALMONELLA* MARUZİYETİNDE İNFLAMMAZOM MEKANİZMALARI ÜZERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hazırlayan
Neriman LÖKER

Danışman
Doç. Dr. Serhat AL

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2024-14149 kodlu proje ile desteklenmiştir

Yüksek Lisans Tezi

Ocak 2026
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Neriman LÖKER

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK

"İntestinal Epitel Hücrelerinde Trokserutin Uygulamasının *Salmonella* Maruziyetinde İnflammazom Mekanizmaları Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi" adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Neriman LÖKER

Danışman
Doç. Dr. Serhat AL

Veterinerlik Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Yeliz UÇAR

KABUL ve ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Serhat AL danışmanlığında **Neriman LÖKER** tarafından hazırlanan "**İntestinal Epitel Hücrelerinde Trokserutin Uygulamasının *Salmonella* Maruziyetinde İnflammazom Mekanizmaları Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi"** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında **Yüksek Lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

…/…/…

JÜRİ **İmza**

Danışman: Doç. Dr. Serhat AL

Üye: Prof. Dr. Zafer GÖNÜLALAN

Üye: Prof. Dr. Neriman İNANÇ

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun …….. tarih ve …….. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

……/…../…

Prof. Dr. Aydın ALAN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Kendimi geliştirmem için sunduğu imkanlardan ve gerek bu tez projesi gerek diğer çalışmalarda sağladığı desteklerden ötürü tez danışmanım Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Serhat AL'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca TYL-2024-14149 proje numaralı tez projemi destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve Birim Personeline, tez çalışmamda ve birçok konuda bana destek olan ekip arkadaşım Hazal ÇOBUR'a, yüksek lisans sürecimin ilk gününden beri beni yanından ayırmayan Adalet DIŞHAN'a ve en önemlisi çalışmalarım süresince birçok fedakârlıklar gösterip, bana maddi ve manevi her şekilde destek olan, yaşamımın her döneminde bana duydukları güven için anneme, babama ve kardeşlerime en derin duygularla teşekkür ederim.

Neriman LÖKER

Kayseri, Ocak 2026

İNTESTİNAL EPİTEL HÜCRELERİNDE TROKSERUTİN UYGULAMASININ *SALMONELLA* MARUZİYETİNDE İNFLAMMAZOM MEKANİZMALARI ÜZERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Neriman LÖKER

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2026
Danışman: Doç. Dr. Serhat AL

ÖZET

Gıda kaynaklı *Salmonella* enfeksiyonları, intestinal epitel hücrelerinde invazyon ve intestinal dokularda inflamatuar ve hücre ölümü yanıtlarını tetikleme kapasiteleri nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunudur. Antioksidan ve antiinflamatuar özelliklere sahip olduğu bildirilen nutrasötik bileşikler, bağırsak lümeninde konak-patojen etkileşimlerini hafifletmek için potansiyel yardımcı stratejiler olarak giderek artan bir ilgi görmektedir. Bir flavonoid türevi olan trokserutin (TRX), epitel bağışıklık yanıtlarını modüle etmeye aday bir molekül olarak dikkat çekmektedir. Bununla birlikte, *Salmonella*-epitel etkileşimleri üzerindeki mekanistik etkisinin tam olarak belirlenmediği görülmektedir. Bu yüksek lisans tezinde, in vitro *Salmonella* maruziyetinde TRX'in insan epitel hücre hatlarında inflamatuar sinyalizasyon, inflammazom ilişkili yolaklar, apoptotik yanıtlar ve bakteriyel invazyon üzerindeki etkilerini sistematik olarak değerlendirilmesi amaçlandı. Bu amaçla in vitro uygun koşullarda kültüre edilen insan kolorektal adenokarsinoma (Caco-2) hücre hatları *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 ile enfeksiyon çokluğu (MOI) ~50 düzeyinde enfekte edildi. Daha sonra kurgulanan araştırma gruplarında gentamisin koruma deneyi ile invaze canlı *Salmonella* düzeyleri kontrol ve TRX uygulanan gruplarda karşılaştırılarak TRX'in bakteriyel invazyon üzerine etkisi araştırıldı. Uygulanan TRX dozunun sitotoksik güvenliği MTT analizleri ile belirlendi. Bu iş paketlerinin yanı sıra *Salmonella* maruziyetinden bir saat önce araştırma grubu olarak kurgulanan hücre hatlarına TRX ön uygulaması yapıldı. *Salmonella* uygulamasından (post-enfeksiyon; PI) altı saat sonra hücre hatlarından total RNA ve protein örnekleri elde edildi. Total RNA izolatları transkriptom ve RT-qPCR analizlerine tabi tutuldu. Çalışmada RNA tabanlı ekspresyon analizlerinde inflammazom (NLRC4, NLRP3, CASP4 ve CASP5) ve doğal yanıt ilişkili sitokin ve kemokinler (TNF-α, NF-κB, IL-1β ve IL-18) hedef alındı. Protein lizatları ise GSDMD protein ekspresyonu ve aktivasyonu analizleri için western blotting analizlerinde değerlendirildi. Enfeksiyon sonrası aynı inkübasyon süresi sonrasında hücreler uygun şekilde elde edilerek total apoptotik yüzdelerin belirlenmesi amacıyla Annexin V/propidium iyodür boyama kullanılarak akış sitometrisi analizleri gerçekleştirildi. Tüm deneysel sonuçlarda, TRX uygulamasının, tedavi edilmemiş enfekte kontrollerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklara yol açmadığı belirlendi ($P > 0,05$). Transkripsiyonel analizler, doğal yanıt reseptörleri,

hücre içi inflammazom sensörleri, inflamatuar sitokinler ve kaspaz genleri için kararlı ekspresyon profilleri ortaya koydu ve katlanma değişim değerleri başlangıç değerlerine yakın kaldığı gözlendi. Benzer şekilde, TRX uygulamasının PI altıncı ve 12. saatlerinde toplam apoptotik hücre oranlarını istatistiksel olarak önemli ölçüde değiştirmediği ve *Salmonella*'nın epitel hücrelerine invazyon düzeylerini etkilemediği belirlendi ($P > 0,05$). Özellikle, bağımsız deneylerdeki bütüncül olarak bulguların tutarlılığı, uygulanan deneysel koşullar altında epitel inflamatuar sinyal mekanizmaları, apoptoz yanıtları veya bakteriyel invazyon üzerinde TRX'in ölçülebilir bir modülatör etki göstermediği sonucunu desteklemektedir. Bu bulgular, TRX'in *Salmonella* enfeksiyonu sırasında intestinal epitel hücrelerinde doğrudan immünomodülatör etki göstermediğini veya etkilerin kurgulanan deneysel dizaynda gözlenmediği düşünülmektedir. Bu hususta olası açıklamalar arasında epitel doğal yanıtın, uygulanan doz ve MOI gerekçeli oluşan enfeksiyon doygunluğu nedeniyle olabileceği görülmektedir. Gelecekteki çalışmalarda, TRX'in kompleks biyolojik ilişkileri daha yakından yansıtan koşullar altında immünomodülatör etkiler gösterip göstermediğini belirlemek için alternatif hücre hatlarında veya in vivo modellerde araştırılmasını gerekli olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, besin takviyesi-konak-patojen etkileşimlerinin mekanistik olarak temellendirilmiş bir anlayışına katkıda bulunarak fonksiyonel gıda ve enfeksiyon biyolojisi araştırmalarında titiz, çok boyutlu değerlendirmenin önemini vurgulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Caco-2 hücre hatları; Konak-patojen interaksiyonu; İnflammazom; Trokserutin; *Salmonella* Typhimurium

EVALUATION OF THE EFFECTS OF TROXERUTIN ADMINISTRATION ON INFLAMMASOME ACTIVATION IN *SALMONELLA* EXPOSED INTESTINAL EPITHELIAL CELLS

Neriman LÖKER

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Veterinary Food Hygiene and Technology
M.Sc. Thesis, January 2026
Supervisor: Assoc. Prof. Serhat AL

ABSTRACT

Foodborne *Salmonella* infections are a significant public health problem due to their capacity to invade intestinal epithelial cells and trigger inflammatory and cell death responses in intestinal tissues. Nutraceutical compounds, reported to possess antioxidant and anti-inflammatory properties, are attracting increasing interest as potential supportive strategies to mitigate host-pathogen interactions in the intestinal lumen. Troxerutin (TRX), a flavonoid derivative, is a promising molecule for modulating epithelial immüne responses. However, its mechanistic effect on *Salmonella*-epithelial interactions appears not to be fully determined. This master's thesis aimed to systematically evaluate the impact of TRX on inflammatory signaling, inflammasome-related pathways, apoptotic responses, and bacterial invasion in human epithelial cell lines exposed to *Salmonella* under in vitro conditions. For this purpose, human colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cell lines cultured in vitro under suitable conditions were infected with *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 at a multiplicity of infection (MOI) level of ~50, Subsequently, in the designed research groups, the levels of invasive live *Salmonella* were compared in the control and TRX-treated groups using a gentamicin protection assay to investigate the effect of TRX on bacterial invasion. MTT assays were used to determine the cytotoxic safety of the applied TRX dose. In addition to these work packages, TRX pre-treatment was performed on the cell lines designed by the research group one hour before *Salmonella* exposure. Total RNA and protein samples were obtained from the cell lines six hours after *Salmonella* administration (post-infection; PI). Total RNA isolates were subjected to transcriptome and RT-qPCR analyses. In this study, RNA-based expression analyses targeted inflammasomes (NLRC4, NLRP3, CASP4, and CASP5) and natural response-related cytokines and chemokines (TNF-α, NF-κB, IL-1β, and IL-18). Protein lysates were evaluated using western blotting to analyze GSDMD protein expression and activation. After the infection and the same incubation period, cells were appropriately obtained, and flow cytometry analyses were performed using Annexin V / propidium iodide staining to determine the total apoptotic percentages. In all experimental results, it was determined that TRX application did not lead to statistically significant differences when compared to untreated infected controls ($P > 0.05$). Transcriptional analyses revealed stable expression profiles for natural

response receptors, intracellular inflammasome sensors, inflammatory cytokines, and caspase genes, with folding change values remaining close to baseline values. Similarly, it was determined that TRX administration did not statistically significantly alter the total apoptotic cell ratios at the 6th and 12th hours of PI and did not affect the level of *Salmonella* invasion into epithelial cells ($P > 0.05$). Specifically, the overall consistency of findings across independent experiments supports the conclusion that TRX does not exhibit a measurable modulatory effect on epithelial inflammatory signaling mechanisms, apoptosis responses, or bacterial invasion under the experimental conditions applied. These findings suggest that TRX does not exhibit a direct immunomodulatory effect on intestinal epithelial cells during *Salmonella* infection, or that the effects were not observed in the experimental design. Possible explanations for this include the epithelial innate response being due to infection saturation resulting from the applied dose and MOI. Further studies are necessary to investigate whether TRX exhibits immunomodulatory effects in alternative cell lines or in vivo models under conditions that more closely reflect complex biological relationships. These results contribute to a mechanistically grounded understanding of supplement-host-pathogen interactions, highlighting the importance of rigorous, multidimensional evaluation in functional food and infection biology research.

Keywords: Caco-2 cell lines; Host-pathogen interactions; Inflammasome; Troxerutin; *Salmonella Typhimurium*

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK .....
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ii
KABUL ve ONAY SAYFASI iii
TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER ix
KISALTMALAR ve SİMGELER xi
TABLO LİSTESİ xvi
ŞEKİL LİSTESİ xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. NUTRASÖTİKLER 4
2.2. TROKSERUTİN (TRX) 7
2.3. *SALMONELLA* 13
2.3.1. Virülans Faktörler 16
2.3.2. Salmonellozisin Gıda Hijyeni Açısından Önemi 21
2.4. GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE LİPOPOLİSAKKARİT (LPS) 23
2.5. PATERN TANIMA RESEPTÖRLERİ (PRR; PATTERN RECOGNITION RECEPTORS) 26
2.5.1. Patojenle İlişkili Moleküler Model (PAMP; Pathogen-Associated Molecular Pattern) 28
2.5.2. Hasar İlişkili Moleküler Model (DAMP; Damage-Associated Molecular Pattern) 28
2.6. TOLL BENZERİ RESEPTÖRLER (TLR; TOLL-LIKE RECEPTORS) .. 29
2.7. TLR4 MEKANİZMASI VE LPS 31
2.8. İNFLAMMAZOMLAR 34
2.9. KASPAZLAR 39
2.10, GASDERMİNLER 41
2.11. LPS-TLR4 MEKANİZMASINDA CASP4/5 VE GSDMD İLİŞKİSİ 44

3. GEREÇ VE YÖNTEM 48
3.1. KONAK HÜCRE HATLARININ HAZIRLANMASI 48
3.2. TROKSERUTİN İÇİN DOZ BELİRLEME 49
3.3. TRX'İN KONAK HÜCRELERE BAKTERI İNVAZYONU ÜZERINE ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ 50
3.4.TRANSKRİPTOM ANALİZLERİ 50
3.4.1.RNA-Dizileme Kütüphane Hazırlığı ve Dizileme Reaksiyonu 51
3.4.2.Biyoinformatik Analizler 51
3.4.3.Transkriptom Analiz Sonuçlarının RT-qPCR ile Validasyonu 53
3.5. KONAK HÜCRE APOPTOZ ÖLÇÜMÜ 55
3.6. WESTERN BLOTTING İLE GASDERMİN D PROTEİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜLMESİ 55
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER 56
4. BULGULAR 57
4.1. TROKSERUTİN UYGULAMA DOZUNUN VE SİTOTOKSİK KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ 57
4.2. TRX'İN KONAK HÜCRELERE BAKTERI İNVAZYONU ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ 58
4.3. GEN EKSPRESYONU SONUÇLARI 58
4.4. TRANSKRİPTOMİK ANALİZLER 61
4.5. GSDMD PROTEİN EKSPRESYONU ÜZERİNE TROKSERUTİNİN ETKİSİ 72
4.6. KONAK HÜCRE APOPTOZU ÜZERİNE TROKSERUTİNİN ETKİSİ 73
5. TARTIŞMA 75
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 85
7. KAYNAKLAR 88
EKLER
ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR ve SİMGELER

AvrA	: *Salmonella* Tip III Sekresyon Sistemi Efektör Proteini
Bax	: Bcl-2 İlişkili X Proteini
Bcl-2	: B Hücre Lenfoma 2 Proteini
B	: Beta
BMI	: Beden Kitle İndeksi
Aβ	: Amiloid Beta
ABCA1	: ATP Bağlayıcı Kaset Taşıyıcı A1
ACSL1	: Uzun Zincirli Açil-CoA Sentetaz 1
ACTB	: Aktin Beta, Referans Gen
AJ	: Adherens Junction (Bağlantı Kompleksleri)
AKT	: Serin/Treonin Protein Kinaz Yolu Proteini
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AMPK	: AMP ile Aktive Olan Protein Kinaz
ANOVA	: Varyans Analizi Yöntemi
Apaf-1	: Apoptoz Aktivasyon Faktörü 1
ATCC	: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
ATP	: Adenozin Trifosfat
BSA	: Sığır Serum Albümini
CASP1	: Kaspaz-1
CASP3	: Kaspaz-3
CASP4	: Kaspaz-4
CASP5	: Kaspaz-5
CASP6	: Kaspaz-6
CASP7	: Kaspaz-7
CASP8	: Kaspaz-8
CASP9	: Kaspaz-9
CASP11	: Kaspaz-11
CAT	: Katalaz
CD4	: Yardımcı T Lenfosit Yüzey Belirteci 4
CD8	: Sitotoksik T Lenfosit Yüzey Belirteci 8
cDNA	: Tamamlayıcı DNA

CD36	: Hücresel Farklılaşma Belirteci 36
CD14	: Hücresel Farklılaşma Belirteci 14
cGAS	: cGMP-AMP Sentaz Enzimi
CLP	: Sekoçekal Ligasyon ve Ponksiyon Modeli
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CXCR4	: C-X-C Motifli Kemokin Reseptörü 4
CFX96	: Real-time PCR Cihaz Modeli
CO_2	: Karbondioksit
Ct	: PCR Döngü Eşik Değeri
DAMP	: Hasar İlişkili Moleküler Desenler
DFNA5	: Kalıtsal İşitme Kaybı ile İlişkili Gen 5
DFNB59	: Genetik İşitme Kaybı ile İlişkili Gen 59
DMEM	: Hücre Kültürü Besiyeri
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DGAT1	: Diasilgliserol O-asiltransferaz
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünosorbent Analiz
ER	: Endoplazmik Retikulum
FBS	: Fetal Sığır Serumu
FAS	: Yağ Asidi Sentaz
FFA	: Serbest Yağ Asidi
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat Dehidrogenaz, Referans Gen
GSDMA	: Gasdermin A Proteini
GSDMB	: Gasdermin B Proteini
GSDMC	: Gasdermin C Proteini
GSDMD	: Gasdermin D Proteini
GSDME	: Gasdermin E Proteini
GLUT4	: Glikoz Taşıyıcı Protein 4
GPx	: Glutatyon Peroksidaz
GSH	: İndirgenmiş Glutatyon
GSSG	: Oksitlenmiş Glutatyon
H&E	: Hematoksilen ve Eozin Boyası
HFD	: Yüksek Yağlı Diyet

HRP	: Yaban Turpu Peroksidazı
HOMA-IR	: İnsülin Direnci Değerlendirme Modeli
HilA	: *Salmonella* İnvazyon Gen Düzenleyici Proteini
HIF-1α	: Hipoksi İlişkili Transkripsiyon Faktörü
IC_{50}	: Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon
IHC	: İmmünohistokimya
IL-1β	: İnterlökin-1 Beta
IL-18	: İnterlökin-18
IL-6	: İnterlökin-6
InvA	: *Salmonella* İnvazyon Proteini
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
LBP	: LPS Bağlayıcı Protein
L	: Litre
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
LPS	: Lipopolisakkarit
MDA	: Malondialdehit
MD-2	: Miyeloid Farklılaşma Proteini 2
Mal / TIRAP	: MyD88-Adaptor Benzeri Protein
MyD88	: Myeloid Farklılaşma Birincil Yanıt 88
MPO	: Miyeloperoksidaz
MAPK	: Mitogen Aktive Protein Kinaz Yolu
MOI	: Enfeksiyon Çoğaltma Oranı
mRNA	: Haberci RNA
MTT	: Hücre Canlılık Test Reaktifi
NET	: Nötrofil Hücre Dışı Tuzakları
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa Beta
NLRP3	: NLR Ailesi Pirin Alanı İçeren Reseptör 3
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
OMP	: Dış Membran Proteini
OMV	: Dış Zar Vezikülleri
OmpR	: Bakteriyel Transkripsiyon Düzenleyici
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin

PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PGC-1α	: PPAR Gama Ko-Aktivatör 1 Alfa
PPARγ Gama	: Peroksizom Proliferatör İle Aktive Olan Reseptör
PRR	: Patern Tanıma Reseptörü
PVDF	: Poliviniliden Florür
PI3K	: Fosfoinozitid 3-Kinaz
PJVK	: Pejvakin Proteini
PrgH	: *Salmonella* Sekresyon Sistemi Bileşeni
qPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIPA	: Radyoimmünopresipitasyon Tamponu
RIP2	: Reseptör Etkileşimli Serin/Treonin Kinaz 2
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RT-qPCR	: Ters Transkripsiyonlu Gerçek Zamanlı PCR
SERPINB1	: Serin Proteaz İnhibitör Ailesi Üyesi
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SCV	: *Salmonella* İçeren Vakuol
SH	: Standart Hata
SipA	: *Salmonella* İnvazyon Proteini
SIRT1	: Sirtuin 1
SIRT3	: Sirtuin 3
SI	: Uluslararası Birim Sistemi
SopB	: *Salmonella* Salgılanan Efektör Proteini
SPI-1	: Salmonella Patojenite Adası 1
SPI-2	: Salmonella Patojenite Adası 2
SPI-7	: Salmonella Patojenite Adası 7
SseL	: *Salmonella* Deubikitinaz Efektör Proteini
STAT5A	: Sinyal İletimi ve Transkripsiyon Aktivatörü 5A
ST	: Serotip
T2DM	: Tip 2 Diyabet

TAK1	: Transforme Edici Büyüme Faktörü-B ile Aktive Olan Kinaz 1
TLR	: Toll Benzeri Reseptör
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü Alfa
T3SS	: Tip 3 Salgı Sistemi
TRAIL	: Apoptoz Başlatıcı Ligand
TRIF	: Toll-like Reseptör Adaptör Proteini
TRAM / TICAM-2	: TRIF İlişkili Adaptör Molekülü
TRIF / TICAM-1	: TRIF İndükleyici Adaptör Molekülü
TRX	: Trokserutin
TXNIP	: Tioredoksin Etkileşimli Protein
USDA	: Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı
V	: Volt birimi
W/V	: Ağırlık/Hacim Oranı
VCAM-1	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü 1
VLDL	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
ΔCt	: PCR'de Eşik Değeri Farkı
ΔΔCt	: Göreceli Gen Ekspresyon Hesaplama Yöntemi

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Bazı nutrasötik bileşiklerin hastalıklar üzerine etkileri 6
Tablo 2.2. Patern tanıma reseptörleri (PRR) ve patojen ilişkili moleküler desenlerin etki mekanizmaları 27
Tablo 2.3. TLR'ler, ligandlar, adaptörler, konum ve hücre türü 31
Tablo 2.4. Farklı Hastalık ve Dokularda İnflammazom Yanıtlarının Çeşitliliği 37
Tablo 2.5. Kaspazların Gruplandırılması ve Biyolojik Fonksiyonları 40
Tablo 2.6. Gasderminlerin Doku Ekspresyonları 43
Tablo 3.1. Kullanılan hedef spesifik primer prop takımları 54
Tablo 4.1. RNA-Seq kütüphanelerine ait özet istatistikler. 64
Tablo 4.2. Kontrol grubuna ait RNA-Seq kütüphanelerinin kalite kontrol metrikleri. 65
Tablo 4.3. Deney grubuna ait RNA-Seq kütüphanelerinin kalite kontrol metrikleri. Toplam okuma sayısı, haritalama oranı, ekzonik/ intronik/intergenik dağılımlar ve rRNA kontaminasyon oranları gösterilmektedir (TRX1-TRX6: biyolojik tekrarlar (*n*=6)) 66

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Trokserutinin yapısı 8
Şekil 2.2. Gram negatif hücre membranının yapısı ve LPS 24
Şekil 2.3. LPS-TLR4 sinyal yolu 32
Şekil 2.4. Non-kanonik inflammazom tarafından sitozolik LPS algılaması 46
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan Caco-2 49
Şekil 4.1. Caco-2 hücrelerinde TRX sitotoksisitesinin belirlenmesi. 57
Şekil 4.2. Trokserutinin, gentamisin koruma deneyinde hücre içi *Salmonella* düzeyi üzerine etkisi (kuyu başına log CFU ortalama ± SEM). 58
Şekil 4.3. *Salmonella* maruziyetinde TRX'in Caco-2 hücrelerinde inflamasyonla ilgili gen ekspresyonunu üzerine etkisi (ortalama ± SEM).. 60
Şekil 4.4. *Salmonella* maruziyetinde TRX uygulamasının, Caco-2 hücrelerinde pro-inflamatuar sitokin ekspresyonu üzerine etkisi (ortalama ± SEM). 61
Şekil 4.5. FastQC kalite kontrol analizi sonuçları. 63
Şekil 4.6. *Salmonella* maruziyetinde Kontrol ve TRX uygulanan hücre hatlarında gözlenen transkriptomik profillerin temel bileşen analizi (PCA). 67
Şekil 4.7. Kontrol (CN) ve deney (TRX) grupları arasındaki diferansiyel gen ekspresyon analizi sonuçlarını gösteren volkan grafiği. 68
Şekil 4.8. Trokserutinin *Salmonella* uygulanmış Caco-2 epitel hücrelerinde, inflamasyon ve piroptoz ilişkili genler üzerine etkisinin transkripsiyonel olarak değerlendirilmesi. 69
Şekil 4.9. Trokserutinin *Salmonella* uygulanmış Caco-2 epitel hücrelerinde, inflamasyon ve hücre ölümü ile ilgili genler üzerine etkisi. 71
Şekil 4.10. Trokserutin, *Salmonella* enfekte hücre hatlarında GSDMD ekspresyonunu veya parçalanması üzerine etkisi 73
Şekil 4.11. Trokserutinin, Salmonella enfekte Caco-2 hücre hatlarında iki farklı inkübasyon zamanında apoptoz üzerindeki etkisi. 2. 74

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nutrasötikler, sağlıklı beslenmenin fonksiyonel bileşenleri olarak gıdalarla alındıklarında klinik ve terapötik fayda sağlayabilme potansiyelinde organik bileşiklerdir (De Felice, 1992). Polifenollerden ve peptitlerden postbiyotik metabolitlere kadar uzanan bu biyoaktif moleküller, intestinal immüniteyi güçlendirme, epitel bütünlüğünü geliştirme, oksidatif ve inflamatuar sinyal yollarını düzenleme kapasitelerinin bilimsel olarak dikkat çekmesiyle önemli bir araştırma alanı halini almıştır. Gıda kaynaklı enfeksiyonlar bağlamında, dirençli bir intestinal ortamının sağlanması kritik öneme sahiptir. Nutrasötikler, intestinal mikrobiyota ve konak doğal yanıt mekanizmalarını etkileyerek gıda kaynaklı enfeksiyonlarda ilk savunma hattını destekleme potansiyeline sahiptir. Son zamanlarda antibiyotiklere karşı gelişen direnç, dünya genelinde hızla artan bir halk sağlığı sorunu haline gelmiş ve özellikle gıda kaynaklı patojenlerin oluşturduğu enfeksiyonlarda tedavi seçeneklerini önemli ölçüde kısıtlamıştır. Bu nedenle, mikroorganizmalarla mücadelede ve şekillenen klinik semptomların hafifletilmesinde klasik antibiyotiklere alternatif olabilecek yeni, etkili ve güvenli destekleyici yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır (Nasri ve ark., 2014; Santini ve Novellino, 2018). Son yıllarda doğal kaynaklı biyoaktif bileşikler olan nutrasötikler, düşük toksisiteleri, çok yönlü biyolojik aktiviteleri ve özellikle inflamasyon, oksidatif stres ve hücresel savunma mekanizmaları üzerindeki düzenleyici etkileri nedeniyle bu alanda güçlü bir aday olarak görülmektedir. Bir nutrasötik olan trokserutin (TRX) ise bir flavonoid çeşididir. Geniş biyolojik etki spektrumu, yüksek biyoyararlanımı ve düşük yan etki profili ile öne çıkmaktadır. Bu bileşik, antiinflamatuar ve antioksidatif etkisi, çeşitli hücresel stres yolaklarını düzenlemesi ve dokuları hasara karşı koruması nedeniyle giderek daha fazla araştırılmaktadır. TRX'in diyabet, hepatik fibrozis, renal hasar

nöroinflamasyon ve metabolik bozukluklar gibi çeşitli patolojik süreçlerde olumlu etkiler gösterdiğine dair çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, intestinal enfeksiyonlar ve özellikle *Salmonella* kaynaklı inflamatuar süreçler üzerindeki etkileri henüz yeterince aydınlatılamamıştır (Badalzadeh ve ark., 2017; Bianchi ve ark., 2018; De Pablo- Fernández ve ark., 2019; Xue ve ark., 2019).

İntestinal sistem, patojenlerin girişine karşı vücudun en önemli bariyerlerinden biri olup epitel hücreleri, mikrobiyota ve bağışıklık sistemi arasında oldukça karmaşık ve dengeli bir etkileşim ağını barındırır. Gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan lipopolisakkarit (LPS), bu sistemin en güçlü uyarıcılarından biridir ve epitel hücrelerinde hem membran düzeyinde TLR4 aracılı inflamatuar yanıtı tetiklemekte hem de sitozole ulaştığında non-kanonik inflammazom yolaklarını aktive ederek kaspaz-4/5 üzerinden piroptotik hücre ölümünü başlatabilmektedir. Lipopolisakkarit aracılı inflamasyon özellikle *Salmonella* enfeksiyonlarının patogenezinde temel belirleyicilerden biridir. *Salmonella*, Tip 3 Sekresyon Sistemleri (T3SS), invazyon efektörleri, biyofilm oluşturma yeteneği ve güçlü LPS yapısı gibi virülans faktörleri sayesinde intestinal epiteli enfekte edebilmekte ve hücre ölümünü, sitokin üretimini tetikleyerek epitel bütünlüğü doğrudan etkilemektedir. Ayrıca *Salmonella*'nın intestinal mikrobiyotada disbiyozis oluşturduğu; bütirat üreten yararlı bakterileri azalttığı, inflamatuar bakterileri artırdığı gösterilmiştir. Bu durum enfeksiyonun şiddetlenmesine katkıda bulunmakta ve epitel hücrelerinin moleküler düzeyde verdiği yanıtları daha kritik hale getirmektedir (Bertani ve Ruiz, 2018; Clay ve ark., 2008; Needham ve ark., 2013).

Bu bağlamda, doğal bileşiklerin gıda kaynaklı *Salmonella* enfeksiyonları sırasında konak hücre yanıtını modüle edici potansiyeli önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir. Trokserutin, oksidatif stres belirteçlerinin azalması, NF-κB ve TLR4 gibi inflamatuar düzenleyicilerin baskılanması gibi etkiler göstermektedir. Ayrıca çeşitli doku ve hücre modellerinde hücre ölümünü azaltıcı, membran bütünlüğünü koruyucu ve antiinflamatuar etkilerinin bulunduğu bildirilmektedir. Ancak tüm bu veriler ışığında, TRX'in *Salmonella* ile enfekte intestinal epitel hücrelerinde, özellikle LPS aracılı inflamasyon, CASP4, CASP5 aktivasyonu, GSDMD düzeyleri, sitokin yanıtı ve bakteriyel invazyon süreçleri üzerindeki etkilerini inceleyen bir çalışma

incelediğimiz kadarı ile literatürde henüz yer almamaktadır. Bu nedenle TRX'in intestinal enfeksiyonlarda potansiyel koruyucu bir ajan olarak değerlendirilebilmesi için konak hücre yanıtı üzerindeki spesifik etkilerinin detaylı şekilde ortaya konulması gerekmektedir.

Bu tez, Caco-2 insan kolon adenokarsinoma hücre hattı kullanılarak *Salmonella* ile oluşturulan in vitro enfeksiyon modellerinde TRX'in konak hücre inflamatuar yanıtı üzerindeki düzenleyici etkilerini araştırmayı amaçlamaktadır. Çalışmada; TRX'in hücre canlılığına etkisi, *Salmonella* invazyon kapasitesi, CASP4/5 gen ekspresyonu, GSDMD protein düzeyleri, TLR4 aracılı sinyal yolakları ve pro-inflamatuar sitokin/kemokin yanıtları üzerindeki modülatör rolü detaylı biçimde değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Böylece TRX'in intestinal epitel hücrelerinde inflamatuar yükü azaltıcı, hücresel hasarı hafifletici ve potansiyel olarak enfeksiyonların seyri sırasında koruyucu bir nutrasötik ajan olarak kullanılabilirliğine ilişkin bilimsel temelli sonuçlar elde edilmesi hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. NUTRASÖTİKLER

Farmakolojide yaşanan gelişmeler ile, doğal kaynaklı çok sayıda biyoaktif bileşik tanımlanmıştır. Son yıllarda, düşük yan etki profilleri ve biyolojik aktiviteleri nedeniyle tıbbi bitkilere olan ilgi artmaktadır. Nutrasötik kavramı, 1989 yılında Dr. Stephen De Felice tarafından önerilen ve "besin" ve "ilaç" olmak üzere iki kelimeden türetilmiş bir terimdir (De Felice, 1992). Bu bileşikler, hastalığın tedavisi ve/veya önlenmesi de dahil olmak üzere sağlık üzerine faydaları olan besin ve komponentleridir. Beslenme bilimi, besin yetersizliklerinin öngörülmesinden başlayarak insan sağlığı ve kronik rahatsızlıkların önüne geçilmesi ve tedavisi üzerindeki öneme kadar giderek yeni ufuklara ulaşmıştır. Gıda ürünleri, yaşamı sürdürmek, enerji sağlamak ve büyümeyi desteklemek için tüketilen besleyici maddelerdir. Günümüzde, besinlerde nutrasötik bileşiklerin tespit edilmesi ve biyolojik etkili moleküllerin izolasyonu üzerine kapsamlı çalışmalar gerçekleştirilmektedir (Puri ve ark., 2022). Nutrasötiklerin önemli özellikleri, etken bileşik için epidemiyolojik hedefin tanımlanması ve ardından etki mekanizmasını anlayan güvenlik ve etkinlik çalışmalarının yapılmasıdır (Nasri ve ark., 2014; Santini ve Novellino, 2018).

Nutrasötikler, besinlerden veya onların bileşenlerinden elde edilen, genellikle yüksek dozlarda kullanılan ve tedavi edici potansiyel taşıyan; besin takviyeleri veya fonksiyonel gıda formunda sunulabilen ve besinsel temel bileşenlere ek olarak faydalı etkiler sağlayan, yaygın gıda veya botanik bazlı kaynaklarda bulunan biyoaktif maddelerdir (Kalra, 2003). Nutrasötikler, belirli sağlık etkisi sunmak amacıyla formüle edilmiş, özel olarak tasarlanmış preparatlar, olarak nitelendirilmektedir. Nutrasötik olarak değerlendirilen bileşenler; diyet lifi,

prebiyotikler, probiyotikler, çoklu doymamış yağ asitleri, antioksidanlar ve çeşitli bitkisel ya da doğal kaynaklı diğer gıda bileşiklerini kapsamaktadır. Nutrasötikler, günlük diyete ek olarak bazı hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde yardımcı olan besin/besin öğelerinin formülasyonu olarak bilinmektedir. Örneğin diyetle alınan flavonoidler, bitkisel kaynaklı önemli bir nutrasötik polifenol sınıfını oluşturmaktadır. Meyveler, sebzeler, tahıllar, tıbbi bitkiler ve bazı içeceklerde bulunan bu yapılar, ortak benzo-γ-piron yapısına sahip fenilpropanoid türevleridir. Flavonoidler, insan sindirim sisteminde genellikle intestinal kanalda yüksek verimlilikte absorbe edilmektedir. Ancak büyük oranda kolon mikrobiyotası ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (Baky ve ark., 2022). Mikrobiyom, bu bileşenleri daha küçük fenolik ve aromatik asitlere parçalayarak emilimlerini kolaylaştırmaktadır. Bu biyotransformasyon süreci, flavonoidlerin biyoaktivitesi ve sistemik etkileri açısından kritik öneme sahiptir. (Nasri ve ark., 2014; Santini ve Novellino, 2018).

Daha önce belirlenmiş veya potansiyel etkileri olan nutrasötikler, hastalık tedavisi ve önlenmesi, yaşlanma karşıtı özellikleri ve antikarsinojenik etkileri ile bilinmektedir. Yapılan araştırmalar ile tedaviye destek sağlamak amacıyla nutrasötiklerin günlük diyete dahil edilmesi önemli bir yaklaşım olarak görülmektedir (Caramia ve Silvi, 2011; Keservani ve ark., 2017).

Bazı farmasötik bileşiklerin neden olduğu yan etkilerin varlığı ve antimikrobiyal direncin ortaya çıkmasıyla, nutrasötik bileşikler alternatif bir terapötik ve önleyici yaklaşım olarak ilgi görmektedir. Bu ilginin nutrasötiklerin daha uygun fiyatlı ve ulaşılabilir olma avantajları ile desteklendiği görülmektedir. Yapılan araştırmalar, nutrasötik bileşenlerin immün sistem fonksiyonları üzerine destekleyici etkilerini göstermiştir. Bu işlevler arasında enfeksiyon yanıt mekanizmasını güçlendirmek, immünomodülatör aktiviteyi artırmak ve otoimmün bozuklukların ve aşırı duyarlılığın etkilerini azaltmaya katkıda bulunmak yer almaktadır. Nutrasötiklerin ayrıca lipid düşürücü, antiinflamatuar, antikanser ve antioksidan aktivite gösterdiği çalışmalar da mevcuttur (Affuso ve ark., 2010; Chen ve ark., 2016; Pitchaiah ve ark., 2017; Singla ve ark., 2014).

Terapötik yaklaşımların etkinliği ve etken maddelerin biyoyararlanımı artırmak için nutrasötik uygulamalarının yapıldığı çalışmalar mevcuttur. Örneğin statin uygulamalarının hamile kadınlarda LDL kolesterolü düşürerek kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde faydalı olduğu saptanmıştır (Fogacci ve Fogacci, 2021; Trialists, 2012). Etkili bir güvenlik profiline ve gebelik üzerinde iyi bilinen bir etkiye sahip nutrasötikler, diyabet ve hipertansif bozuklukları önlemek için veya standart ilaçlarla tedaviye yardımcı olarak uygun bir seçenek olarak görülmektedir. Nutrasötikler, uygulamalarına göre geleneksel, geleneksel olmayan, güçlendirilmiş, rekombinant, fitokimyasal, fonksiyonel gıdalar, diyet takviyeleri, probiyotikler ve prebiyotikler olarak sınıflandırılabilmektedir. Farklı sınıflardaki nutrasötiklerin, yapılarına bağlı olarak çeşitli uygulamaları ve kullanımları bulunmaktadır. Resveratrol, astaksantin, kanabidiol, keşiş meyvesi, d-tagatoz potansiyel olarak yeni nutrasötikler olarak kanıtlanmış adaylardır (Fogacci ve Fogacci, 2021; Roy ve ark., 2018; Ruchi, 2017; Singh ve Sinha, 2012; Williamson ve ark., 2019). Bazı nutrasötiklerin kullanım amaçları Tablo 2.1'de verilmektedir.

Tablo 2.1. Bazı nutrasötik bileşiklerin hastalıklar üzerine etkileri

Hastalık	**Nutrasötik**	**Potansiyel Etki**	**Kaynak**
Hiperlipidemi	*Allium sativum*	Kolesterol sentezinin endojen olarak azaltması	Chakraborty ve Roy, 2021
Hipertansiyon	*Allium sativum*	sistolik kan basıncında azalma	Chan ve ark., 2020,
Kanser	Kumarin	anti-anjiyogenik aktiviteyi artırma	Majnooni ve ark., 2019
Diyabet	Berberin	Kan şekeri kontrolü	Xia ve ark., 2011.
Alzheimer Hastalığı	Naringenin	Öğrenme ve hafıza performansını artırma	Ghofrani ve ark., 2015
Obezite	*Momordica chrantia*	Vücut ağırlığını düşürme, kan lipid ve şeker profilini iyileştirme	Phimarn ve ark., 2018
Romatoid Artrit	Kurkumin	Eklem iltihabı ve ağrıyı hafifletme, oksidatif stresi baskılama	Al-Okbi, 2014
Kanser	Resveratrol	COX-2, NF-κB ve PI3K/Akt yollarının baskılanması	Nair ve ark., 2010

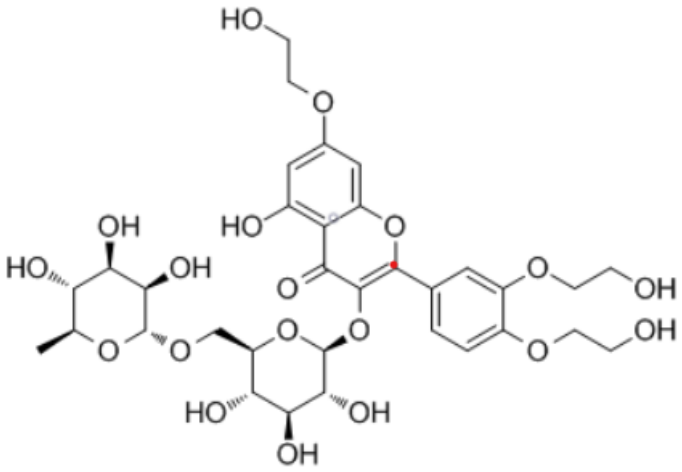
Diğer tüm hastalıklar arasında, kardiyovasküler hastalıklar nutrasötik müdahaleye uygun önemli riskle ilişkili faktörleri ortaya koymaktadır. Nutrasötiklerin

kardiyovasküler hastalıklarda kullanılabileceğini gösteren önemli kanıtlar vardır (Bahorun ve ark., 2019; Caliceti ve ark., 2019; Reklou ve ark., 2020). Diyet takviyelerinin risk yönetiminde ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde faydalı olduğu kanıtlanmıştır ve genel olarak aritmilerin, konjestif kalp yetmezliğinin, hipertansiyonun ve hiperlipidemilerin tedavisinde kullanımları rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2014; Janabi ve ark., 2020; Myung ve ark., 2021; Porto ve ark., 2019; Russell ve ark., 2021).

Nutrasötikler, kronik inflamasyonla ilişkili hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde yardımcı olan inflamasyon önleyici aktiviteler göstermektedir. Nutrasötiklerin antiinflamatuar ajanlar olarak bir diğer faydası, inflamasyon önleyici terapötik ilaçlara tamamlayıcı bir alternatif olarak kullanılabilmeleridir. Bu özellik nedeniyle uygulanan ilaç dozlarının hafifletilmesi ve olası yan etkilerin azaltılması sağlanabilmektedir. (Petiwala ve Johnson, 2013; Vinothkumar ve ark., 2012).

2.2. TROKSERUTİN (TRX)

Trokserutin, ilk olarak 1830 yılında Japon pagoda ağacından (*Sophora japonica*) izole edilmiştir. Trokserutin, rutin yapısında 3', 4' ve 7. pozisyonlarda hidroksillenmiş doğal bir flavonoid olan rutoside'den elde edilen bir flavonoldür. Çay, kahve, tahıl taneleri ve çeşitli meyve ve sebzelerin bileşenlerinden biri olarak dikkat çekmektedir. Farmakokinetik özellikleri nedeniyle P4 vitamini olarak bilinmektedir. Suda yüksek çözünürlüğü nedeniyle gastrointestinal sistemde kolayca emilmektedir. Yapısı nedeniyle düşük doku toksisitesi göstermektedir. Trokserutin, flavonoid-3-o-glikozitler olarak tanımlanan organik bileşikler sınıfına aittir. Bunlar, C3 pozisyonunda bir karbonhidrat grubuna O-glikozidik olarak bağlı flavonoid bileşiklerdir (Şekil 2.1). Trokserutin, ana bileşik olarak tris rutinin yaklaşık %80'ini oluştururken, bis rutin, tetrakis rutin ve mono rutin ihmal edilebilir bir oranda görülmektedir (Badalzadeh ve ark., 2017; Bianchi ve ark., 2018; De Pablo-Fernández ve ark., 2019; Xue ve ark., 2019).



