

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

## UTP'nin Raw 264.7 Hücre Hattında Canlılık Üzerine Etkileri

Erkan ERMIŞ<sup>1</sup>, Zeynep CANSEV<sup>2</sup>, Onur ETGÜ<sup>3</sup>, Diğdem YÖYEN ERMIŞ<sup>3</sup>,  
Haluk Barbaros ORAL<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Bursa.

<sup>2</sup> TED Bursa Koleji, Bursa.

<sup>3</sup> Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı, Bursa.

### ÖZET

Makrofajlar immün sistemin önemli hücreleridir ve eksiklikleri ya da disfonksiyonları vücutta ciddi hastalıklara yol açar. Bir pirimidin nükleotidi olan üridin-5'-trifosfat'ın (UTP) makrofajlar için bir sinyal molekülü gibi davrandığı bilinmektedir. Ancak UTP'nin makrofaj canlılığı ya da proliferasyonu üzerine etkileri henüz araştırılmamıştır. Dolayısıyla bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda (1, 10 ve 100 µM) uygulanan UTP'nin RAW 264.7 fare makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri farklı zaman noktalarında MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] testi kullanılmak suretiyle incelenmiştir. UTP uygulandıktan 24 ya da 48 saat sonra hücre canlılığında kontrole göre herhangi bir fark gözlenmezken, 10 µM konsantrasyonda uygulanan UTP'nin 72 saat sonra hücre canlılığını kontrole göre %27,7 oranında (p<0,001) artırdığı tespit edilmiştir. İlginç olarak 100 µM konsantrasyonda uygulanan UTP aynı zaman aralığında hücre canlılığını kontrole göre anlamlı (p<0,05) olarak azaltmıştır. Bulgularımız UTP'nin makrofaj canlılığını doza ve zamana bağlı olarak artırdığını ancak yüksek konsantrasyonda toksik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Dolayısıyla elde ettiğimiz veriler, doğru dozda uygulanan UTP'nin dokularda makrofaj hücre metabolizmasını ya da proliferasyonunu artırarak immün sistem fonksiyonlarına katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** UTP. RAW 264.7. Makrofaj. Canlılık. MTT.

### Effects of UTP on Viability in RAW 264.7 Cell Line

### ABSTRACT

Macrophages are important cells of immune system and their deficiency or dysfunction lead to severe diseases. Uridine-5'-triphosphate, a pyrimidine nucleotide, is known to behave as a signaling molecule for macrophages. However, the effect of UTP on macrophage viability or proliferation is yet to be researched. Therefore, we investigated the effects of different concentrations (1, 10 and 100 µM) of UTP on RAW 264.7 mouse macrophage cell viability at different time points using MTT [(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)] assay. We found that while there was no difference among groups at 24 or 48 hours following UTP administration, cell viability was enhanced by 27.7% (p<0,001) compared to controls at 72 hours after 10 µM UTP administration. Interestingly, UTP at 100 µM concentration decreased cell viability significantly (p<0,05) compared to controls. Our findings reveal that UTP enhances macrophage viability in a dose- and time-dependent manner while higher concentrations provide toxic effects. Hence the present data suggest that UTP administered at appropriate concentrations may contribute to immune system functions through enhancing macrophage cell metabolism or proliferation in tissues.

**Key Words:** UTP. RAW 264.7. Macrophage. Viability. MTT.

**Geliş Tarihi:** 25.Temmuz.2022

**Kabul Tarihi:** 25.Ağustos.2022

Dr. Diğdem YÖYEN ERMIŞ  
Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
İmmünoloji Anabilim Dalı, Bursa  
Tel.: 0224 295 41 18  
E-posta: dyoyenermis@uludag.edu.tr

### Yazarların ORCID Bilgileri:

Erkan ERMIŞ: 0000-0001-5359-3477  
Zeynep CANSEV: 0000-0002-2360-7724  
Onur ETGÜ: 0000-0002-9689-3135  
Diğdem YÖYEN ERMIŞ: 0000-0001-5871-8769  
Barbaros ORAL: 0000-0003-0463-6818

İmmün sistem organizmaya yabancı organik ya da inorganik materyali tanımlayarak onlara karşı savunma tepkisi veren karmaşık bir yapıdır. Vücudun patojenik mikroorganizmalara karşı kendisini korumak ya da yabancı maddeleri veya kanser hücrelerini yok etmek amacıyla verdiği reaksiyonlar immün sistem komponentleri olan lenfoid organlar, immün hücreler, antikorlar ve sitokinlerin birlikte görev yaparak ortaya çıkardıkları yanıtlar ile şekillenir<sup>1</sup>. İmmünite canlıların çoğunda doğal (innate) ve kazanılmış (adaptive) immünite olmak üzere iki alt tipe görülür. Doğal immünite geniş bir yelpaze içinde pek çok uyarana karşı özgün olmayan bir koruma

sağlar iken kazanılmış immünite daha önce karşılaştığı hücre ya da molekülleri tanımlamayı öğrenmek suretiyle zararlı etkene karşı özgün bir yanıt oluşturur<sup>2</sup>.