Şekil 2.1. Trokserutinin yapısı (Zamanian ve ark., 2021)

Trokserutinin antioksidan, antiinflamatuar, antihiperlipidemik, antineoplastik, antitrombotik, antifibrotik ve nefroprotektif gibi ilginç farmakolojik etkilere sahip olduğu belirtilmiştir. Özellikle kumarinle kullanıldığında, kronik venöz yetmezlik hastalıklarının tedavisinde geniş farmakolojik aktiviteleri nedeniyle önemli ilgi görmüştür (Adam ve ark., 2005; Azarfarin ve ark., 2018; Elangovan ve Pari, 2013; Fan ve ark., 2009; Farajdokht ve ark., 2017; Shan ve ark., 2017; Zamanian ve ark., 2017a; Zamanian ve ark., 2017b). Baş ve boyun bölgesi radyoterapi uygulamalarında TRX ve kumarin karışımının uygulanmasının tükürük bezleri ve mukozalarda koruma sağladığı bildirilmiştir. Aynı zamanda antiinflamasyon ve antioksidatif etkiler yoluyla nefron koruyucu özellikleri bildirilmiştir. (Liu ve ark., 2010; Marhic, 1991; Maurya ve ark., 2004; Maurya ve ark., 2005; Wenisch ve Biffignandi, 2001; Wijayanegara ve ark., 1992).

Trokserutinin beyin, böbrek, kalp, damar ve karaciğer gibi birçok dokuda koruyucu bir rolü gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, TRX uygulamasının ratlarda nikel maruziyetinin neden olduğu testis toksisitesini engellediği gösterilmiştir. TRX ayrıca Alzheimer hasta modellerinde amiloid-beta (Aβ) birikiminin neden olduğu öğrenme ve hafıza bozukluklarını üzerine olumlu etki gösterdiği belirlenmiştir (Elangovan ve Pari, 2013; Farajdokht ve ark., 2017; Shan ve ark., 2017; Zamanian ve ark., 2017a). Ayrıca, TRX insülin direncine ve diyabete karşı pozitif etki gösterdiği ve oksidatif stresi azaltarak tip 1 diyabetli erkek ratlarda testis fonksiyonunu ve sperm üretimini iyileştirdiği belirlenmiştir (Hamidian ve ark., 2019). Trokserutinin lipid

peroksidasyonunun ana ürünü olan malondialdehit (MDA) seviyelerinde azalma ile ilişkili olarak Aβ tarafından indüklenen oksidatif stres ve apoptoza karşı hipokampal nöronlar üzerinde koruyucu bir etki gösterdiği bildirilmektedir (Farajdokht ve ark., 2017).

Bazı çalışmalar, ROS ve diğer serbest radikallerin mitokondriyal disfonksiyona ve beyinde Aβbirikiminin artmasına yol açtığını göstermiştir. Yapılan araştırmalarda, TRX'in nöroprotektif bir ajan olarak in vivo ve in vitro deneysel modellerde, TRX'in sıçan beyin dokularında artan süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ve azalan MDA seviyeleriyle aracılık ederek oksidatif stresi ve iskemik hasarı azalttığı gösterilmiştir (Yan ve ark., 2013; Luca ve ark., 2015; Ma ve ark., 2019; Reddy, 2009). Oksijen-glikoz yoksunluğu ve reoksijenasyon hasarı için nörovasküler ünite modeline ek olarak TRX'in; IL-1β, IL-6, TNF-α gibi pro-inflamatuar sitokinlerin ve proapoptotik belirteçlerin (Bax, p53 ve kaspaz-3) seviyelerini azaltıp ve kan-beyin bariyeri fonksiyonlarını iyileştirerek serebral iskemi/reperfüzyon hasarından sonra nöronlar üzerinde koruyucu etkilere sahip olduğu görülmüştür (Zhào ve ark., 2018). Lipopolisakkarit (LPS) kaynaklı inflamasyon ve oksidatif hasar modelinde, 6 ardışık gün boyunca intraperitoneal TRX uygulaması, ROS üretimini ve MDA seviyelerini azaltarak ve TNFα ve NF-κB gibi mediatörlerin salınımını iyileştirerek MSS üzerine pozitif etkiler göstermiştir (Jamali-Raeufy ve ark., 2019).

Trokserutin, LPS ile indüklenen nöroinflamasyon ve oksidatif stres modelinde SIRT1/SIRT3 sinyal yolunu aktive ederek nöroprotektif etkiler göstermektedir. Parkinson hastalığı, substantia nigra'daki dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ve α-sinüklein proteininin ilerleyici agregasyonu ve Lewy cisimcikleri ile Lewy nöritlerinin birikmesiyle oluşan ilerleyici ve kronik bir nörodejeneratif hastalıktır. Trokserutin tedavisi, ratlarda apomorfin ile indüklenen dönme davranışını azaltmış ve astrositoz ve apoptozu inhibe ederek dar ışın testinde ratların performansını iyileştirmiş ve ayrıca muhtemelen PI3K/ERβ sinyal mekanizması tarafından aracılık edilen bir süreçte striatumdaki oksidatif stresi azalttığı görülmüştür (Jamali-Raeufy ve ark., 2019; McMillan ve ark., 2011; Rangasamy ve ark., 2019; Xu ve Pu, 2016).

Post-natal dönemde monosodyum glutamat uygulamasıyla indüklenen insülin direnci modelinde, TRX tedavisi insülin duyarlılığını artırmakta ve plazma glikoz ile insülin

düzeylerini düşürerek antidiyabetik etkiler göstermektedir; bu etkiler muhtemelen peroksizom proliferatör aktive edilmiş reseptörler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Trokserutin uygulamasının plazma glikoz ve insülin konsantrasyonlarını düşürdüğü ve ayrıca insülin duyarlılığını iyileştirdiği görülmüştür (Ranijth ve ark., 2013). Ek olarak, TRX aminotransferaz (AST ve ALT) aktivitesini azaltarak karaciğer hasarına karşı koruyucu etkilere sahip olduğu bildirilmektedir. Trokserutin, plazma ve karaciğer dokusunda enzimatik antioksidanların (SOD, CAT ve GPx) ve enzimatik olmayan antioksidanların (azaltılmış GSH, C ve E vitamini) aktivitelerini artırarak oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (Awasthi ve ark., 2017).

Trokserutin, karaciğerde adiponektinin mRNA ekspresyonunu artırır ve bu da hepatik yıldız hücre aracılı adenozin monofosfatla aktive edilen protein kinaz ve peroksizom proliferatör aktive edilmiş reseptör-α yolları üzerinde inhibitör bir etki yoluyla antifibrotik aktiviteye sahiptir (Ranijth ve ark., 2013). Trokserutin ayrıca hidrofobik etkileşimler yoluyla albümin gibi protein glikasyonunu önleyerek hiperglisemide komplikasyonların gelişimini azaltabileceği bildirilmektedir (Awasthi ve ark., 2017)

Yüksek yağ ve sakaroz kaynaklı diyabetli yetişkin erkek sıçanlarda dört haftalık bir süre boyunca TRX uygulanması, muhtemelen glikoz toleransından kaynaklanan insülin duyarlılığını iyileştirerek açlık serum glikozunu, lipid profilini ve insülin seviyelerini azalttığı gösterilmiştir. Trokserutin ayrıca diyabetli grubun gastroknemius kasındaki insülin reseptörünün mRNA ve protein seviyelerini artırmıştır. Bunula birlikte, b-arrestin-2 ve c-Src protein seviyelerini, glikoz alımını, oksidasyonu, glikojen seviyesini artırdığı ve T2DM grubunun gastroknemius kasındaki GLUT4 ekspresyonunu artırdığı gözlenmiştir (Sampath ve Karundevi, 2014). Trokserutinin dört hafta boyunca diyetle verilmesi, sağlıklı ve diyabetli sıçanların hipokampüs dokusunda NF-κB, IRAK-1 ve TRAF-6'nın mRNA seviyelerini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Trokserutinin koruyucu etkilerinin, NF-κB mRNA ekspresyonunu ve adaptör proteinleri TRAF-6 ve IRAK-1'i miR-146a gibi hedeflerinin düzenlenmesi yoluyla inhibe etme yeteneğiyle ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Yavari ve ark., 2016).

Trokserutin; SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzim aktivitelerini artırmak, MDA içeriğini azaltmak ve NF-κB, iNOS ve COX-2 ekspresyonunu inhibe etmek şeklinde üç farklı moleküler mekanizma yoluyla D-galaktozun neden olduğu böbrek hasarını önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda ayrıca, erkek C57BL/6J farelerine sekiz hafta boyunca TRX verilmesinin, BDE-47 ile tedavi edilen farelerin böbreğinde CXCR4-TXNIP/NLRP3 inflammazomu yoluyla inflamasyon kinetiğini düzenlediği bildirilmiştir (Fan ve ark., 2009; Shan ve ark., 2018).

Yapılan çalışmalarda TRX'in gentamisin kaynaklı akut böbrek hasarındaki koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Trokserutin uygulaması glomerüler filtrasyon hızını artırarak ve idrar albümini, idrar albümini/kreatinin oranını, serum kreatinin ve kan üre azotu seviyelerini azaltarak böbrek fonksiyonunu desteklediği gösterilmiştir. Ayrıca, TRX'in, renal tübüler hasar belirteci KIM-1'in ifade seviyesini, renal histopatolojik değişiklikleri ve oksidatif stresi azaltarak gentamisin kaynaklı böbrek dokusu hasarını önemli ölçüde hafiflettiği bildirilmiştir. Trokserutin uygulamasının IL-10, TNF-α ve IL-6 gibi inflamatuar sitokin düzeylerini ve ayrıca apoptoz düzeyini düşürdüğü gözlenmiştir. Aynı zamanda prolifere hücre nükleer antijeninin (PCNA) regülasyonunu arttırarak dokularda rejeneratif kapasitesini artırır bu da trokserutinin potansiyel böbrek koruyucu etkisini göstermektedir (Salama ve ark., 2018).

Depresyon hastalarındaki disbiyotik intestinal mikrobiyotanın depresyonun ilerlemesinde rol oynayabileceği ileri sürülmektedir. Trokserutinin merkezi sinir sistemi üzerindeki etkisine dair yapılan çalışmalarda, trokserutinin bağırsaktaki *Proteobacteria*, *Bacteroides* ve *Actinobacteria* varlığını azaltırken *Lactobacillus* ve *Firmicutes* gibi yararlı bakterileri destekleyerek farelerde depresyon ve anksiyete benzeri davranışları etkili bir şekilde hafiflettiği gösterilmiştir. Dahası TRX'in farelerde nükleotid metabolizması, kafein metabolizması, pürin metabolizması, arginin biyosentezi, histidin metabolizması, 2-oksokarboksilik asit metabolizması, amino asitlerin biyosentezi, glisin, serin ve treonin metabolizması ve arginin ve prolin metabolizması dahil olmak üzere çeşitli metabolik yolları düzenlediği bildirilmektedir (Lan ve ark., 2024).

Trokserutinin obeziteyi ve ilgili metabolik parametreleri ve yüksek yağlı diyet ile tedavi edilen farede karaciğer hasarlarını etkili bir şekilde iyileştirdiğini gösteren

sonuçlar mevcuttur. Dahası, trokserutin yüksek yağlı diyet ile beslenen farede hepatik glukoneogenezin artırılmasını önemli ölçüde azaltmıştır. Yüksek yağlı diyet ile tedavi edilen fare karaciğerlerinde nükleer faktör-κB (NF-κB) p65 transkripsiyonel aktivasyonunu ve inflamatuar sitokinlerin salınımını belirgin şekilde baskılanmıştır. Mekanizma olarak TRX, yüksek yağlı diyet ile tedavi edilen fare karaciğerlerinde oksidatif stres kaynaklı ER stresini azaltarak Nükleotid oligomerizasyon alanı (NOD) ekspresyonunu ve NOD1/2 ile etkileşimli protein-2 (RIP2) arasındaki etkileşimi önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. hepatik glikoz bozuklukları üzerindeki iyileştirici ve anti-obezite etkisini göstermektedir (Zhang ve ark., 2017). Bunların yan ısıra TRX, LPS ile indüklenen deneysel enfeksiyonda; LPS'nin neden olduğu ROS üretimi, akut nöroinflamasyonu, apoptotik hücre ölümü ve SIRT1/SIRT3 sinyal yolunun inaktivasyonu gibi hücresel yanıtları inhibe ettiği bildirilmiştir (Jamali-Raeufy ve ark., 2019). Ayrıca TRX ön tedavisinin TLR4 ve NF-κB ifadelerini azalttığını; TNF-α ve IL-1β düzeylerini düşürdüğünü gösteren sonuçlar da mevcuttur (Masoud ve ark., 2021).

Kanser kemoterapisinin en sık görülen yan etkilerinden biri ağız ve gastrointestinal mukozittir. Bağırsak mukoziti, 5-florourasil antimetabolit tedavisinin neden olduğu hücresel ve doku hasarının bir sonucu olarak gastrointestinal sistemde inflamatuar ve/veya ülseratif süreçle karakterizedir. Konuyla ilgili yapılan bir çalışma, TRX'in farelerin bağırsak mukozasında 5-florourasil kaynaklı değişiklikleri önleyebildiğini göstermiştir. Bağırsak mukozitinin önlenmesi, bağırsak mukozası hücre ve dokularının farklı örüntüleri ve lökopeni, oksidatif hasar, nötrofilik çoğalma, mastositoz, goblet hücre azalması ve bağırsağın histolojik ve morfometrik verilerinde değişiklikler gibi biyokimyasal özelliklerle gösterilmiştir (de Miranda ve ark., 2020). Trokserutinin ülseratif kolit hasarı üzerine etkisinin bulunduğu fareler üzerinde yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Dekstran sülfat sodyum ile indüklenen ülseratif kolit sonrasında farelerin vücut ağırlıklarının önemli ölçüde azaldığı bununla birlikte, TRX'in kilo kaybını etkili bir şekilde ortadan kaldırdığı görülmüştür. Dahası, trokserutin kolon kısalması gibi patolojik değişiklikleri ölçüde iyileştirmiştir. Trokserutinin, nötrofil ve monositlerin şiddetli infiltrasyonu, kript distorsiyonu, goblet hücresi tükenmesi ve yoğun mukoza epitel ülserasyonu dahil olmak üzere

kolon dokusundaki ciddi patolojik hasarları iyileştirmede etkili olduğu görülmüştür (Wang ve ark., 2021).

Mikroglial hücre aracılı nöroinflamasyon, merkezi sinir sistemi homeostazının temel bir itici gücüdür ve nörodejenerasyon ve nörolojik hastalıkların gelişimi için önemli bir risk faktörüdür. Trokserutinin, LPS ile uyarılan BV2 mikroglialarında IL-6, IL-1β ve TNF-α ekspresyonunu inhibe ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca, TRX, LPS'ye maruz kalan BV2 mikroglialarında dönüştürücü büyüme faktörü-β (TGF-β) ve farklılaşma kümesi 206'nın (CD206) salınımını hızlandırmıştır. Trokserutin, LPS stimülasyonu ve Nrf2 ve hem oksijenaz-1 (HO-1) protein ekspresyonunun aracılık ettiği NF-κB fosforilasyonunu ve kappa B alfa (IκBα) inhibitörünü bloke ederek nöroinflamatuar yanıtı düzenleyerek anti-nöroinflamatuar etki göstermiştir (Ma ve ark., 2025). TRX'in bildirilen bu özellikleri nedeniyle bu tez projesinde, İnsan kolon adenokarsinoma hücre hatlarında (Caco-2) deneysel olarak oluşturulan in vitro *Salmonella* enfeksiyonlarında öncül TRX uygulamalarının konak hücre doğal yanıtı üzerine etkinliği araştırılmıştır.

2.3. *SALMONELLA*

Salmonella, 1884 yılında veteriner hekim Daniel E. Salmon tarafından domuz intestinal kanalından izole edilerek "*Bacillus choleraesuis*" olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra bu isim 1900 yılında Lignieres tarafından "*Salmonella choleraesuis*" olarak değiştirilmiştir. Nomenklatürde *Salmonella* cinsinin *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olarak iki türe ayrıldığı görülmektedir. Sıcak kanlı canlılarda patojen olan *Salmonella enterica* ise altı alt türe ayrılmaktadır (Ryan ve ark., 2017). Genom ve biyokimyasal özelliklerinin analizine göre bu türlerin *enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae* ve *indica* olduğu bilinmektedir. Bu alt türler, antijenik özelliklerine göre serogruplara (O antijeni) ve serovarlara (H antijeni) ayrılmaktadır. Özellikle *Salmonella enterica* subsp. *enterica*'ya mensup sıcakkanlı canlılarda patojenik etki gösteren 2500'den fazla serovar olduğu bildirilmektedir (Popa ve Papa, 2021).

Hem insanlarda hem de hayvanlarda farklı klinik tablolar şekillendirebilen hastalıklara neden olabilen *Salmonella*'nın serotiplendirilmesi veya diğer bir ifadeyle

antijenik olarak sınıflandırılması konvansiyonel olarak; somatik O antijenleri, flagellar H antijenleri ve Vi kapsüler antijenleri olmak üzere 3 tip yüzey antijeniyle gerçekleştirilmektedir. O antijeni *Salmonella* izolatının ait olduğu grubu belirlerken, H antijeni serovar tanımlamayı sağlamaktadır. Kapsül antijenin (Vi), Typhi, Paratyphi C (bu antijen Paratyphi A veya B'de bulunmaz) ve *Salmonella* Dublin'de bulunduğu bildirilmiştir. O antijeni, LPS'nin dış yüzeyinde bulunan, ısıya dayanıklı bir polisakkarittir. Her bir O antijeni içerdiği 5-6 şeker ünitesindeki varyasyonları, aralarındaki kovalent bağları ve alt birimleri arasındaki bağlantıların yapısal değişiklikleri ile özelleşmektedir. H antijenleri ise bakteri flagellasının filament kısmı olarak nitelendirilmektedir. *Salmonella* serovarlarının bir tip H antijeni (monofazik) veya iki tip H antijeni (difazik) eksprese ederek farklılaşabildikleri gösterilmiştir. Patotiplendirmede önemli olan bir diğer faktör ise Vi kapsüler antijenidir. Bu antijenik determinantın varlığı enfeksiyonun şiddeti ve *Salmonella* tanımlanmasında önemli rol oynamaktadır (Ryan ve ark., 2017).

Salmonella, *Enterobacteriaceae* familyasına ait, Gram negatif, oksidaz negatif, katalaz pozitif, spor oluşturmayan, fakültatif anaerob basil şeklinde bir bakteridir. Hemen hemen tüm *Salmonella* türleri, peritrik flagellalar ile hareketli iken *Salmonella* Gallinarum ve Pullorum serovarları bu hususta istisna olarak göze çarpmaktadır. Mezofilik bir bakteri olarak *Salmonella*'nın optimal üreme sıcaklığının 37 °C olduğu ve üremenin jenerasyon zamanı değişimine bağlı olarak 2-54°C aralığında olabildiği bilinmektedir. *Salmonella* üremesi için optimum pH 6.5-7.5 aralığındadır. Bununla birlikte, sabit faza özgü pH bağımlı asit direnci (AR) mekanizmalarını veya düşük pH asit tolerans tepkisini (ATR) kullanarak çok daha geniş bir pH değeri aralığında (3.99 ila 9.5) çoğalabilmektedir. Bu yanıt, hücrelerin büyüme hızını ve hücre içindeki pH dengesini düzenleyen, çoğu membranla ilgili olan çeşitli proteinlerin spesifik ekspresyonu ile açıklanmaktadır. Bu değişikliklerin düşük su aktivitesi ve ısı stresi gibi diğer streslere karşı koruyucu mekanizmaları tetiklediği bilinmektedir. Pastörizasyon parametrelerinde inhibe olduğu bilinen etkenin 50 °C'nin altındaki lethal olmayan sıcaklıklara 15 ila 30 dakika süreyle maruz kalmanın ATR'den tamamen bağımsız olarak *Salmonella*'da daha yüksek sıcaklıklara karşı tolerans oluşmasını sağlayabileceği bildirilmektedir. ATR'ye benzer şekilde, ısı ön işlemi aynı zamanda hücrelerin ısı direncini artırabilen ısı şoku

proteinlerinin ekspresyonu da indüklenmektedir. Bu stres yanıt sisteminin, genel stres transkripsiyon düzenleyici proteinlerinden oluştuğu ve diğer çevresel koşullara karşı da çapraz koruma etkisine sahip olduğu bilinmektedir (Alvarez-Ordóñez ve ark., 2015; Asplund ve Nurmi, 1991; Doyle ve Mazzotta, 2000; Foster, 1995; Gruzdev ve ark., 2011; Iibuchi ve ark., 2010; Ryan ve ark., 2017).

Salmonella çoğalması ve canlılığında sürdürmesinde su aktivitesinin (a_w) önemli bir rol oynadığı ve 0,94'ten düşük a_w ortamlarında etkenin inhibe olduğu bildirilmektedir. *Salmonella*'nın toprak ve düşük nemli gıdalar gibi çevresel habitatlarda karşılaştığı en önemli zorluklardan biri, buharlaşmalı kurutma yoluyla veya suyun toprakta bulunan küçük parçacıklara yapışmasıyla oluşan matris potansiyeli yoluyla su kaybıdır. *Salmonella*, suyun buharlaşmasını yavaşlatarak ve membranları ve proteinleri su kaybının neden olduğu denatürasyondan koruyan spesifik mekanizmalarla tamamen kurumayı önleyerek düşük a_w'ye karşı koruma sağlamaktadır. Bakteri hücresinin yüzeyinde, genellikle glikokaliks olarak adlandırılan hücre dışı bir matris oluşturan ekzopolisakkaritler ve ilgili proteinlerden oluşan bir katman bulunabilmektedir. Bu yüzey yapısının, suyu tutarak tamamen kurumayı önlemek ve buharlaşma yoluyla kaybedilen miktarı sınırlamak gibi çeşitli koruyucu işlevlere sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca, curli adı verilen amiloid lifleri ile ilişkili hücre dışı selülozun, *Salmonella* Typhimurium'da kuruma direnci ve hayatta kalmada önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Alvarez-Ordóñez ve ark., 2015; Asplund ve Nurmi, 1991; Doyle ve Mazzotta, 2000; Foster, 1995; Gruzdev ve ark., 2011; Iibuchi ve ark., 2010; Ryan ve ark., 2017).

Hidrojen sülfür (H_2S) üretimi, lizin ve ornitin dekarboksilasyonu ve üre hidrolizi gibi bazı biyokimyasal özellikleri *Salmonella* tanımlanmasında güncel olarak kullanılmaktadır (Alvarez-Ordóñez ve ark., 2015; Asplund ve Nurmi, 1991; Doyle ve Mazzotta, 2000; Foster, 1995; Gruzdev ve ark., 2011; Iibuchi ve ark., 2010; Ryan ve ark., 2017).

2.3.1. Virülans Faktörler

Salmonella'nın patojenitesindeki farklılıklar, virülans faktör çeşitliliğinin ve konak duyarlılığının bir yansımasıdır. Genetik olarak yakından ilişkili olmalarına rağmen, *Salmonella enterica*'nın farklı serotiplerinin virülansı ve epidemiyolojisinde farklılıklar göze çarpmaktadır. Örneğin, çoğu serovar kendini limitleyen gastroenterite neden olurken, spesifik serotiplerin (Typhi, Paratyphi A ve C vb.) septisemi ve hatta bazı non-tifoidal serovarların da gastroenterit ile multisistemik hastalıklara (iNTS) neden olabileceği bildirilmektedir (Fierer ve Guiney, 2001; Fluit, 2005).

Salmonella Typhimurium ve Enteritidis serovarları dünya çapında yaygın olarak bulunmakta ve gıda kaynaklı NTS olgularında başlıca rol oynamaktadır. Bu serovarların insanlara gıdanın dışında su veya hayvanlarla doğrudan temas yoluyla da bulaşabildiği bilinmektedir. *Salmonella* Typhimurium ST313 ve Enteritidis ST11, Doğu Afrika'da çocuklarda ve yetişkinlerde iNTS'lerin başlıca sebebi olarak bildirilmiştir. Her iki serovarın da çevresel koşullarda canlılıklarını sürdürmek ve konak adaptasyonunu hızlandırmak için gen delesyonu ve pseudogen varlığı gösterdiklerine dair veriler bulunmaktadır. Özellikle hassas grup bireylerde NTS, iNTS formuna evrilmesiyle hastalık tablosu tifo benzeri semptomlarla şiddetlenebilmektedir. İmmünolojik olarak sağlıklı bireylerde NTS, nadiren saptanabilir septisemi kliniği göstermektedir. Bu nedenle, yakın zamanda diyare öyküsü olan veya olmayan yetişkin bir hastada NTS tanısı konulduğunda, bu durum altta yatan bir immün yetersizliğinin (ya edinilmiş genetik sebepler, endovasküler enfeksiyon odağı vb.) araştırılmasını gerekmektedir (Fierer, 2022).

Bazı *Salmonella* serovarlarının konak türe uyum sağlayarak o türde hastalık tablosu şekillendirdiği görülmektedir. Örneğin *Salmonella* Pullorum ve Gallinarum daha çok kanatlı tifosu etkeni olarak kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde problem oluştururken insanlar için patojen kabul edilmemektedir. *Salmonella* Typhi'nin de genellikle insan spesifik olarak insan kaynaklı olarak yayılım gösterebildiği, çapraz kontaminasyonlar dışında gıda ve hayvanlar ile bulaşın sınırlı olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra Cholerae-suis, Abortus-ovis ve Dublin serovarlarının sırasıyla domuz, koyun ve sığırla ilişkilendirildiği bildirilmektedir. *Salmonella* serovarlarının konak

adaptasyonu ve fenotipik çeşitliliği, genetik varyasyonlar ve polimorfizmlere dayanmaktadır. Konak spesifite ve patojeniteyi doğrudan etkileyen bakteriyel dış membran yapıları konak immün sisteminin temel hedefleri olarak bilinmektedir. Özellikle antijenik çeşitliliğin farklı mekanizmalar ile konak spesifite dışında enfeksiyon esnasında bireysel olarak şekillenecek konak immün yanıtı etkilediği bilinmektedir (Fierer ve Guiney, 2001; Fluit, 2005).

Virülans, mikroorganizmanın konakçıyı enfekte etme ve bir hastalığa neden olma yetenekleri olarak ifade edilebilmektedir. Bağımlı veya bağımsız olarak çalışan virülans faktörleri ise bakterinin konakta hücresel düzeyde kolonize olmasında ve enfeksiyon tablosu şekillendirmesinde aktif rol almaktadır. Bu faktörler salgılayıcı, membranla ilişkili ya da sitozolik niteliktedir. Sitozolik faktörler, bakterinin hızlı adaptif (metabolik, fizyolojik ve morfolojik) değişimlere uğramasını kolaylaştırırken dış membran yapıları bakterinin konakçı hücreye tutunması ve invaze olmasını sağlamaktadır. Bunların yanısıra bakterinin membran dışına ilettiği çeşitli salgı faktörleri (ekzotoksinler gibi) etkenin virülansını etkilemektedir. (Sharma ve ark., 2017).

Salmonella serovarlarında değişken olarak bulunan bir dizi önemli virülans fenotipi, bakteriyel kromozomda bulunan spesifik patojenite adaları ile haritalanmıştır. *Salmonella* patojenite adaları (SPI; *Salmonella* Pathogenicity Islands) adı verilen bu genetik alanlar serovarların farklı form ve düzeylerde enfeksiyon tablosu oluşturmalarına sebep olmaktadır. Virülansın merkezi unsurları olan SPI bölgelerinin kazanımı, *Salmonella* türlerinin konak organizmaya ait koşullara adaptasyonunda önemli bir rol oynadığı varsayılmaktadır. *Salmonella* tarafından enfeksiyon esansında aktif şekilde kullanılan virülans genleri kodlayan SPI'ların serovarlar arasında büyük oranda yatay gen transferi yoluyla taşınabildiği düşünülmektedir. Bu hipotez, SPI'ların sıklıkla farklı nükleotid dizilerine sahip olması, bu bölgelerin yakınında farklı genomik dizi kalıntılarının bulunması ve faj ve/veya transpozon ilişkili genlerin varlığı gibi savlar ile desteklenmektedir (Galán 1999; Fierer ve Guiney, 2001; Kombade ve ark., 2021).

Salmonella insan vücuduna girdiğinde ilk bağlanma yeri fagositik olmayan hücrelere invazyonla birlikte ince bağırsağın bağırsak epitelidir. İstila, tetik ve fermuar

mekanizmaları olarak adlandırılan iki mekanizma yoluyla aracılık edilebilir. Tetikleme mekanizması, SPI-1 üzerinde bulunan bir T3SS tarafından gerçekleştirilir ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini ve membranın karışmasını içerir. Fermuar mekanizması T3SS'den bağımsızdır, Rck lokusunu içerir ve konakçı reseptör aracılıdır. Mekanizmalar, aktivasyon tarzlarına göre farklılık gösterir: tetikleme mekanizması, hücrenin içinden salgı sistemleri tarafından iletilen bakteriyel efektörler tarafından aktive edilirken, fermuar mekanizması, hücrenin dışındaki konakçı hücre reseptörleri aracılığıyla aktive edilir (Elhadad ve ark., 2016; Velge ve ark., 2012). *Salmonella* patojenitesinde anahtar rol oynayan T3SS, intestinal epitel hücrelere invaze olma ve fagositler içinde hayatta kalma gibi *Salmonella*'nın patojenitesi için ana faktörler sağlamaktadır Yapılan araştırmalarda 20'den fazla SPI keşfedilmiştir ve T3SS gibi önemli virülans faktörlerine yönelik genleri ve *Salmonella*'nın konakçıda istilasına ve kalıcılığına yardımcı olan efektör proteinleri içermektedir. T3SS, efektör molekülleri konakçı hücrelere enjekte etmek için konakçı hücrelerde bir translokon gözenek oluşturan iğne benzeri bakteriyel membran yapılarıdır. (Blondel ve ark., 2009; Groismanve ark., 2014; Marcus ve ark., 2000; Steele-Mortimer ve ark., 2002; Winstanley ve Hart, 2001).

T3SS-1 ve T3SS-2'yi kodlayan SPI-1 ve SPI-2 ve *S. enterica*'nın tüm serovarlarında bulunmaktadır. T3SS-1, fagositik olmayan intestinal epitel hücrelerinin istilası için gereklidir. Bakteri konak hücre bağlantısı kurulduktan sonra efektörler konak hücreye enjekte edilebilir. SipA, SipC, SopB, SopE ve SopE2 efektörlerinin *Salmonella* tarafından konak hücreye salınması, konak aktin profillerinin yeniden düzenlenmesi yoluyla membran dalgalanmalarına neden olarak invazyon mekanizmasında rol oynamaktadır. *Salmonella*'nın enterositlere invazyonuna yardımcı olmanın yanı sıra çeşitli T3SS-1 efektörleri, pro-inflamatuar sitokin, enfeksiyon bölgesine fagositik hücrelerin taksisi için kemokin ekspresyonunu ve kaspaz mekanizmalarını indüklediği bilinmektedir. İnvazyon sonrasında intraselüler ortamda bulunan *Salmonella* içeren vakuollerin (SCV) konak hücrenin NF-κB tarafından düzenlenen apoptozunu inhibe etmek için AvrA, SseL, SpvB gibi efektör proteinler barındırdığı gösterilmiştir. (Hapfelmeier ve ark., 2004; Knodler ve ark., 2002; Lin ve ark., 2003; Ramos-Morales, 2012;)

SPI-2 ile kodlanan T3SS-2, makrofajlar ve dentritik hücreler gibi fagositik hücrelerin istilasında ve ardından bakterinin hücre içi hayatta kalmasında önemlidir. SPI-7, *Salmonella* Typhi ve Paratyphi C ile bazı *Salmonella* Dublin suşlarında bulunan büyük bir patojenite adasıdır. SPI-7, makrofaj enfeksiyonunda rolü olan tip IVb pili'yi kodlayan genleri, T3SS-1 tarafından salgılanan efektör protein SopE'yi ve Vi kapsüler antijeni içerebilmektedir. Vi kapsülü *Salmonella* Typhi'nin sistemik enfeksiyonu için önemli olan konak kompleman sistemini ve bakterinin opsonizasyonunu engelleyen önemli bir polisakkarittir (Johnson ve ark., 2018; Pfeifer ve ark., 1999; Pickard ve ark., 2003; Seth-Smith, 2008; Valdivia ve Falkow, 1997).

Patojenite adalarında kodlanan T3SS ve diğer virülans faktörlerin yanı sıra, *S. enterica*'nın bazı serovarları, retiküloendotelyal sistemdeki bakteriyel çoğalma için önemli olduğu gösterilen büyük (50 ila 285 kb) virülans plazmidi içerir. Klinik olarak, *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium, Choleraesuis ve Dublin gibi birçok *S. enterica* serovarının bu virülans plazmidi içerdiği bildirilmiştir. Ancak *Salmonella* Typhi ve *Salmonella* Paratyphi A ve B gibi bazı önemli serovarlarda virülans plazmidlerinin olmadığı gösterilmiştir. Bazı saha izolatlarından varlığı gösterilen daha büyük (~140 kb) virülans plazmitlerinin ayrıca antibiyotik direnç genlerini içerdiği bilinmektedir. Bu virülans plazmitleri, spv genlerine ek olarak fimbrial *pef* ve *fae* operonlarını ve *tra* konjugasyon genlerini de içerir. *Salmonella* fimbriasının pro-inflamatuar yanıtı indüklediği, epitelyal hücrelere adhezyona yardımcı olduğu ve biyofilm oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir (Feng ve ark., 2012; Li ve ark., 2015; Olsen ve ark., 2004; Ou ve Baron, 1991).

Gram negatif patojenlerde yaygın olan lipopolisakkarit lipid A endotoksinine ek olarak *Salmonella* türleri, enfeksiyonun seyri sırasında birçok ekzotoksin üretebilmektedir. Birkaç farklı sitotoksin ve bir enterotoksin içerdiği bilinen *Salmonella* ekzotoksinleri konak ile bakteri interaksiyonununda rol oynamaktadır. Örneğin bu toksinlerden olan *Salmonella* sitoletal genişletici toksinin (CDT; cytolethal distending toxin) etkilenen konak hücrelerde hücre döngüsünün durması, hücresel distansiyon ve apoptozla sonuçlanan DNA hasarına neden olduğu ortaya konmuştur (Grasso ve Frisan, 2015; Leclerc ve ark., 2017; Krishnakumar ve ark.,

2007; Pacello ve ark., 2008; Prouty ve ark., 2002; Sano ve ark., 2007; Simm ve ark., 2014).

Salmonella'nın diğer önemli bir özelliği ise biyofilm oluşturmadır. Biyofilm oluşumu, patojen bakterilerin lokalize ve kolonize olmalarında önemli bir özellik olarak ayrıca çeşitli mekanizmalar yoluyla bakterinin antibiyotiklere ve dezenfektanlara karşı direnç gelişimine yardımcı olduğu bilinmektedir. Biyofilm oluşturma kapasitesine sahip *Salmonella* izolatlarının, zorlu çevresel koşullarda (kısıtlı besin maddesi, düşük pH, yüksek sıcaklık vb.) hayatta kalma oranını arttırdığı gösterilmiştir. *Salmonella* dış membran matrisi ana bileşenlerinden olan curli fimbrialar, ekzopolisakkarit yapılar, selüloz, patojenin biyofilm oluşturma yeteneği açısından önemlidir. *Salmonella* Typhi ve *Salmonella* Typhimurium serovarlarının insan safra taşları üzerinde biyofilm oluşturabildiği ve biyofilm oluşumunun safraya bağlı olduğu in vitro olarak gösterilmiştir (Grasso ve Frisan, 2015; Leclerc ve ark., 2017; Krishnakumar ve ark., 2007; Pacello ve ark., 2008; Prouty ve ark., 2002; Sano ve ark., 2007; Simm ve ark., 2014).

Demir (Fe^{3+}), *Salmonella*'nın konak intraselüler ortamında hayatta kalması ve prolifere olması için önemli faaliyetler olan DNA replikasyonları, elektron taşınması (sitokromlar), amino asit ve nükleotid sentezi ve oksidatif metabolizma enzimleri için önemli bir kofaktördür. Enfeksiyona yanıt olarak konak hücresi, laktoferrin transferrin, ferritin ve NRAMP1 gibi proteinler eksprese ederek Salmonella aktivasyonunu sınırlamak amacıyla serbest Fe kısıtlanır. Ancak *Salmonella*, konak intraselüler matrisinde Fe düzeyini arttırmak ve absorbe edebilmek için Enterobactin ve Salmochelin gibi siderofor adı verilen demir şelatörleri üreterek Konak hücrede çoğalmayı sağlamaktadır. Bu virülans faktörlerine ek olarak *Salmonella*'nın, kaçış amacıyla makrofajlar içinde flagella üretimini, konakçı tarafından üretilen reaktif oksijen türleriyle nötralize etmek için süperoksit dismutazın kullanımını içeren birçok önemli virülans faktörleri de vardır (Grasso ve Frisan, 2015; Leclerc ve ark., 2017; Krishnakumar ve ark., 2007; Pacello ve ark., 2008; Prouty ve ark., 2002; Sano ve ark., 2007; Simm ve ark., 2014).

2.3.2. Salmonellozisin Gıda Hijyeni Açısından Önemi

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, diyare dünya çapında ciddi bir halk sağlığı sorunu olup, her yıl milyonlarca kişiyi etkilemekte ve 2021 verilerine göre yaklaşık 1,17 milyon ölüme yol açmaktadır (WHO, 2023). Salgınların kaynağı araştırıldığında üçte birinin gıda kaynaklı olduğu görülmektedir. Kanatlı, domuz ve sığır etleri, yumurta ve ürünleri insanlarda *Salmonella* enfeksiyonlarının önemli kaynakları olarak belirlenmiştir. *Salmonella* tipik olarak kontamine su veya gıda yoluyla fekal-oral yolla yayılır. *Salmonella* enfeksiyonu, açık yaraların veya vücudun mukozal kısımlarının kontamine ürünlerle, yüzeylerle veya suyla teması yoluyla meydana gelse de gelişmiş ülkelerdeki *Salmonella* salgınlarının temel nedeninin gıda olduğu bildirilmektedir. Enfeksiyon yolları, ekolojilerine bağlı olarak belirli *Salmonella* serotipleriyle ilişkili olma eğilimindedir. Örneğin, *Salmonella* Enteritidis yumurtlayan kümes hayvanları arasında bulunur ve kabuklu yumurtalarla ilişkili hastalık salgınlarının nedeni olmuştur (Besser, 2018; Boore vd. 2015; Popa ve Papa, 2021; Wattiau ve ark., 2011; WHO, 2015).

Hastalık oluşumu ile ilgili yapılan ilk çalışmalar, *Salmonella* enfeksiyonuna neden olmak için 10^6 organizmalık bulaşıcı dozun gerekli olduğunu ileri sürmüştür; ancak son çalışmalar bu tahmini ortalama 10^{3-4} CFU olarak yenilemiştir. Ek olarak, hastalık olasılığının veya atak oranının bulaşıcı dozla bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Dünya sağlık Örgütü tarafından yayınlanan raporda 1, 10 ve 100 organizmalık ortalama dozlar verildiğinde hastalık olasılığının sırasıyla %0,2, %2,2 ve %13 olduğu tahmin edilmiştir (Elhadad ve ark., 2016; Velge ve ark., 2012; WHO ve FAO, 2002).

İnsan bağırsağında 500 ila 1000 farklı bakteri türü bulunur ve bunlar çoğunlukla *Firmicutes, Bacteroidetes* ve *Actinobacteria olmak üzere* üç bakteri şubesine aittir. İntestinal kanal mikrobiyotası, *Salmonella*'nın çoğalması ve kolonizasyonunun baskılamasında ve bağışıklık tepkisinin optimize edilmesinde önemli görevler üstlenmektedir (Hurley ve ark., 2014; Rivera-Chávez ve Bäumler, 2015). Zhu ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan çalışmada, *Salmonella enterica* serovar Pullorum ile enfekte edilen tavuklarda bağırsak mikrobiyotasında belirgin bir disbiyozis geliştiği bildirilmiştir. Enfekte grupta *Firmicutes*/*Bacteroidetes* oranının arttığı, buna karşın kısa zincirli yağ asitleri (özellikle bütirat) üreten

Lachnospiraceae, Ruminococcaceae ve *Faecalibacterium* türlerinin belirgin şekilde azaldığı saptanmıştır. Bununla birlikte, *Enterobacteriaceae* ve *Desulfovibrionaceae* gibi bakterilerin oranında artış gözlenmiştir. Bu değişikliklerin sonucunda, bağırsakta antiinflamatuar kısa zincirli yağ asitlerinin düzeyinin azalması ve inflamasyonla ilişkili metabolitlerin artması *Salmonella*'nın kolonizasyonuna uygun bir mikrobiyal ortam oluşturmuştur. Ayrıca, mikrobiyota üyeleri arasındaki simbiyotik ilişkilerin zayıfladığı belirlenmiş, bu durum da kolonizasyon direncinin azalmasına yol açmıştır. Çalışma genel olarak, bütirat üreten yararlı bakterilerin azalmasının epitel bariyer fonksiyonunu ve immün yanıtı zayıflatarak *Salmonella*'nın tutunmasını ve çoğalmasını kolaylaştırdığını ortaya koymuştur (Mon ve ark., 2020).

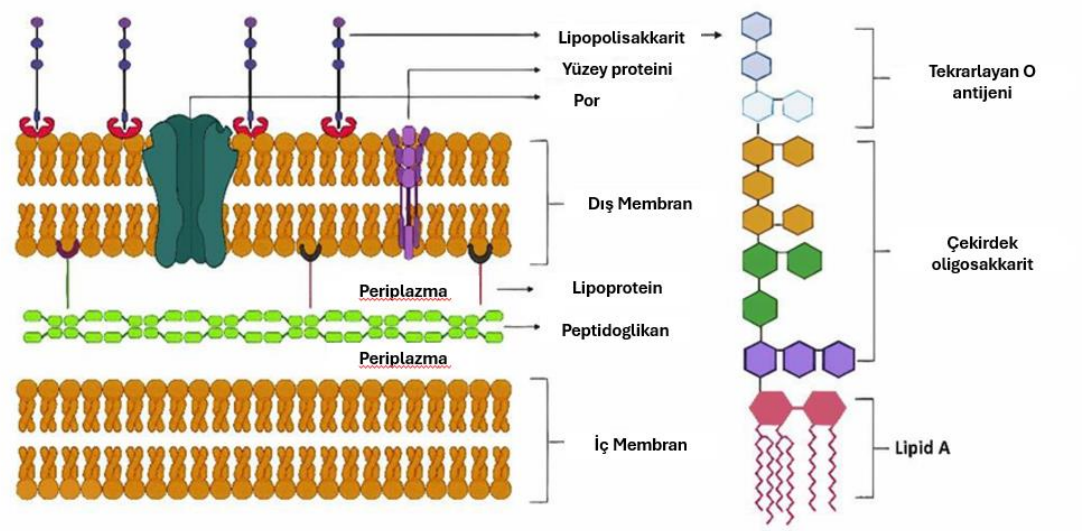
Salmonella'nın su aktivitesi düşük ve dondurulmuş gıdalarda uzun süre canlılığını koruyabildiği bilinmektedir. Kuru gıdalar ve baharatlarda varlığını sürdürebildiği bildirilmiştir (Podplak ve ark., 2010). Gıda zinciri boyunca kesim veya hasat, işleme, depolama, dağıtım ve taşımadan hazırlamaya kadar olan kötü hijyen uygulamaları, tüketiciyi ölümcül olabilecek gıda kaynaklı enfeksiyonlara maruz bırakabilmektedir (Ehuwa ve ark., 2021). Gıda hijyeni uygulamaları, temizliğe, çiğ hayvansal hammaddenin diğer çiğ/pişmiş gıdalardan ayrılmasına, doğru sıcaklık uygulamaları ve gıdaların ısı işleminden önce ve sonra soğutulmasına (saklanmasına) odaklanmaktadır. Gıda işleme sırasındaki hatalı hijyen uygulamaları gıdalarda *Salmonella*'nın üretim hattı boyunca yayılmasına yol açabilmektedir. Kitlesel gıda üretiminin yoğunlaşması, popülasyon artışı ve değişen toplumsal tüketim alışkanlıkları, gıda kaynaklı salgınlar için daha yüksek bir risk ortaya çıkarmaktadır. Gıda personelleri, hayvansal hammaddeler, paketlenmemiş gıda ürünleri, gıda teknolojisi ekipmanları ve son ürünlerin depolandığı alanlar gibi gıda zincirinin tüm aşamalarında kontaminasyon gözlenebilmektedir (Ehuwa ve ark., 2021; Podolak ve ark., 2010).

Gıda güvenliği yönetim sistemleri, gıda tüketiminden kaynaklanan insan sağlığına yönelik riskleri tahmin etmeyi ve bu riskleri kontrol altına almak ve azaltmak için azaltma stratejilerini belirlemeyi, seçmeyi ve uygulamayı amaçlamaktadır. Yeni yaklaşımların, gıda güvenliği sorunlarının daha keskin bir şekilde tespit edilmesine ve bunlarla doğru şekilde mücadele için etkin stratejilerin belirlenmesine olanak

sağladığı bilimsel olarak ortaya konulmuştur (Bintsis, 2017). 1996 yılında ABD Tarım Bakanlığı (USDA) Gıda Güvenliği Denetim Servisi (FSIS), et ve kümes hayvanı ürünlerinde patojen mikroorganizmaların oluşumunu azaltmak amacıyla Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktası (HACCP) Sistemleri Nihai Kuralını yayınlamıştır. 2001 yılında USDA, bu programların etkinliğini vurgulayan ve HACCP öncesi uygulamayla karşılaştırıldığında numunelerdeki *Salmonella* varlığının %50 azaldığını gösteren bir rapor yayınlamıştır (USDA, 2001). Kontrol çabaları aynı zamanda kabuklu yumurtalarda *Salmonella*'nın kontrolüne yönelik uygulamaların standartlaştırılmasını da kapsayacak şekilde genişletilmiştir. *Salmonella* Enteritidis'e yönelik risk değerlendirmesi 1996 yılında başlatılmış ve bunu "Yumurta Güvenliği Eylem Planı" takip etmiştir. 1999 yılına gelindiğinde 100,000 kişide vaka sayısı 1.98'e düşmüş olup, FSIS yumurta ve yumurta ürünlerine yönelik standartların geliştirilmesine rehberlik etmeye devam etmektedir (CDC, 2010; USDA, 1996; USDA, 2001).

2.4. GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE LİPOPOLİSAKKARİT (LPS)

Gram negatif bakteriler, sitoplazmik bileşenleri çevreleyen bir iç membran ve hücreyi çevresinden ayıran bir dış membrana sahiptir. Bu iki membran, peptidoglikan hücre duvarını içeren, periplazma olarak adlandırılan aköz bir hücresel bölmeyi çevrelemektedir. Dış membran çevresel tehditlere karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır. Bu iki tabakadan oluşan membranda, iç tabaka fosfolipid ve dış tabaka ise lipopolisakkarit (LPS) molekülleri bulundurmaktadır. LPS'nin yapısı Şekil 2.2'de gösterilmiştir (Bertani ve Ruiz, 2018).



Şekil 2.2. Gram negatif hücre membranının yapısı ve LPS (Kalyan ve ark., 2022).

Gram negatif bakterilerin hücre dışı yapısı LPS, proteinler, lipidler, genetik materyaller ve diğer bazı virülans faktörleri içermektedir. Dış membran proteinleri (OMP) ve pasif difüzyon kanalları (porinler), besin maddelerinin hücre içine alınmasında işlev görmektedir. Periferik dış membran proteinleri, kovalent olarak bağlanmış N-terminal lipid kuyrukları ile dış membrana bağlanan lipoproteinlerdir. Lipoproteinlerin, dış membran biyogenezinde veya peptidoglikan sentezinde rol oynama ve membran stresini algılama gibi işlevleri bulunmaktadır (Konovalova ve ark., 2017).

LPS, dış membranın ana yapısal bileşeni olarak lipid A, çekirdek oligosakkarit ve O antijeni olmak üzere üç yapısal bölgeden oluşmaktadır. Molekülün hidrofobik kısmı olan lipid A, biyolojik etkilerin önemli bir kısmından sorumludur. Çekirdek oligosakkarit, lipid A'nın glukozaminlerine bağlı, tekrar etmeyen bir yapı olarak göze çarpmaktadır. O antijeni ise çekirdek oligosakkarite eklenmiş bir polisakkarit olarak 2-8 şekerden oluşmaktadır. Belirli bir bakteriye özgü olan bu O-spesifik zincir yapıları, yukarıda bahsedildiği üzere Gram negatif bakterileri tanımlamak için kullanılmaktadır (Bertani ve Ruiz 2018; Caroff ve Novikov, 2020).

LPS'nin genel yapısı büyük ölçüde korunmakla birlikte tür ve alttür seviyesinde çeşitli yapısal varyasyonlar gözlenebilmektedir. Benzer şekilde, lipid A'nın da tür düzeyinde korunduğu ve çevresel koşullara yanıt olarak değişikliklere uğrayabildiği

bildirilmiştir. Çekirdek oligosakkaritler ise türler arasında ve hatta bir türün bazı suşları arasında dahi değişiklik gösterebilmektedir (Bertani ve Ruiz, 2018). LPS, birçok Gram negatif organizma için endotoksin olarak adlandırılmıştır. İmmün sistem, LPS'nin lipid A yapısına, Toll Benzeri Reseptör 4 (TLR 4) ile yanıt verecek şekilde gelişmiştir. Bununla birlikte, LPS yapılarında lipid A'yı da kapsayan önemli çeşitlilikler görülmektedir. Bu çeşitliliğin sonucunda, konak tarafından farklı LPS yapılarına farklı tepkiler gelişmiştir. *E. coli* ve *Salmonella* tarafından üretilen klasik, hekzasile edilmiş, bisfosforile lipid A molekülünün diğer lipid A formlarına oranla daha güçlü immünojenik etki oluşturduğu tespit edilmiştir (Bertani ve Ruiz, 2018). Ayrıca, daha az immünojenik lipid A üretimi, bazı patojenler tarafından konakçının bağışıklık tepkisinden kaçmak için kullanılan bir stratejidir. Bazı organizmalar, LPS'lerini O antijeni ile maskeleyerek konakçı bağışıklık tepkisinden kaçabilmektedir. O antijeni, antikor üretimini indüklese de antijen zincirinin uzunluğu, antikorların bakteriye fiziksel olarak erişmesini engeller. Bu da bakteriyi kompleman aracılı öldürülmeden korur. O-antijen yapısı, bakterileri lizise karşı koruduğundan enfeksiyon şekillenmesi ve patojenite açısından önemlidir (Bertani ve Ruiz, 2018; Clay ve ark., 2008; Needham ve ark., 2013).

LPS, konak immün sistemi tarafından verilen yanıtları modüle ederek bakteri-konak etkileşimlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu yanıtlar, LPS'nin lipid A bölgesine bağlanan Patern Tanıma Reseptörleri (PRR; Pattern Recognition Receptors,) ve söz konusu PRR'nin hücre içindeki lokalizasyonu tarafından belirlenerek membrana bağlı ya da sitozolik olarak şekillenebilmektedir. Lipid A bölgesini tespit eden membran lokalize PRR'ler, doğal immün sisteminin hem sitokin hem de interferon salınımını indüklerken sitozolik PRR'ler hücre zarında gözenek oluşumunu ve IL-1 ailesi inflamatuar sitokinlerinin salınımını indüklemektedir (Bertani ve Ruiz, 2018; Gauthier ve ark., 2022).

LPS molekülleri, bakteriyel çoğalma sırasında ve antibiyotik kullanımı gibi sebepler ile hücresel yapısal bütünlüklerinin bozulduğu durumlarda serbest kalabilmektedir. LPS, konak kan dolaşımında büyük miktarlarda salınırsa, şiddetli bir inflamatuar tepkiye yol açarak çoklu organ yetmezliğine ve ölümle sonuçlanabilen septik şoka

neden olabilmektedir. Düşük düzeyde LPS varlığı ise konak immün sistemini tetikte tutmaktadır (Caroff ve Novikov, 2020).

2.5. PATERN TANIMA RESEPTÖRLERİ (PRR; PATTERN RECOGNITION RECEPTORS)

Bağışıklık, kazanılmış ve doğal bağışıklık olarak ikiye ayrılmaktadır. Kazanılmış bağışıklıktan, spesifik bir patojene veya antijene yanıt olarak çoğalan T ve B lenfositleri sorumludur. Kazanılmış bağışıklık tepkilerinin (humoral ve hücresel) oluşturulması için belli bir süreye ihtiyaç duyulmaktadır. Sonrasında hafıza T ve B lenfositlerinin üretilmesi yoluyla kazanılan direnç kalıcı hal almaktadır. Doğal bağışıklık ise hasar veya patojen istilası üzerine hızlı bir yanıt sağlayarak kazanılmış immün sisteminin antijene özgü bir yanıt başlatmasına öncül olmaktadır. Doğal bağışıklık makrofajlar, doğal öldürücü (NK; Natural Killer) hücreler, nötrofiller, mukozal epitel hücreleri ve endotel hücrelerinden oluşmaktadır. Bağışıklık sistemi, patojenleri spesifik moleküllere özgün reseptörler vasıtasıyla ayırt edebilmektedir (Abreu ve Arditi, 2004; El-Zayat ve ark., 2019).

Patojenler konak tarafından tanınmamak için mutasyona uğrama eğilimindedir. Bu sorunun konak açısından çözümü patojenler üzerindeki korunmuş moleküler yapıları tanıyan çeşitli PRR'lerin evrimleşmesiyle sağlanmaktadır. Germline (ebeveynlerden çocuklara üreme hücresi yoluyla aktarılan) mutasyonlar tarafından kodlanan PRR'ler, mikroorganizmaların varlığını algılamaktan sorumludur. PRR'ler arasında TLR ve C tipi lektin reseptörleri (CLR) gibi transmembran proteinlerinin yanı sıra retinoik asitle indüklenebilir gen I benzeri reseptörler (RLR), nükleotid oligomerizasyon alanı benzeri reseptörler (NLR, ayrıca NACHT, LRR ve PYD alanı proteinleri olarak da adlandırılır) ve AIM2 ailesinin üyeleri gibi sitozolik DNA sensörleri bulunmaktadır. Bazı durumlarda viral proteinler bu reseptörlerin tetikleyicisi olsa da baskın viral aktivatörler nükleik asitlerdir. Reseptörler ile ilgili detaylı bilgi Tablo 2.2'de verilmiştir (Abreu ve Arditi, 2004; El-Zayat ve ark., 2019; Takeuchi ve Akira, 2010; Thompson ve ark., 2011).

Tablo 2.2. Patern tanıma reseptörleri (PRR) ve patojen ilişkili moleküler desenlerin etki mekanizmaları (Li ve Wu, 2021)

PRR	**Etki alanları**	**Hücresel dağıtım**	**PAMP**	**Kaynak**	**Sinyal yolağı**
Toll Benzeri Reseptörler (TLR)					
TLR1 (TLR1-TLR2)	LRR alanı Transmembran alan TIR alanı (hücre dışından hücre içine)	Mo, DC, Ma, Eo, Ba	Triasil lipopeptit	Bakteri	Çoğu TLR: MyD88'e bağımlı yollar TLR3: TRIF'ye bağımlı yollar TLR4: MyD88'e bağımlı yollar ve TRIF'ye bağımlı yollar
TLR2 (TLR1-TLR2, TLR2-TLR6)		Mo, DC, Ma, Eo, Ba	Lipoteikoik asit, arabinomannan, peptidoglikan, zimosan, lipoprotein, por proteini	Bakteri, mikobakteri, mantar, mikoplazma, *Neisseria*	
TLR3		Mφ, DC, IEC	dsRNA	Virüs	
TLR4 (MD-2/CD14)		Mφ, DC, Ma, Eo	LPS, HSP	Bakteri, konak	
TLR5		IEC	Flagellin	Bakteri	
TLR6 (TLR2-TLR6)		Mo, DC, Ma, Eo, Ba	Lipoteikoik asit, peptidoglikan	Bakteri	
TLR7		pDC, Mφ, Eo	ssRNA, İmidazokinolin	Virüs, yapay olarak sentez	
TLR8		Mφ, N	ssRNA	Virüs	
TLR9		pDC, Eo, Ba	Metillenmemiş CpG DNA	Bakteri, virüs	
TLR10 (insan)		pDC, Eo, Ba	dsRNA	Virüs	
TLR11 (fare)		Mφ, DC	Profilin ve ilişkili proteinler	*Toxoplasma gondii*	
TLR12 (fare)		DC	Profilin ve ilişkili proteinler	*Toxoplasma gondii*	
TLR13 (fare)		Bilinmiyor	23s ribozomal RNA	Bakteri	
RLR					
RIG-1	RD)-CTD-DexD/H helikaz alanı-CARD	Sitozol	5'-trifosforile edilmiş RNA, kısa zincirli dsRNA	Virüs	MAVS-TRAF6-NF-κB/TBK1 yolları
MDA5			poli IC, uzun zincirli dsRNA	Virüs	
LGP2			dsRNA	Virüs	
Nod Benzeri Reseptörler (NLR)					
NOD1	LRR alanı - alanı- efektör alanları	IEC, Mφ sitozolü	iE-DAP	Gram negatif bakteri	RIP2-TAK1-NF-κB yolları
NOD2			MDP	Bakteri	
C tipi lektin reseptörleri (CLR)					
Dektin-1	CTLD-ITAM	DC, Mφ	β-Glukan	Mantar	Tirozin kinaza bağımlı ve bağımlı olmayan yollar
Dektin-2			α-Mannan	Mantar	
ALR'ler	HIN-200-PYD	Sitozol	dsDNA	Bakteri	İnflammazom-piroptoz

ALR: Absent in melanoma-2-like reseptörler; Ba: bazofiller; CARD: kaspaz aktivasyonu ve toplama alanı; CTD: C-terminal alanı; CTLD: C tipi lektin benzeri alanlar; DC: dendritik hücre; dsRNA: çift sarmallı RNA; Eo: eozinofiller; HSP: ısı şok proteini; iE-DAP: γ-D-glu-mezo-diaminopimelik asit; IEC: bağırsak epitel hücresi; ITAM: immünoreseptör tirozin-bazlı aktivasyon motifi; LRR: lösin açısından zengin tekrar; Ma: mastosit; MAVS: mitokondriyal antiviral sinyal proteini; MDP: muramil dipeptit; MyD88: miyeloid farklılaşma faktörü 88; N: nötrofil; NBD: nükleotid bağlama alanı; NF-κB: nükleer faktör κB; pDC: plazmasitoid dendritik hücre; PYD: pyrin alanı; Mo: monosit; RD: baskılayıcı alanı; RIP2: reseptörüyle etkileşime giren serin-treonin proteini 2; ssRNA: tek sarmallı RNA; TAK1: dönüştürücü büyüme faktörü- β-aktive edilmiş kinaz 1; TBK1: TANK bağlama kinaz 1; TIR: Toll/IL-1R alanı; TRAF6: tümör nekroz faktörü reseptörüne bağlı faktör; TRIF TIR: alanı içeren adaptör proteini indükleyen interferon β.

2.5.1. Patojenle İlişkili Moleküler Model (PAMP; Pathogen-Associated Molecular Pattern)

Doğal yanıtta (patern tanıma olarak da bilinir) mikroorganizmalara özgü moleküler yapıların tespiti esas görev olarak kabul edilmektedir. Her bir PRR geniş bir özgüllüğe sahip olarak ortak bir yapısal motif veya desene sahip çok sayıda moleküle potansiyel olarak bağlanabilmektedir. PRR'lerin hedef aldığı patojenle ilişkili moleküller (PAMP'ler) patojenik hem de patojenik olmayan mikroorganizmalarda mevcut olabilmektedir (Medzhitov, 2007). Bakteriyel PAMP'ler genellikle DNA (örn. metillenmemiş CpG motifleri), çift sarmallı RNA (dsRNA), tek sarmallı RNA (ssRNA) ve 5'-trifosfat RNA'nın yanı sıra lipoproteinler, lipopolisakkarit, peptidoglikan, lipoteikoik asitler ve hücre duvarı lipoproteinleri gibi hücre duvarının bileşenleridir. Toll benzeri reseptörler ve retinoid asitle indüklenebilir gen I (RIG-I) benzeri reseptörler (RLR'ler), AIM2 benzeri reseptörler (ALR'ler) ve nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alanı (NOD) benzeri reseptörler (NLR'ler) gibi diğer PRR'ler tarafından tanınmaktadır. PAMP'lerin doğal immün sistem tarafından tespiti, mikroorganizmaların varlığına işaret etmektedir (Medzhitov 2007; Tang ve ark., 2012). PAMP'ler üç ana nedenden dolayı doğal bağışıklık tarafından tanınmaya çok uygundur. Bunlar; (i) belirli bir sınıfa ait mikroorganizmalar arasında değişmemeleri, (ii) mikroorganizmalara özgü olan ve olmayan moleküller arasında ayrım yapılmasına izin vermeleri ve (iii) adaptif evrim yoluyla mikroorganizmaların doğal bağışıklık tanımadan kaçma yeteneklerini sınırlandırmaları olarak verilebilir. Böylece PAMP'ler, mikroorganizma kaynaklı konak organizmaya ait birçok yapısal hücre ve doğal immün sisteminin patern tanıma reseptörü (PRR) taşıyan hücreleri tarafından tanınmaktadır (Medzhitov 2007; Tang ve ark., 2012).

2.5.2. Hasar İlişkili Moleküler Model (DAMP; Damage-Associated Molecular Pattern)

Hasar İlişkili Moleküller Yapılar (DAMP), normal olarak hücre içinde tutulan ve bu nedenle normal fizyolojik koşullar altında immün sistem tarafından tanınmaktan gizlenen endojen faktörlerdir. Hücresel stres veya hasar koşulları altında, bu moleküller hücre dışı ortama salınabilir ve inflamasyonu tetikleyebilir. Hücre ölümünün türü, özellikle immünojenitesini ve immün sistemi uyarıcı DAMP'leri

serbest bırakma yeteneğini etkilemektedir. Ancak genel olarak DAMP'ler, konakçıya yönelik potansiyel bir tehlikenin sinyalleri olarak yorumlanmaktadır (Chen ve Nuñez 2010).

Nekrozun genellikle aşırı hasar koşullarında (iskemi, travma gibi) meydana geldiği bilinmektedir. Nekrotik hücrelerde şekillenen plazma membran bütünlüğünün bozulmasıyla hücre içi materyallerin hücreden salınması gerçekleşmektedir. Nekrotik hücrelerden türetilen prototip DAMP'ler arasında kromatinle ilişkili protein yüksek hareketli grup kutusu 1 (HMGB1), ısı şok proteinleri (HSP: Heat Shock Proteins), heparin sülfat, ATP, RNA, DNA ve ürik asit gibi pürin metabolitleri bulunmaktadır. Hücre içi bir kaynaktan gelen DAMP'lere ek olarak hücre dışı olarak yerleştirilmiş DAMP'ler de bulunmaktadır. Bunlar tipik olarak doku hasarı sırasında matris bozulmasıyla salınmaktadır. Hyaluronan, heparan sülfat ve biglikan gibi hücre dışı matriks parçaları, ölmekte olan hücrelerden salınan enzimler veya doku onarımı ve yeniden yapılanmasını desteklemek üzere aktive edilen proteazlar tarafından proteolizin bir sonucu olarak üretilmektedir. Benzer şekilde, hücre içi moleküllere ek olarak, IL-1α ve IL-33 gibi biyolojik olarak aktif pro-inflamatuar sitokin ve kemokinlerin hücre içi depoları da nekrotik hücreler tarafından salınabildiği bilinmektedir. Bu faktörler geleneksel olarak DAMP olarak kabul edilmese de inflamatuar yanıtlara aracılık edebilmektedir. TLR'ler ve ileri glikasyon son ürünleri için reseptör (RAGE), DAMP reseptörleri olarak kategorize edilmektedir (Chen ve Nuñez 2010; Tang ve ark. 2012).

2.6. TOLL BENZERİ RESEPTÖRLER (TLR; TOLL-LIKE RECEPTORS)

TLR'ler makrofajlar, dentritik hücreler, NK hücreleri, mast hücreleri ve granülositler (nötrofiller, bazofiller ve eozinofiller) gibi tüm doğal bağışıklık hücrelerinde olduğu gibi, miyelomonositik hücreler, endotelyal ve epitelyal hücrelerin yanı sıra çeşitli organ parankima hücreleri tarafından da ifade edilmektedir. TLR'ler, tümü ortak bir hücre dışı lösin açısından zengin ve stoplazmik alanda bulunan transmembran proteinlerdir. TLR'nin sitoplazmik alanı, IL-1 ve IL-18 reseptörlerine homologdur ve bu reseptörlerde ortak olan Toll/IL-1 reseptörü (TIR) homoloji alanı içermektedir. TLR'ler, nükleer translokasyon ve pro-inflamatuar transkripsiyon faktörü NF-κB'nin

aktivasyonu ile sonuçlanan, TIR sinyal bölgeleri aracılığıyla ifade edilen ortak bir aktivasyon yolunu paylaşmaktadır (Abreu ve Arditi, 2004; El-Zayat ve ark., 2019)

TLR'ler ile uyum içinde çalışan ilgili bir PRR seti, NOD1 ve NOD2 olarak bilinen iki ana hücre içi proteinden oluşmaktadır. NOD1, Gram negatif bakterilerden peptidoglikan yapısında bulunan diamino-pimelat içeren parçaları tanımaktadır. NOD2, neredeyse tüm Gram negatif ve pozitif bakterilerin peptidoglikanında ortak bir yapı olan muramil dipeptidi tanımaktadır (Cristofaro ve Opal, 2006). Bu NOD proteinleri, invaziv bakteriyel patojenlere karşı hücresel doğal yanıt aktive etmede birbirleriyle ve TLR'lerle sinerji oluşturmaktadır. TLR aktivasyonu, konak tarafından patojenlere karşı bir savunma mekanizması olarak sinyal kademelerini uyararak çeşitli inflamatuar sitokinlerin ve immün modülatörlerin salınmasına yol açmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda yüksek TLR aktivasyonun, sürekli pro-inflamatuar sitokin ve kemokin üretimine sebep olduğu ve bağışıklık homeostazını bozduğu bildirilmektedir. Bunun sonucu olarak lupus eritematozus ve romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklar, kanser, sepsis, Alzheimer ve tip 1 diyabet gibi birçok hastalığın gelişmesine ve ilerlemesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (El-Zayat ve ark., 2019). Ayrıca dengede sürdürülen TLR4 sinyalizasyonunda oluşan eksikliklerin, inflamatuar bağırsak hastalığı riskini arttırdığı düşünülmektedir. TLR4 veya NOD proteinlerinin varyant formlarından bakteriyel antijenlerin gecikmeli veya yetersiz temizlenmesinin, antijen fazlalığı durumuyla sonuçlanabileceği ve inflamatuar bağırsak hastalığının gelişimine katkıda bulunabileceği varsayılmaktadır (Cristofaro ve Opal, 2006).

Bugüne kadar TLR'nin PAMP ve DAMP'lerin çeşitli düzeylerde tanıyabilen 10 insan ve 13 murin alt tipi tanımlanmıştır. TLR'ler, virüs, bakteri, mikobakter, mantar ve parazitlerden türetilen farklı PAMP'leri tespit edebilmektedir. Bunlar arasında LPS'in TLR4; flagellinlerin TLR5; lipoproteinlerin TLR1, TLR2 ve TLR6; çift sarmallı (ds) RNA'nın TLR3; tek sarmallı (ss) RNA'nın TLR7 ve TLR8 ve DNA'nın ise TLR9 tarafından tanındığı ortaya konmuştur (Abreu ve Arditi, 2004; Kawai ve Akira 2011; El-Zayat ve ark., 2019). Tanımlanmış olan TLR tipleri ilgili ligand adaptör yapıları konumları ve bulundukları hücre türü Tablo 2.3'te detaylı olarak verilmiştir.

Bakterilerin TLR'ler tarafından tanıması tür spesifik PAMP yapılarına bağlı olarak, plazma zarında (örn. TLR4) veya bir fagozomda (örn. TLR2) gerçekleşebilmektedir. Buna bağlı olarak oluşacak yanıtın lokalizasyonu da konak hücre tipine özgü değişkenlik gösterebilmektedir. Spesifik TLR'ler, patojenlerin çeşitli yapısal unsurları arasında ayrım yaparak spesifik bir savunma için uygun bir inflamatuar yanıtın oluşturulmasını sağlamaktadır (Abreu ve Arditi, 2004).

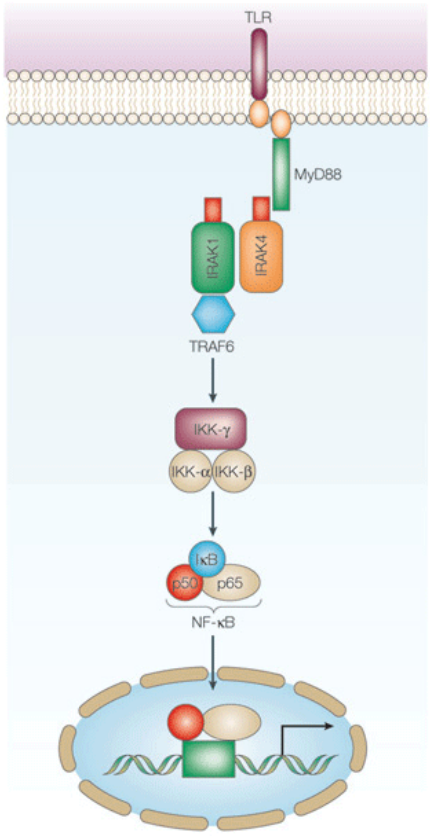
Tablo 2.3. TLR'ler, ligandlar, adaptörler, konum ve hücre türü (Frazão ve ark., 2013)

Reseptör	**Tanıma**	**Ligand Konumu**	**Adaptör**	**Konum**	**Hücre Türü**
TLR1	Triasil lipopeptitler	Bakteri	MyD88	Hücre membranı	PMN, monosit, makrofaj, B hücresi, DC hücresi
TLR2	Glikolipidler, LTA, HSP70, zimosan	Gram pozitif bakteri, hücre konakçısı	MyD88	Hücre membranı	Monosit, miyeloid DC, mast hücresi
TLR3	Çift sarmallı DNA	Virüs	TRIF	Endozom	DC, B hücresi
TLR4	LPS, HSP, fibrinojen, heparan sülfat fragmanları, hyaluronik asit fragmanları	Gram negatif bakteri	MyD88/ TRIF/ TRAM	Hücre membranı	Monosit, makrofaj, miyeloid DC, mast hücresi, bağırsak epiteli
TLR5	Flagellin	Bakteri	MyD88	Hücre membranı	Monosit, makrofaj, DC, bağırsak epiteli
TLR6	Çoklu diasil lippopeptitler	Mikoplazma	MyD88	Hücre membranı	Monosit, makrofaj, mast hücresi, B hücresi
TLR7	İmidazokinolin, loksorbin (guanozin analoğu), bropirimin, tek sarmallı RNA	Küçük sentetik bileşenler	MyD88	Endozom	Monosit, makrofaj, plazmosit DC, B hücresi
TLR8	Küçük sentetik bbileşikler, tek sarmallı RNA		MyD88	Endozom	Monosit, makrofaj, DC, mast hücresi
TLR9	Metillenmiş CpG-DNA	Bakteri	MyD88	Endozom	Monosit, makrofaj, plazmosit DC, B hücresi
TLR10	Bilinmeyen	Bilinmeyen	Bilinmeyen	Hücre membranı	Monosit, makrofaj, B hücresi
TLR11	Profilin	*Toxoplasma gondii, üropatojenik E.coli*	MyD88	Hücre membranı	Monosit, makrofaj, karaciğer hücreleri, böbrek hücreleri, mesane epiteli

2.7. TLR4 MEKANİZMASI VE LPS

Belirtildiği gibi TLR4, LPS reseptörüdür. Son çalışmalar, LPS tanımanın karmaşık olduğunu, TLR4'ü kapsayan bir mekanizma olduğunu; ancak TLR4'ün tek başına immün yanıt için yeterli olmadığını ortaya koymuştur (Cristofaro ve Opal, 2006; Miyake, 2004). LPS'nin tanınmasında yer alan ilk konak protein LPS bağlayıcı

proteindir (LBP). Söz konusu protein, karaciğerde üretilen ve kan dolaşımında bulunan bir akut faz proteinidir. LBP'nin rolü, başlangıçta LPS'yi bağlamak ve ardından CD14 ile bir kompleks oluşturarak LPS'nin reseptör kompleksine kenetlenmesine yardımcı olmaktır (Şekil 2.3). Böylece LPS'nin, TLR4 ve LPS tanıma kompleksi ek bileşenlerinden olan MD-2'den oluşan LPS reseptör kompleksine aktarılması sağlanmaktadır (Pålsson-McDermott ve O'Neill, 2004).



Şekil 2.3. LPS-TLR4 sinyal yolu (Miller ve ark., 2005).

Ekstraselüler yardımcı protein MD-2'nin, TLR4 ile ifade edildiği takdirde konak hücrenin LPS duyarlılığını arttırdığı ortaya konularak LPS ilişkili TLR4 sinyalizasyonu hakkında tamamlayıcı veriler elde edilmiştir. LPS'ye doğrudan bağlanan MD-2'nin bu yolak üzerine etkisi CD14 veya LPS bağlayıcı proteinden bağımsızdır. Efektör hücreler tarafından gösterilen pro-inflamatuar yanıtının modülasyonuna katkıda bulunan MD-2 ve ilişkili TLR4 kompleksi hücre içi sinyal yollarını başlatmakla sorumludur (Cristofaro ve Opal, 2006; Kuzmich ve ark., 2017; Shimazu ve ark., 1999).

LPS'ye yanıt olarak TLR4 tarafından aktive edilen ve kapsamlı şekilde üzerine çalışmalar sürdürülen sinyal yolakları işlevlerini adaptör proteinler ile göstermektedir. Bu adaptörler arasında miyeloid farklılaşma faktörü 88 (MyD88), MyD88 adaptör benzeri protein (Mal, TIRAP), Toll/interlökin-1 reseptör (TIR) içeren adaptör molekülü (TRIF, TICAM-1) ve TRIF (TRAM, TICAM-2) molekülleri gösterilmektedir (Pålsson-McDermott ve O'Neill, 2004).

TLR4'ün MyD88'e bağımlı ve bağımsız iki mekanizması bulunmaktadır. LBP ve CD14'ün ardışık eylemi, hücre yüzeyi üzerinde aktive edilmiş TLR4/MD-2 heterodimerlerinin oluşumunu desteklediğinde, hücre içi sinyal TLR4/MyD88/NF-κB ve TLR4/TRIF/IRF3 yolları olmak üzere iki farklı yönden birbirini takip etmektedir (Kuzmich ve ark., 2017).

MyD88 sinyali, pro-inflamatuar sitokinlerin hızlı üretimi ve tehditlere karşı doğal bağışıklık tepkileri ile ilişkilidir. Bunun aksine, TRIF sinyallemesi, adaptif bağışıklık tepkilerini teşvik edebilen süreçlerle ilişkilidir (Díaz-Dinamarca ve ark., 2023). MyD88'den bağımsız yolda, TRIF adaptörü aracılığıyla TLR4, TLR3 ile aynı yoldan sinyal verir ve IFNβ üretimiyle sonuçlanır. TLR4 sinyali yoluyla NF-κB aracılı olaylarla hızlı sinyal iletimi ve sitokin sentezleri, adaptör proteini MyD88 gerektirir (Cristofaro ve Opal, 2006).

TLR4'ün hücre içi kısmı ve TLR4 adaptör proteinlerinin tümü, karşılıklı etkileşimlerden sorumlu TIR alanlarına sahiptir. MyD88'e bağımlı ve TRIF'e bağımlı yolakların rekabetçi oldukları görülmüştür. TLR4/MyD88 yolağı, plazma zarı üzerinde bulunan LPS/MD-2/TLR4 kompleksinden başlarken, TLR4/TRIF transdüksiyonu, kompleksin endozomlara dönüşümünden sonra başlamaktadır (Cristofaro ve Opal, 2006; Kuzmich ve ark., 2017).

MyD88 yolağında, TIRAP adaptörü, aktifleştirilmiş heterodimeri oluşturan iki TLR4'ün TIR-TIR dimerine bağlanmaktadır. TIRAP, hücre içi bir proteindir ve membranın sabitlenmesi için gerekli olan bir fosfatidilinositol 4,5-bifosfat bağlama alanına sahip olarak bir homodimer oluşturmaktadır. TLR4'ün TIR alanlarına bağlanarak birlikte MyD88'in katılımı için arayüz oluşturmaktadır (Kuzmich vd. 2017).

MyD88 molekülleri, serin/treonin kinazları, Interlökin-1 reseptörü ile ilişkili kinazları (IRAK2 ve IRAK4) bağlamasıyla tetiklenen birtakım reaksiyonlar çeşitli protein kinazları aktive ederek ve NF-κB ile pro-inflamatuar sitokinler IL-1β, TNF-α ve IL-6'nın üretimini ve salımını indüklemektedir (Ferrao ve ark., 2014; Lin ve ark., 2010). TLR4, PAMP'ler dışında, hücresel hasara yanıt olarak fibronektinler, küçük hiyalüronan parçaları ve hatta doymuş yağ asitleri gibi hasarlı ve nekrotik dokulardan (steril inflamasyon) türetilen DAMP'ler tarafından da aktive edilebilmektedir (Lee ve Seong, 2009). Eksojen uyaranların yanı sıra, oksitlenmiş fosfolipidler veya yüksek hareketli grup kutusu 1 (HMGB1) gibi endojen konak moleküllerin de TLR4'ü aktive ettiği gösterilmiştir (Tsung ve ark., 2005). Farklı LPS, CD14 ve MD-2 (bir disakkarit omurgasına bağlı 5 veya 6 lipofilik yağ asidi zinciri ve bir veya iki fosfat grubu) ile optimum etkileşimi sağlayan kimyasal belirleyicilerle korunmuş bir lipid A parçasını paylaşmaktadır. DAMP'lerin algılanmasında CD14 ve MD-2'nin rolü de dahil olmak üzere TLR4 aktivasyonunun moleküler mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (Kuzmich ve ark., 2017). DAMP'ler, ateroskleroz, romatoid artrit, nöroinflamasyon ve travma ve kanama dahil olmak üzere TLR4 aktivasyonunun neden olduğu birçok patolojide gösterilmiştir. Çok yakın bir zamanda, TLR4'ün uyuşturucu kullanımı ve majör depresif bozukluklar ve amyotrofik lateral skleroz (ALS) için umut verici bir terapötik hedef olduğu öne sürülmüştür (De Paola ve ark., 2016). Periferik nöropatik ağrının tedavisinde TLR4 antagonistlerinin olası uygulaması da tartışılmıştır (Kuzmich ve ark., 2017).

2.8. İNFLAMMAZOMLAR

İnflammazomlar, patojen veya hasarla ilişkili moleküler desenler olarak bilinen farklı moleküllerin tanınması veya homeostazın bozulması (homeostaz değiştiren moleküler süreçler (HAMP'ler)) veya efektör tetiklemeli bağışıklık (ETI) olarak adlandırılan hücresel homeostazın bozulması yoluyla konak hücreye yönelik tehditlere yanıt veren doğal yanıt sisteminin kritik ajanlarıdır. NLRP1, kaspaz aktivasyon domain 8 (CARD8), NLRP3, NLRP6, NLRC4/NAIP, AIM2, pirin ve kaspaz-4/-5/-11 dahil olmak üzere birkaç farklı protein inflammazom mekanizmalarında aktif rol almaktadır. Bu çeşitli sensör dizisi, alternatif sinyal

algılama kapasitesi ve esneklik yoluyla inflammazom yanıtını güçlendirir (Barnett ve ark., 2023).

İnflammazomlar, hücresel stres ve patojenle ilişkili moleküler kalıpları algılayarak miyeloid ve epitel hücrelerinin sitozolünde toplanır ve inflamatuar kaspazların toplanması ve aktivasyonu için iskele görevi görür. İnflammazomlar, çeşitli patojenlere karşı konak ve bağışıklık tepkilerinde yararlı roller oynar (de Vasconcelos ve Lamkanfi, 2020). Sıklıkla bakteriyel, viral ve fungal patojenlere karşı koruma sağlamasına rağmen, inflammazom aktivasyonu genellikle çeşitli (oto)inflamatuar, otoimmün, metabolik, nörodejeneratif ve malign hastalıklarda zararlıdır (Mangan ve ark. 2018; Van Gorp ve ark. 2019; Voet ve ark. 2019).

İnflammazom sinyal yolları kanonik ve kanonik olmayan olarak iki şekilde kategorize edilmektedir Kanonik inflammazomlar aktive edilmiş bir PRR, ASC ve kaspaz-1'den oluşmaktadır. Kanonik inflammazomu oluşturan multiprotein kompleksi kaspaz-1 (CASP1)'i aktive ederek konak hücrede doğal yanıtın tetiklenmesi sağlanmaktadır. Birçok NLR protein ailesindeki proteinler de dahil olmak üzere birçok protein inflammazom oluşumuna katılmaktadır. Bunlar, etki alanını içeren proteinlerden türetilen NACHT adı verilen nükleotid bağlayıcı etki alanı içerir: NLR ailesi apoptoz inhibitör proteini (NAIP), MHC sınıf II transkripsiyon aktivatörü (CIITA), *Podospora anserina*'dan uyumsuzluk lokusu proteini (HET-E) ve telomeraz ilişkili protein (TP-1). N-terminal PYD içeren NLR'ler NLRP olarak adlandırılırken, N-terminal CARD'lı NLR'ler NLRC olarak adlandırılır. NLRP3, miyeloid ve epitel hücrelerinin sitozolünü çok sayıda PAMP için temizlemektedir. Bu nedenle, söz konusu mekanizmanın hücresel stresi ve dengesizliği algıladığı varsayılmaktadır. Diğer iyi tanımlanmış kanonik inflammazom oluşturan NLR'ler arasında NLRC4, insan NLRP1 ve fare Nlrp1a ve Nlrp1b bulunur. Bunlar flagellin, dipeptidil peptidaz 8/9'un inhibisyonu8/9 ve *Bacillus anthracis* türevi öldürücü toksin (LeTx) gibi uyaranlara yanıt vermektedir (de Vasconcelos ve ark. 2019b; Franchi ve ark. 2006; Miao ve ark. 2006; Okondo ve ark. 2018; Zhong ve ark. 2018). NLR'lere benzer şekilde, HIN200/PYHIN ailesi üyesi AIM2, TRIM ve pirin, iyi tanımlanmış inflammazom ilişkili PRR'lerdir. AIM2, karboksi-terminal HIN200 alanı aracılığıyla doğrudan sitozolik DNA'ya

bağlanmaktadır. Pirin ise, mikrobiyal patojenler tarafından inaktive edilen RhoA GTPaz modifikasyonlarını algılayarak doğal yanıtta rol almaktadır (Bürckstümmer ve ark. 2009; Dubey ve ark., 2025; Fernandes-Alnemri ve ark. 2009; Xu ve ark. 2014). Bir kez aktif hale geldiğinde, bu inflammazom reseptörleri, kaspaz-1 ile etkileşimi köprüleyen bipartit inflammazom adaptör ASC'yi devreye sokmaktadır. Ancak kaspaz-1'in doğrudan devreye girmesi, NLRP1, Nlrp1a, Nlrp1b ve NLRC4 dahil olmak üzere CARD içeren NLR'ler bağlamında da mümkündür (Broz ve ark. 2010; Broz ve Dixit 2016; Masters ve ark. 2012; Van Opdenbosch ve ark. 2014). İnflammazom oluşumu, kaspaz-1'in otoproteolitik işlenmesini başlatarak hücresel substratlarının parçalanmasını teşvik etmektedir. Bu substratlar arasında pro-IL-1β, pro-IL-18 ve gasdermin D (GSDMD) bulunmaktadır (Aglietti ve ark., 2016; Ding ve ark., 2016; Kagayaki ve ark., 2015; Liu ve ark., 2016; Sborgi ve ark., 2016; Shi ve ark., 2015). Kaspaz-1 tarafından kesildikten sonra, GSDMD N terminali (GSDMD-NT) plazma membranında gözenekler oluşturmak üzere oligomerize olur ve bu gözenekler membran depolarizasyonuna ve hücre yırtılmasına aracılık eder. GSDMD porları ayrıca IL-1β ve IL-18 salgılanması için kanal görevi görerek, bu sitokinlerin salınımını hücresel fizyolojinin bozulmasına internal olarak bağlar. Bu nedenle, inflammazom oluşumu, patojenik tehditler ve konakçıya verilen hasar için önemli bir bekçi görevi gören güçlü bir pro-inflamatuar yanıt üreten hücresel durumun temel bir altüst oluşudur. (Broz ve Dixit 2016; Evavold ve ark., 2018; Heilig ve ark., 2018 Lamkanfi ve Dixit 2014).

İnflammazom mekanizmalarının aktivasyonunda genellikle TLR'ler tarafından uyarılan bir başlatma sinyali bulunmaktadır. İnflammazomların farklı alt grupları, farklı sitozolik desen tanıma reseptörleri içermektedir. Nod benzeri reseptör (NLR) ailesinin ve HIN-200 ailesinin üyeleri, çeşitli patojen veya tehlikeyle ilişkili moleküler desenleri tanımak için önemli inflammazom reseptörleridir. NLRP3 inflammazomu, çok çeşitli mikrobiyal patojenlere ve kristalin gibi tıbbi açıdan önemli maddelere yanıt olarak bir araya gelmektedir. NAIP-NLRC4 inflammazomu, bakteriyel flagellin veya *Salmonella* Typhimurium gibi hücre içi patojenler tarafından ifade edilen T3SS sistemlerinin çubuk ve iğne bileşenlerinin sitozolik tespiti üzerine oluşmaktadır. Bir araya geldikten sonra, inflammazomlar pro-CASP1 için aktive edici platformlar görevi görmektedir. Aktive edilmiş CASP1 daha sonra

IL-1β/18 öncüllerini olgun formlarına dönüştürür. İnsan CASP4 ortoloğu olan fare CASP11, sitozolik bakteriyel LPS reseptörü olarak doğrudan etki ederek LPS'ye bağlanmaktadır. Daha sonra CASP11'in, piroptozu tetikleyebileceği, ancak IL-1β/18 olgunlaşması üzerindeki etkisi dolaylı olduğu bilinmektedir. Bu süreç, CASP1'in NLRP3'e bağımlı aktivasyonuna ihtiyaç duymaktadır. İnflammazom yanıtları ile ilgili detaylı bilgiler Tablo 2.4'te verilmiştir (Davis ve ark., 2011; Dinarello, 2009; Kagayaki ve ark., 2011; Schroder ve Tschopp, 2010; Shi ve ark., 2014).

Tablo 2.4. Farklı Hastalık ve Dokularda İnflammazom Yanıtlarının Çeşitliliği (Barnett ve ark., 2023)

İnflammazom	**Hücre Tipi**	**Hastalık ve Patojen İlişkisi**	**Aktivasyon Mekanizmaları**	
			Algılanan moleküller (PAMP/DAMP)	**Algılanan süreçler (HAMP/ETI)**
NLRP1	Fare miyeloid hücreleri, insan hava yolu epitel hücreleri, insan keratinositleri	*B. anthracis* (fare), *S. flexneri* (fare), viral enfeksiyonlar (örn. HRV, SARS-CoV-2, SFV), vitiligo, sedef hastalığı, atopik dermatit, artrit, diskeratoz	Viral dsRNA	DPP8/9 inhibisyonu, *S. flexneri* IpaH7.8 tarafından ubikitinasyon, *B. anthracis* öldürücü toksin tarafından parçalanma, viral proteazlar, ribotoksik ve hücresel stres
CARD8	İnsan T hücreleri İnsan miyeloid hücreleri	HIV-1	-	DPP8/9 inhibisyonu, HIV-1 proteazı ile parçalanma
NLRP3	Miyeloid hücreler, Oligodendrositler, Asrtositler, Endotelyal hücreler, Retinal pigment epitel hücreleri	Viral enfeksiyonlar (IAV, SARS-CoV-2), bakteriyel enfeksiyonlar (*L. monocytogenes*, *L. pneumophila*), mantar enfeksiyonları (*C. albicans*, *A. fumigatus*),ateroskleroz, Tip 2 diyabet, obezite, kronik böbrek hastalığı, gut, kanser	Nükleik asitler (örneğin, oksitlenmiş DNA, viral RNA), monosodyum ürat kristalleri, cGAMP, silika, β-glukanlar, hifler, mannan, zimosan, Aβ lifleri, α-sinüklein, seramidler, doymuş yağ asitleri, kolesterol kristalleri	K+ dışarı akışı (örn. bakteriyel toksinler, viral gözenek oluşturan proteinler, GSDMD gözenek oluşumu), Ca^{+2} akışı, Cl^{-} dışarı akışı, mitokondriyal veya lizozomal işlev bozukluğu, ER-endozom membran temas noktalarının kaybı, metabolik kaymalar (örn. yağ asidi sentezi), hiperozmotik stres
NLRP6	Miyeloid hücreler, kolon epitel hücreleri, kolon goblet hücreleri	Bakteriyel enfeksiyonlar (örneğin *L. monocytogenes*, *C. rodentium*), viral enfeksiyonlar (örneğin ECMV, MHV), kolit, kanser	Lipoteikoik asit, viral RNA	-

Tablo 2.4. Devam.

NAIP/NLRC4	Miyeloid hücreler, bağırsak epitel hücreleri, astrositler, retinal pigmentli epitel hücreleri	Bakteriyel enfeksiyonlar (örn. *L. pneumophila, S. typhimurium, P. aeruginosa*), yaşa bağlı makula dejenerasyonu, makrofaj aktivasyon sendromu, kolit, periyodik ateş sendromları	hNAIP: bakteriyel flagellin ve T3SS iğne ve çubuk proteinleri; mNAIP1: T3SS iğne proteini; mNAIP2: T3SS çubuk proteini; mNAIP5/6: bakteriyel flagellin	Hiperosmotik stres
AIM2	Miyeloid hücreler, keratinositler, T düzenleyici hücreler	Bakteriyel enfeksiyonlar (örneğin *L. monocytogenes*, *F. tularensis*), viral enfeksiyonlar (örneğin CMV, VACV, HPV, SARS-CoV-2), *Plasmodium* enfeksiyonu, *A. fumigatus* enfeksiyonu, radyasyona bağlı doku hasarı, poliartrit, ateroskleroz, kanser, kolit	dsDNA	-
Pirin	Miyeloid hücreler	Ailevi Akdeniz ateşi sendromu, bakteriyel enfeksiyon (örneğin: *Y. pestis, C. difficile*)	-	Aktin sitoskeletonunun bozulması
Kaspaz-4/-5/-11	miyeloid hücreler, epitel hücreler, keratinositler, endotel hücreler	Bakteriyel enfeksiyonlar (örneğin: *L. pneumophila*, *S. typhimurium*)	LPS, oksitlenmiş 1-palmitoil-2-araşidonoil-sn-glisero-3-fosforilkolin	-

Kanonik olmayan inflammazom, fare kaspaz-11 ve onun insan ortologları kaspaz-4 (CASP4) ve -5 (CASP5)'i içerir. Kanonik olmayan kaspazların aktivasyon için farklı gereksinimleri bulunmaktadır. Kaspaz-1'in aksine, kaspaz-11 ekspresyonu tip I IFN'ler tarafından indüklenir ve tip I IFN sinyallemesinin kaybı, bakteriyel enfeksiyon sırasında kaspaz-11 aktivasyonunu azaltır. Bu yanıt, kaspaz-11'in ligandına erişimi için de kritiktir. Çünkü patojen içeren vakuolleri lize eden IFN ile indüklenebilir GTPazlar, sitozolde LPS'nin kaspaz-11 tarafından algılanmasını sağlamaktadır. Ligandlara erişim, kanonik olmayan inflammazom oluşumu için kritik rol oynamaktadır. İnsan guanilat bağlayıcı protein-1 (hGBP1), gram negatif bakterilerin dış zarından lipid A'yı açığa çıkaran "deterjan benzeri" bir mekanizma yoluyla kaspaz-4 LPS tespitini kolaylaştırmaktadır. Sitozolik LPS girişinin bir diğer mekanizması da konak proteinleridir, çünkü yüksek mobiliteli grup 1'e (High

mobility group box 1 protein; HMGB1) bağlı LPS'nin alımı kaspaz-11 aktivasyonuna aracılık etmektedir. Kaspaz 4/-5/-11, pro-IL-1β'yı olgun formuna dönüştürmez, ancak LPS ile aktive edilen CASP4 ve CASP5, piroptozu, inflamasyonu ve antimikrobiyal savunmayı indüklemek için gasdermin D (GSDMD)'yi tetiklediği bilinmektedir. Kaspazlar-4/-5/-11, IL-1β'yı doğrudan parçalamadığından, bu sitokinin salınımı daha sonraki kaspaz-1 aktivasyonuna bağlıdır. Mekanik olarak, kaspaz-11, GSDMD'nin por aktivasyonu yoluyla K^+ iyonunun dışa akışını ve NLRP3 ile IL-1β salınımını aktive eder (Barnett ve ark., 2023; Kayagaki ve ark. 2011; Lee ve ark., 2018; Meunier ve ark., 2014; Schauvliege ve ark., 2002; Schmid-Burgk ve ark. 2015; Shi ve ark. 2014; Yen ve Ganea, 2009).

2.9. KASPAZLAR

Kaspazlar, programlanmış hücre ölümü ve doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini düzenlemede merkezi rol oynayan, evrimsel olarak korunmuş bir grup sistein bağımlı aspartat spesifik proteaz enzim ailesidir. Bu grup, inaktif zimojen olarak sentezlenir; hücresel stres, enfeksiyon veya inflamatuar sinyallere yanıt olarak aktive olmaktadır. Bu enzimler; sistein-aspartik proteazlar, sistein aspartazlar veya sistein bağımlı aspartat yönlendirmeli proteazlar olarak da bilinir. Bir kaspaz, aktif bölgesinde, aspartik asit ve hedef proteine tutunan bir nükleofilik sistein içermektedir. Kaspaz aracılı işleme, substrat inaktivasyonuna neden olabilse de, apoptoz ve inflamasyon gibi düzenli süreçlere katılan aktif sinyal molekülleri de üretebilir. Kaspazlar apoptozdaki bilinen rollerine (memelilerde kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-7, kaspaz-8 ve kaspaz-9) ve inflamasyondaki rollerine (insanlarda kaspaz-1, kaspaz-4, kaspaz-5 ve kaspaz-12 ve farelerde kaspaz-1, kaspaz-11 ve kaspaz-12) göre genel olarak sınıflandırılmıştır. Apoptozda yer alan kaspazlar, etki mekanizmalarına göre başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8 ve kaspaz-9) ve infazcı kaspazlar (kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7) olarak alt sınıflara ayrılmıştır (Tablo 2.5) (Cookson ve Brennan, 2001; Galluzzi ve ark., 2016; McIlwain ve ark., 2013).

Tablo 2.5. Kaspazların Gruplandırılması ve Biyolojik Fonksiyonları (Sahoo ve ark., 2023)

Grup	Kaspazların Alt Tipi	Biyolojik Fonksiyon ve Rolleri
İnflamatuar Kaspazlar	Kaspaz-1	Piroptoz, apoptoz, inflamasyon, DNA bölünmesi, nükleer yoğunlaşma, bağışıklık sisteminde, kardiyovasküler sistemde ve merkezi sinir sisteminde hücre ölümü
	Kaspaz-4	Endoplazmik retikulum stresi, piroptoz, apoptoz, inflamasyon, DNA bölünmesi, nükleer yoğunlaşma, bağışıklık sisteminde, kardiyovasküler sistemde ve merkezi sinir sisteminde hücre ölümü
	Kaspaz-5	Piroptoz, apoptoz, inflamasyon, DNA bölünmesi, nükleer yoğunlaşma, bağışıklık sisteminde, kardiyovasküler sistemde ve merkezi sinir sisteminde hücre ölümü
	Kaspaz-11	Pirotozis, apoptozis ve lökosit göçü
Başlatıcı Kaspazlar	Kaspaz-2	Hücre döngüsü, otofaji, genomik stabilite, yaşlanma, tümör oluşumu, tümör baskılanması, pentoz fosfat ve lipid metabolizması
	Kaspaz-8	İnflammazom, nekroptoz, lens hücre farklılaşması, terminal keratinosit farklılaşması, eritrosit ve trombosit oluşumu, T ve B hücre proliferasyonu
	Kaspaz-9	Sinaptik kayıp, eritropoez, embriyonik gelişim ve lösemik ve kas farklılaşması
	Kaspaz-10	T hücreli akut lenfoblastik, lösemi, multipl miyelom, karsinom
İnfazcı Kaspazlar	Kaspaz-3	Apoptozis, embriyonik ve hematopoietik kök hücre farklılaşması, osteoblastlar ve nöronal farklılaşma, miyotüp oluşumu, sinaptik plastisite, otofaji
	Kaspaz-6	Hücre döngüsü, sinaptik kayıp ve işlev bozukluğu, B hücresi çoğalması
	Kaspaz-7	Kemik gelişimi, dentinogenez
	Kaspaz-12	Endoplazmik retikulum stresi
	Kaspaz-14	Keratinosit farklılaşması

İnflamatuar kaspazlar, pro-inflamatuar sitokinlerin ve tehlike sinyallerinin salınımını uyararak hücresel doğal yanıt gelişiminde rol oynamaktadır. apoptoza benzer şekilde, ancak kelimenin ilk kısmının ateş veya ateşle ilgili olan pyro ile değiştirilmesiyle ortaya atılan "piroptozis" terimi, ilk olarak pro-inflamatuar programlanmış hücre ölümünü tanımlamak ve bunu apoptozis'ten ayırmak için önerilmiştir. Apoptozis genellikle litik olmayan ve istenmeyen hücreleri kontrollü olarak yok eden bir süreç olarak kabul edilirken, piroptozis plazma membranında lizis ile karakterize bir hücre ölümü biçimidir. Patojenle enfekte olmuş hücrelerin inaktivasyonu ile inflamatuar sitokinlerin salınımı indüklenerek hasar bölgesine doku makrofajlarının toplanmasını sağlamaktadır. Kaspaz-1, kaspaz-4, kaspaz-5, kaspaz-11, kaspaz-12 ve kaspaz-13 inflamatuar kaspazlar olarak kategorize edilmektedir. İnsanlarda kaspaz-1, kaspaz-4, kaspaz-5 ve kaspaz-12, farelerde kaspaz-11 ve sığırlarda kaspaz-13 bulunmaktadır

(Aglietti ve Dueber, 2017; Bergsbaken ve ark., 2009; Cookson ve Brennan, 2001; Dagenais ve ark., 2012; Fink ve Cookson, 2005; Jorgensen ve Miao, 2015; Wei ve ark., 2022).

2.10. GASDERMİNLER

Gasdermin gen ailesi ilk olarak 2000'li yılların başında farelerde alopesi benzeri çeşitli cilt mutasyonlarına neden olan aday genler olarak bildirilmiştir (Saeki ve ark., 2000). Gasdermin terimi, fare gastrointestinal kanalında ve cilt epitelinde gasdermin A (GSDMA) proteinlerinin özel ifade profiline dayanmaktadır. 1998 yılında yapılan çalışmalar, gasderminlerin N-terminal bölgesinde, insanlarda otozomal dominant non-sendromik işitme kaybıyla ilişkilendirilen bir protein olan otozomal dominant non-sendromik sensörinöral 5 (DFNA5) ile güçlü bir dizi benzerliği paylaştığını belirtmiştir (Laer ve ark., 1998; Sato ve ark., 1998). Bu homolojiye dayanarak, farklı gasdermin ailesi üyesi ve gasdermin benzeri proteinler tanımlanmıştır. Söz konusu protein ailesi şu anda insanlarda GSDMA, GSDMB, GSDMC, GSDMD, GSDME (DFNA5) ve PJVK (DFNB59) olmak üzere altı paralog gen içermektedir (Laer ve ark., 1998; Saeki ve ark., 2000; Sato ve ark., 1998).

Gasdermin proteinleri, doğal yanıt mekanizmalarının bir ürünü olarak konak hücre plazma membranında por oluşturan efektör moleküllerdir. Söz konusu proteinlerin ekspresyonu sonucunda membran bütünlüğünün bozulması ile programlanmış hücre ölümü sağlanmaktadır. Gasdermin D ve ilgili aile üyeleri, inflamatuar kaspazlar (kanonik inflammazom yolaklarında bulunan kaspaz-1 veya kanonik olmayan yollarda kaspaz-4/5/11 gibi) tarafından aktive edildiğinde büyük, seçici olmayan porlar oluşturmaktadır. Bu porlar, intraselüler iyonların ve IL-1β ve IL-18 gibi inflamasyon ilişkili sitokinlerin dışarı salımını, hücre içi ozmotik dengenin bozulmasını, membran bütünlüğünün bozulmasını ve nihayetinde piroptotik hücre ölümünü sağlamaktadır. Gasderminler, enfekte hücreleri ortadan kaldıran, konak hücre içi mikrobiyal replikasyonu kısıtlayan ve inflamasyon sinyalizasyonunu tetikleyen önemli doğal yanıt ajanlarıdır (Zahid ve ark., 2021).

Yapısal dizi homolojilerine dayanarak farklı dokularda ifade edilen gasdermin proteinleri, tanımlanmıştır (Tablo 2.6). Tanımlanmalarından kısa bir süre sonra hücre

canlılığı ve inflamasyonla ilgili fonksiyonları tespit edilmeye başlanmıştır. Gasderminlerin potansiyel etkisini gösteren en doğrudan kanıt, mutasyona uğramış, C-terminal olarak kesilmiş insan GSDME ekspresyonunun insan hücrelerinde apoptoza, maya hücrelerinde ise hücre döngüsünün durmasına neden olduğunu gösteren araştırmalardan gelmiştir (De Beeck ve ark., 2011; Van Rossom ve ark., 2012).

Fosfoinozitidler ve kardiyolipinin plazma zarı dış yaprağında bulunmamaktadır. Aktive edilmiş GSDMD yalnızca plazma zarının iç yaprağını hedef aldığı ve bu nedenle memeli hücrelerini içeriden inaktive edebildiği belirlenmiştir. Aktive edilmiş GSDMD (ve diğer gasderminler), in vitro olarak kardiyolipin içeren zarlarda etkili bir şekilde gözenekler oluşturmaktadır. Bu durum bakteri ve mitokondrilerin de GSDMD'nin hedefi olabileceğini düşündürmektedir. Gasdermin porlarının iç ve dış çapları sırasıyla 18 ve 28 nm'dir ve plazma membranında por oluşumu, iyon akışı ve hücre lizisiyle sonuçlanan hücre şişmesi gibi bir dizi olayı doğal olarak tetikler (Liu ve ark., 2016; Platnich ve ark., 2018; Ruan ve ark., 2018). Büyük boyutları göz önüne alındığında, GSDMD porları, CASP1 aracılı piroptozun ardından IL-1 sitokinlerinin yanı sıra bazı endojen DAMP'lerin de piroptotik hücrelerden salınmasına olanak sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar, GSDMD yokluğunun, aktif CASP1 tarafından IL-1β işlenmesini etkilemeden olgun IL-1β salınımını tamamen azalttığını göstermektedir. GSDMD porları, nötrofillerde olduğu gibi hücre lizisinin olmadığı, hücre lizisinin ozmotik bir koruyucu tarafından engellendiği veya por miktarının hücreleri lize etmeye yetmediği durumlarda (O-asetiltransferaz A genini kodlayan genden yoksun *Staphylococcus aureus* mutantı enfeksiyonu veya oksitlenmiş 1-palmitoil-2-araşidonoil-sn-glisero-3-fosforilkolin (oxPAPC) ile tedavi gibi) bile IL-1β salınımından sorumlu olduğu bildirilmiştir (Evavold ve ark., 2018). Bu çalışmalar ayrıca lipozom membranlarında oluşan GSDMD gözeneklerinin, lipozomlar henüz yırtılmamış olsa bile lipozom lümeninden IL-1β salabileceğini göstermiştir (Evavold ve ark., 2018). IL-1β, IL-18 ve piroptozis, patojen temizliğine ve antimikrobiyal bağışıklığa katkıda bulunan önemli mekanizmalar olmasına rağmen, her biri kontrol edilmediği takdirde dokulara zarar verme ve konağın hayatta kalmasını tehlikeye atma kapasitesine sahiptir. İnflammazom aktivasyonunun ters gitmesi sonucu sepsis ile nedeniyle enfeksiyonun şiddetlenebileceği gösterilmiştir

(Evavold ve ark., 2018; He ve ark., 2015; Heilig ve ark., 2018; Kayagaki ve ark., 2015; Russo ve ark., 2018; Shi ve ark., 2015).

Tablo 2.6. Gasderminlerin Doku Ekspresyonları (Broz ve ark., 2020)

Gasdermin/Sistem	GSDMA	GSDMB	GSDMC	GSDMD	GSDME	PJVK
Sindirim Sistemi						
Kolon	-	+	-	+	-	-
Özofagus	+	+	+	+	-	-
Karaciğer	-	+	-	+	-	-
Pankreas	-	-	-	+	-	-
Tükürük Bezi	-	+	-	+	+	-
İnce Bağırsak	-	+	-	+	+	-
Mide	-	+	-	+	-	-
Üreme Sistemi						
Fallopi Tüpü	-	-	-	-	+	-
Ovaryum	-	+	-	-	+	+
Prostat	+	-	-	-	-	-
Testis	-	+	-	-	+	+
Uterus	-	+	-	+	+	-
Vajina	-	+	+	+	+	-
Solunum Sistemi						
Epitel	-	+	-	-	-	-
Akciğer	-	+	-	+	-	-
Boşaltım Sistemi						
Mesane	+	+	-	+	+	-
Böbrek	-	-	-	+	-	-

Tablo 2.6. Devam.

Dolaşım Sistemi						
Arter	-	+	-	+	+	-
Kalp	-	-	-	+	-	-
Merkezi Sinir Sistemi						
Beyin	-	+	-	+	+	-
Hipofiz	-	-	-	-	-	+
Diğer Dokular						
Adipoz	-	+	-	+	+	-
Meme	-	+	-	+	-	-
Deri	+	+	+	+	-	-
Dalak	-	+	+	+	-	-
Tiroid	-	+	-	-	+	-
Bağışıklık Hücreleri						
$CD4^+$T Hücreleri	+	+	-	+	-	+
$CD8^+$T Hücreleri	-	+	-	+	-	+
B Hücreleri	-	+	-	+	-	+
Doğal Katil Hücreler	-	+	-	+	-	-
Monositler	-	-	-	+	-	-

Yapılan araştırmalarda Gasdermin D'nin (GSDMD) membran por oluşumundan sorumlu inflamatuar kaspazların bir substratı olduğu keşfedilmiştir. GSDMD'nin kaspaz enzimleri ile etkileşime girmesi, plazma membranında hücrelerin hızlı lizisine

yol açan por oluşumuna katılan N-terminal yapılarının (NTD) açığa çıkmasına neden olmaktadır. (Chen ve ark., 2014; Conos ve ark., 2016; Kayagaki ve ark., 2015; Liu ve ark., 2016; Shi ve ark., 2017; de Vasconcelos ve Lamkanfi, 2020).

2.11. LPS-TLR4 MEKANİZMASINDA CASP4/5 VE GSDMD İLİŞKİSİ

Gram negatif bakteriyel enfeksiyonlarda, LPS, GSDMD aracılığıyla piroptoz ile sonuçlanan konak hücre doğal yanıt mekanizmalarını tetiklemektedir. Hücre dışı LPS, başlangıçta plazma membranındaki TLR4/MD-2 reseptör kompleksi tarafından tanınmaktadır. Sonrasında MyD88 ve TRIF sinyalizasyonu aktive edilerek pro-IL-1β, pro-IL-18, bileşenleri NF-κB aracılığı ile aktive edilmektedir. Bu mekanizmanın yanı sıra *Salmonella* gibi patojenlerin intraselüler ortamda serbestleşmesi ile LPS, doğrudan insan CASP4 ve CASP5 tarafından algılanmaktadır. Aktive edilen sinyal mekanizması sonucunda GSDMD'nin, ilgili kaspaz enzimleri tarafından işlenmesiyle konak membranda N-terminal porlar oluşmaktadır. Ayrıca, bu porlardan K^+ gibi iyonların salınımının, kanonik NLRP3 inflammazomunu sekonder olarak aktive ederek CASP1 aracılıklı piroptozu indüklediği belirlenmiştir (Xu ve ark., 2020). İnsan CASP4 ve CASP5, LPS tarafından aktive edildiklerinde hücre içine invaze olan Gram negatif bakterilere karşı konak savunması sağlanmaktadır. LPS ilişkili CASP4, CASP5 ve CASP11, GSDMD aktivasyonu ile sitozolik bakterilerin serbestleşmesini sağlayarak onları hücre dışı savunma mekanizmalarına duyarlı hale getirmektedir (Baker ve ark., 2015; Shi ve ark., 2014).

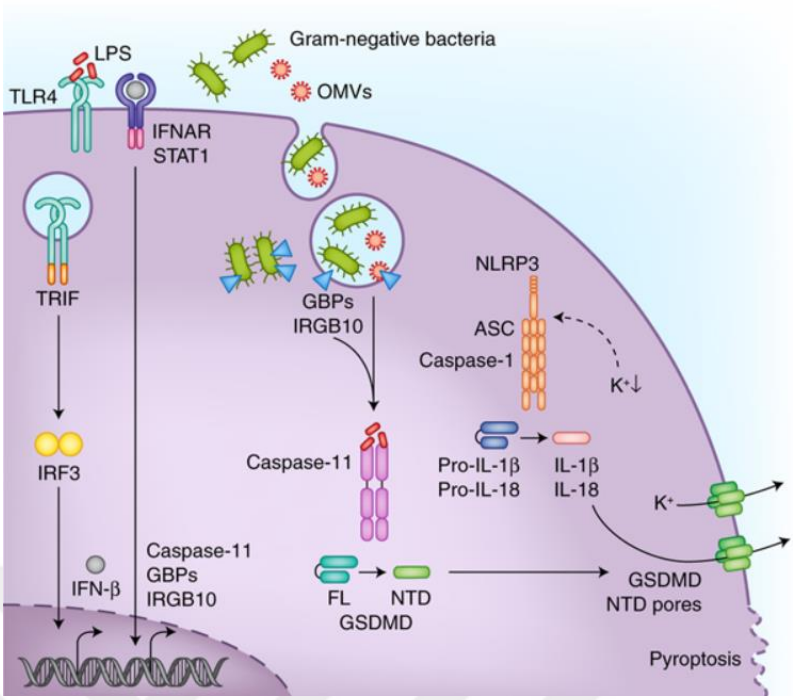
Gram negatif bakteriler tarafından invaze edilen nötrofillerde, kromatin iplikçikleri CASP4 (farelerde CASP11) aktivasyonu ile konak hücre dışına salınmaktadır. Nötrofil hücre dışı tuzakları (NET'ler) olarak adlandırılan bu iplikçiklerin bakteriyel yayılımı önlediği tespit edilmiştir. NETosis olarak bilinen bu non-spesifik yanıt ile enfeksiyon şiddetinin azaltıldığı ortaya konmuştur (Chan ve ark. 2023).

CASP11'in, pro-IL-1β veya pro-IL-18'i doğrudan işleyemediği ancak ilgili sitokinlerin aktive edilmesinde dolaylı olarak rol oynadığı tespit edilmiştir. GSDMD porları, NLRP3'e bağlı CASP1 aktivasyonuna ve bunun sonucunda oluşan sitokin kesilmesine yol açan hücre stresini tetiklemektedir. Buna karşılık aktif CASP4, inflamatuar yanıtları başlatmak için doğrudan pro-IL-1β ve pro-IL-18'i aktive

edebilmektedir (Şekil 2.4) (Baker ve ark., 2015; Chan ve ark. 2023; Schroder ve ark., 2012; Shi ve ark., 2014; Liu ve ark., 2016).

Hücrelerde, CASP4 öncelikle endoplazmik retikulumun (ER) dış zarında yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda insan CASP4'ün, ER stresi kaynaklı apoptozda önemli bir rol oynadığı gösterilen fare CASP12 ile homolog olduğu belirlenmiştir. Mao ve ark. (2010) insan melanom hücrelerinde TNF ile ilişkili apoptozis indükleyen ligandın (TRAIL) CASP4 aktivasyonu ile apoptozis indüksiyonunda yer aldığını bildirmiştir. Bu durum CASP4'ün farklı apoptotik yollarda beklenenden daha geniş bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. (Mao ve ark., 2010; Nakagawa ve ark., 2000).

CASP5'e karsinogenezde bir rol atfedilmiştir. CASP5 genindeki somatik mutasyonlar lösemi, akciğer kanseri, kolorektal kanser, endometriyal kanser ve gastrointestinal kanser dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde tanımlanmıştır. CASP5'in endojen mRNA düzeylerinin ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu analizi, çeşitli insan dokularında CASP1'e benzer bir dağılım modeline sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Fare ortoloğu CASP11 gibi, insan monosit lösemi hücre hattı THP-1'deki CASP5 ekspresyonu lipopolisakkarit tarafından da indüklenebilir. CASP5, IL-1 işlenmesini düzenlemek için CASP1 ile çalışabilir. CASP5, insanlarda Akdeniz ateşi (MEFV), nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı içeren protein-2/CARD15 (NOD2) ve serpin ailesi b üyesi 1 (SERPINB1) genleriyle etkileşime girer. Bu etkileşim CASP5 aktivitesini düzenler. CASP5 ayrıca sedef hastalığına bağlı cilt lezyonlarında da bulunmuştur (Berkun ve ark., 2012; Faucheu ve ark., 1996; Martinon ve ark., 2009; Schroder ve Tschopp, 2010; Van Opdenbosch ve Lamkanfi, 2019).



Şekil 2.4. Non-kanonik inflammazom tarafından sitozolik LPS algılaması (Rathinam ve ark., 2019).

Lipopolisakkaritlerin sitozole erişimi ve bunun sonucunda oluşan CASP11 aktivasyonu yalnızca sitozolik bakterilerle enfeksiyonlar sırasında değil, aynı zamanda fagozomlarda canlılığını sürdürebilen veya inaktive edilen non-sitozolik bakterilerle de meydana gelmektedir (Vanaja ve ark., 2016). Bakterilerin konak hücrelerle teması olmadığında, bakteriler tarafından oluşturulan hücre dışı veziküllerin (OMV), LPS'nin sitozolik erişiminde kritik bir rol oynadığı belirlenmiştir. Bakteriyel dış zar vezikülleri, bakteriyel büyüme sırasında ve antibiyotikler ve antimikrobiyal peptitler gibi olumsuz koşullara maruz kaldığında salınan zarla çevrili yapılardır. Bu yapıların bol miktarda LPS içerdiği bilinmektedir. Patojen ilişkili OMV'ler, LPS gibi PAMP yapılarını sitozole ulaştırarak kaspaz-11 aracılı piroptozu tetikleyebilmektedir. Bu dış zar vezikülleri klatrin aracılı endositoz yoluyla konak hücreler tarafından alınarak OMV'de bulunan LPS'nin, sitozole ulaşmasını sağlamaktadır. Lipopolisakkaritlerin, CASP11 veya CASP4/5 aktivasyonu için OMV aracılı olarak konak hücre sitozolüne iletildiği, Gram negatif bakteride gözlemlenmiştir. Çalışmalar, sitozolde LPS'nin taşınması ve algılanmasında tip I interferon sinyallemesinin merkezi bir rol oynadığını ortaya

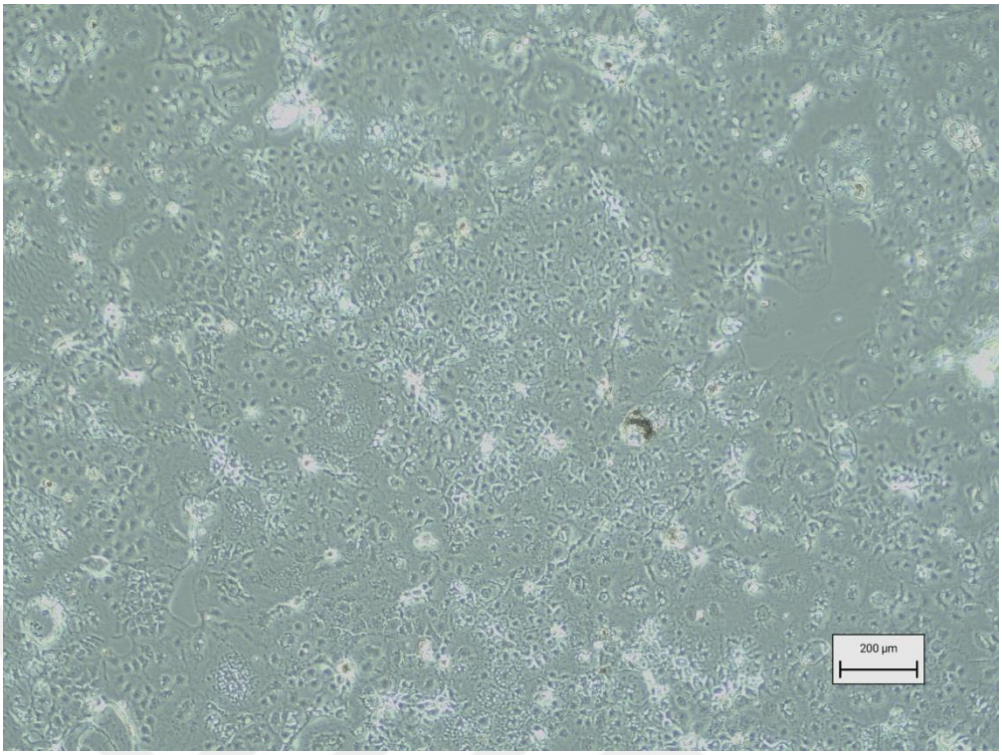
koymuştur. Lipopolisakkaritlerin sitozolik reseptörü olan CASP11'in kendisi interferonla uyarılan bir gendir; insan kaspaz-4'ünün aksine CASP11, dinlenme halindeki hücrelerde zayıf bir şekilde eksprese edildiği ve Gram negatif bakterilerle enfeksiyonlar sırasında optimum ekspresyonu sağladığı bildirilmektedir. Doğal yanıtın şekillenmesinde aktif rol oynayan TLR'lerin aktivasyonu ile NF-κB doğrudan ve TLR4-TRIF yolağı ise tip I interferonlar aracılığıyla dolaylı olarak başlatılmaktadır. Bu mekanizmalar ile temel olarak CASP11 ekspresyonu, otonom ve otonom olmayan bir şekilde Cpb1-C3-C3aR tamamlayıcı yolu tarafından pozitif olarak düzenlendiği gösterilmiştir (Kulp ve Kuehn, 2010; Mandal ve ark., 2018; Napier ve ark., 2016; Rathinam ve ark., 2012; Vanaja ve ark., 2016; Wacker ve ark., 2017).

Bu genel bilgiler ışığında, kısa zincirli bir karbonhidrat olan TRX'in Caco-2 hücre hatlarında *Salmonella* Typhimurium deneysel enfeksiyonlarında tetiklediği önemli doğal yanıt mekanizmaları üzerine etkinliğinin araştırılması hedeflenmiştir. Özellikle TRX'in TLR4 ve hücre içi reseptörler ile ilişkili inflamatuar ve inflammazomal yolaklar ve GSDMD aracılı piroptoz üzerine etkinliğinin ortaya konulmasının gastrointestinal enfeksiyonlarda yangısal semptomların hafifletilmesi durumu değerlendirilmektedir. Böylece özellikle çocuklar, yaşlılar, hamileler ve immünsupresif bireyler gibi toplumun hassas grup bireylerinde gıda enfeksiyonları esnasında sağlıklı beslenme ve hedef nutrasötik takviyesinin doğrudan alımı ile yaşam kalitelerinin yükseltilebileceği öngörülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. KONAK HÜCRE HATLARININ HAZIRLANMASI

Tez kapsamında insan kolorektal adenokarsinoma (Caco-2) hücre hatları kullanıldı. Bu amaçla Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı kültür koleksiyonlarında -80 °C'de muhafaza edilen 20-21 pasaj sayılı hücre hatları aktive edildi. Tüp içeriği önceden steril şekilde hazırlanmış %20 fetal sığır serum (FBS) ve 50 U/mL Penisilin, 50 µg/mL Streptomisin ilaveli Dulbecco's Modifiye Eagle Medium (DMEM; pH 7.2-7.4) bulunan flasklara aktarıldı. İşlem öncesinde hazırlanan besiyeri flasklara aseptik şekilde ilave edildi. Flasklar hücre aktarımından önce besiyeri pH stabilizasyonu (pH: 7.0-7.6) ve inkübasyon adaptasyonu için 37 °C'de %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş etüvde 15 dk inkübe edildi. Hücre aktarımından sonra flasklar aynı koşullarda inkübasyona tabi tutuldu ve belirli aralıklarla adhere olan hücreler kontrol edilerek beslendi. Hücrelerin %80 ve üzeri yoğunluğa ulaşması durumunda tripsinize edilen hücreler kuyu plakalara aktarıldı (Şekil 3.1). Takip edilen inkübasyonda kuyu plakalarda > %80 yoğunluğa ulaşmış konak hücre hatlarında analizler gerçekleştirildi (Raffatellu ve ark., 2005).



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan Caco-2 (insan kolorektal adenokarsinoma) hücre hattının faz kontrast mikroskop görüntüsü (pasaj sayısı 26;>%80 yoğunluklu).

3.2. TROKSERUTİN İÇİN DOZ BELİRLEME

Trokserutinin Caco-2 hücre hatları üzerine sitotoksisitesi MTT analizi ile belirlendi. MTT analizinde hücreler, 96'lı kuyu plakaya her bir kuyu için yaklaşık 10^4 hücre 100 µL DMEM olacak şekilde ekildikten sonra plakalar 37°C'de %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş etüvde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyulardan besiyeri alındı ve aynı besiyerinde, farklı dozlarda hazırlanmış konsantrasyonlar kuyulara eklendi. Etken maddenin uygulanmasından sonra plakalar aynı koşullarda 24 saatlik bir inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon sonunda besiyeri alındıktan sonra her bir kuyuya 12 mM MTT stok solüsyonundan 10 µL eklendi. Plakalar 37°C'de dört saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir kuyuya 100 µL SDS-HCl solüsyonu eklenip, 37°C'de 4-18 saat inkübe edildikten sonra otomatik mikro plaka okuyucu (Thermo MultiScan, ABD) ile 570 nm'de optik dansite ölçümleri gerçekleştirildi. Yarı-maksimum inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) değerinin belirlenmesi amacıyla, kontrol grubuna göre hücre canlılığında %50 azalmaya

dayanarak doğrusal olmayan regresyon ile doz-yanıt eğrisi oluşturuldu (Kumar ve ark., 2018). Çalışma için tek doz belirlendi.

3.3. TRX'İN KONAK HÜCRELERE BAKTERİ İNVAZYONU ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Çalışma kapsamında *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 referans izolatının konak hücre hatlarında invazyon düzeyinin belirlenmesi için gentamisin koruma deneyi uygulandı (Arpaia ve ark., 2011). Trokserutin ve kontrol grubu olmak üzere ikigrup belirlendi. Bu amaçla altılı kuyu plakalarda %80 yoğunluğa ulaşan konak hücre hatları 100 µL 0,5 McFarland dansitede taze *Salmonella* kültürü ile (MOI: 50) enfekte edildi. Bakteriyel invazyonun gerçekleşmesi için plakalar %5 CO_2 ortamında 37 °C'de iki saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her kuyu, steril fosfat tamponlu salin (PBS) ile iki kez yıkandı. Daha sonra 100 µg/mL konsantrasyonda gentamisin (Sigma, ABD) içeren DMEM ile %5 CO_2'de 37°C'de iki saatlik bir inkübasyon uygulandı. Gentamisinin ekstraselüler bakterileri inhibe ettiği bu inkübasyon sonrası her kuyu üç kez PBS ile yıkandı ve konak hücrelerin, 1.5 mL %1 Triton X-100 ile %5 CO_2 içinde 37°C'de 15 dk boyunca inkübe edilmesi ile ayrılmaları sağlandı. Elde edilen lizat daha sonra PBS ile desimal sulandırmaya tabi tutularak modifiye triptic soy agar (mTSA; 0,3 g/L sodyum tiyosülfat ve 0,5 g/L demir (III) amonyum sitrat ilaveli TSA) üzerine yayma plak yöntemi ile ekildi. Petriler 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrası uygun dilüsyon faktörü hesaplanarak her bir kuyu için invaze bakteri sayısı yüzde (%) log kob olarak hesaplandı.

3.4.TRANSKRİPTOM ANALİZLERİ

Deneysel olarak oluşturulmuş in vitro *Salmonella* enfeksiyonları ile ilişkili inflamasyon ve inflammazom mekanizmalarında etkin rol alan genlerin ekspresyonları üzerine TRX etkisi transkriptomik olarak irdelendi. Bu amaçla trokserutin eklenmiş ve eklenmemiş iki deney grubu oluşturuldu. Trokserutin gruplarında deneysel enfeksiyondan 1 saat önce TRX verildi ve enfeksiyonun altıncı saatinde aşağıda detayları verilen analizler gerçekleştirildi.

3.4.1. RNA-Dizileme Kütüphane Hazırlığı ve Dizileme Reaksiyonu

Kontrol ve deney gruplarının dizayn edildiği altılı kuyu plakalardan total RNA eldesi RNeasy Mini kit (Qiagen, ABD) ile üreticinin talimatları takip edilerek izole edildi. Elde edilen total RNA örneklerinin izolasyon kalitesi ve verimliliği florometrik olarak Qubit 3.0 cihazı ile RNA kiti kullanılarak belirlendi. Daha sonra total RNA izolatlarında kalite skorlaması Agilent Bioanalyzer 2100 sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. RNA izolatlarında ribozomal RNA uzaklaştırma (rRNA depletion) temelli RNA dizileme (RNA-Seq) kütüphanesi hazırlanarak dizileme işlemi gerçekleştirildi. Ökaryotik rRNA'ların uzaklaştırılması ve RNA-Seq dizileme kütüphanelerinin hazırlanmasında "NEBNext rRNA Depletion Kit v2 (İnsan)" ve "NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit" ticati kitleri kullanıldı. Hazırlanmış RNA örnekleri, çift-yönlü paired-end (PE150) metodolojisi ile Illumina NovaSeq 6000 platformu kullanılarak dizilime işlemine tabi tutuldu. Her bir örnek için, düşük ekspresyon seviyesine sahip mRNA ve uzun kodlanmayan RNA (lncRNA) moleküllerinin yüksek hassasiyetle tespit edilebilmesini temin dilmesi amacıyla, her bir numuneden minimum 12 gigabaz (Gb) veri elde edilmesi sağlandı.

3.4.2. Biyoinformatik Analizler

RNA dizileme reaksiyonu sonucu elde edilen ham okumalarda filtreleme işlemi (adaptör dizilerinin kaldırılması, düşük kaliteli okumaların filtrelenmesi (<Q30, Phred skoru), baz uzunluğu 75 bç'nin altındaki okumaların kaldırılması, okumaların ilk ve son 10 bazında görülen düşük kaliteli dizilerin uzaklaştırılması ve Poly-A/T kuyrukların temizlenmesi) Trimmomatic v0,39 (Bolger ve ark., 2014) ve fastp v0,24.0 (Chen ve ark., 2018) yazılımlarının güncel sürümleri kullanılarak gerçekleştirildi. Filtreleme işleminden önce ve sonra okumaların FASTQC v0,12.1 yazılımı ile (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) kalite kontrolü yapılarak MultiQC v1.27.1 (Ewels ve ark., 2016) aracı ile tüm dosyaların kalite metrikleri birleştirildi. Filtreleme sonucu elde edilen yüksek kaliteli RNA dizileme okumaları, GENCODE genomik veri tabanında yer alan (https://www.gencodegenes.org/human/) en güncel insan genomu "human genome Release 47 (GRCh38.p14)" ve güncel genom anotasyon dosyası (".gtf") kullanılarak hizalandı. Genoma hizalama, transkript dizisi ve modelinin oluşturulması ve farklı

ifade edilen genlerin belirlenmesi işlemlerinde sırası ile HISAT2 v2.2.1 ve StringTie v2.2.2 iş akış yazılımları kullanıldı (Pertea ve ark., 2016). HISAT2 v2.2.1 yazılımı ile genom hizalanması sonucu elde edilen ".bam" dosyasından, StringTie yazılımı ile transkript modeli (".gtf") ve "transkript.fasta" dizileri elde edildi. Samtools v1.21.1 (Li ve ark., 2009) kullanılarak hizalama dosyaları sıralanarak indekslenmeleri sağlandı. Hizalama adımından sonra ilk olarak featureCounts aracı kullanılarak gen seviyesinde okuma sayıları (ing. "count file") elde edildi. Bu sayılar, farklı biyolojik koşullar arasındaki gen ifade farklılıklarını belirlemek için temel girdi verisi olarak kullanıldı. Ardından, elde edilen okuma sayıları DESeq2 v1.46.0 (Love ve ark., 2014) paketine aktarılarak istatistiksel analizler gerçekleştirildi. DESeq2 v1.46.0, negatif binom modelini kullanarak verilerin varyasyon düzeyleri belirlendi. Daha sonra çoklu test düzeltmesi uygulanarak yanlış pozitif sonuçlar minimize edildi. Yapılan işlemler sonucunda istatistiksel olarak anlamlı farklı ifade edilen genler (DEG'ler) belirlendi. Gruplar arasında gen ifade değerleri açısından uyum olup olmadığı temel bileşenler analizi (PCA) ile değerlendirildi. Grupların kümelenme durumları ClustVis (Metsalu ve ark., 2015) veya ComplexHeatmap v2.22.0 (Gu, 2022) R paketi ile görselleştirildi. Gruplar arasındaki gen ifade değerlerine ilişkin farklılıkların görselleştirilmesi (volcano plot, MA plot, heatmap vb.) DEBrowser v1.26.0 (Kucukkural ve ark., 2019) veya EnhancedVolcano v1.16.0 (Blighe ve ark., 2018) R paketleri ile yapıldı. Farklı ifade edilen genlerin biyolojik süreç (biological process), moleküler işlev (molecular function) ve hücresel bileşen (cellular component) kategorilerine ilişkin gen ontoloji (GO) zenginleştirme analizleri, güncel ShinyGO v0,82 (http://bioinformatics.sdstate.edu/go/) (Ge ve ark., 2020) açık erişimli kodlar ile yapıldı. Yolak zenginleştirme analizleri g:Profiler, GSEA v4.3.2, Cytoscape v3.9.1 ve EnrichmentMap v3.3.6 yazılımlarını içeren entegre bir yaklaşımla, Reimand ve ark. (2019) tarafından geliştirilen yöntemler izlenerek gerçekleştirildi. Metabolik yolak ve sinyal yolaklarının daha detaylı analizinde KEGG (https://www.genome.jp/kegg/) ve Reactome (https://reactome.org/) veri tabanları kullanıldı.

DEG analizi sonrasında belirlenen lncRNA'lar ve mRNA'lar arasındaki potansiyel regülatör ilişkilerin incelenmesi amacıyla kapsamlı bir lncRNA-mRNA etkileşim ağı analizi gerçekleştirildi. Bu analiz sürecinde, ilk olarak Gffcompare çıktısı

kullanılarak kodlama potansiyeli olmayan transkriptler (class code "u", "i", "x", "s" vb.) tanımlandı. Ardından, FEELnc v0,2.0 (Wucher ve ark., 2017) aracılığıyla lncRNA'ların kodlama potansiyeli biyoinformatik olarak doğrulandı. Bu transkriptler intergenik, antisens, intronic gibi kategorilere sınıflandırıldı. lncRNA-mRNA etkileşimlerinin tahmin edilmesi iki farklı yaklaşımla gerçekleştirildi. Cis-düzenleme mekanizmaları için, genomik lokasyona dayalı potansiyel cis-düzenleyici lncRNA'lar (100 kb içerisindeki genler) belirlendi. Trans-düzenleme mekanizmaları için ise, RIsearch2 v2.1 (Alkan ve ark., 2017) veya LncRTPred v1.0 (Das ve ark., 2024) araçları kullanılarak lncRNA-mRNA dizi temelli etkileşim tahminleri gerçekleştirildi. Buna ek olarak, WGCNA v1.72 (Langfelder ve Horvath, 2008) R paketi ile koekspresyon ağ analizi gerçekleştirildi. lncRNA-mRNA'ları içeren fonksiyonel modüller tespit edildi. Tanımlanan etkileşimlerin ağ yapısının oluşturulması ve görselleştirilmesi Cytoscape v3.10,3 (Shannon ve ark., 2003) yazılımı ile gerçekleştirildi. Bu ağın topolojik özellikleri NetworkAnalyzer eklentisi kullanılarak karakterize edildi. Bu amaçla merkezi düğümler ve motifler belirlendi. Elde edilen lncRNA-mRNA etkileşim ağı, CyTargetLinker v4.1.0 (Kutmon ve ark., 2013) eklentisi aracılığıyla miRNA'lar, transkripsiyon faktörleri ve diğer düzenleyici elementleri de içerecek şekilde genişletilerek daha kapsamlı bir düzenleyici ağ elde edildi.

3.4.3. Transkriptom Analiz Sonuçlarının RT-qPCR ile Validasyonu

RNA sekans verilerinin validasyonu için transkriptom analizlerinde kullanılan total RNA izolatlarından üreticinin talimatları izlenerek cDNA sentez kiti (Applied Biosystems by Thermo Fisher, Carlsbad, CA, ABD) ile cDNA örnekleri elde edildi (RT). Elde edilen normalize cDNA örneklerinde hücresel yanıt ve inflammazom ilişkili genler kantitatif olarak referans genler ile karşılaştırmalı olarak araştırıldı. Çalışmada kullanılacak tüm primer çiftleri özgün olarak dizayn edildi. Gen ekspresyonu analizlerinde kullanılmak üzere dizayn edilmiş primer prob takımlarının özellikleri Tablo 3.1'de özetlenmiştir (Cobur ve ark., 2025). RT-qPCR analizlerinde SSO Advenced Universal probe master mix (Bio-Rad, ABD) üreticinin talimatlarına göre kullanıldı. Gerçek zamanlı PCR analizleri 10 pmol konsantrasyonunda her bir primer/prob takımı ile CFX96 PCR Sisteminde (Bio-Rad, ABD) gerçekleştirildi.

Elde edilen Ct değerlerinden kontrol ve referans gen verileri (ACTB, GAPDH) kullanılarak her bir gen bölgesi ve grup için gen ekspresyon düzeyleri hesaplanması için karşılaştırmalı ΔΔCt metodu uygulandı (Livak ve Schmittgen, 2001).

Tablo 3.1. Kullanılan hedef spesifik primer prop takımları

Oligo	**Dizi (5'->3')**	**GC (%)**	**Tm (°C)**
HSq-ACTB-F	GACTGACTACCTCATGAAGATCC	47,83	57,80
HSq-ACTB-R	GCCATCTCTTGCTCGAAGT	52,63	57,55
HSq-ACTB-P	FAM-AGCGGGAAATCGTGCGTGACATTA-BHQ1	50,00	64,40
HSq-GAPDH-F	AGGTCATCCCTGAGCTGAA	52,63	57,59
HSq-GAPDH-R	CTGCTTCACCACCTTCTTGAT	47,62	58,21
HSq-GAPDH-P	FAM-TCAGTGGTGGACCTGACCTG-BHQ1	60,00	65,90
HSq-TLR4-F	GGACCTTTCCAGCAACAAGA	50,00	59,60
HSq-TLR4-R	CAGGGACAGGTCTAAAGAGAGA	50,00	61,30
HSq-TLR4-P	FAM-TGCACAGACTTGCGGGTTCTACAT	50,00	64,30
HSq-CASP4-F	AGTCCTCTGACAGCACATTC	50,00	58,90
HSq-CASP4-R	GGTGTCATAAAGCAGCACATC	48,00	57,60
HSq-CASP4-P	FAM-TCTGCGGAACTGTGCATGATGAGA	50,00	64,50
HSq-CASP5-F	TGGAATACCTGGGCAAAGATG	48,00	60,01
HSq-CASP5-R	GATCAGGGCCTTGTCTTCAAT	48,00	59,90
HSq-CASP5-P	FAM-ACACGATGTTCTGACATTGAAGGAAGAGG-BHQ1	45,00	64,50
HSq-NFKB1-F	GTGGTGCCTCACTGCTAACT	55,00	61,50
HSq-NFKB1-R	GGATGCACTTCAGCTTCTGT	50,00	59,20
HSq-NFKB1-P	FAM-TTCCCACACCGTGTAAACCA	50,00	62,10
HSq-TNFa-F	GATCCCTGACATCTGGAATCTG	50,00	60,60
HSq-TNFa-R	GAAACATCTGGAGAGAGGAAGG	50,00	60,80
HSq-TNFa-P	FAM-CCAGAATGCTGCAGGACTTG	55,00	61,10
HSq-IL1B-F	GGTGTTCTCCATGTCCTTTGTA	45,45	57,98
HSq-IL1B-R	GCTGTAGAGTGGGCTTATCATC	50,00	58,34
HSq-IL1B-P	FAM-CTGTACCTGTCCTGCGTGTT-BHQ1	55,00	61,60
HSq-IL18-F	TCCTCCTGATAACATCAAGGATACA	40,00	58,86
HSq-IL18-R	CCTTCGTATGATGAAGATTCAAATTGC	37,04	59,62
HSq-IL18-P	FAM-TCAGAGAAGTGTCCCAGGACATGA-BHQ1	45,00	58,50
HSq-NLRP3-F	GAAGTGGACTGCGAGAAGTT	50,00	59,40
HSq-NLRP3-R	CGTTCGTCCTTCCTTCCTTT	50,00	60,50
HSq-NLRP3-P	FAM-CCAGGAGTTCTTTGCCGCCATGTA-BHQ1	54,00	66,30
HSq-NLRC4-F	CTCCGGGATTTCAGCAAGTT	50,00	58,17
HSq-NLRC4-R	CCACACCAGCACATCTCTTTAT	45,00	58,39
HSq-NLRC4-P	FAM-TATTCAGCTCTGCCACAAGCCTCA-BHQ1	50,00	64,30

3.5. KONAK HÜCRE APOPTOZ ÖLÇÜMÜ

Oluşturulan deney gruplarında hücresel apoptoz yüzdelerinin belirlenmesi amacıyla akış sitometrisi analizleri gerçekleştirildi. Bu amaçla Annexin V-FITC boyama kiti (Annexin A5-FITC KIT- Apoptosis Detection Kit; Beckman Coulter, ABD) kullanıldı. Bu test ile total apoptotik hücre oranları belirlenerek *Salmonella* enfeksiyonunda TRX'nin etkinliği hücresel düzeyde ortaya konuldu. Bu amaçla deney gruplarından hazırlanan hücrelerin üretici protokolüne uygun olarak akış sitometri cihazında (Beckman Coulter CytoFlex, ABD) okumaları gerçekleştirildi (Arpaia ve ark., 2011).

3.6. WESTERN BLOTTING İLE GASDERMİN D PROTEİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜLMESİ

LPS maruziyetinin 6. saatinde TRX uygulanmış deney gruplarına ait hücreler soğuk PBS ile yıkandı ve 10 µl/ml protease inhibitör kokteyli (Sigma, Almanya) içeren RIPA lizis tamponu kullanılarak lize edildi. Lizatlar daha sonra 10,000 g'de 4°C'ye ayarlı olarak 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen protein konsantrasyonları, Qubit 3 (Thermo, ABD) ile üreticinin talimatları takip edilerek florometrik olarak ölçüldü. Ortalama protein konsantrasyonu 4.02 µg/µL olarak belirlendi. Ölçüm işlemlerini takiben, eşit konsantrasyonlardaki protein örnekleri örnek tamponunda (25 mmol/LTris-Cl, pH 6.8, %1 SDS, %5 β-merkaptoetanol, %10 gliserol, %0,01 bromfenol mavisi)'da çözdürüldü. Proteinler hazırlandıktan sonra, tüm örnekler %12'lik poliakrilamit jelde (Bio-Rad, ABD), 120 V'da yürütüldü. Marker olarak "prestained" (BioRad, ABD) kullanılarak transferin olup olmadığı kontrol edildi. PVDF membran jelin boyutuna uygun olarak kesilip, 3 dakika boyunca %100 metanol ile muamele edildi. Yürütme işleminin sonunda, semi-dry blotlama işlemi uygulanarak jelde bulunan proteinler PVDF membrana (BioRad) 4°C`de 1 saat boyunca 100 V'da aktarıldı. Proteinlerin transfer işlemini takiben, PVDF membran, EveryBlot Blocking Buffer (Bio-Rad, ABD) ile üretici talimatları takip edilerek spesifik olmayan birincil antikor bağlanmalarını önlemek için bloklandı. Daha sonra ise, proteinlerin transfer olduğu membranlar anti-GSDMD antikoru (Abcam, ab155233) ile çalkalamalı olarak 4°C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon işleminin sonunda, membranlar üç kere 10 dakika

PBS/%0,25 Tween-20 solüsyonu ile yıkandı. Son olarak membranlar üzerine sekonder antikor (HRP, ab205718), eklenerek bir saat inkübasyona bırakıldı. İnternal kontrol olarak ise β-Aktin (Abcam, ab8227) kullanıldı. Bu işlemler sonunda proteinler Bio-Rad ChemiDoc XRS+ görüntüleme cihazında belirlendi ve miktarları ölçüldü. Görüntüleme işleminde; Bio-Rad CFX Maestro protein görüntüleme programı kullanıldı. Görüntüleme işleminde; SuperSignal™ West Atto Ultimate Sensitivity Substrate (Thermo, ABD) kullanıldı (Gram ve Kowalewski., 2022). Bant yoğunlukları, aynı ilgi alanı bölgelerine sahip ayarlanmış hacimler ve otomatik arka plan çıkarma yöntemi kullanılarak Bio-Rad Image Lab yazılımı ile değerlendirildi.

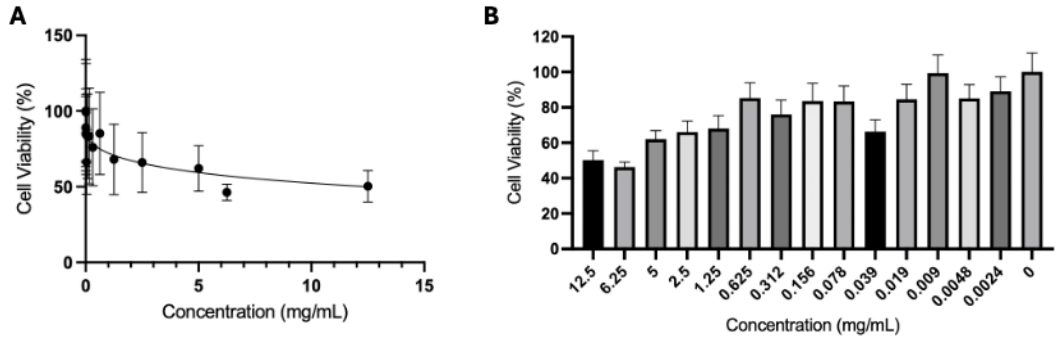
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Çalışma kapsamında uygulanan tüm deneyler üç ayrı biyolojik tekrar olarak gerçekleştirildi. Her bir biyolojik tekrarda en az 2 teknik tekrar yapıldı. Tekrarlı elde edilen verilerin ortalamaları standart hataları (SH) ile verildi. Elde edilen ham verilerin derlenmesinde ve istatistik analizlerin yapılmasında ve Rstudio açık erişimli programlama dili (https://www.rstudio.com/) ve GraphPad Prism v10,6.01 paket programları kullanıldı. Grup karşılaştırmalarında elde edilen gözlemlerin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendi. Normal dağılımda tekrarlı ölçümlerde kontrol ve TRX grupları arasındaki ilişkiler tek yönlü varyans analizleri (One-way ANOVA) ile belirlendi. Çalışmada önemlilik düzeyi $P< 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. TROKSERUTİN UYGULAMA DOZUNUN VE SİTOTOKSİK KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ

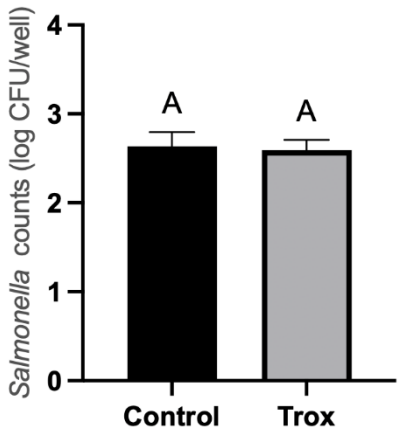
Hücreler artan konsantrasyonlarda TRX (mg/mL) ile muamele edildi ve hücre canlılığı MTT reaktifi kullanılan kolorimetrik canlılık testi ile değerlendirildi. 12,5 mg/mL'den 0,0024 mg/mL'ye kadar seri dilüsyonla hazırlanmış dozların sitotoksik etkisi analiz edildi. Doz-yanıt eğrisinin doğrusal olmayan regresyon analizinde, hücre canlılığında konsantrasyona bağlı bir azalma olduğu ortaya kondu. İlgili analiz ile Caco-2 hücre hatlarında hesaplanan IC_{50} değeri 25,71 mg/mL olarak bulundu. Sonraki deneyler için toksik olmayan çalışma dozlarını belirlemek amacıyla azalan, sitotoksik altı konsantrasyonlarda TRX ile muamele edilen Caco-2 hücrelerinin hücre canlılığı Şekil 4.1'de gösterilmektedir. Belirlenen IC_{50} değerinin altındaki konsantrasyonların sitotoksisiteye neden olmadığı görüldü. Uygulama dozu literatür taranarak 156 µg/mL olarak belirlendi (Cavalcanti ve ark., 2020; Hassanshahi ve ark., 2020; Tan ve ark., 2023; Yu ve ark., 2021).



Şekil 4.1. Caco-2 hücrelerinde TRX sitotoksisitesinin belirlenmesi. (A) Caco-2 hücrelerinde TRX kaynaklı sitotoksisitenin doz-yanıt analizi. (B) Farklı konsantrasyonlarda uygulanan TRX'in hücre canlılığı üzerine etkisi (Ortalama ± SEM).

4.2. TRX'İN KONAK HÜCRELERE BAKTERİ İNVAZYONU ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Trokserutinin hücre içi *Salmonella* invazyonu üzerine etkisi, gentamisin koruma testi kullanılarak değerlendirildi. *Salmonella* maruziyetinden sonra, konak hücre dışı bakteriler gentamisin uygulaması ile ortadan kaldırıldı. Daha sonra canlı hücre içi *Salmonella*, koloni oluşturan birim (CFU) sayımı ile belirlendi. Şekil 4.2'de de gösterildiği gibi, hücre içi *Salmonella* varlığı kontrol ve TRX grupları arasında anlamlı bir farklılık göstermedi ($P > 0,05$). Bu sonuçlar, uygulanan TRX dozunun test edilen deneysel koşullar altında *Salmonella* invazyonu ve hücre içi hayatta kalmasını önemli ölçüde etkilemediğini göstermektedir.



Şekil 4.2. Trokserutinin, gentamisin koruma deneyinde hücre içi *Salmonella* düzeyi üzerine etkisi (kuyu başına log CFU ortalama ± SEM). Aynı harfi paylaşan gruplar anlamlı olarak farklı değildir ($P > 0,05$).

4.3. GEN EKSPRESYONU SONUÇLARI

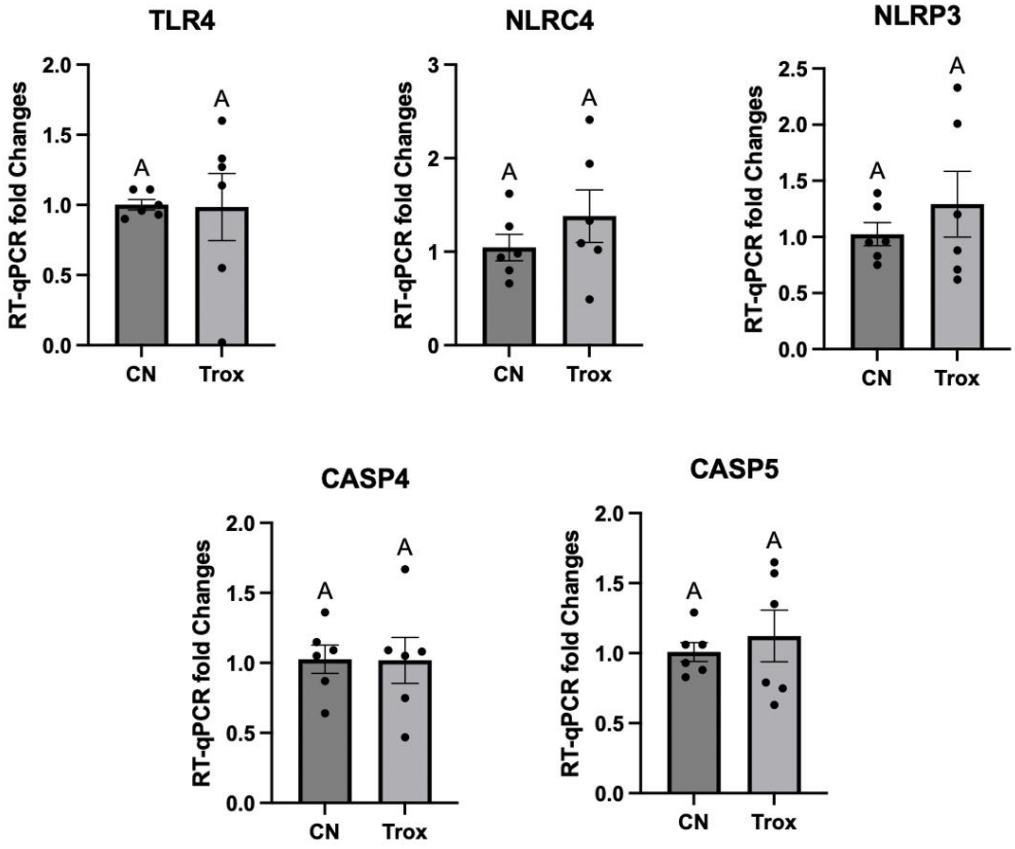
Rt-qPCR sonuçları

Trokserutinin, Caco-2 hücrelerinde RT-qPCR yöntemiyle, doğal yanıt ve inflamasyonla ilgili genler üzerindeki transkripsiyonel etkileri değerlendirildi. Kontrol (CN) ve trokserutin (Trox) uygulanmış Caco-2 hücrelerinde TLR4, NLRC4, NLRP3, CASP4 ve CASP5'in mRNA ekspresyon seviyeleri RT-qPCR ile ölçüldü. Gen ekspresyon seviyeleri, iç referans genlere (GAPDH ve ACTB) göre normalize edildikten sonra kontrol grubuna göre kat değişim olarak ifade edildi. Analiz sonucunda TRX uygulamasının test edilen deneysel koşullar altında hedef

inflamasyon ve doğal yanıt genlerinde önemli transkripsiyonel modülasyonuna neden olmadığı belirlendi (Şekil 4.3).

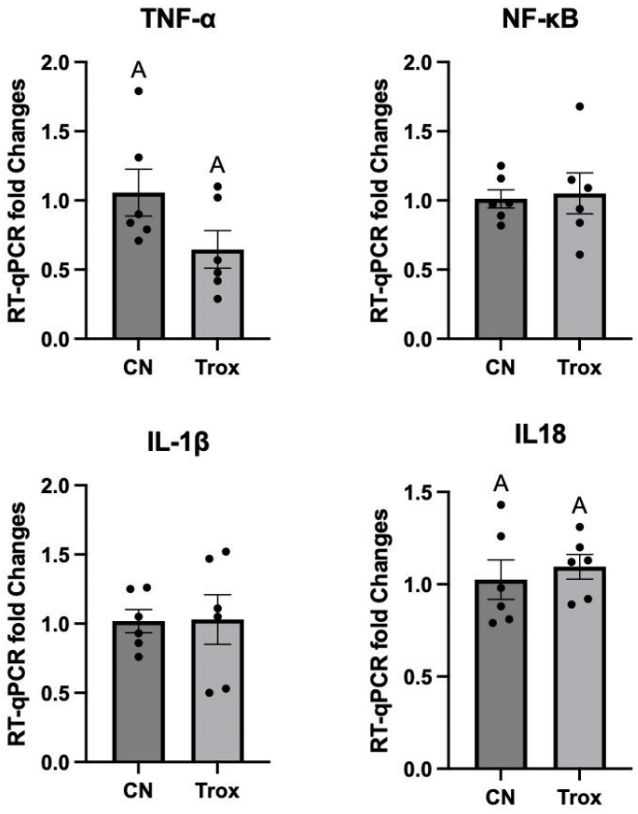
TLR4, NLRC4 ve NLRP3 mRNA ekspresyonunun karşılaştırmalı analizi, kontrol (CN) ve trokserutin ile tedavi edilen (Trox) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını ortaya koydu. Biyolojik tekrarlar arasında hafif bir bireyler arası değişkenlik gözlemlenmesine rağmen, ortalama katlanma değişim değerleri her iki grupta da başlangıç değerlerine yakın kaldı; bu da TRX'in uygulanan deneysel koşullar altında patern tanıma reseptörü veya kanonik inflamasyon transkripsiyonunu önemli ölçüde modüle etmediğini göstermektedir ($P > 0,05$).

Benzer şekilde, kanonik olmayan inflamasyonla ilişkili kaspazlar olan CASP4 ve CASP5'in ekspresyon seviyeleri, kontrollere kıyasla trokserutin uygulaması ile önemli düzeyde değişmediği gözlendi ($P > 0,05$). Bu bulgular, trokserutinin Caco-2 hücrelerinde mRNA düzeyinde kanonik olmayan inflammazom yolakları üzerinde ölçülebilir bir düzenleyici etki göstermediğini ve TRX'in olası immünomodülatör etkilerinin bu inflamasyon yolu bileşenlerinin doğrudan transkripsiyonel kontrolü yoluyla aracılık edilmesinin olası olmadığını desteklemektedir.



Şekil 4.3. *Salmonella* maruziyetinde TRX'in Caco-2 hücrelerinde inflamasyonla ilgili gen ekspresyonunu üzerine etkisi (ortalama ± SEM). Aynı harfi paylaşan gruplar istatistiksel olarak farklı değildir (P > 0,05).

Trokserutinin pro-inflamatuar salımını transkripsiyonel düzeyde etkileyip etkilemediğini araştırmak için, ilgili genlerin ekspresyonu RT-qPCR ile değerlendirildi. TNF-α ve NF-κB mRNA düzeylerinin analizi, kontrol ve TRX ile tedavi edilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını ortaya koydu. TNF-α ve NF-κB ekspresyonlarının gruplar arasında anlamlı bir fark oluşmadığı gözlendi (P > 0,05). Benzer şekilde, inflamatuar ilişkili sitokinler olan IL-1β ve IL-18'in ekspresyonları da TRX uygulamasında anlamlı bir şekilde değişmedi. Bu bulgular, TRX'in Caco-2 hücrelerinde başlıca inflamatuar sitokinler üzerinde transkripsiyonel düzenleyici etki göstermediğini ortaya koymaktadır. *Salmonella* maruziyetinde TRX uygulamasının, Caco-2 hücrelerinde pro-inflamatuar sitokin ekspresyonu üzerine etkisi Şekil 4.4'te verilmiştir.

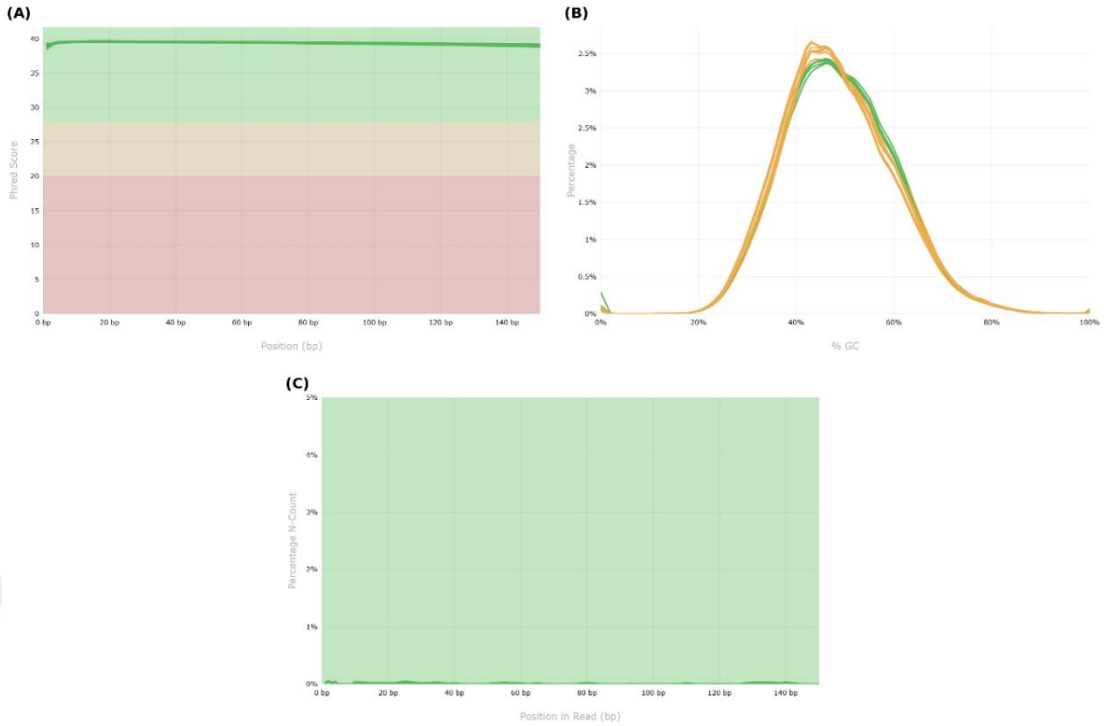


Şekil 4.4. *Salmonella* maruziyetinde TRX uygulamasının, Caco-2 hücrelerinde pro-inflamatuar sitokin ekspresyonu üzerine etkisi (ortalama ± SEM). Aynı harfi paylaşan gruplar istatistiksel olarak farklı değildir (P > 0,05).

4.4. TRANSKRİPTOMİK ANALİZLER

RNA-Seq kütüphanelerinin sekans kalitesi ve okuma sayıları Tablo 4.1'de özetlenmiştir. Tüm örneklerde 150 bp çift yönlü (ing. paired-end) okuma stratejisi uygulanmıştır ve örnek başına toplam okuma sayısı 22,6 milyon ile 33,0 milyon arasında değişim göstermiştir. Sekans kalitesinin en önemli göstergelerinden biri olan Q20 değerleri tüm örneklerde %98,99-99,42 aralığında, Q30 değerleri ise %96,40-97,51 aralığında tespit edilmiştir. Bu değerler, bazların büyük çoğunluğunun yüksek doğrulukla belirlendiğini ve sekans hatası oranının son derece düşük olduğunu ortaya koymaktadır. GC içeriği %47,32-48,87 aralığında homojen bir dağılım sergilemiş olup bu durum, kütüphaneler arasında sistematik bir sapma olmadığını ve PZR amplifikasyon yanlılığının minimal düzeyde kaldığını göstermektedir.

RNA-Seq verilerinin kalite değerlendirmesi FastQC analizi ile gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.5'te özetlenmiştir. Sekans kalite histogramı incelendiğinde, tüm örneklerde Phred kalite skorlarının okuma boyunca 35-40 aralığında sabit kaldığı ve yüksek kalite eşiği olan Q30'un üzerinde seyrettiği görülmektedir. Bu durum, baz belirleme doğruluğunun %99,9'un üzerinde olduğunu ve sekans hatalarının ihmal edilebilir düzeyde kaldığını göstermektedir. GC içeriği dağılımı (Şekil 4.5.B) değerlendirildiğinde, tüm kütüphanelerin %40-50 aralığında tek modlu normal dağılım sergilediği tespit edilmiştir. Bu homojen dağılım profili, kütüphanelerde kontaminasyon bulunmadığını, PZR amplifikasyon yanlılığının minimal düzeyde olduğunu ve örnekler arası teknik varyasyonun düşük olduğunu ortaya koymaktadır. Belirsiz baz (N) içeriği analizi (Şekil 4.5.C), sekans kalitesinin bir diğer kritik göstergesidir. N bazları, sekanslama cihazının bir pozisyondaki nükleotidi güvenilir şekilde belirleyemediği durumları temsil etmektedir. Tüm örneklerde N içeriğinin okuma boyunca %0'a yakın seyretmesi, baz çağırma işleminin yüksek doğrulukla gerçekleştirildiğini ve veri kaybının olmadığını doğrulamaktadır. Bu üç parametre birlikte değerlendirildiğinde, elde edilen RNA-Seq verilerinin yüksek kalitede olduğu ve diferansiyel gen ekspresyonu, alternatif kırpılma ve yolak analizleri gibi biyoinformatik uygulamalar için güvenilir bir temel oluşturduğu sonucuna varılmaktadır.



Şekil 4.5. FastQC kalite kontrol analizi sonuçları. **(A)** Pozisyona göre ortalama Phred kalite skorları; tüm örneklerde okuma boyunca Q>30 değeri korunmuştur. **(B)** Sekans başına GC içeriği dağılımı; örnekler normal dağılım sergilemekte olup %40-50 aralığında tepe değeri gözlemlenmektedir. **(C)** Pozisyona göre belirsiz baz (N) oranı; tüm pozisyonlarda N içeriği %0'a yakın seyretmektedir.

RNA-Seq kütüphanelerinin kalite değerlendirmesinde kullanılan temel metrikler Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'te özetlenmiştir. Kontrol grubunda haritalama oranları %91,3 ile %97,8 arasında, deney grubunda ise %91,0 ile %97,6 arasında değişim göstermiştir. Bu yüksek haritalama oranları, sekans okumalarının referans genoma başarılı bir şekilde hizalandığını ve kütüphane hazırlama sürecinde kontaminasyon veya teknik sorun yaşanmadığını göstermektedir. Ekzonik okuma oranları her iki grupta da %88-92 aralığında tespit edilmiş olup bu değerler, okumaların büyük çoğunluğunun protein kodlayan gen bölgelerine karşılık geldiğini ve mRNA zenginleştirme işleminin etkin bir şekilde gerçekleştirildiğini ortaya koymaktadır. Kütüphane kalitesinin diğer önemli göstergeleri olan intronik (%5-7) ve intergenik (%1-2) okuma oranlarının düşük seviyelerde kalması, genomik DNA kontaminasyonunun minimal düzeyde olduğuna işaret etmektedir. Benzer şekilde, rRNA kontaminasyon oranının tüm örneklerde %1,2-1,7 gibi düşük değerlerde seyretmesi, rRNA uzaklaştırma aşamasının başarıyla tamamlandığını doğrulamaktadır. Elde edilen bu kalite kontrol metrikleri bir bütün olarak

değerlendirildiğinde, RNA-Seq deneyinin yüksek kalitede gerçekleştirildiği ve elde edilen verilerin downstream analizler için güvenilir bir temel oluşturduğu sonucuna varılmaktadır.

Tablo 4.1. RNA-Seq kütüphanelerine ait özet istatistikler,

Örnek Adı	Okuma Yönü	Okuma Sayısı	Toplam Nükleotid	Okuma Uzunluğu	Q20(%)	Q30(%)	GC(%)
CN1	Forward	25 487 724	3 823 158 600	150	99,38	97,42	47,78
CN1	Reverse	25 487 724	3 823 158 600	150	99,07	96,78	47,87
CN2	Forward	30 972 492	4 645 873 800	150	99,41	97,41	48,8
CN2	Reverse	30 972 492	4 645 873 800	150	99,15	96,92	48,87
CN3	Forward	26 468 666	3 970 299 900	150	99,35	97,3	48,45
CN3	Reverse	26 468 666	3 970 299 900	150	99,09	96,82	48,5
CN4	Forward	30 020 768	4 503 115 200	150	99,42	97,51	48,54
CN4	Reverse	30 020 768	4 503 115 200	150	99,18	97,09	48,62
CN5	Forward	28 950 875	4 342 631 250	150	99,36	97,28	47,56
CN5	Reverse	28 950 875	4 342 631 250	150	99,12	96,91	47,6
CN6	Forward	26 085 796	3 912 869 400	150	99,35	97,26	47,32
CN6	Reverse	26 085 796	3 912 869 400	150	99,14	97,01	47,39
TRX1	Forward	27 085 306	4 062 795 900	150	99,27	97,17	48,19
TRX1	Reverse	27 085 306	4 062 795 900	150	99	96,69	48,26
TRX2	Forward	22 616 649	3 392 497 350	150	99,34	97,27	48,42
TRX2	Reverse	22 616 649	3 392 497 350	150	99,03	96,71	48,5
TRX3	Forward	24 428 783	3 664 317 450	150	99,29	96,88	48,37
TRX3	Reverse	24 428 783	3 664 317 450	150	98,99	96,4	48,46
TRX4	Forward	33 017 117	4 952 567 550	150	99,37	97,41	48,13
TRX4	Reverse	33 017 117	4 952 567 550	150	99,13	96,95	48,2
TRX5	Forward	24 844 920	3 726 738 000	150	99,39	97,42	48,34
TRX5	Reverse	24 844 920	3 726 738 000	150	99,12	96,87	48,39
TRX6	Forward	30 079 341	4 511 901 150	150	99,32	97,21	48,22
TRX6	Reverse	30 079 341	4 511 901 150	150	99,08	96,82	48,27

Kontrol (CN1-CN6) ve deney (TRX1-TRX6) gruplarına ait ileri yönlü (ing, forward) ve geri yönlü (ing, reverse) okumalar için okuma sayısı, toplam nükleotid, okuma uzunluğu, kalite skorları (Q20, Q30) ve GC içeriği gösterilmektedir,

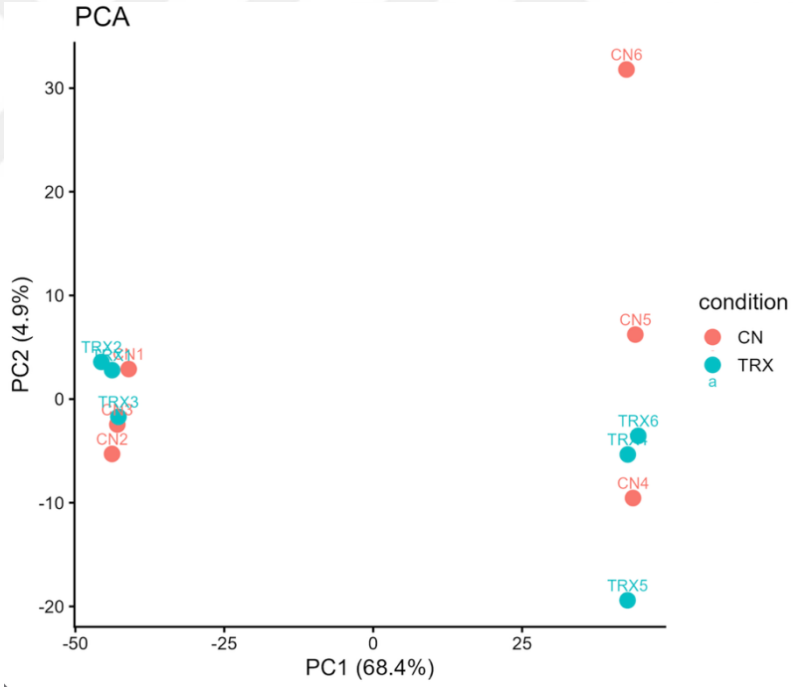
Tablo 4.2. Kontrol grubuna ait RNA-Seq kütüphanelerinin kalite kontrol metrikleri, Toplam okuma sayısı, haritalama oranı, ekzonik/ intronik/intergenik dağılımlar ve rRNA kontaminasyon oranları gösterilmektedir (CN1-CN6: biyolojik tekrarlar (n=6)),

Metrik	CN1	CN2	CN3	CN4	CN5	CN6
Haritalama Oranı	0,9767	0,9782	0,9758	0,9142	0,9131	0,9259
Ekzonik Oran	0,8998	0,9041	0,8985	0,9166	0,8913	0,8963
İntronik Oran	0,0625	0,0587	0,0621	0,0522	0,0683	0,0650
İntergenik Oran	0,0141	0,0159	0,0146	0,0084	0,0179	0,0174
İntragenik Oran	0,9623	0,9628	0,9606	0,9687	0,9596	0,9613
rRNA Oranı	0,0146	0,0142	0,0151	0,0123	0,0168	0,0166
Kimerik Okumalar	162 232	186 392	148 802	156 620	165 030	123 410
Kimerik Hizalama Oranı	0,0033	0,0031	0,0029	0,0029	0,0031	0,0026
Ekzonik Okumalar	44 487 015	54 474 030	46 110 579	50 041 471	46 825 200	43 027 800
İntergenik Okumalar	697 530	959 598	750 912	460 116	939 547	836 586
İntragenik Okumalar	47 579 033	58 009 493	49 297 505	52 889 397	50 411 735	46 149 866
Belirsiz Okumalar	1 164 986	1 282 961	1 272 879	1 247 527	1 182 287	1 020 461
İntronik Okumalar	3 092 018	3 535 463	3 186 926	2 847 926	3 586 535	3 122 066
Düşük Haritalama Kalitesi	50 623 350	61 597 282	52 594 434	59 722 030	57 535 200	51 847 520
Düşük Kaliteli Okumalar	49 441 549	60 252 052	51 321 296	54 597 040	52 533 569	48 006 913
Haritalanan Okumalar	49 441 549	60 252 052	51 321 296	54 597 040	52 533 569	48 006 913
Tekil Haritalanan Okumalar	49 441 549	60 252 052	51 321 296	54 597 040	52 533 569	48 006 913
Uyumsuz Bazlar	11 923 678	14 709 832	12 574 832	13 584 007	12 355 335	11 484 204
Globin-Dışı Okumalar	49 441 481	60 251 980	51 321 231	54 596 969	52 533 505	48 006 863
rRNA Okumaları	722 945	857 629	776 317	671 108	884 915	799 150
Toplam Baz	7 380 564 174	8 977 947 833	7 632 381 804	8 122 342 630	7 825 635 635	7 154 793 203
Toplam Haritalanan Çiftler	24 325 129	29 673 167	25 242 835	26 889 461	25 853 569	23 636 001
Toplam Okumalar	54 443 820	67 151 780	56 986 550	62 044 186	62 650 863	56 541 347
Tekil Haritalama (QC Geçen)	50 623 350	61 597 282	52 594 434	59 722 030	57 535 200	51 847 520

Tablo 4.3. Deney grubuna ait RNA-Seq kütüphanelerinin kalite kontrol metrikleri, Toplam okuma sayısı, haritalama oranı, ekzonik/ intronik/intergenik dağılımlar ve rRNA kontaminasyon oranları gösterilmektedir (TRX1-TRX6: biyolojik tekrarlar (*n*=6)),

Metrik	TRX1	TRX2	TRX3	TRX4	TRX5	TRX6
Haritalama Oranı	0,9694	0,9758	0,9743	0,9204	0,9140	0,9104
Ekzonik Oran	0,9115	0,9167	0,8990	0,8927	0,8879	0,8928
İntronik Oran	0,0545	0,0506	0,0622	0,0664	0,0702	0,0662
İntergenik Oran	0,0134	0,0142	0,0145	0,0174	0,0201	0,0182
İntragenik Oran	0,9660	0,9673	0,9612	0,9591	0,9581	0,9589
rRNA Oranı	0,0134	0,0130	0,0150	0,0173	0,0166	0,0173
Kimerik Okumalar	171 910	122 112	156 596	158 670	111 136	145 626
Kimerik Hizalama Oranı	0,0033	0,0028	0,0033	0,0026	0,0025	0,0027
Ekzonik Okumalar	47 473 253	40 163 505	42 497 670	53 945 533	40 087 674	48 577 239
İntergenik Okumalar	698 219	620 102	684 846	1 049 537	907 765	992 236
İntragenik Okumalar	50 312 818	42 378 485	45 436 409	57 958 483	43 255 779	52 176 794
Belirsiz Okumalar	1 071 344	814 427	1 149 421	1 422 223	984 100	1 241 526
İntronik Okumalar	2 839 565	2 214 980	2 938 739	4 012 950	3 168 105	3 599 555
Düşük Haritalama Kalitesi	53 729 058	44 899 848	48 518 590	65 658 782	49 396 848	59 763 778
Düşük Kaliteli Okumalar	52 082 381	43 813 014	47 270 676	60 430 243	45 147 644	54 410 556
Haritalanan Okumalar	52 082 381	43 813 014	47 270 676	60 430 243	45 147 644	54 410 556
Tekil Haritalanan Okumalar	52 082 381	43 813 014	47 270 676	60 430 243	45 147 644	54 410 556
Uyumsuz Bazlar	12 657 850	10 796 703	12 057 843	14 277 889	11 151 737	13 800 478
Globin-Dışı Okumalar	52 082 332	43 812 958	47 270 633	60 430 125	45 147 594	54 410 481
rRNA Okumaları	695 669	567 465	709 195	1 044 718	748 725	941 046
Toplam Baz	7 758 382 882	6 533 966 166	7 034 525 871	8 970 343 907	6 719 756 945	8 087 544 795
Toplam Haritalanan Çiftler	25 559 632	21 542 536	23 227 295	29 794 694	22 238 892	26 787 740
Toplam Okumalar	57 789 893	48 477 141	52 446 535	71 400 388	54 175 956	65 298 114
Tekil Haritalama (QC Geçen)	53 729 058	44 899 848	48 518 590	65 658 782	49 396 848	59 763 778

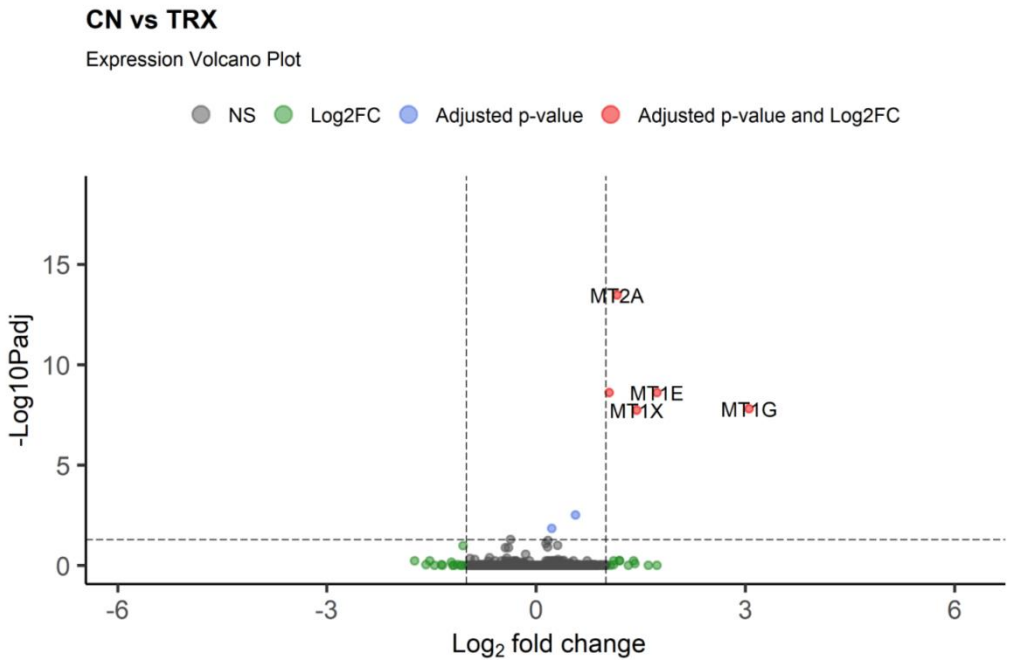
Kontrol (CN) ve TRX uygulanan *Salmonella* ile enfekte edilmiş Caco-2 hücre hatları arasında hücreleri arasındaki global transkripsiyonel farklılıkları değerlendirmek için temel bileşen analizi (PCA) gerçekleştirildi (Şekil 4.6). Toplam varyansın %68,4'ünü açıklayan birinci temel bileşen (PC1), örneklerin biyolojik tekrarların elde edilmesi durumuna göre ayırarak tekerrür analizlerin genel gen ekspresyon profili üzerinde güçlü bir etkisi olduğunu gösterdi. Varyansın %4,9'unu oluşturan ikinci temel bileşen (PC2), grup içi ek değişkenliği yakaladı. TRX ile tedavi edilen örnekler ile kontrol örnekleri arasında örtüşme gözlemlendi. Bireysel biyolojik tekrarlar, her koşul içinde orta derecede dağılım gösterdi ve grup ayrımını etkileyen aşırı uç değerlere dair hiçbir kanıt bulunmadı. Bu sonuçlar, TRX tedavisinin *Salmonella* ile enfekte edilmiş epitel hücre hatlarında belirgin bir değişim ile ilişkili olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.6. *Salmonella* maruziyetinde Kontrol ve TRX uygulanan hücre hatlarında gözlenen transkriptomik profillerin temel bileşen analizi (PCA).

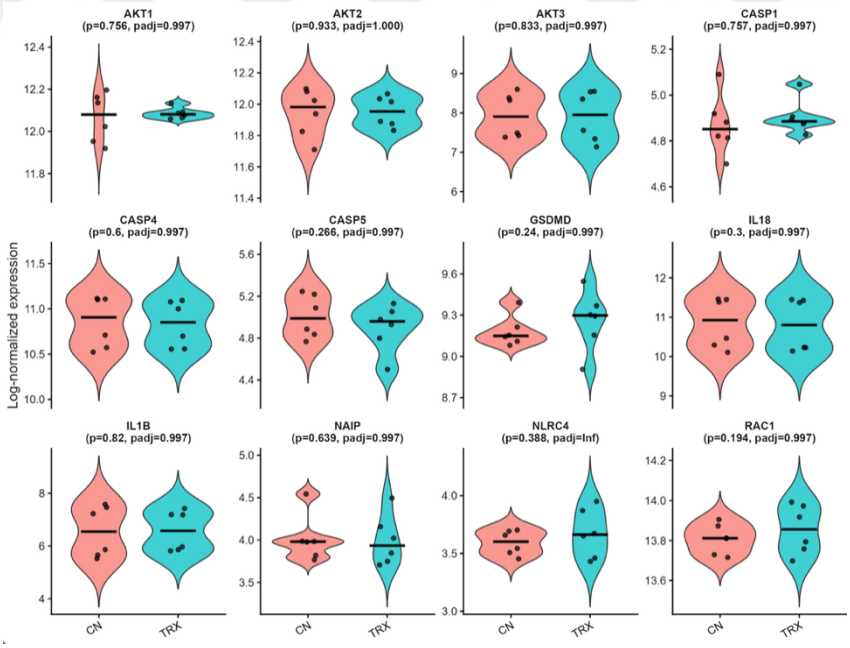
Kontrol ve deney grupları arasındaki gen ifade profili volkan grafiği analizi ile görselleştirildi (Şekil 4.7). Analiz sonucunda, hem istatistiksel anlamlılık (düzeltilmiş P değeri <0,05) hem de biyolojik anlamlılık (|log2FC|> 1) kriterlerini sağlayan sınırlı sayıda gen tespit edildi. Bu genler arasında en dikkat çekici olanları metalotiyonin

(MT) gen ailesi üyeleri olduğu belirlendi. Özellikle MT2A en yüksek istatistiksel anlamlılığa sahip gen olarak öne çıkarken (-log10padj ≈ 14), MT1E, MT1X ve MT1G genleri de hem yüksek kat değişimi değerleri hem de güçlü istatistiksel anlamlılık ile farklı ifade profili sergiledi. Metalotiyonin genleri, hücre içi metal homeostazı, oksidatif stres yanıtı ve detoksifikasyon mekanizmalarında kritik rol oynayan düşük molekül ağırlıklı, sisteinden zengin proteinleri kodlamaktadır. Bu genlerin deney grubunda koordineli bir şekilde yukarı regüle olması, uygulanan tedavinin hücresel stres yanıtını ve/veya metal metabolizmasını aktive ettiğine işaret etmektedir. Volkan grafiğinin genel görünümü değerlendirildiğinde, büyük çoğunluğun istatistiksel eşiğin altında kaldığı (gri noktalar) ve sadece birkaç genin her iki kriteri de karşıladığı (kırmızı noktalar) görülmektedir. Bu durum, deney koşulunun transkriptom düzeyinde spesifik ve hedefe yönelik bir etki oluşturduğunu, global bir gen ifade değişikliğinden ziyade belirli yolakların seçici olarak modüle edildiğini düşündürmektedir.



Şekil 4.7. Kontrol (CN) ve deney (TRX) grupları arasındaki diferansiyel gen ekspresyon analizi sonuçlarını gösteren volkan grafiği. X ekseni log2 kat değişimi (log2FC) değerlerini, Y ekseni ise istatistiksel anlamlılığı (-log10 düzeltilmiş p değeri) temsil etmektedir. Gri noktalar: istatistiksel olarak anlamlı olmayan genler (NS); yeşil noktalar: yalnızca kat değişim eşiğini (|log2FC|> 1) aşan genler; mavi noktalar: yalnızca düzeltilmiş p değeri eşiğini (padj <0,05) aşan genler; kırmızı noktalar: hem kat değişimi hem de düzeltilmiş p değeri eşiklerini aşan diferansiyel eksprese genler. Dikey kesikli çizgiler $log_2FC = \pm 1$ eşiklerini, yatay kesikli çizgi ise padj = 0,05 eşiğini göstermektedir.

Transkriptomik analizler neticesinde PI3K-AKT sinyallemesini (AKT1-3), inflamasyon ve piroptoz yollarını (NAIP, NLRC4, CASP1, CASP4, CASP5, GSDMD), pro-inflamatuar sitokinleri (IL-1B, IL-18) ve sitoskeletal düzenlemeyi (RAC1) temsil eden seçilmiş genlerin karşılaştırmalı analizi, kontrol TRX uygulanan *Salmonella* ile enfekte edilmiş Caco-2 hücre hatları arasında log-normalleştirilmiş ifade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını ortaya koydu (Şekil 4.8). Bireysel genler, gruplar arasında örtüşen ifade dağılımları göstermiş olup, biyolojik tekrarlar boyunca karşılaştırılabilir transkripsiyonel eğilimler ve dağılımlar sergiledi. Ayarlanmış p değerleri, çoklu test düzeltmesinden sonra farklı ifade bulunmadığını gösterdi. Bu bulgular, TRX'in uygulanan doz ve deney düzeneğinde bireysel gen düzeyinde, inflamasyon aktivasyonu, sitokin üretimi veya PI3K-AKT sinyallemesinin temel bileşenlerinde güçlü transkripsiyonel değişikliklere neden olmadığını ve etkilerinin tek tek transkriptlerin belirgin düzenlenmesinden ziyade koordineli, yolak düzeyinde modülasyon yoluyla gerçekleştiği fikrini desteklediğini göstermektedir.



Şekil 4.8. Trokserutinin *Salmonella* uygulanmış Caco-2 epitel hücrelerinde, inflamasyon ve piroptoz ilişkili genler üzerine etkisinin transkripsiyonel olarak değerlendirilmesi.

Transkriptomik analiz, kontrol (CN) ve TRX uygulanan *Salmonella* ile enfekte edilmiş Caco-2 hücre hatları arasında farklı gen ekspresyon paternleri ortaya koydu.

TLR-NOD yolak bileşenleri ve aşağı akış NF-κB/MAPK sinyal molekülleri de dahil olmak üzere doğal yanıt ve sinyal iletimi ile ilişkili genler, CN ve TRX uygulamasına bu gen modüllerinde tutarlı bir profil izlendiği görüldü. Benzer şekilde, TNF, IL-1B, IL-6, CXCL8 ve IL-18 dahil olmak üzere pro-inflamatuar sitokinleri ve kemokinleri kodlayan transkriptler, kontrollere TRX uygulanan örneklerde benzer regülasyonda olduğu belirlendi. Buna paralel olarak, apoptoz ve piroptozun birden fazla düzenleyicisi, TRX grubunda kontrolle benzer transkripsiyonel aktivite sergiledi. Özellikle, NLRC4, CASP1, CASP4/5 ve GSDMD dahil olmak üzere inflamasyon aktivasyonu ve piroptoz ile ilişkili genler ve PI3K-AKT yolu bileşenlerinin korunduğu gözlendi. Toplu olarak, bu veriler TRX uygulamasının intestinal epitel hücrelerinde *Salmonella* kaynaklı inflamasyon ve hücre ölümüyle ilişkili transkripsiyonel yanıtları üzerine etkili olmadığı sonucuna varılmaktadır. Trokserutinin *Salmonella* uygulanmış Caco-2 epitel hücrelerinde, inflamasyon ve hücre ölümü ile ilgili genler üzerine etkisinin gösterildiği ısı haritası Şekil 4.9'da verilmiştir.

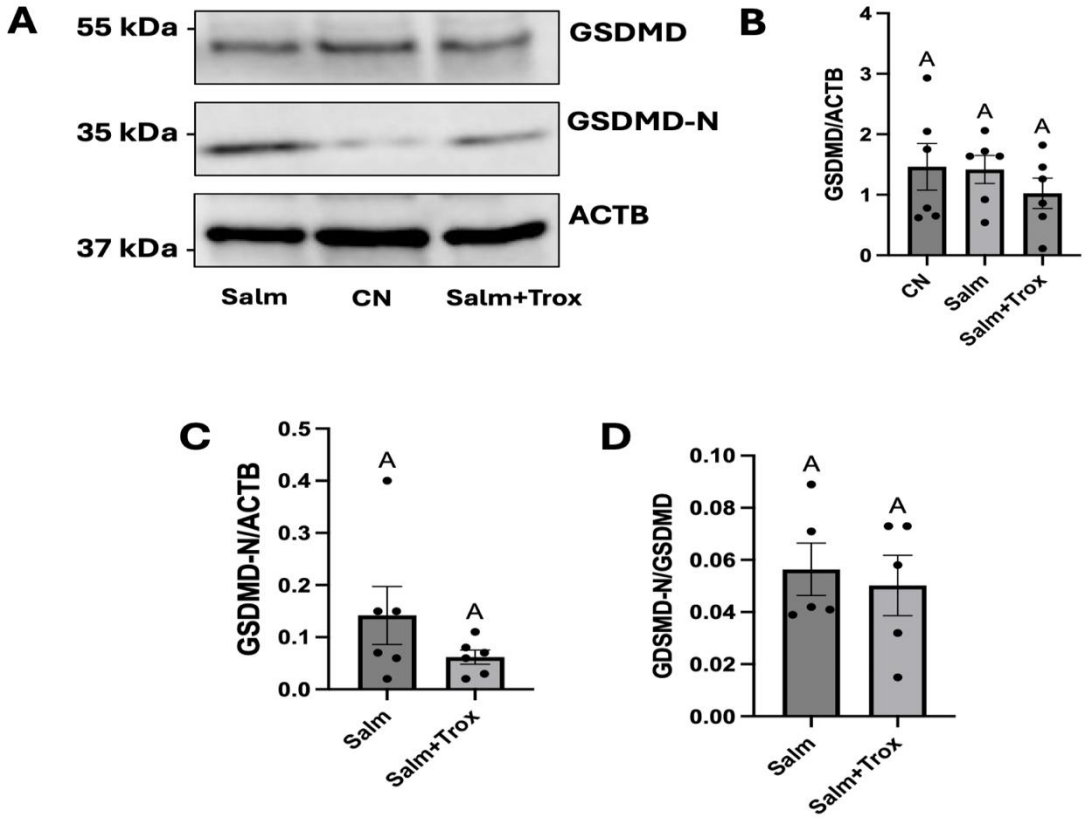


Şekil 4.9. Trokserutinin *Salmonella* uygulanmış Caco-2 epitel hücrelerinde, inflamasyon ve hücre ölümü ile ilgili genler üzerine etkisi. Isı haritasında satır bazında z-skor normalleştirilmiş ekspresyon verileri bulunmaktadır. Genler fonksiyonel yollara göre gruplandırılmıştır.

4.5. GSDMD PROTEİN EKSPRESYONU ÜZERİNE TROKSERUTİNİN ETKİSİ

Trokserutinin *Salmonella* enfeksiyonu sırasında inflamasyonla ilişkili piroptotik sinyal mekanizmaları üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla GSDMD ekspresyonu ve parçalanması Western blot analizi ile değerlendirildi. Gerçekleştirilen analizde kontrol (herhangi bir müdahalede bulunmayan hücre hatları), *Salmonella* ve *Salmonella* maruziyetinde TRX uygulanan hücrelerde tam uzunlukta GSDMD ve parçalanmış formunun (GSDMD-N) varlığı doğrulandı (Şekil 4.10.A). Yapılan analizlerde inflamasyon mekanizmalarının tetiklenmediği kontrol grubunda GSDMD-N bulunmaması analizin validasyonu açısından ortaya kondu. Densitometrik kantifikasyon, β-aktine normalize edilmiş toplam GSDMD ekspresyonunun deneysel gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermediği ($P > 0,05$) belirlendi. Bu sonuç *Salmonella* enfeksiyonunun ve TRX uygulamasının genel GSDMD protein düzeyini değiştirmediğini göstermektedir (Şekil 4.10.B).

Salmonella maruziyeti ile β-aktine normalize edilmiş GSDMD-N seviyelerinin Western blotting ile saptanabilir durumda olduğu görüldü. Ancak trokserutin uygulaması, *Salmonella* varlığında GSDMD-N düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe yol açmadı ($P > 0,05$) (Şekil 4.10.C). Tutarlı bir şekilde, GSDMD-N'nin tam uzunluktaki GSDMD'ye oranı olarak ifade edilen GSDMD parçalanma verimliliğinin hesaplanması (Şekil 4.10.D), *Salmonella* ve *Salmonella*+TRX grupları arasında anlamlı bir fark göstermedi ($P > 0,05$).

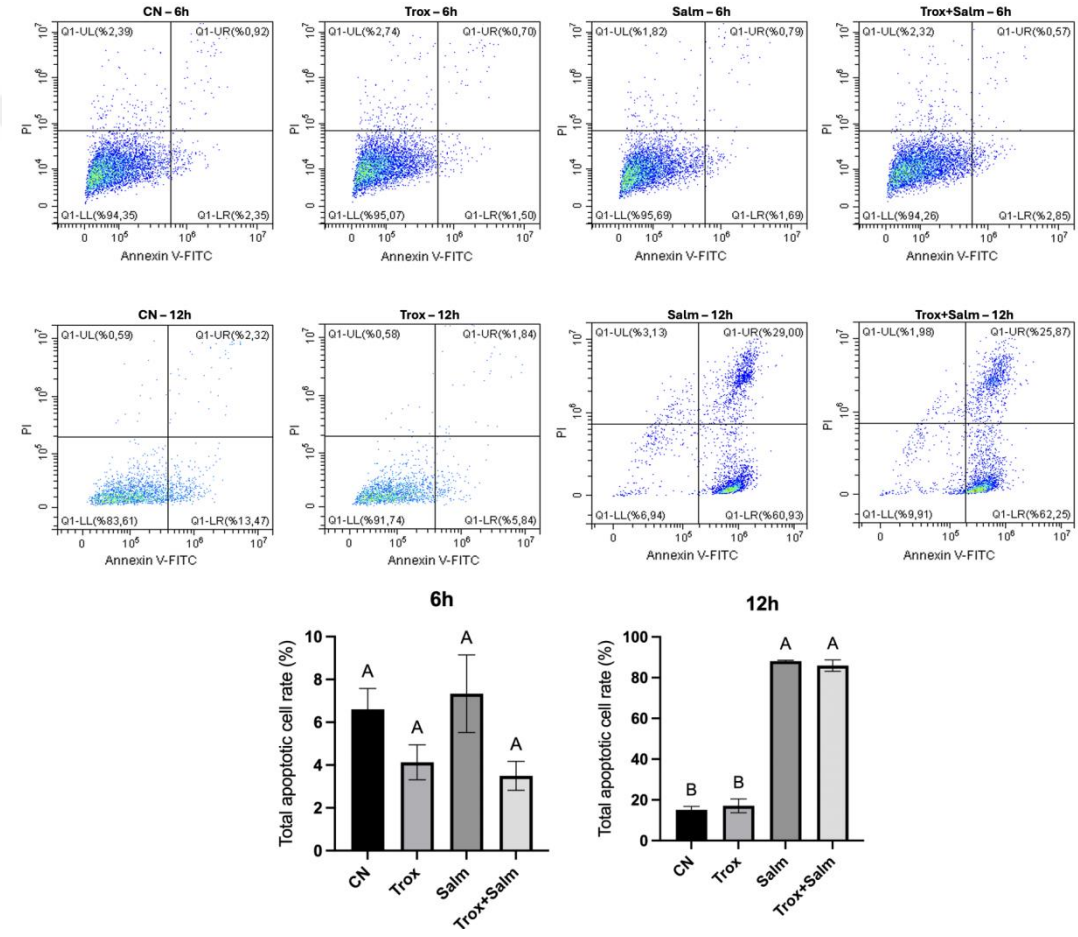


Şekil 4.10. Trokserutin, *Salmonella* enfekte hücre hatlarında GSDMD ekspresyonunu veya parçalanması üzerine etkisi (A) *Salmonella* ile enfekte (Salm), kontrol (CN) ve *Salmonella* + trokserutin (Salm + Trox) gruplarında tam uzunlukta GSDMD (~53 kDa), parçalanmış GSDMD (GSDMD-N, ~35 kDa) ve β-aktin (ACTB, ~37 kDa) gösteren Western blot görüntüsü. (B) β-aktin normalize GSDMD-N'nin densitometrik değerlendirilmesi; (C) β-aktine normalize GSDMD densitometrik değerlendirilmesi; (D) GSDMD-N/GSDMD oranı. Veriler, bağımsız biyolojik tekrarları temsil eden bireysel veri noktalarıyla ortalama ± standart hata (SEM) olarak sunulmaktadır. İstatistiksel analiz, tek yönlü ANOVA ve ardından post hoc çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılmıştır; aynı harfi paylaşan gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemektedir ($P > 0,05$).

4.6. KONAK HÜCRE APOPTOZU ÜZERİNE TROKSERUTİNİN ETKİSİ

Caco-2 hücre hatlarında gerçekleştirilen TRX uygulamasının *Salmonella* maruziyetinin altıncı ve 12. saatlerinde şekillenen apoptoz yüzdeleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek için Annexin V-FITC/PI akış sitometrisi analizleri gerçekleştirildi. Altıncı saatte, tüm deney gruplarında düşük apoptoz oranları gözlendi ve kontrol (CN), TRX, *Salmonella* ve TRX+Salm grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($P > 0,05$). *Salmonella* maruziyetinden 12 saat sonra toplam apoptotik hücrelerde (erken + geç apoptoz) belirgin bir artış gözlendi. Hem Salm hem de TRX+Salm grupları, Annexin V pozitif popülasyonlara

doğru belirgin bir kayma göstererek, CN ve sadece TRX gruplarına kıyasla toplam apoptotik oranlarda önemli bir artışa neden oldu (P <0,001). Sadece TRX ile tedavi, kontrole göre apoptozu önemli ölçüde değiştirmedi. Önemli olarak, TRX uygulaması, 12 saatte *Salmonella* kaynaklı apoptoz üzerine etki göstermediği belirlendi (P > 0,05). Bu bulgular, Salmonella enfeksiyonunun Caco-2 hücrelerinde zamana bağlı bir apoptotik yanıtı tetiklediğini, TRX'in ise test edilen konsantrasyon ve maruz kalma süresinde tespit edilebilir bir anti-apoptotik etki göstermediğini ortaya koymaktadır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Trokserutinin, Salmonella enfekte Caco-2 hücre hatlarında iki farklı inkübasyon zamanında apoptoz üzerindeki etkisi. (A) Caco-2 hücrelerinin Annexin V-FITC ve PI boyama profillerini gösteren temsili akış sitometrisi sahte renkli nokta grafikleri. (B) Altı saatlik TRX uygulamasında Caco-2 hücrelerindeki toplam apoptotik hücre oranı (erken + geç apoptoz). (C) On iki saatlik TRX uygulamasında Caco-2 hücrelerindeki toplam apoptotik hücre oranı. *Salmonella* maruziyeti, 12 saatte toplam apoptotik oranı önemli ölçüde artırdı (P <0,001); ancak, uygulanan dozda TRX'in apoptotik oranlar üzerine istatistiksel olarak anlamlı etki göstermediği belirlendi (P > 0,05).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada amaç, TRX uygulamasının, uygulanan doz ve deneysel koşullar altında insan epitel hücre hatlarında *Salmonella* invazyonu, inflamatuar gen transkripsiyonu, kanonik olmayan inflamazom ve apoptotik yanıtları üzerine etkili olup olmadığını belirlemekti. Hücre kültürü çalışmaları, hücresel düzeyde meydana gelen fizyolojik aktiviteleri, biyokimyasal reaksiyonları ve metabolik mekanizmaları incelemek için kullanılan önemli tekniklerden biridir. Temel prensibi, hücreleri dokulardan ayırıp uygun bir yapay ortamda kültüre edilmesi prensibine dayanmaktadır. Hücre kültürü modelleri, hücresel ve fizyolojik koşulları simüle edebilen kontrollü bir ortam sunmaktadır. İn vitro modeller ayrıca insan konak bağışıklık tepkilerini, patojen kaçış stratejilerini ve belirli virülans faktörlerin hastalık şiddeti üzerindeki etkisini araştırmak için olanak sağlamaktadır. Hücre kültürü, hücresel düzeyde ilaç adaylarının, biyoaktif bileşiklerin ve toksik maddelerin hücresel etki mekanizmalarının keşfedilmesine olanak tanımaktadır. Ayrıca bu modeller, maliyetli klinik öncesi in vivo çalışmaların kurgulanması açısından erken ilaç araştırmalarında terapötiklerin etkinliğini ve toksik yan etkilerini değerlendirmede kullanılabilmektedir (Hung, 2022; Duval ve ark. 2017; Nichols ve ark. 2014).

İntestinal epitel hücrelerin Gram negatif bakterilere karşı oluşturduğu doğal savunma yanıtlarının önemli bir kısmı, hücre içi LPS algılaması üzerinden aktive edilen non-kanonik inflammazom yolaklarıyla ilişkilidir. Rathinam ve ark. (2019), sitoplazmaya geçen LPS'nin CASP4'ü doğrudan aktive ederek GSDMD aracılı piroptotik yanıtı başlattığı ve bunun epitel bariyerinin bakteriyel yayılımı sınırlamak için kritik bir mekanizma olduğu vurgulamıştır. Bu bulgu, *Salmonella* ile enfekte ettiğimiz intestinal epitel hücrelerinde gözlemlediğimiz CASP4/5 ekspresyon artışı ve GSDMD protein düzeylerindeki yükselmenin, literatürde tanımlanan bu savunma mekanizmasının bir yansıması olabileceğini göstermektedir.

LPS algılaması mekanistik olarak sadece hücre yüzeyindeki TLR4 ile sınırlı değildir. İntraselüler ortama geçen LPS'nin doğrudan CASP4/5'i aktive ederek non-kanonik inflammazomu başlattığını gösteren Mazgaeen ve Gurung (2020) yaptığı çalışma, çalışmamızda *Salmonella* enfeksiyonu sonrasında gözlemlediğimiz CASP4/5 ekspresyonundaki artışın biyolojik temelini desteklemektedir. Bu çalışma ayrıca, LPS'nin hem membran reseptörleri hem de sitozolik sensörler aracılığıyla tanınmasının, enfeksiyon sırasında paralel ve tamamlayıcı inflamatuar yollar oluşturduğu belirtmektedir. Viganò ve ark. (2015), insan CASP4 ve CASP5'in sitoplazmik LPS'yi doğrudan algılayarak non-kanonik inflammazomun tek basamaklı aktivasyonunu yönettiğini ve bunun özellikle monositlerde hızlı GSDMD aracılı piroptoz ve inflamatuar sitokin salınımını indüklediğini göstermiştir. Çalışmada ayrıca CASP4/5'in LPS varlığında bağımsız olarak aktive olduğu ve IL-1 ailesi sitokinlerinin salınmasını kolaylaştırdığı ortaya konmuştur. Ayrıca CASP4 veya CASP5'in susturulmasının bu inflamatuar yanıtı anlamlı biçimde azalttığı bildirilmiştir.

Zamyatina ve Heine (2020), lipid A'nın yapısal varyantlarının inflammazom aktivasyonuna etkili olduğunu ve CASP4/11'in, TLR4'e kıyasla daha geniş bir LPS çeşitliliğini tanıyabildiğini ortaya koymuştur. Bu bağlamda, *Salmonella* ile enfekte ettiğimiz intestinal hücre modelinde gözlemlediğimiz CASP4/5 ekspresyon artışı, GSDMD aktivasyonu ve inflamatuar sitokin salınımı, sitozolik LPS algılamasına bağlı non-kanonik inflammazom aktivasyonunu yansıtıyor olabileceği kanısını doğurmaktadır. Yapılan çalışmalar, insan non-kanonik inflammazomunun sadece GSDMD aracılığıyla piroptotik hücre ölümü başlatmakla kalmayıp, aynı zamanda IL-18'in doğrudan aktivasyonunu da tetikleyebildiğini göstermiştir. CASP4, pro-IL-18'i spesifik olarak keserek aktif IL-18'e dönüştürmekte ve bu mekanizma, klasik inflammazomda görülen sitokin işlenmesinden bağımsız bir yolak oluşturmaktadır (Devant ve ark., 2023; Shi ve ark., 2023).

Nutrasötiklerin Caco-2 hücre kültür hatlarında deneysel olarak araştırılması, epitel bariyer bütünlüğü, inflamatuar modülasyon ve konak-patojen etkileşimleri de dahil olmak üzere intestinal epitel fizyolojisi üzerindeki doğrudan etkilerinin açıklığa kavuşturulması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu kontrollü in vitro platform,

in vivo veya klinik çalışmalara geçmeden önce doz-tepki davranışı, hücresel yollar ve güvenlik profilleri hakkında özgün veriler sağlamaktadır. Nutrasötiklerin hücre hattında çalışılması gerçek etki mekanizmasının anlaşılmasına da yardımcı olmaktadır. İn vitro çalışmalar, hücre kültürlerinde etki mekanizmalarını hızlı ve kontrollü şekilde inceleme imkânı sağlamaktadır. Nutrasötikler çoğu zaman güvenli olarak algılansa da, hücre kültürü üzerine yüksek dozda uygulandığında toksik etki gösterebileceği öngörülmektedir. Özellikle çözücünün biyolojik sistemlere uyumluluğu ve çözünen maddenin hücresel alımının ne düzeyde olduğu kinetik olarak önem arz etmektedir. İn vitro sitotoksisite analizleri ile alınan sonuçlar bu konu hakkında bilgi vermektedir. Sitotoksisite, bir bileşiğin canlı hücreler üzerinde hücre hasarına veya hücre ölümüne neden olan olumsuz etkisi olarak tanımlanmaktadır (Adan ve ark.2016). Trokserutinin kanserli hücreler üzerine sitotoksik etkisi varken sağlıklı hücreler üzerine toksik etkisinin sınırlı olduğu çeşitli araştırmalarca gösterilmiştir. Örneğin, insan oral epidermoid karsinoma hücre hattı (KB) kullanılan bir çalışmada TRX'in KB hücreleri üzerindeki etkisi MTT testi ile incelenmiş ve hücre çoğalmasının doza bağlı bir şekilde azaldığı görülmüştür. Trokserutinin KB hücreleri üzerindeki IC_{50} değeri 50 μg/mL olarak bulunmuştur. Konsantrasyondaki artışla KB hücrelerinin canlılığının azaldığı gösterilmektedir. Çalışmada 60 μg/mL'de canlı hücre yüzdesi %44 iken, 100 μg/mL'de %27 olarak görülmüştür. Kontrol grubundaki hücrelerle karşılaştırıldığında, TRX tarafından büzülme, ayrılma, şekil bozukluğu ve membran kabarcıklanması gibi değişiklikler indüklendiği rapor edilmiştir (Tan ve ark., 2023).

İnsan serviks kanseri hücrelerinden elde edilen HeLa hücre hatları ile yapılan bir çalışmada 160 ve 320 mg/mL konsantrasyonda 24 saatlik TRX uygulamasının, HeLa hücrelerine karşı büyümeyi inhibe edici etki gösterdiği bildirilmiştir. Trokserutin, 24 saatlik tedavi sonrasında 320 mg/mLde IC_{50} değeriyle HeLa hücrelerine karşı büyümeyi inhibe edici etki göstermiştir (Hassanshahi ve ark., 2020). Yapılan bir in vivo çalışmada ise BALB/c farelerde tümör dokuları tartılıp ölçülerek TRX'in tümör büyümesinin inhibisyonu üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Tümör hacminin TRX ile tedavi edilen grupta (hem düşük doz hem de yüksek doz) kontrol grubuna kıyasla belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. Tümör hacmi, yüksek doz TRX ile tedavi edilen grupta, düşük doz ile tedavi edilen gruba kıyasla daha fazla azalmıştır. Tümör

ağırlığı, TRX ile tedavi edilen grupta (hem düşük doz hem de yüksek doz) kontrol grubuna kıyasla belirgin şekilde azalmıştır. Yüksek doz TRX ile tedavi edilen grup, düşük doz ile tedavi edilen gruba kıyasla tümör ağırlığında önemli bir azalma görülmüştür (Yu ve ark., 2021).

Bu çalışmaların aksine TRX'in hücre koruyucu etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada TRX'in antioksidan özellikleri ve serbest radikallerle etkileşimleri değerlendirilmiştir. Peroksil radikal başlatıcıları olan tersiyer butil hidroperoksit (TBHP) ve hidrojen peroksit; insan bağırsak epiteli-INT407, insan akciğer fibroblastı-L132 ve fare dalak lenfositlerinde oksidatif stres indükleyicileri olarak kullanılmıştır. Trokserutinin hücresiz bir ortamda, mitokondri gibi hücre altı ortamlarda ve INT 407, L132 hücreleri ve fare dalak lenfositlerinde antioksidan yeteneği değerlendirilmiştir. DPPH ve ABTS gibi serbest radikallerin TRX tarafından temizlendiği görülmüştür. Çalışmada uygulanan 39 μM TRX dozunun, ABTS radikallerini neredeyse tamamen temizlediği gösterilmiştir. TRX, model radikallere benzer konsantrasyonlarda biyolojik olarak önemli süperoksit anyonunu önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca nitrik oksit radikallerini de temizlediği, ancak diğer radikaller kadar verimli olmadığı bildirilmiştir. Trokserutin sadece farklı uzun ve kısa ömürlü serbest radikalleri temizlemekle ve DNA tek zincir kırıklarına karşı koruma sağlamakla kalmamış, aynı zamanda sıçan karaciğer mitokondrilerinde TBARS (Tiyobarbiturik asit reaktif maddeleri) oluşumunu etkili bir şekilde azaltmıştır. INT407 hücrelerinde TRX varlığında veya yokluğunda DCF-DA kullanılarak daha ileri bazal ROS seviyeleri ölçülmüş ve TRX'in bazal ROS seviyelerini önemli ölçüde düşürebildiği bulunmuştur. Trokserutin sadece bazal ROS'u azaltmakla kalmamış, aynı zamanda TBHP (Tert-bütil hidroperoksit) kaynaklı ROS seviyelerini de azaltmıştır (Panat ve ark., 2016).

İnsan periferik kan lökositleri (PBL) kullanılarak yapılan ve TRX'in etkilerinin gözlendiği bir çalışmada 100 ila 1000 μM doz uygulamalarının 24 saat sonra PBL'ler üzerinde belirgin bir sitotoksik etki oluşturmadığı ve iplik kopmaları ve mutajenite üretmediği görülmüştür. Kemoprevansiyon açısından, bu flavonoid insan PBL'lerinde hidrojen peroksit tarafından başlatılan sitotoksisiteyi, genotoksisiteyi ve mutajeniteyi azaltmıştır. Ayrıca, trokserutin PBL'ler üzerinde belirgin bir sitotoksik

etki göstermemiş ve GSH'ye (glutatyon) bağımlı enzimlerin modülasyonu yoluyla hidrojen peroksit tarafından oluşturulan oksidatif strese karşı koruyucu bir etki göstermiştir (Cavalcanti ve ark., 2020).

Bağışıklık sistemi, enfeksiyonlara karşı koruma sağlarken aynı zamanda aşırı veya yetersiz yanıtları önleyerek vücut dengesini (homeostaz) korur. Doğal yanıt regülasyonu, bağışıklık hücrelerinin (ör. makrofajlar, T ve B hücreleri, doğal öldürücü hücreler) aktivitesinin, redoks dengesi, epigenetik mekanizmalar ve sitokinler gibi çoklu yollarla hassas şekilde ayarlanmasını içerir. Bu regülasyon, otoimmün hastalıkların, enfeksiyonların ve alerjilerin önlenmesinde ve tedavisinde merkezi rol oynar. Nutrasötikler (vitaminler, mineraller, polifenoller, omega-3 yağ asitleri, probiyotikler, β-glukanlar gibi), bağışıklık sisteminin doğal yanıt regülasyonunu destekleyici çoklu mekanizmalarla etki gösterir. Doğal bağışıklık yanıtının fizyolojik düzeyde düzenlenmesi, enfeksiyonlara, inflamatuar süreçlere ve tümör gelişimine karşı etkin bir savunma oluşturulması açısından kritik öneme sahiptir. Bu kapsamda nutrasötiklerin, özellikle bitkisel polisakkaritlerin, doğal immün yanıt üzerinde çok yönlü düzenleyici etkiler gösterdiği bildirilmektedir. Bitkisel polisakkaritlerin makrofajlarda reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin üretimini artırdığı ve bunun NF-κB ile ilişkili yolakların aktivasyonu ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Lee ve ark., 2005; Yin ve ark., 2019). Ayrıca bu bileşiklerin makrofajların fagositoz kapasitesini ve sitokin sekresyonunu artırdığı, bunun hücre içi Ca^{2+} düzeylerinde artış ve salınım faktörlerinin aktivasyonu ile gerçekleştiği gösterilmiştir. Narenciye kaynaklı pektik polisakkaritlerin ise RAW264.7 makrofajlarında TNF-α, IL-6 ve IL-12 gibi hem pro-hem antiinflamatuar sitokinleri eş zamanlı düzenleyerek immün yanıt dengeleyici bir etki oluşturduğu bildirilmektedir (Shin ve ark., 2018).

Bitkisel polisakkaritlerin makrofaj aktivasyonunun, hücre yüzeyindeki TLR4, CD14, CR3, SR, MR ve Dectin-1 gibi desen tanıma reseptörleri üzerinden gerçekleştiği ve bu reseptörlerin uyarımıyla çeşitli sinyal iletim kaskadlarının başlatılarak inflamasyon ilişkili genlerin transkripsiyonunun artırıldığı ifade edilmektedir (Yin ve ark. 2019). Bu bileşiklerin yalnızca makrofajlar üzerinde değil, dentritik hücreler üzerinde de immünomodülatör etkilere sahip olduğu; pektinin IL-6 ve IL-10

salınımını azalttığı (Sahasrabudhe ve ark., 2018) ve inülin, pektin, arabinoksilan ile β-glukanın IL-10/IL-12 oranını yükselterek pro-inflamatuar sitokinlerin salınımını baskıladığı bildirilmiştir (Cai ve ark., 2020).

Jafari-Khataylou ve ark. (2020) farelerde LPS ile indüklenen sepsis modelinde TRX'in inflamatuar yanıtı belirgin şekilde azalttığını göstermiştir. Trokserutinin uygulaması, pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini baskılamış, antioksidan savunmayı artırarak organ hasarını ve histolojik inflamasyonu azaltmıştır. Bu bulgular, bizim in vitro Salmonella enfekte intestinal hücre modelimizde gözlediğimiz TRX'in sitokin üretimi, hücre canlılığı ve inflammazom yanıtlarını baskılama etkisiyle paralellik göstermektedir. Jamali-Raeufy ve arkadaşlarının 2019 tarihli çalışması, LPS ile tetiklenen nöroinflamasyon ve oksidatif stres modelinde TRX'in önemli düzeyde koruyucu ve antiinflamatuar etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Trokserutinin uygulaması, LPS'ye bağlı ROS üretimini baskılamış; lipid peroksidasyon ve oksidatif stres belirteçlerini azaltmış ve apoptoz ile doku hasarını hafifletmiştir. Masoud ve ark. (2021), TRX ön uygulamasının, sıçan kalp iskemi/reperfüzyon modeli bağlamında TLR4/NF-κB sinyal yolunu baskılayarak inflamatuar yanıtı azaltabildiğini göstermiştir. Trokserutin uygulaması, NF-κB aktivitesini düşürmüş; bunun sonucunda pro-inflamatuar sitokinlerin üretimi azalırken, hücresel hasar ve doku nekrozu belirgin biçimde azalmıştır.

Bova ve ark. 2024 yılında yayımlanan bir çalışmada, Trokserutinin anaplastik tiroid kanseri (ATC) hücrelerinde hem proliferasyonu hem invazyonu azaltarak hücre canlılığını düşürdüğü; aynı zamanda oksidatif stres ve inflamatuar yanıtı modüle ettiği gösterilmiştir. Trokserutin uygulaması, NF-κB sinyal yolunu baskılayarak pro-inflamatuar sitokinlerin (IL-6, IL-17A) üretimini azaltmış ve NF-κB aktivasyonunu kontrol altına almıştır. Yu ve ark. (2020), Trokserutinin H9C2 kardiyomiyositlerinde oksijen-glikoz yoksunluğu ve yeniden oksijenasyon (OGD/R) ile tetiklenen oksidatif stres ve inflamasyonu azalttığını göstermiştir. Trokserutin uygulaması, hücrelerde ROS üretimini düşürmüş, lipid peroksidasyon ve hücre hasarını azaltmıştır. Bunun yanında, PI3K/AKT/HIF-1α sinyal yolunun aktivasyonunu artırarak antioksidan ve hücre koruyucu etkilerini pekiştirmiştir. Bu bulgular, *Salmonella* ile enfekte intestinal hücrelerde gözlemlediğimiz TRX'in

koruyucu etkilerini desteklemektedir. Thomas ve ark. (2019), Trokserutinin hepatokarsinom hücrelerinde hem antiproliferatif hem de antiinflamatuar etkilerini araştırmıştır. Çalışma, TRX'in Nrf2 ve NF-κB sinyal yollarını eş zamanlı olarak modüle ederek, prooksidan stresin ve inflamatuar sitokinlerin üretimini azaltabildiğini göstermiştir. Trokserutin uygulaması, NF-κB aktivitesini baskılayarak IL-6 ve TNF-α gibi pro-inflamatuar sitokinlerin salımını düşürmüş; Nrf2 aracılığıyla antioksidan savunma mekanizmalarını aktive etmiştir.

Trokserutin benzeri nutrasötikler olan flavonoid glikozit yapılı Delfinidin-3-O-glukozit, siyanidin-3-O-glukozit ve malvidin-3-glukozit gibi antosiyanin glikozitleri, makrofajlar, mezenkimal kök hücreler ve epitel hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde pro-inflamatuar sitokinleri (örn. IL-1β, IL-6, TNF-α) baskılar ve antiinflamatuar sitokinleri (örn. IL-10, TGF-β) artırır (Neves ve ark., 2022). Bu etkiler büyük ölçüde, doğuştan gelen bağışıklık aktivasyonunun merkezinde yer alan NF-κB ve NLRP3 inflammazom yollarının inhibisyonuyla sağlanır (Huang ve ark., 2014). Bazı antosiyaninler ayrıca düzenleyici T hücresi farklılaşmasını destekler ve bağışıklık kontrol noktası proteinlerini baskılayarak potansiyel olarak tümör karşıtı bağışıklığı güçlendirir (Semmarath ve ark. 2022).

Nutrasötiklerin apoptozu artırıcı veya azaltıcı etkisi olabilir. Yapılan bazı çalışmalar resveratrolün apoptozu tetiklediğini göstermektedir. Yapılan bir çalışma etkinin tümör boyutunun küçülmesi ve sağkalım oranının artmasını olarak açıklarken (Tseng ve ark. 2004); başka bir çalışmada, Wang ve arkadaşları, resveratrolün miR-21 ve miR-19'u inhibe ettiğini ve PTEN ve p53'ü yukarı regüle ettiğini, bunun sonucunda glioma hücrelerinde majör onkojenik PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunun inhibisyonuna yol açtığını, böylece tümör hücrelerinin proliferasyonunu ve invazyonunu azalttığını ve apoptozu indüklediğini göstermiştir. PI3K / AKT / mTOR ve Ras / MAPK yolları, kuarsetinin gliomada hücre canlılığını inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği yollar olarak gösterilmiştir (Pan ve ark., 2015).

Kuarsetinin apoptozun önemli bir düzenleyicisi olmasının yanı sıra, bu kinaz otofajiyi de etkileyebilir. Bir çalışmada, kuarsetin nanopartiküllerinin ERK sinyal yolunu etkileyerek insan nörogliyomasının gelişimini önleyebileceği öne sürülmüştür (Lou ve ark., 2016). Melatonin üzerine yapılan bir çalışmada, melatoninin miR-

155'in, FOXO3a 3'-UTR'nin tamamlayıcı bölgeleri aracılığıyla doğrudan FOXO3a proteininin sentezini inhibe ettiği, böylece TRAIL'in (nekroz faktörüyle ilişkili apoptoz kaynaklı ligand) ve Noxa ve Bim gibi yalnızca BH3 proteinlerinin baskılanması yoluyla apoptozu inhibe ederek glioma hücrelerinin çoğalmasına ve invazyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Ling ve ark., 2013).

Trokserutinin HeLa hücreleri üzerine apoptotik etkisinin değerlendirilmesi üzere yapılan çalışmada; Bax, Bcl-2 ve kesilmiş kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyon seviyesi gibi bazı biyokimyasal apoptoz parametreleri üzerindeki etkisi immünoblot analizi ile ölçülmüştür. Bu sonuçlar, 320 mg/ml dozlarındaki TRX'in insan HeLa tümör hücrelerine karşı apoptotik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla, TRX (320 mg/ml), Bax ve kesilmiş kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyon seviyesini önemli ölçüde artırmış ve ayrıca 320 mg/ml TRX konsantrasyonunda kontrole kıyasla Bax:Bcl-2 oranını artırmıştır (Hassanshahi ve ark., 2020). Trokserutinin apoptotik etkisi toksik etkisine benzer şekilde gelişmektedir. Apoptotik etkisi daha çok kanserli hücreler üzerinedir.

Trokserutinin 2,2,4,4-Tetrabromodifenil eter kaynaklı böbrek hücre apoptozunu ve idrar protein salgısını azaltıcı etkilerinin olduğu yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca yapılan Western blot analizleri, TRX takviyesinin Bcl-2/Bax oranını artırdığını; mitokondriden sitokrom c salınımını, prokaspaz-9 ve prokaspaz-3 aktivasyonunu ve PARP'ın parçalanmasını engellediğini göstermektedir (Shan ve ark., 2017). Metotreksat kaynaklı böbrek hasarı üzerine TRX'in etkisinin araştırıldığı bir çalışmada otofaji aktivasyonunun yanı sıra inflamasyon ve apoptozu inhibe ederek böbrek hasarını hafiflettiği gösterilmiştir (Arab ve ark., 2021). Yine böbrek hasarı üzerine Wistar sıçanlarında yapılan bir çalışmada TRX, tek taraflı üreter obstrüksiyonu serum kreatinin düzeyini, renal vasküler direnci, oksidatif stres parametrelerinden malondialdehit seviyesini, Bax, parçalanmış kaspaz-3 ve TNF-α protein düzeylerini önemli ölçüde artırmıştır. Bulgular TRX'in böbrek koruyucu etkisinin, antioksidan stres, antiinflamasyon, antiapoptozis özellikleriyle ilişkili olabileceğini göstermektedir (Kaeidi ve ark., 2020).

Üçlü negatif meme karsinomu üzerine yapılan bir çalışmada ise TNBC/MDA-MB-231 hücrelerinde TRX'in antikanser aktivitesini apoptozu indükleyerek meme

kanseri hücre büyümesi üzerindeki inhibe edici etkileri üzerine çalışılmıştır. Çalışmada TRX'in, antiapoptotik protein ekspresyonunu inhibe ederek Sitokrom c, kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün yukarı regülasyonuna neden olduğu gözlenmiştir (Saranya ve ark., 2020).

Ülseratif kolit hastalığını iyileştirmeye yönelik potansiyel bileşiklerin taranması üzerine yapılan bir çalışmada TRX'in yeni bir farmakolojik aktivitesi, yani farelerde Ülseratif kolit üzerinde önemli bir iyileştirme etkisi olduğunu bulunmuştur. İn vitro ve in vivo seviyelerin deneysel sonuçları, TRX'in bağırsak epitel hücrelerinde ve kolon dokusunda hasara neden olan oksidatif stres seviyesini etkili bir şekilde azaltabileceğini, sıkı bağlantı ile ilişkili proteinlerin dağılımını ve ekspresyonunu koruyabileceğini ve kolon dokusunun bariyer fonksiyonunu koruyabileceğini göstermiştir (Wang ve ark., 2021). Bu sonuç TRX'in patojen bakteri invazyonunu epitel hücre bütünlüğünü koruyarak engellediği şeklinde yorumlanabilir. Oksidatif strese ek olarak, şiddetli inflamatuar yanıt da ülseratif koliti kötüleştiren önemli bir patolojik faktördür. Bununla birlikte, TRX'in kolon dokusundaki inflamatuar hücrelerin infiltrasyonunu ve inflamasyonla ilişkili proteinlerin ve pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu azaltabildiği görülmüştür. Antioksidan ve antiinflamatuar etkileri sayesinde TRX, kolon dokusunda hücre apoptoz sürecini inhibe ederek kolon fibrozisinin şiddetini hafifletmiştir (Wang ve ark., 2021). Üzüm, hurma ve nar yan ürünlerinden elde edilen polifenolik özütlerin nutrasötik olarak kullanımı sonucunda, konak canlılığını tehlikeye atmadan bakteriyel adhezyon, invazyon ve inflamasyonu azalttığı gözlenmiştir. Özellikle *S. enterica*'nın Caco-2 hücrelerine adhezyonunu önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Yine bu bileşiklerin yüksek dozda verilmesinin *S. enterica*'nın invazyonunu da %30 oranında engellediği görülmüştür (Moreno-Chamba ve ark., 2024).

Trokserutin benzeri nutrasötikler olan flavonoid glikozit yapılı nutrasötiklerin apoptoz üzerine etkileri TRX ile benzerdir. Antosiyaninlerin fare kolon kanseri hücreleri (MC38) üzerindeki tümör inhibe edici etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, 500 μM yaban mersini antosiyanin özütünün %48,1 oranında mitokondriyal hasara yol açtığı, apoptotik cisimler oluşturmak üzere kaspaz-3, kaspaz-9 aktivitesini artırdığı ve hücre çoğalmasını engellediği bulunmuştur (Jing ve ark., 2020).

Antosiyaninlerin aktif bir bileşeni olan siyanidin-3-O-glukozit esas olarak koyu renkli tahıllarda bulunur. Siyanidin-3-O-glukozit, moleküler mekanizmasıyla birlikte insan mide kanseri hücreleri üzerindeki etkisi açısından araştırılmıştır. Sonuç olarak, siyanidin-3-O-glukozidin, MKN-45 hücrelerinin apoptoza uğramasına neden olduğu; hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu; hücre göçünü engellediği ve ROS seviyelerinde artışa neden olarak MAPK, STAT3 ve NF-κB sinyal yollarını aktive ettiği görülmüştür (Sun ve ark., 2023).

Antosiyaninlerin; üzüm çekirdeği prosiyanidini ve siyanidin-3-O-β-glukozit klorür; sergilediği apoptoz metabolizmasının düzenlenmesi ve antioksidan etkiler gibi konuların araştırıldığı bir çalışmada in vivo ve in vitro analizler gerçekleştirilmiştir. üzüm çekirdeği prosiyanidini uygulamasının böbrek hücresi apoptozunu ve diyabetik fare böbreklerinde Bcl-2 ekspresyonunu baskıladığı ortaya konmuştur. Ayrıca, üzüm çekirdeği prosiyanidini uygulamasının diyabetik fare böbreklerinde p38 mitogen aktivasyon protein kinaz (MAPK) ve hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2 (ERK1/2) oksidaz aktivitesini artırmanın yanı sıra, tiyoredoksin etkileşimli protein (TXNIP) ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir. HK-2 hücreleri kullanılarak yapılan in vitro deneyler, C3G'nin HG aracılı reaktif oksijen türlerinin oluşumunu, hücresel apoptozu, parçalanmış kaspaz-3 ekspresyonunu ve Bax/Bcl-2 oranını baskıladığını; ve mitokondrilerden salınan sitokrom c ekspresyonunu artırdığını ortaya koymuştur. Ayrıca, C3G ile tedavinin, HG koşulları altında HK-2 hücrelerinde p38 MAPK ve ERK1/2 oksidaz aktivitesinin fosforilasyonuna ek olarak, TXNIP ekspresyonunu da baskıladığı gösterilmiştir (Wei ve ark., 2018). *Aronia melanocarpa*'daki antosiyaninlerin, Alzheimer hastalığı patofizyolojisinin önemli bir medyatörü olan Aβ1-42'nin neden olduğu apoptoza karşı sitoprotektif etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise antosiyaninlerle ön işlemin Aβ1-42 ile indüklenen apoptozu önemli ölçüde engellediği, hücre içi kalsiyum ve ROS'u azalttığı ve ATP ile mitokondriyal membran potansiyelini artırdığını görülmüştür (Meng ve ark., 2018).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, TRX uygulamasının, uygulanan doz ve deneysel koşullar altında insan epitel hücre hatlarında *Salmonella* invazyonu, inflamatuar gen transkripsiyonu, kanonik olmayan inflammazom ve apoptotik yanıtları üzerine etkili olmadığı belirlendi. Doğal yanıt ve inflamasyonla ilişkili genleri hedefleyen RT-qPCR panelleri, total RNA sekanslamasına dayalı transkriptomik analizler, apoptoz analizleri ve protein tabanlı araştırmalar dahil olmak üzere birden fazla bağımsız ölçümde bu bulguların tutarlılığı, TRX'in test edilen dozda, etki süresinde ve diğer metodolojik parametrelerde epitel konak yanıtları veya bakteriyel invazyon üzerinde ölçülebilir bir modülatör etki göstermediğini ortaya koymaktadır. Özellikle kurgulanan *Salmonella* gruplarında *Salmonella* uygulanmamış deney grubundan ayırıcı olarak GSDMD'nin aktive edilmiş olması araştırmanın deneysel enfeksiyon aşamasının başarı ile gerçekleştirildiği sonucunu doğurmaktadır. Bu bağlamda birbirilerini farklı mekanizmalar ile destekleyen farklı iş paketlerinde TRX'in kontrol gruplarından istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmaması, teknik varyasyonları göstermekten ziyade bu sonucun biyolojik geçerliliğini güçlendirmektedir.

Elde edilen bulgular için olası bir açıklama, epitel hücre hatlarının TRX aracılı immünomodülasyona duyarlılığı sınırlaması ihtimalidir. Caco-2 hücre hatlarının, immün sistem hücrelerine kıyasla nispeten sınırlı bir doğal yanıt sinyalleme kapasitesine sahip olduğu görülmektedir. Benzer in vitro çalışmalarda model olarak kullanılan THP-1 ve kemik iliği kökenli makrofajlar (BMDM) gibi hücre hatlarının Caco-2'ye kıyasla inflamasyon, apoptoz ve hücre içi patojen yönetimini kontrol eden temel düzenleyici mekanizmalar açısından daha üstün olduğu anlaşılmaktadır. Ancak bu çalışmada, gıdalar ile alimenter yolla alınabilecek TRX gibi nutrasötiklerin sindirim sisteminde oluşan *Salmonella* enfeksiyonları esnasında olası antiinflamatuar

etkilerinin ortaya konması amacıyla intestinal epitel modelinin kullanılması ana hipotez olarak belirlenmiştir. Araştırmada uygulanan TRX'in beklenen etkiyi göstermemesinin temel bir gerekçelerinden biri uygulanan yüksek MOI (~50) seviyesi olarak görülmektedir. *Salmonella*'nın hücre kültürü besiyerinde inkübasyon koşullarında çoğalmaya devam etmesi durumu da göz önünde bulundurulduğunda konak hücre yanıtlarının işlevsel bir doygunluk noktasına ulaşmış olabileceği ve bu durumun TRX'in modülatör etkilerini maskelediği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra canlı *Salmonella* varlığı bakteriyel farklı moleküler tanıma desenlerinin de doğal yanıt üzerine kompleks etki göstermesine neden olabilmektedir. Bu araştırmada denetlenmeyen farklı antijenik determinantların ve tetikledikleri yolakların istenilen etkinin oluşmamasına sebep olabileceği öngörülmektedir. Bu sebeple etki spesifik moleküler mekanizmaların tetiklenmesinde özellikle in vitro çalışmalarda LPS ve flagellin gibi doğrudan etkili bakteriyel komponentlerinin canlı mikroorganizma yerine kullanılması hedef spesifik etkinin araştırılması için daha uygun olacağı sonucuna ulaşılmıştır. Çalışma sonuçlarını etkileyen bu kritik husus, inflamatuar ve apoptotik yolların, transkripsiyon sonrası, translasyon sonrası ve hücre içi sinyal olayları da dahil olmak üzere birden fazla düzeyde sıkı bir şekilde düzenlenmesinden kaynaklanabilmektedir. Bununla birlikte deneysel açıdan bakıldığında, doz seçimi, bileşiğin biyoyararlanımı ve TRX'in enfeksiyon esnasında epitelyal alım kabiliyeti de gözlemlenen nötrlüğe katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Trokserutin her ne kadar suda çözünebilir bir yapıda olsa da, epitel monokatmanlarda tespit edilebilir etkiler gösterebilmesi için daha yüksek hücre içi konsantrasyonlara, daha uzun ön maruz kalma sürelerine veya alternatif uygulama yaklaşımlarına ihtiyaç duyabileceği öngörülmektedir. Bu nedenlerle, ileri çalışmalar, erken ve geç maruziyet aşamalarında kinetik analizlere öncelik vermeli, protein düzeyinde ve fonksiyonel sinyal iletimi sonuçlarını içermeli ve farklı kültür sistemleri ve/veya in vivo çalışmalar karşılaştırmalı olarak ele alınmalıdır. Bu hususlar ışığında deneysel metodolojinin biyolojik sonuçlarının genişletilmesi, TRX'in immünomodülatör etkiler gösterip göstermediğini veya biyolojik aktivitesinin epitel hücre hatlarının kullanıldığı *Salmonella* enfeksiyon modellerinde temelde sınırlı olup olmadığını açıklığa kavuşturmaya yardımcı olacaktır. TRX, *Salmonella*'ya bağlı bağırsak inflamasyonunda destekleyici bir nutrasötik tedavi seçeneği olarak potansiyel

taşımaktadır. Genel olarak, mevcut bulgular, nutrasötik-konak-patojen etkileşimlerini değerlendirirken model seçimi, zamanlama ve mekanistik derinliğin önemini vurgulamaktadır.

7. KAYNAKLAR

Abreu MT, Arditi M. Innate immunity and toll-like receptors: Clinical implications of basic science research. J Pediatr, 2004;144(4): 421-429.

Adam BS, Pentz R, Siegers CP, Strubelt O, Tegtmeier M. Troxerutin protects the isolated perfused rat liver from a possible lipid peroxidation by coumarin. Phytomedicine, 2005;12(1-2): 52-61.

Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell proliferation and cytotoxicity assays. Curr Pharm Biotechnol, 2016;17(14): 1213-1221.

Affuso F, Ruvolo A, Micillo F, Sacca L, Fazio S. Effects of a nutraceutical combination (berberine, red yeast rice and policosanols) on lipid levels and endothelial function randomized, double-blind, placebo-controlled study. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2010;20(9): 656-661.

Aglietti RA, Dueber EC. Recent insights into the molecular mechanisms underlying pyroptosis and gasdermin family functions. Trends Immunol, 2017;38(4): 261-271.

Aglietti RA, Estevez A, Gupta A, Ramirez MG, Liu PS, Kayagaki N, Dueber EC. GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. Proc Natl Acad Sci USA, 2016;113(28): 7858-7863.

Al-Okbi SY. Nutraceuticals of anti-inflammatory activity as complementary therapy for rheumatoid arthritis. Toxicol Ind Health, 2014;30(8): 738-749.

Alvarez-Ordóñez A, Broussolle V, Colin P, Nguyen-The C, Prieto M. The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: Implications for food safety. Int J Food Microbiol, 2015;213: 99-109.

Arab H, El-Aal SA, Eid A, Arafa E, Mahmoud A, Ashour A. Targeting inflammation, autophagy, and apoptosis by troxerutin attenuates methotrexate-induced renal injury in rats. Int Immunopharmacol, 2021;103: 108284.

Arpaia N, Godec J, Lau L, Sivick KE, McLaughlin LM, Jones MB, Barton GM. TLR signaling is required for *Salmonella* Typhimurium virulence. Cell, 2011;144(5): 675-688.

Asplund K, Nurmi E. The growth of *Salmonellae* in tomatoes. Int J Food Microbiol, 1991;13(2): 177-181.

Awasthi S, Ravi A, Saraswathi NT. Troxerutin imparts preservative effects on albumin by preventing Maillard reaction-mediated early and advanced glycation modification. J Biomol Struct Dyn, 2017;35(12): 2681-2687.

Azarfarin M, Farajdokht F, Babri S, Salehpour F, Taghizadeh M, Mohaddes G. Effects of troxerutin on anxiety-and depressive-like behaviors induced by chronic mild stress in adult male rats. Iran J Basic Med Sci, 2018;21(8): 781-788.

Badalzadeh R, Chodari L, Ghorbanzadeh V. Troxerutin, a bioflavonoid, improves oxidative stress in blood of streptozotocin-induced type-1 diabetic rats. Iran J Pharm Sci, 2017;13(2): 75-86.

Bahorun T, Aruoma OI, Neergheen-Bhujun VS. Phytomedicines, nutraceuticals, and functional foods regulatory framework: The African context. In: Nutraceutical and functional food regulations in the United States and around the world. Academic Press, 2019. p. 509-521.

Baker PJ, Boucher D, Bierschenk D, Tebartz C, Whitney PG, D'Silva DB, Masters SL. NLRP3 inflammasome activation downstream of cytoplasmic LPS recognition by both caspase-4 and caspase-5. Eur J Immunol, 2015;45(10): 2918-2926.

Baky MH, Elshahed M, Wessjohann L, Farag MA. Interactions between dietary flavonoids and the gut microbiome: a comprehensive review. Br J Nutr, 2022;128: 577-591.

Barnett KC, Li S, Liang K, Ting JPY. A 360 view of the inflammasome: Mechanisms of activation, cell death, and diseases. Cell, 2023;186(11): 2288-2312.

Bele AA, Khale A. An approach to a nutraceutical. Asian J Res Chem, 2013;6: 1161-1164.

Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. Nat Rev Microbiol, 2009;7(2): 99-109.

Berkun Y, Karban A, Padeh S, Pras E, Shinar Y, Lidar M, Bujanover Y. NOD2/CARD15 gene mutations in patients with familial Mediterranean fever. In: Seminars in Arthritis and Rheumatism. WB Saunders, 2012. p. 84-88.

Bertani B, Ruiz N. Function and biogenesis of lipopolysaccharides. EcoSal Plus, 2018;8(1).

Bianchi M, Canavesi R, Aprile S, Grosa G, Del Grosso E. Troxerutin, a mixture of O-hydroxyethyl derivatives of the natural flavonoid rutin: Chemical stability and analytical aspects. J Pharm Biomed Anal, 2018; 150: 248-257.

Bintsis T. Foodborne pathogens. AIMS Microbiol, 2017;3(3): 529-563.

Bjanes E, Garcia Sillas R, Matsuda R, Demarco B, Fettrelet T, DeLaney AA, Kornfeld OS, Lee BL, Rodríguez López EM, Grubaugh D, et al. Genetic targeting of Card19 is linked to disrupted NINJ1 expression, impaired cell lysis, and increased susceptibility to Yersinia infection. PLoS Pathog, 2021;17(10): e1009967.

Blondel CJ, Jiménez JC, Contreras I, Santiviago CA. Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in Salmonella serotypes. BMC Genomics, 2009; 10: 354.

Boore AL, Hoekstra RM, Iwamoto M, Fields PI, Bishop RD, Swerdlow DL. *Salmonella enterica* infections in the United States and assessment of coefficients of variation: A novel approach to identify epidemiologic characteristics of individual serotypes, 1996-2011. PLoS One, 2015;10(12): e0145416.

Bova V, Basilotta R, Casili G, Lanza M, Filippone A, Campolo M, Capra AP, Vitale G, Chisari G, Colarossi C, Giuffrida D, Paterniti I, Esposito E. The protective role of troxerutin (Trox) in counteracting anaplastic thyroid carcinoma (ATC) progression. Biomedicines, 2024; 12: 1755.

Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. Nat Rev Immunol, 2016;16(7): 407-420,

Broz P, Pelegrín P, Shao F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. Nat Rev Immunol, 2020;20(3): 143-157.

Broz P, von Moltke J, Jones JW, Vance RE, Monack DM. Differential requirement for caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. Cell Host Microbe, 2010; 8: 471-483.

Bürckstümmer T, Baumann C, Blüml S, Dixit E, Dürnberger G, Jahn H, et al. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. Nat Immunol, 2009; 10: 266-272.

Cai Y, Folkerts J, Folkerts G, Maurer M, Braber S. Microbiota-dependent and -independent effects of dietary fibre on human health. Br J Pharmacol, 2020; 177: 1363-1381.

Caliceti C, Urao N, Rizzo P, Giuliano M. New trends in antioxidant compounds: A precise nutraceutical in cardiometabolic disorders. Oxid Med Cell Longev, 2019; 2019: 4794563.

Caramia G, Silvi S. Probiotics: from the ancient wisdom to the actual therapeutical and nutraceutical perspective. In: Probiotic Bacteria and Enteric Infections: Cytoprotection by Probiotic Bacteria, 2011. p. 3-37.

Caroff M, Novikov A. Lipopolysaccharides: structure, function and bacterial identifications. OCL, 2020; 27: 31.

Cavalcanti B, Neto J, de Sousa Silva A, Barreto F, Ferreira J, Magalhães H, Silva C, Vieira Í, Ricardo N, Júnior H, Moraes M. Chemopreventive effect of troxerutin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human leukocytes through modulation of glutathione-dependent enzymes. J Toxicol Environ Health A, 2020; 84: 137-151.

CDC. Multistate outbreak of human Salmonella I 4,[5],12: i: —infections associated with frozen rodents (final update). 2010, Erişim: https: //www.cdc.gov/salmonella/2010/frozen-rodents-8-2-2010,html. Erişim tarihi: 2 Ocak 2024

Chakraborty R, Roy S. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from plants: a review of their diversity, modes of action, prospects, and concerns in the

management of diabetes-centric complications. J Integr Med, 2021; 19: 478-492.

Chan AH, Burgener SS, Vezyrgiannis K, Wang X, Acklam J, Von Pein JB, Schroder K. Caspase-4 dimerisation and D289 auto-processing elicit an interleukin-1β-converting enzyme. Life Sci Alliance, 2023;6(10).

Chan WJJ, McLachlan AJ, Luca EJ, Harnett JE. Garlic (Allium sativum L.) in the management of hypertension and dyslipidemia - A systematic review. J Herb Med, 2020; 19: 100292.

Chen G, Wang H, Zhang X, Yang ST. Nutraceuticals and functional foods in the management of hyperlipidemia. Crit Rev Food Sci Nutr, 2014;54(9): 1180-1201.

Chen GL, Chen SG, Chen FU, Xie YQ, Han MD, Luo CX, Gao YQ. Nutraceutical potential and antioxidant benefits of selected fruit seeds subjected to an in vitro digestion. J Funct Foods, 2016; 20: 317-331.

Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. Nat Rev Immunol, 2010;10(12): 826-837.

Chen KW, Groß CJ, Sotomayor FV, Stacey KJ, Tschopp J, Sweet MJ, Schroder K. The neutrophil NLRC4 inflammasome selectively promotes IL-1β maturation without pyroptosis during acute *Salmonella* challenge. Cell Rep, 2014;8(2): 570-582.

Clay CD, Soni S, Gunn JS, Schlesinger LS. Evasion of complement-mediated lysis and complement C3 deposition are regulated by Francisella tularensis lipopolysaccharide O antigen. J Immunol, 2008;181(8): 5568-5578.

Conos SA, Lawlor KE, Vaux DL, Vince JE, Lindqvist LM. Cell death is not essential for caspase-1-mediated interleukin-1β activation and secretion. Cell Death Differ, 2016;23(11): 1827-1838.

Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death. Trends Microbiol. 2001;9(3): 113-114.

Cristofaro P, Opal SM. Role of toll-like receptors in infection and immunity. Drugs, 2006;66(1): 15-29.

CT Trialists. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. Lancet, 2012; 380: 581-590,

Çobur H, Löker N, Dışhan A, Vurmaz M, Karatepe P, Hızlısoy H, Akçay A, İncili GK, Hayaloğlu AA, Al S. Lactiplantibacillus plantarum postbiotics suppress *Salmonella Typhimurium* invasion and modulate innate responses in human intestinal epithelial cells. Probiot Antimicrob Proteins, 2025; (epub ahead of print).

Dagenais M, Skeldon A, Saleh M. The inflammasome: in memory of Dr. Jurg Tschopp. Cell Death Differ, 2012;19(1): 5-12.

Davì G, Santilli F, Patrono C. Nutraceuticals in diabetes and metabolic syndrome. Cardiovasc Ther, 2010;28(4): 216-226.

Davis BK, Wen H, Ting JPY. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. Annu Rev Immunol, 2011; 29: 707-735.

De Beeck KO, Van Camp G, Thys S, Cools N, Callebaut I, Vrijens K, Van Laer L. The DFNA5 gene, responsible for hearing loss and involved in cancer, encodes a novel apoptosis-inducing protein. Eur J Hum Genet, 2011;19(9): 965-973.

de Miranda JAL, Martins CS, Fideles LS, Barbosa MLL, Barreto JEF, Pimenta HB, Freitas FOR, Pimentel PVdS, Teixeira CS, Scafuri AG, dos Santos Luciano MC, Araújo JL, Rocha JA, Vieira IGP, Ricardo NMP, da Silva Campelo M, Ribeiro MENP, de Castro Brito GA, Cerqueira GS. Troxerutin prevents 5-fluorouracil induced morphological changes in the intestinal mucosa: role of cyclooxygenase-2 pathway. Pharmaceuticals, 2020; 13: 10.

De Pablo-Fernández E, Lees AJ, Holton JL, Warner TT. Prognosis and neuropathologic correlation of clinical subtypes of Parkinson disease. JAMA Neurol, 2019;76(4): 470-479.

De Paola M, Sestito SE, Mariani A, Memo C, Fanelli R, Freschi M, Bendotti C, Calabrese V, Peri F. Synthetic and natural small molecule TLR4 antagonists inhibit motoneuron death in cultures from ALS mouse model. Pharmacol Res, 2016; 103: 180-187.

De Sá K, Amaral L, Rodrigues T, Ishimoto A, De Andrade W, De Almeida L, Freitas-Castro F, Batah S, Oliveira S, Pastorello M, Fabro A, Zamboni DS. Gasdermin-D activation promotes NLRP3 activation and host resistance to Leishmania infection. Nat Commun, 2023; 14: 36626.

de Vasconcelos NM, Lamkanfi M. Recent insights on inflammasomes, gasdermin pores, and pyroptosis. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2020;12(5): a036392.

de Vasconcelos NM, Vliegen G, Gonçalves A, De Hert E, Martín-Pérez R, Van Opdenbosch N, Jallapally A, Geiss-Friedlander R, Lambeir AM, Augustyns K, et al. DPP8/DPP9 inhibition elicits canonical Nlrp1b inflammasome hallmarks in murine macrophages. Life Sci Alliance, 2019;2: e201900313.

DeFelice SL. Nutraceuticals: opportunities in an emerging market. Scrip Mag, 1992; 9: 14-15.

Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service. 9 CFR part 304. Pathogen reduction; hazard analysis and critical control point (HACCP) systems; final rule. Fed Regist, 1996; 61: 38805-38989.

Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service. Progress report on Salmonella testing of raw meat and poultry products, 1998-2001. Erişim tarihi: 2 Ocak 2024.

Devant P, Dong Y, Mintseris J, W, Gygi S, Wu H, Kagan J. Structural insights into cytokine cleavage by inflammatory caspase-4. Nature, 2023; 624: 451-459.

Díaz-Dinamarca DA, Salazar ML, Escobar DF, Castillo BN, Valdebenito B, Díaz P, Manubens A, et al. Surface immunogenic protein from Streptococcus agalactiae and Fissurella latimarginata hemocyanin are TLR4 ligands and

activate MyD88- and TRIF dependent signaling pathways. Front Immunol, 2023; 14: 1186188.

Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. Annu Rev Immunol, 2009; 27: 519-550,

Doyle ME, Mazzotta AS. Review of studies on the thermal resistance of *Salmonellae*. J Food Prot, 2000;63(6): 779-795.

Dubey SR, Turnbull C, Pandey A, et al. Molecular mechanisms and regulation of inflammasome activation and signaling: sensing of pathogens and damage molecular patterns. Cell Mol Immunol, 2025; 22: 1313-1344.

Duval K, Grover H, Han LH, et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. Physiology, 2017; 32: 266-277.

Ehuwa O, Jaiswal AK, Jaiswal S. *Salmonella*, food safety and food handling practices. Foods, 2021;10(5): 907.

Elangovan P, Pari L. Ameliorating effects of troxerutin on nickel-induced oxidative stress in rats. Redox Rep. 2013;18(6): 224-232.

Elhadad D, Desai P, Grassl GA, McClelland M, Rahav G, Gal-Mor O. Differences in host cell invasion and *Salmonella* pathogenicity island 1 expression between *Salmonella enterica serovar Paratyphi A* and nontyphoidal *S. Typhimurium*. Infect Immun, 2016;84(4): 1150-1165.

El-Zayat SR, Sibaii H, Mannaa FA. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. Bull Natl Res Cent, 2019;43(1): 187.

Evavold CL, Ruan J, Tan Y, Xia S, Wu H, Kagan JC. The pore-forming protein gasdermin D regulates interleukin-1 secretion from living macrophages. Immunity, 2018;48(1): 35-44.

Fan SH, Zhang ZF, Zheng YL, Lu J, Wu DM, Shan Q, Wang YY. Troxerutin protects the mouse kidney from d-galactose-caused injury through anti-inflammation and anti-oxidation. Int Immunopharmacol, 2009;9(1): 91-96.

Farajdokht F, Amani M, Bavil FM, Alihemmati A, Mohaddes G, Babri S. Troxerutin protects hippocampal neurons against amyloid beta-induced oxidative stress and apoptosis. EXCLI J, 2017; 16: 1081.

Faucheu C, Blanchet AM, Collard-Dutilleul V, Lalanne JL, Diu-Hercend A. Identification of a cysteine protease closely related to interleukin-1β-converting enzyme. Eur J Biochem, 1996;236(1): 207-213.

Feng Y, Liu J, Li YG, Cao FL, Johnston RN, Zhou J, Liu GR, Liu SL. Inheritance of the *Salmonella* virulence plasmids: mostly vertical and rarely horizontal. Infect Genet Evol, 2012;12(5): 1058-1063.

Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. Nature, 2009; 458: 509-513.

Ferrao R, Zhou H, Shan Y, Liu Q, Li Q, Shaw DE, Wu H, et al. IRAK4 dimerization and trans-autophosphorylation are induced by Myddosome assembly. Mol Cell, 2014; 55: 891-903.

Fierer J, Guiney DG. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of Salmonella infection. J Clin Invest, 2001;107(7): 775-780.

Fierer J. Invasive non-typhoidal *Salmonella* (iNTS) infections. Clin Infect Dis, 2022;75(4): 732-738.

Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. Infect Immun, 2005;73(4): 1907-1916.

Fluit AC. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? FEMS Immunol Med Microbiol, 2005;43(1): 1-11.

Fogacci F, Fogacci S. Cardiovascular risk factors management in pregnancy: a role for nutraceuticals? Nutraceuticals and Cardiovascular Disease: An Evidence-based Approach for Clinical Practice. 2021: 245-253.

Foster JW. Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. Crit Rev Microbiol, 1995;21(4): 215-237.

Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Özören N, Jagirdar R, Nunez G. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1β in salmonella-infected macrophages. Nat Immunol, 2006;7(6): 576-582.

Frazão J, Errante P, Condino-Neto A. Toll-like receptors' pathway disturbances are associated with increased susceptibility to infections in humans. Arch Immunol Ther Exp, 2013;61.

Galán JE. Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. Curr Opin Microbiol, 1999;2(1): 46-50.

Galluzzi L, López-Soto A, Kumar S, Kroemer G. Caspases connect cell-death signaling to organismal homeostasis. Immunity, 2016;44(2): 221-231.

Gauthier AE, Rotjan RD, Kagan JC. Lipopolysaccharide detection by the innate immune system may be an uncommon defence strategy used in nature. Open Biol, 2022;12(10).

Ghofrani S, Joghataei MT, Mohseni S, Baluchnejadmojarad T, Bagheri M, Khamse S, Roghani M. Naringenin improves learning and memory in an Alzheimer's disease rat model: insights into the underlying mechanisms. Eur J Pharmacol, 2015; 764: 195-201.

Golla U. Emergence of nutraceuticals as the alternative medications for pharmaceuticals. IJCAM, 2018; 11: 155-158.

Gram A, Kowalewski MP. Molecular mechanisms of lipopolysaccharide (LPS) induced inflammation in an immortalized ovine luteal endothelial cell line (OLENDO). Vet Sci, 2022;9(3).

Grasso F, Frisan T. Bacterial genotoxins: merging the DNA damage response into infection biology. Biomolecules, 2015;5(3): 1762-1782.

Groisman E, Blanc-Potard AB, Uchiya K. Pathogenicity islands and the evolution of Salmonella virulence. In: [Kit/Book], 2014: 127-150.

Gruzdev N, Pinto R, Sela S. Effect of desiccation on tolerance of Salmonella enterica to multiple stresses. Appl Environ Microbiol, 2011;77(5): 1667-1673.

Hamidian GR, Mehri K, Qadiri A, Ahmadi M, Oghbaei H, Vatankhah AM, Keyhanmanesh R. Troxerutin affects the male fertility in prepubertal type 1 diabetic male rats. Iran J Basic Med Sci, 2019;22(2): 197-205.

Hapfelmeier S, Ehrbar K, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Hardt WD. Role of the *Salmonella* pathogenicity island 1 effector proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar *Typhimurium* colitis in streptomycin-pretreated mice. Infect Immun, 2004;72(2): 795-809.

Hassanshahi J, Mirzahosseini-Pourranjbar A, Hajializadeh Z, Kaeidi A. Anticancer and cytotoxic effects of troxerutin on HeLa cell line: an in-vitro model of cervical cancer. Mol Biol Rep, 2020; 47: 6135-6142

He WT, Wan H, Hu L, Chen P, Wang X, Huang Z, Han J, et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1β secretion. Cell Res, 2015;25(12): 1285-1298.

Heilig R, Dick MS, Sborgi L, Meunier E, Hiller S, Broz P. The Gasdermin-D pore acts as a conduit for IL-1β secretion in mice. Eur J Immunol, 2018;48(4): 584-592.

Huang W, Liu Y, Wang J, Wang X, Li C. Anti-inflammatory effect of the blueberry anthocyanins malvidin-3-glucoside and malvidin-3-galactoside in endothelial cells. Molecules, 2014; 19: 12827-12841.

Hung S. Bioactivity and toxicity evaluation of nutraceuticals using in vitro cell-based models: a review. 2022.

Hurley D, McCusker MP, Fanning S, Martins M. Salmonella-host interactions - modulation of the host innate immune system. Front Immunol, 2014; 5: 481.

Iibuchi R, Hara-Kudo Y, Hasegawa A, Kumagai S. Survival of *Salmonella* on a polypropylene surface under dry conditions in relation to biofilm-formation capability. J Food Prot. 2010;73(8): 1506-1510, https: //doi.org/10,4315/0362-028X-73.8.1506

Jafari-Khataylou Y, Emami S, Mirzakhani N. Troxerutin attenuates inflammatory response in lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. Res Vet Sci, 2020.

Jamali-Raeufy N, Kardgar S, Baluchnejadmojarad T, et al. Troxerutin exerts neuroprotection against lipopolysaccharide (LPS) induced oxidative stress and neuroinflammation through targeting SIRT1/SIRT3 signaling pathway. Metab Brain Dis, 2019; 34: 1505-1513.

Janabi AHW, Kamboh AA, Saeed M, Xiaoyu L, Bibi J, Majeed F, Lv H, et al. Flavonoid-rich foods (FRF): a promising nutraceutical approach against lifespan-shortening diseases. Iran J Basic Med Sci, 2020;23(2): 140.

Jing N, Song J, Liu Z, Wang L, Jiang G. Glycosylation of anthocyanins enhances the apoptosis of colon cancer cells by handicapping energy metabolism. BMC Complement Med Ther, 2020; 20: 309.

Johnson R, Mylona E, Frankel G. Typhoidal *Salmonella*: distinctive virulence factors and pathogenesis. Cell Microbiol, 2018;20(9): e12939.

Johnston TP, Korolenko TA, Pirro M, Sahebkar A. Preventing cardiovascular heart disease: promising nutraceutical and non-nutraceutical treatments for cholesterol management. Pharmacol Res, 2017; 120: 219-225.

Jorgensen I, Miao EA. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. Immunol Rev, 2015;265(1): 130-142.

Kaeidi A, Taghipour Z, Allahtavakoli M, Fatemi I, Hakimizadeh E, Hassanshahi J. Ameliorating effect of troxerutin in unilateral ureteral obstruction-induced renal oxidative stress, inflammation, and apoptosis in male rats. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2020; 393: 879-888

Kalra EK. Nutraceutical—definition and introduction. AAPS PharmSci, 2003; 5: 25.

Kalyan M, Tousif AH, Sonali S, Vichitra C, Sunanda T, Praveenraj SS, Ray B, Gorantla VR, Rungratanawanich W, Mahalakshmi AM, Qoronfleh MW, Monaghan TM, Song B-J, Essa MM, Chidambaram SB. Role of endogenous lipopolysaccharides in neurological disorders. Cells, 2022; 11: 4038.

Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. Front Immunol, 2014; 5: 461.

Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, O'Rourke K, Anderson K, Warming S, Dixit VM, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. Nature, 2015;526(7575): 666-671.

Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, Newton K, Qu Y, Liu J, Heldens S, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. Nature, 2011; 479: 117-121.

Keservani RK, Kesharwani RK, Sharma AK, Gautam SP, Verma SK. Nutraceutical formulations and challenges. In: Developing New Functional Food and Nutraceutical Products. Academic Press, 2017: 161-177.

Knodler LA, Celli J, Hardt WD, Vallance BA, Yip C, Finlay BB. *Salmonella* effectors within a single pathogenicity island are differentially expressed and translocated by separate type III secretion systems. Mol Microbiol, 2002;43(5): 1089-1103.

Kombade S, Kaur N. Pathogenicity island in Salmonella. In: *Salmonella* Spp. - A Global Challenge. IntechOpen, 2021.

Konovalova A, Kahne DE, Silhavy TJ. Outer membrane biogenesis. Annu Rev Microbiol, 2017; 71: 539-556.

Krishnakumar R, Kim B, Mollo EA, Imlay JA, Slauch JM. Structural properties of periplasmic SodCI that correlate with virulence in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. J Bacteriol, 2007;189(12): 4343-4352.

Kulp A, Kuehn MJ. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. Annu Rev Microbiol, 2010; 64: 163-184.

Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. Cold Spring Harb Protoc, 2018;2018(6): pdb.prot095505.

Kuzmich NN, Sivak KV, Chubarev VN, Porozov YB, Savateeva-Lyubimova TN, Peri F. TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis. Vaccines, 2017;5(4): 34.

Laer LV, Huizing EH, Verstreken M, Van Zuijlen D, Wauters JG, Bossuyt PJ, Van Camp G, et al. Nonsyndromic hearing impairment is associated with a mutation in DFNA5. Nat Genet, 1998;20(2): 194-197.

Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. Cell, 2014;157(5): 1013-1022.

Lan ZF, Yao W, Xie YC, Chen W, Zhu YY, Chen JQ, Chen JX, et al. Oral troxerutin alleviates depression symptoms in mice by modulating gut microbiota and microbial metabolism. Mol Nutr Food Res, 2024;68(3): 2300603.

Leclerc JM, Dozois CM, Daigle F. *Salmonella enterica* serovar *Typhi* siderophore production is elevated and Fur inactivation causes cell filamentation and attenuation in macrophages. FEMS Microbiol Lett, 2017;364(15): fnx147.

Lee BL, Stowe IB, Gupta A, Kornfeld OS, Roose-Girma M, Anderson K, Kayagaki N, et al. Caspase-11 auto-proteolysis is crucial for noncanonical inflammasome activation. J Exp Med, 2018;215(9): 2279-2288.

Lee KM, Seong SY. Partial role of TLR4 as a receptor responding to damage-associated molecular pattern. Immunol Lett, 2009; 125: 31-39.

Lee KY, Jeon YJ. Macrophage activation by polysaccharide isolated from Astragalus membranaceus. Int Immunopharmacol, 2005; 5: 1225-1233.

Li J, Overall CC, Johnson RC, Jones MB, McDermott JE, He F, Adkins JN, Cambronne ED. ChIP-seq analysis of the σE regulon of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* reveals new genes implicated in heat shock and oxidative stress response. PLoS One, 2015;10(9): e0138466.

Lin SC, Lo YC, Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. Nature, 2010; 465: 885-890,

Lin SL, Le TX, Cowen DS. SptP, a *Salmonella Typhimurium* type III-secreted protein, inhibits the mitogen-activated protein kinase pathway by inhibiting Raf activation. Cell Microbiol, 2003;5(4): 267-275.

Ling N, Gu J, Lei Z, Li M, Zhao J, Zhang HT, Li X. MicroRNA-155 regulates cell proliferation and invasion by targeting FOXO3a in glioma. Oncol Rep, 2013;30(5): 2111-2118.

Liu CM, Ma JQ, Lou Y. Chronic administration of troxerutin protects mouse kidney against D-galactose-induced oxidative DNA damage. Food Chem Toxicol, 2010;48(10): 2809-2817.

Liu X, Zhang Z, Ruan J, Pan Y, Magupalli VG, Wu H, Lieberman J. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. Nature, 2016;535(7610): 153-158.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods, 2001;25(4): 402-408.

Lou M, Zhang LN, Ji PG, Feng FQ, Liu JH, Yang C, Li BF, Wang L. Quercetin nanoparticles induce autophagy and apoptosis through the AKT/ERK/Caspase-3 signaling pathway in human neuroglioma cells: in vitro and in vivo. Biomed Pharmacother, 2016; 84: 1-9.

Luca M, Luca A, Calandra C. The role of oxidative damage in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease and vascular dementia. Oxid Med Cell Longev, 2015; 2015: 504678.

Ma S, Fan H, Zhang J, Wang L, Shi H, Li C. Troxerutin attenuates LPS-induced inflammation in BV2 microglial cells involving Nrf2 activation and NF-κB pathway inhibition. Iran J Basic Med Sci, 2025; 28: 1531-1538.

Ma W, Wang S, Liu X, Tang F, Zhao P, Cheng K, Feng W, et al. Protective effect of troxerutin and cerebroprotein hydrolysate injection on cerebral ischemia through inhibition of oxidative stress and promotion of angiogenesis in rats. Mol Med Rep, 2019;19(4): 3148-3158.

Majnooni MB, Fakhri S, Smeriglio A, Trombetta D, Croley CR, Bhattacharyya P, Bishayee A. Antiangiogenic effects of coumarins against cancer: from chemistry to medicine. Molecules, 2019; 24: 4278.

Mandal P, Feng Y, Lyons JD, Berger SB, Otani S, DeLaney A, Mocarski ES, et al. Caspase-8 collaborates with caspase-11 to drive tissue damage and execution of endotoxic shock. Immunity, 2018;49(1): 42-55.

Mangan MS, Olhava EJ, Roush WR, Seidel HM, Glick GD, Latz E. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. Nat Rev Drug Discov, 2018;17(8): 588-606.

Mao ZG, Jiang CC, Yang F, Thorne RF, Hersey P, Zhang XD. TRAIL-induced apoptosis of human melanoma cells involves activation of caspase-4. Apoptosis, 2010;15(10): 1211-1222.

Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. Microbes Infect, 2000;2(2): 145-156.

Marhic C. Clinical and rheological efficacy of troxerutin in obstetric gynecology. Rev Fr Gynecol Obstet, 1991;86(2 Pt 2): 209-212.

Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. Annu Rev Immunol, 2009; 27: 229-265.

Masoud F, Mokhtari B, Gholami S, Javadi A, Badalzadeh R. Troxerutin preconditioning modulates the activity of TLR4/NF-κB signaling pathway and mitochondrial ATP-sensitive potassium channels in a rat model of myocardial ischemia/reperfusion injury. 2021.

Masters SL, Gerlic M, Metcalf D, Preston S, Pellegrini M, O'Donnell JA, McArthur K, Baldwin TM, Chevrier S, Nowell CJ, et al. NLRP1 inflammasome activation induces pyroptosis of hematopoietic progenitor cells. Immunity, 2012; 37: 1009-1023.

Maurya DK, Balakrishnan S, Salvi VP, Nair CKK. Protection of cellular DNA from γ-radiation-induced damages and enhancement in DNA repair by troxerutin. Mol Cell Biochem, 2005; 280: 57-68.

Maurya DK, Salvi VP, Nair CKK. Radioprotection of normal tissues in tumor-bearing mice by troxerutin. J Radiat Res, 2004;45(2): 221-228.

Mazgaeen L, Gurung P. Recent advances in lipopolysaccharide recognition systems. Int J Mol Sci, 2020;21.

McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013;5(4): a008656.

McMillan PJ, White SS, Franklin A, Greenup JL, Leverenz JB, Raskind MA, Szot P. Differential response of the central noradrenergic nervous system to the loss of locus coeruleus neurons in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. Brain Res, 2011; 1373: 240-252.

Medzhitov R. Recognition of Microorganisms and Activation of the Immune Response. Nature, 2007; 449: 819-826.

Meng L, Xin G, Li B, Li D, Sun X, Yan T, Li L, Shi L, Cao S, Meng X. Anthocyanins extracted from Aronia melanocarpa protect SH-SY5Y cells against amyloid-β (1-42)-induced apoptosis by regulating Ca^{2+} homeostasis and inhibiting mitochondrial dysfunction. J Agric Food Chem, 2018;66(49): 12967-12977.

Meunier E, Dick MS, Dreier RF, Schürmann N, Broz DK, Warming S, Broz P. Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. Nature, 2014; 509: 366-370,

Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI, Aderem A. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1β via Ipaf. Nat Immunol, 2006; 7: 569-575.

Miller S, Ernst R, Bader ML. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. Nat Rev Microbiol, 2005; 3: 36-46.

Miyake K. Innate Recognition of Lipopolysaccharide by Toll-like Receptor 4-MD-2. Trends Microbiol, 2004; 12: 186-192.

Mon KKZ, Zhu Y, Chanthavixay G, Kern C, Zhou H. Integrative analysis of gut microbiome and metabolites revealed novel mechanisms of intestinal Salmonella carriage in chicken. Sci Rep, 2020; 10: 4809.

Moreno-Chamba B, Salazar-Bermeo J, Narváez-Asensio M, Navarro-Simarro P, Saura D, Neacsu M, Martí N, Valero M, Martínez-Madrid M. Polyphenolic extracts from Diospyros kaki and Vitis vinifera by-products stimulate cytoprotective effects in bacteria-cell host interactions by mediation of transcription factor Nrf2. Phytomedicine, 2024; 134: 156020.

Myung SK, Kim HB, Lee YJ, Choi YJ, Oh SW. Calcium supplements and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis of clinical trials. Nutrients, 2021; 13: 368.

Nair HB, Sung B, Yadav VR, Kannappan R, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Delivery of antiinflammatory nutraceuticals by nanoparticles for the prevention and treatment of cancer. Biochem Pharmacol, 2010; 80: 1833-1843.

Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-β. Nature, 2000; 403: 98-103.

Napier BA, Brubaker SW, Sweeney TE, Monette P, Rothmeier GH, Gertsvolf NA, Monack DM. Complement pathway amplifies caspase-11-dependent cell death and endotoxin-induced sepsis severity. J Exp Med, 2016; 213: 2365-2382.

Nasri H, Baradaran A, Shirzad H, Rafieian-Kopaei M. New concepts in nutraceuticals as alternative for pharmaceuticals. Int J Prev Med, 2014; 5: 1487.

Needham BD, Carroll SM, Giles DK, Georgiou G, Whiteley M, Trent MS. Modulating the innate immune response by combinatorial engineering of endotoxin. Proc Natl Acad Sci USA, 2013; 110: 1464-1469.

Neves B, De Freitas S, Borelli P, Rogero M, Fock R. Delphinidin-3-O-glucoside in vitro suppresses NF-κB and changes the secretome of mesenchymal stem cells affecting macrophage activation. Nutrition, 2022; 105: 111853.

Nichols JE, Niles JA, Vega SP, et al. Modeling the lung: design and development of tissue engineered macro- and micro-physiologic lung models for research use. Exp Biol Med, 2014; 239: 1135-1169.

Okondo MC, Rao SD, Taabazuing CY, Chui AJ, Poplawski SE, Johnson DC, Bachovchin DA. Inhibition of Dpp8/9 activates the Nlrp1b inflammasome. Cell Chem Biol, 2018; 25: 262-267.

Olsen JE, Brown DJ, Thomsen LE, Platt DJ, Chadfield MS. Differences in the carriage and the ability to utilize the serotype associated virulence plasmid in strains of *Salmonella enterica* Serotype *Typhimurium* investigated by use of a self-transferable virulence plasmid, pOG669. Microb Pathog, 2004; 36: 337-347.

Ou JT, Baron LS. Strain differences in expression of virulence by the 90 kilobase pair virulence plasmid of *Salmonella* serovar *Typhimurium*. Microb Pathog, 1991; 10: 247-251.

Pacello F, Ceci P, Ammendola S, Pasquali P, Chiancone E, Battistoni A. Periplasmic Cu,Zn superoxide dismutase and cytoplasmic Dps concur in protecting *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* from extracellular reactive oxygen species. Biochim Biophys Acta, 2008; 1780: 226-232.

Pålsson-McDermott EM, O'Neill LAJ. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. Immunology, 2004; 113: 153-162.

Pan HC, Jiang Q, Yu Y, Mei JP, Cui YK, Zhao WJ. Quercetin promotes cell apoptosis and inhibits the expression of MMP-9 and fibronectin via the AKT and ERK signalling pathways in human glioma cells. Neurochem Int, 2015; 80: 60-71.

Panat N, Maurya D, Ghaskadbi S, Sandur S. Troxerutin, a plant flavonoid, protects cells against oxidative stress-induced cell death through radical scavenging mechanism. Food Chem, 2016; 194: 32-45.

Petiwala SM, Johnson JJ. Diterpenes from rosemary (Rosmarinus officinalis): Defining their potential for anti-cancer activity. Cancer Lett, 2015; 367: 93-102.

Pfeifer CG, Marcus SL, Steele-Mortimer O, Knodler LA, Finlay BB. *Salmonella Typhimurium* virulence genes are induced upon bacterial invasion into phagocytic and nonphagocytic cells. Infect Immun, 1999; 67: 5690-5698.

Phimarn W, Sungthong B, Saramunee K, Caichompoo W. Efficacy of *Momordica charantia L*. on blood glucose, blood lipid, and body weight: a meta-analysis of randomized controlled trials. Pharmacogn Mag, 2018; 14: 56.

Pickard D, Wain J, Baker S, Line A, Chohan S, Fookes M, Barron A, et al. Composition, acquisition, and distribution of the Vi exopolysaccharide-encoding *Salmonella enterica* pathogenicity island SPI-7. J Bacteriol, 2003; 185: 5055-5065.

Pitchaiah G, Akula A, Chandi V. Anticancer potential of nutraceutical formulations in MNU-induced mammary cancer in Sprague Dawley rats. Phcog Mag, 2017; 13: 46.

Platnich JM, Chung H, Lau A, Sandall CF, Bondzi-Simpson A, Chen HM, Muruve DA, et al. Shiga toxin/lipopolysaccharide activates caspase-4 and gasdermin D to trigger mitochondrial reactive oxygen species upstream of the NLRP3 inflammasome. Cell Rep, 2018; 25: 1525-1536.

Popa GL, Papa MI. *Salmonella* spp. infection - a continuous threat worldwide. Germs, 2021; 11: 88-96.

Porto CM, da Silva TDPS, Sougey EB. Contribuições da vitamina D no tratamento de sintomas depressivos e fatores de risco cardiovascular: protocolo de estudo para um ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo. Trials, 2019; 20: 583.

Prouty AM, Schwesinger WH, Gunn JS. Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. Infect Immun, 2002; 70: 2640-2649.

Puri V, Nagpal M, Singh I, Singh M, Dhingra GA, Huanbutta K, Dheer D, Sharma A, Sangnim T. A comprehensive review on nutraceuticals: therapy support and formulation challenges. Nutrients, 2022; 14: 4637.

Raffatellu M, Wilson RP, Chessa D, Andrews-Polymenis H, Tran QT, Lawhon S, Khare S, Adams LG, Bäumler AJ. SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* invasion of epithelial cells. Infect Immun, 2005; 73: 146-154.

Ramos-Morales F. Impact of *Salmonella* Enterica type III secretion system effectors on the eukaryotic host cell. Int Schol Res Notices, 2012; e787934.

Rangasamy SB, Dasarathi S, Pahan P, Jana M, Pahan K. Low-dose aspirin upregulates tyrosine hydroxylase and increases dopamine production in

dopaminergic neurons: implications for Parkinson's disease. J Neuroimmune Pharmacol, 2019; 14: 173-187.

Ranjith V, Radika M, Anuradha C. Effect of troxerutin on insulin resistance induced by post-natal administration of monosodium glutamate: a comparative study with rosiglitazone. J Clin Lab Investiga Updat, 2013; 1: 36-47.

Rathinam VA, Vanaja SK, Waggoner L, Sokolovska A, Becker C, Stuart LM, Fitzgerald KA, et al. TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. Cell, 2012; 150: 606-619.

Rathinam VAK, Zhao Y, Shao F. Innate immunity to intracellular LPS. Nat Immunol, 2019; 20: 527-533.

Reddy PH. Amyloid beta, mitochondrial structural and functional dynamics in Alzheimer's disease. Exp Neurol, 2009; 218: 286-292.

Reklou A, Katsiki N, Karagiannis A, Athyros V. Effects of lipid lowering drugs on arterial stiffness: one more way to reduce cardiovascular risk? Curr Vasc Pharmacol, 2020; 18: 38-42.

Rivera-Chávez F, Bäumler AJ. The pyromaniac inside you: *Salmonella* metabolism in the host gut. Annu Rev Microbiol, 2015; 69: 31-48.

Roy S, Chikkerur J, Roy S, Dhali A, Kolte A, Sridhar M, Samanta A. Tagatose as a potential nutraceutical: production, properties, biological roles, and applications. J Food Sci, 2018; 83: 2699-2709.

Ruan J, Xia S, Liu X, Lieberman J, Wu H. Cryo-EM structure of the gasdermin A3 membrane pore. Nature, 2018; 557: 62-67.

Ruchi S. Role of nutraceuticals in health care: a review. Int J Green Pharm, 2017; 11: 03.

Russell C, Keshavamurthy S, Saha S. Nutraceuticals in the management of cardiovascular risk factors: where is the evidence? Cardiovasc Haematol Disord Drug Targets, 2021; 21: 150-161.

Russo AJ, Behl B, Banerjee I, Rathinam VA. Emerging insights into noncanonical inflammasome recognition of microbes. J Mol Biol, 2018; 430: 207-216.

Ryan MP, O'Dwyer J, Adley CC. Evaluation of the complex nomenclature of the clinically and veterinary significant pathogen *Salmonella*. Biomed Res Int, 2017; 2017: 3782182.

Saeki N, Kuwahara Y, Sasaki H, Satoh H, Shiroishi T. Gasdermin (Gsdm) localizing to mouse chromosome 11 is predominantly expressed in upper gastrointestinal tract but significantly suppressed in human gastric cancer cells. Mamm Genome, 2000; 11: 718-724.

Sahasrabudhe NM, Beukema M, Tian L, Troost B, Scholte J, Bruininx E, Bruggeman G, van den Berg M, Scheurink A, Schols HA, et al. Dietary fiber pectin directly blocks toll-like receptor 2-1 and prevents doxorubicin-induced ileitis. Front Immunol, 2018; 9: 383.

Sahoo G, Samal D, Khandayataray P, Murthy MK. A review on caspases: key regulators of biological activities and apoptosis. Mol Neurobiol, 2023; 60: 5805-5837.

Salama SA, Arab HH, Maghrabi IA. Troxerutin down-regulates KIM-1, modulates p38 MAPK signaling, and enhances renal regenerative capacity in a rat model of gentamycin-induced acute kidney injury. Food Funct, 2018; 9: 6632-6642.

Sampath S, Karundevi B. Effect of troxerutin on insulin signaling molecules in the gastrocnemius muscle of high fat and sucrose-induced type-2 diabetic adult male rat. Mol Cell Biochem, 2014; 395: 11-27.

Sano G, Takada Y, Goto S, Maruyama K, Shindo Y, Oka K, Matsui H, Matsuo K. Flagella facilitate escape of *Salmonella* from oncotic macrophages. J Bacteriol, 2007; 189: 8224-8232.

Santini A, Novellino E. Nutraceuticals-shedding light on the grey area between pharmaceuticals and food. Expert Rev Clin Pharmacol, 2018; 11: 545-547.

Saranya T, Kavithaa K, Paulpandi M, Ramya S, Preethi S, Balachandar V, Narayanasamy A. Enhanced apoptogenesis and oncogene regulatory mechanism of troxerutin in triple negative breast cancer cells. Toxicol Res, 2020;9(3): 230-238.

Sato H, Koide T, Masuya H, Wakana S, Sagai T, Umezawa A, Shiroishi T, et al. A new mutation Rim3 resembling Re den is mapped close to retinoic acid receptor alpha (Rara) gene on mouse chromosome 11. Mamm Genome, 1998; 9: 20-25.

Sborgi L, Rühl S, Mulvihill E, Pipercevic J, Heilig R, Stahlberg H, Hiller S, et al. GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. EMBO J, 2016; 35: 1766-1778.

Schauvliege R, Vanrobaeys J, Schotte P, Beyaert R. Caspase-11 gene expression in response to lipopolysaccharide and interferon-γ requires nuclear factor-κB and signal transducer and activator of transcription (STAT) 1. J Biol Chem, 2002; 277: 41624-41630,

Schmid-Burgk JL, Gaidt MM, Schmidt T, Ebert TS, Bartok E, Hornung V. Caspase-4 mediates non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. Eur J Immunol, 2015; 45: 2911-2917.

Schroder K, Irvine KM, Taylor MS, Bokil NJ, Le Cao KA, Masterman KA, Sweet MJ, et al. Conservation and divergence in Toll-like receptor 4-regulated gene expression in primary human versus mouse macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012;109: E944-E953.

Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. Cell, 2010; 140: 821-832.

Semmarath W, Mapoung S, Umsumarng S, Arjsri P, Srisawad K, Thippraphan P, Yodkeeree S, Dejkriengkraikul P. Cyanidin-3-O-glucoside- and peonidin-3-O-glucoside-rich fraction of black rice germ and bran suppresses inflammatory responses from SARS-CoV-2 spike glycoprotein S1 induction in vitro in A549

lung cells and THP-1 macrophages via inhibition of the NLRP3 inflammasome pathway. Nutrients, 2022; 14: 2738.

Seth-Smith HMB. SPI-7: *Salmonella*'s Vi-encoding pathogenicity island. J Infect Dev Ctries, 2008; 2: 267-271.

Shan Q, Zheng GH, Han XR, Wen X, Wang S, Li MQ, Zheng YL. Troxerutin protects kidney tissue against BDE-47-induced inflammatory damage through CXCR4-TXNIP/NLRP3 signaling. Oxid Med Cell Longev, 2018; 2018: 9865495.

Shan Q, Zhuang J, Zheng G, Zhang Z, Zhang Y, Lu J, Zheng Y. Troxerutin reduces kidney damage against BDE-47-induced apoptosis via inhibiting NOX2 activity and increasing Nrf2 activity. Oxid Med Cell Longev, 2017; 2017: 6034692.

Sharma AK, Dhasmana N, Dubey N, Kumar N, Gangwal A, Gupta M, Singh Y. Bacterial virulence factors: secreted for survival. Indian J Microbiol, 2017; 57: 1-10,

Shi J, Gao W, Shao F. Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death. Trends Biochem Sci, 2017; 42: 245-254.

Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, Shao F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. Nature, 2015; 526: 660-665.

Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, Hu L, Shao F. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. Nature. 2014; 514: 187-192.

Shi X, Sun Q, Hou Y, Zeng H, Cao Y, Dong M, Ding J, Shao F. Recognition and maturation of IL-18 by caspase-4 noncanonical inflammasome. Nature, 2023; 624: 442-450.

Shin MS, Park SB, Shin KS. Molecular mechanisms of immunomodulatory activity by polysaccharide isolated from the peels of Citrus unshiu. Int J Biol Macromol, 2018; 112: 576-583.

Simm R, Ahmad I, Rhen M, Le Guyon S, Römling U. Regulation of biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium.* Future Microbiol, 2014; 9: 1261-1282.

Singh J, Sinha S. Classification, regulatory acts and applications of nutraceuticals for health. Int J Pharma Bio Sci, 2012; 2: 177-187.

Singla V, Pratap Mouli V, Garg SK, Rai T, Choudhury BN, Verma P, Ahuja V. Induction with NCB-02 (curcumin) enema for mild-to-moderate distal ulcerative colitis—A randomized, placebo-controlled, pilot study. J Crohns Colitis, 2014; 8: 208-214.

Steele-Mortimer O, Brumell JH, Knodler LA, Méresse S, Lopez A, Finlay BB. The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* is necessary for intracellular proliferation and vacuole biogenesis in epithelial cells. Cell Microbiol, 2002; 4: 43-54.

Sun W, Zhang N, Zhang T, Li Y, Xue H, Cao J, Hou W, Liu J, Wang Y, Jin C. Cyanidin-3-O-glucoside induces the apoptosis of human gastric cancer MKN-45 cells through ROS-mediated signaling pathways. Molecules, 2023; 28: 652.

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. Cell, 2010; 140: 805-820,

Tan L, Ding H, Xi H. Troxerutin, a bioflavonoid, exhibits oxidative stress-induced cytotoxic effects on KB cells. Indian J Pharm Educ Res, 2023.

Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. Immunol Rev, 2012; 249: 158-175.

Thomas N, George K, Selvam A. Anticancer mechanism of troxerutin via targeting Nrf2 and NF-κB signalling pathways in hepatocarcinoma cell line. Toxicol In Vitro, 2019; 54: 317-329.

Trialists CT. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. Lancet, 2012; 380: 581-590,

Tseng SH, Lin SM, Chen JC, Su YH, Huang HY, Chen CK, Lin PY, Chen Y. Resveratrol suppresses angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats. Clin Cancer Res, 2004;10(6): 2190-2202.

Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Billiar TR, et al. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. J Exp Med, 2005; 201: 1135-1143.

Valdivia RH, Falkow S. Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. Science, 1997; 277: 2007-2011.

Van Gorp H, Van Opdenbosch N, Lamkanfi M. Inflammasome-dependent cytokines at the crossroads of health and autoinflammatory disease. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019;11: a028563.

Van Opdenbosch N, Gurung P, Vande Walle L, Fossoul A, Kanneganti TD, Lamkanfi M. Activation of the NLRP1b inflammasome independently of ASC-mediated caspase-1 autoproteolysis and speck formation. Nat Commun, 2014; 5: 3209.

Van Opdenbosch N, Lamkanfi M. Caspases in cell death, inflammation, and disease. Immunity, 2019; 50: 1352-1364.

Van Rossom S, Op de Beeck K, Franssens V, Swinnen E, Schepers A, Ghillebert R, Winderickx J. The splicing mutant of the human tumor suppressor protein DFNA5 induces programmed cell death when expressed in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Front Oncol, 2012; 2: 77.

Vanaja SK, Russo AJ, Behl B, Banerjee I, Yankova M, Deshmukh SD, Rathinam VA. Bacterial outer membrane vesicles mediate cytosolic localization of LPS and caspase-11 activation. Cell, 2016; 165: 1106-1119.

Velge P, Wiedemann A, Rosselin M, Abed N, Boumart Z, Chaussé AM, Grépinet O, vd. Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for Salmonella pathogenesis. MicrobiologyOpen, 2012; 1: 243-258.

Viganò E, Diamond C, Spreafico R, Balachander A, Sobota R, Mortellaro A. Human caspase-4 and caspase-5 regulate the one-step non-canonical inflammasome activation in monocytes. Nat Commun, 2015; 6: 9761.

Vinothkumar V, Manoharan S, Sindhu G, Nirmal MR, Vetrichelvi V. Geraniol modulates cell proliferation, apoptosis, inflammation, and angiogenesis during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. Mol Cell Biochem, 2012; 369: 17-25.

Voet S, Srinivasan S, Lamkanfi M, van Loo G. Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. EMBO Mol Med, 2019;11: e10248.

Wacker MA, Teghanemt A, Weiss JP, Barker JH. High-affinity caspase-4 binding to LPS presented as high molecular mass aggregates or in outer membrane vesicles. Innate Immun, 2017; 23: 336-344.

Wang G, Dai F, Yu K, Jia Z, Zhang A, Huang Q, Kang C, Jiang H, Pu P. Resveratrol inhibits glioma cell growth via targeting oncogenic microRNAs and multiple signaling pathways. Int J Oncol, 2015;46(4): 1739-1747.

Wang X, Gao Y, Wang L, Yang D, Bu W, Gou L, Huang J, Duan X, Pan Y, Cao S, Gao Z, Cheng C, Feng Z, Xie J, Yao R. Troxerutin improves dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice. J Agric Food Chem, 2021; 69: 2729-2744.

Wattiau P, Boland C, Bertrand S. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. Appl Environ Microbiol, 2011; 77: 7877-7885.

Wei J, Wu H, Zhang H, Li F, Chen S, Hou B, Shi Y, Zhao L, Duan H. Anthocyanins inhibit high glucose-induced renal tubular cell apoptosis caused by oxidative stress in db/db mice. Int J Mol Med, 2018; 41: 1608-1618.

Wei X, Xie F, Zhou X, Wu Y, Yan H, Liu T, Zhang L. Role of pyroptosis in inflammation and cancer. Cell Mol Immunol, 2022; 19: 971-992.

Wenisch C, Biffignandi PM. Effect of bioflavonoids (trihydroxyethylrutin and disodium flavodate) in vitro on neutrophil reactive oxygen production and phagocytic ability assessed by flow cytometry. Curr Med Res Opin, 2001; 17: 123-127.

WHO. Risk assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens. Erişim: https: //www.who.int/publications-detail-redirect/9291562293. Erişim Tarihi: 02 Ocak 2024.

Wijayanegara H, Mose JC, Achmad L, Sobarna R, Permadi W. A clinical trial of hydroxyethylrutosides in the treatment of haemorrhoids of pregnancy. J Int Med Res, 1992; 20: 54-60,

Williamson E, Liu X, Izzo A. Trends in use, pharmacology, and clinical applications of emerging herbal nutraceuticals. Br J Pharmacol, 2019; 177: 1227-1240.

Winstanley C, Hart CA. Type III secretion systems and pathogenicity islands. J Med Microbiol, 2001; 50: 116-126.

World Health Organization. Diarrhoeal disease. 2023. Erişim: https: //www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease. Erişim Tarihi: 6 Kasım 2025.

Xia X, Yan J, Shen Y, Tang K, Yin J, Zhang Y, Weng J. Berberine improves glucose metabolism in diabetic rats by inhibition of hepatic gluconeogenesis. PLoS One, 2011;6: e16556.

Xu H, Yang J, Gao W, Li L, Li P, Zhang L, Gong YN, Peng X, Xi JJ, Chen S, et al. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. Nature, 2014; 513: 237-241.

Xu L, Pu J. Alpha-synuclein in Parkinson's disease: from pathogenetic dysfunction to potential clinical application. Parkinsons Dis, 2016; 2016: 1720621.

Xu Z, Chen ZM, Wu X, Zhang L, Cao Y, Zhou P. Distinct molecular mechanisms underlying potassium efflux for NLRP3 inflammasome activation. Front Immunol, 2020; 11: 609441.

Xue X, Chen Y, Wang Y, Zhan J, Chen B, Wang X, Pan X. Troxerutin suppresses the inflammatory response in advanced glycation end-product-administered chondrocytes and attenuates mouse osteoarthritis development. Food Funct, 2019; 10: 5059-5069.

Yan MH, Wang X, Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. Free Radic Biol Med, 2013; 62: 90-101.

Yavari R, Badalzadeh R, Alipour MR, Tabatabaei SM. Modulation of hippocampal gene expression of microRNA-146a/microRNA-155-nuclear factor-kappa B inflammatory signaling by troxerutin in healthy and diabetic rats. Indian J Pharmacol, 2016; 48: 675-680,

Yen JH, Ganea D. Interferon β induces mature dendritic cell apoptosis through caspase-11/caspase-3 activation. Blood, 2009; 114: 1344-1354.

Yin M, Zhang Y, Li H. Advances in research on immunoregulation of macrophages by plant polysaccharides. Front Immunol, 2019; 10: 145.

Yu J, Huang X, Cao M, Qian L, Shao L, Chinnathambi A, Alharbi S, Jian J. Anticancer effect of troxerutin in human non-small-cell lung cancer cell A549 and inhibition of tumor formation in BALB/c nude mice. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2021;40(3): 25-35.

Yu Z, Yu H, Li J, Li C, Hua X, Sheng X. Troxerutin attenuates oxygen-glucose deprivation and reoxygenation-induced oxidative stress and inflammation by enhancing the PI3K/AKT/HIF-1α signaling pathway in H9C2 cardiomyocytes. Mol Med Rep, 2020; 22: 1351-1361.

Zahid A, Ismail H, Jin T. Molecular and structural aspects of gasdermin family pores and insights into gasdermin-elicited programmed cell death. Biochem Soc Trans, 2021; 49: 2697-2710,

Zamanian M, Bazmandegan G, Sureda A, Sobarzo-Sanchez E, Yousefi-Manesh H, Shirooie S. The protective roles and molecular mechanisms of troxerutin

(vitamin P4) for the treatment of chronic diseases: a mechanistic review. Curr Neuropharmacol, 2021; 19: 97-110,

Zamanian M, Hajizadeh MR, Esmaeili Nadimi A, Shamsizadeh A, Allahtavakoli M. Antifatigue effects of troxerutin on exercise endurance capacity, oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 levels in trained male rats. Fundam Clin Pharmacol, 2017; 31: 447-455.

Zamanian M, Shamsizadeh A, Esmaeili Nadimi A, Hajizadeh M, Allahtavakoli F, Rahmani M, Allahtavakoli M. Short-term effects of troxerutin (vitamin P4) on muscle fatigue and gene expression of Bcl-2 and Bax in the hepatic tissue of rats. Can J Physiol Pharmacol, 2017; 95: 708-713.

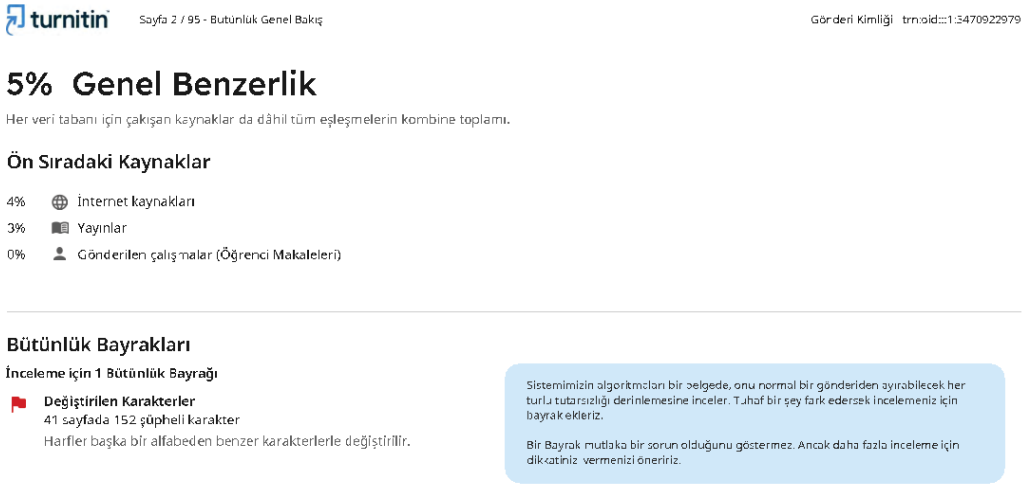
Zamyatina A, Heine H. Lipopolysaccharide recognition in the crossroads of TLR4 and caspase-4/11 mediated inflammatory pathways. Front Immunol, 2020; 11: 585146.

Zhang Z, Wang X, Zheng G, Shan Q, Lu J, Fan S, Sun C, Wu D, Zhang C, Su W, Sui J, Zheng Y. Troxerutin attenuates enhancement of hepatic gluconeogenesis by inhibiting NOD activation-mediated inflammation in high-fat diet-treated mice. Int J Mol Sci, 2017; 18: 31.

Zhao H, Liu Y, Zeng J, Li D, Zhang W, Huang Y. Troxerutin and cerebroprotein hydrolysate injection protects neurovascular units from oxygen-glucose deprivation and reoxygenation-induced injury in vitro. Evid Based Complement Alternat Med, 2018; 2018: 9859672.

Zhong FL, Robinson K, Teo DET, Tan KY, Lim C, Harapas CR, Yu CH, Xie WH, Sobota RM, Au VB, et al. Human DPP9 represses NLRP1 inflammasome and protects against autoinflammatory diseases via both peptidase activity and FIIND domain binding. J Biol Chem, 2018; 293: 18864-18878.

EKLER



turnitin Sayfa 2 / 95 - Bütünlük Genel Bakış Gönderi Kimliği trn:oid:::1:3470922979

5% Genel Benzerlik

Her veri tabanı için çakışan kaynaklar da dâhil tüm eşleşmelerin kombine toplamı.

Ön Sıradaki Kaynaklar

4% İnternet kaynakları
3% Yayınlar
0% Gönderilen çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)

Bütünlük Bayrakları

İnceleme için 1 Bütünlük Bayrağı

Değiştirilen Karakterler
41 sayfada 152 şüpheli karakter
Harfler başka bir alfabeden benzer karakterlerle değiştirilir.

Sistemimizin algoritmaları bir belgede, onu normal bir gönderiden ayırabilecek her türlü tutarsızlığı derinlemesine inceler. Tuhaf bir şey fark edersek incelemeniz için bayrak ekleriz.

Bir Bayrak mutlaka bir sorun olduğunu göstermez. Ancak daha fazla inceleme için dikkatiniz vermenizi öneririz.

turnitin Sayfa 2 / 95 - Bütünlük Genel Bakış Gönderi Kimliği trn:oid:::1:3470922979

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Neriman LÖKER
Uyruğu : Türkiye (T.C.)

EĞİTİM

DERECE	KURUM	MEZUNİYET
Yüksek Lisans	Erciyes Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı	2022-2026
Lisans	Selçuk Üni. Akşehir Kadir Yallagöz SYO/Beslenme ve Diyetetik	2016-2020
Lise	Nuh Mehmet Küçükçalık Anadolu Lisesi	2012-2016

STAJ DENEYİMİ

YIL	KURUM
23/09/19-25/09/19	Diyetkon Beslenme ve Diyet Danışmanlığı
30/09/19-09/10/19	Selçuk Üniversitesi
14/10/19-23/10/19	Konya 26 Nolu ASM
28/10/19-06/11/19	Konya 29 Nolu ASM
11/11/19-20/11/19	Konya 36 Nolu ASM
02/12/19-01/01/20	Selçuk Üniversitesi
10/02/2020-11/03/2020	Selçuk Üniversitesi

YABANCI DİL

İngilizce (72,5 YÖKDİL, Eylül 2023)

KATILIM BELGELERİ

İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitimi Katılım Belgesi, Selçuk Üniversitesi (05.12.2018)

Diyetisyen Kariyer Zirvesi Katılım Belgesi, Mavi Elma Grup (16-17 Aralık 2017, İstanbul)

10, Uluslararası Katılımlı Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 24-27 Nisan 2024, Diyarbakır.

10, Uluslararası Katılımlı Erciyes Tıp Tıbbi Genetik Kongresi, 12-14 Haziran 2025, Kayseri.

3. Uluslararası Hayvansal Gıdalar Kongresi, 22-24 Ekim 2025, Kıbrıs Batı Üniversitesi, Gazimağusa, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti.

SERTİFİKALAR

Obezitede Tıbbi Beslenme, Konya Beslenme ve Diyetetik Semineri, Gençlik Durağı Eğitim Danışmanlık ve Organizasyon Hizmetleri, 22 Aralık 2018, Konya.

Obeziteyi Tetikleyen Faktörler, Konya Beslenme ve Diyetetik Semineri, Gençlik Durağı Eğitim Danışmanlık ve Organizasyon Hizmetleri, 22 Aralık 2018, Konya.

Bariatrik Cerrahide Metabolik Değişiklikler, Konya Beslenme ve Diyetetik Semineri, Gençlik Durağı Eğitim Danışmanlık ve Organizasyon Hizmetleri, 22 Aralık 2018, Konya.

Bariatrik Cerrahi Öncesi ve Sonrası Beslenme, Konya Beslenme ve Diyetetik Semineri, Gençlik Durağı Eğitim Danışmanlık ve Organizasyon Hizmetleri, 22 Aralık 2018, Konya.

Klinik Nütrisyon Mercek Altında, Türkiye Diyetisyenler Derneği, 22 Nisan 2022.

SUNUMLAR, BİLDİRİLER VE YAYINLAR

GENBANK KAYDI:

Whole genome sequence of *Lactiplantibacillus plantarum*, GenBank accession number: NZ_JBDIBM000000000,1. Contributed to sequencing, annotation, and submission process as part of the research team. (Erciyes University, 2025)

ULUSLARARASI YAYIN:

Çobur, H., Löker, N., Dışhan, A., Vurmaz, M., Karatepe, P., Hızlısoy, H., ... & Al, S. (2025). *Lactiplantibacillus Plantarum* Postbiotics Suppress *Salmonella Typhimurium* Invasion and Modulate Innate Responses in Human Intestinal Epithelial Cells. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 1-14.

SÖZLÜ BİLDİRİ:

Çobur, H., Löker, N., Hızlısoy, H., İncilİ, G.K., Hayaloğlu, A.A., Al, S. *Lactiplantibacillus plantarum* Postbiyotiğinin Karakterizasyonu ve *Salmonella Typhimurium* Konak Hücre İnvazyonu Üzerine Etkinliğinin Belirlenmesi. 10, Uluslararası Katılımlı Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, 24-27 Nisan 2024, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır. Kongre Bildiri Kitabı, s. 31.

Loker, N., Cobur, H., Dishan, A., Al, S. Whole genome characterization of probiotic *Latilactobacillus sakei* isolated from traditional Turkish pastrami: A functional genomics perspective on health-promoting bacteria. 10th International Congress of Medical Genetics, on the 30th Anniversary of Erciyes Medical Genetics, June 12-14, 2025, Erciyes University, Kayseri, Türkiye.

Löker, N., Al, S. Investigation of LPS-Induced Modulation of the Non-Canonical Inflammasome Pathway by Troxerutin. 3rd International Congress on Food of Animal Origin, 22-24 October 2025, Famagusta, Northern Cyprus (KKTC), Türkiye Klinikleri Scientific Sessions p.73.

Löker, N., Çobur, H., Yaman Gram, D., Al, Ö., Dishan, A., Akgöl, M., Kaya, B., İncili, G. K., Hayaloğlu, A. A., Al, S. Effect of a Postbiotic Derived from *Latilactobacillus sakei* on Intestinal Microbiota. 3rd International Congress on Food of Animal Origin, 22-24 October 2025, Famagusta, Northern Cyprus (KKTC), Türkiye Klinikleri Scientific Sessions p.77.

POSTER SUNUMU:

Cobur, H., Loker, N., Dishan, A., Hizlisoy, H., Incili, G.K., Hayaloglu, A.A., Al, S. Antimicrobial and immunomodulatory effects of postbiotics and cell-free supernatants from *Lactobacillus* strains on *Salmonella* Typhimurium infections in vitro. EMBO | EMBL Symposium: Infection - pathogens, hosts, and microbiomes, 26-28 May 2025, EMBL Advanced Training Centre, Heidelberg Germany. Abstract Book, p. 55.