İmmün sistem nötrofil, monosit, makrofaj, dendritik hücre, doğal öldürücü hücreler ve lenfosit hücrelerini içerir. Makrofajlar tüm dokularda bulunur ve karaciğerde Kupffer hücreleri, beyinde mikroglia ve akciğerlerde alveolar makrofaj gibi dokuya özgü isimler alırlar. Doğum öncesinde dokularda yerlerini alabildikleri<sup>3</sup> gibi, özellikle hastalık esnasında olmak üzere kandaki monositlerden farklılaşarak<sup>4</sup> dokulara yerleşebilirler. Makrofajlar konakçı savunmasına katkıda bulunmak üzere fagositoz yetenekleri sayesinde yabancı hücre ya da molekülleri tespit eder ve sindirirler<sup>5</sup>. Doğal immünitedeki rollerinin yanı sıra makrofajlar diğer immün hücreleri hasar alanına toplamak, lenfositlere antijen sunmak ve çeşitli kimyasal ve düzenleyici faktörleri ortama salıvermek suretiyle kazanılmış immünitede de görev alırlar.

Makrofajların solunum sistemi savunmasındaki önemini anlayabilmek için akciğerler ve hava yollarında sağladıkları immün cevaplar önemli örnekler olarak göze çarpmaktadır. Virüsler gibi hava yolu ile bulaşan patojenlere karşı ilk savunma hattını oluşturan makrofajlar fagositoz yöntemi ile hem virüsleri ve virüs ile enfekte olan hücreleri ortadan kaldırırlar hem de bu virüsleri immün sistemin diğer komponentlerine sunarlar; sonuç olarak viral enfeksiyon sınırlandırılır. Dolayısıyla makrofajlar immün sistemin önemli öğeleridir ve yoklukları ya da disfonksiyonları kronik granülomatoz hastalık<sup>6</sup> gibi ciddi sağlık problemlerine yol açabilir. Makrofaj sayısı ya da fonksiyonu kanser (örneğin, aplastik anemi) veya enfeksiyon (örneğin HIV) gibi hastalıklar ya da kanser kemoterapisi ya da steroid tedavisi gibi durumlardan olumsuz yönde etkilenebilir<sup>7</sup>. Bu tür durumlarda immün sistem yeterli koruma sağlayamaz ve kişinin enfeksiyonlara duyarlı hale gelmesine yol açabilir; örneğin, 1918 yılında ortaya çıkan İspanyol gribi pandemisinin etkeni olan H1N1 virüsünün makrofaj eksikliği halinde daha ölümcül bir enfeksiyona neden olduğu bildirilmiştir<sup>8</sup>.

Üridin-5'-trifosfat (UTP) dokularda bulunan bir pirimidin nükleotididir<sup>9</sup>. Temel olarak RNA sentezine katılmakla birlikte bir enerji kaynağı ve metabolik reaksiyonlarda substrat aktivatörü olarak da görev alır. UTP ayrıca bazı biyolojik etkilerini hücre yüzeylerinde bulunan P2Y2<sup>10</sup> ve P2Y4<sup>11</sup> reseptörlerini uyarmak suretiyle gösterir. Bu reseptörler uyarıldıklarında hücre içinde bağlı oldukları G proteinler aracılığıyla fosfolipaz C'yi aktive ederek diaçilgliserol (DAG) ve inositol trifosfat (IP3) düzeylerini ve dolayısıyla hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarını artırır<sup>12</sup>. UTP tarafından uyarılan P2Y2 ve P2Y14 reseptörlerinin makrofaj hücre membranlarındaki varlığı kanıtlanmıştır<sup>13</sup>.

Önceki çalışmalarda UTP'nin makrofajlarda iç ve dış elektriksel akımları indüklediği<sup>14</sup>, doku kalıntılarının fagositik temizlenmesi için bir sinyal molekülü gibi davranarak makrofajların toplanmasını sağladığı<sup>15</sup> ve kandaki monositlerin hasar alanına doğru yönlendirilmesini teşvik ettiği<sup>16</sup> bildirilmiştir.

Ancak bütün bu bilinenlere rağmen UTP'nin makrofaj canlılığı üzerine etkileri henüz incelenmemiştir. Dolayısıyla çalışmamızın amacı literatürde ilk defa UTP'nin RAW 264.7 fare makrofaj hücre kültüründe makrofaj canlılığı üzerine etkilerini incelemektir. Aynı zamanda etkinin doza ve zamana bağlı olup olmadığı araştırılmıştır.

## Gereç ve Yöntem

### Kimyasallar

Üridin-5'-trifosfat (Kat. No: U6875), sodyum dodesil sülfat (SDS; Kat. No: 11667289001) ve dimetilformamid (DMF; Kat. No: 227056) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından; Dulbecco's modifiye eagle medyum (DMEM; Kat. No: 30-2002), fetal sığır serumu (FBS; Kat. No: 30-2021), L-glutamin (Kat. No: 30-2214) ve penisilin-streptomisin solüsyonu (Kat. No: 30-2300) American Type Culture Collection (ATCC; Bethesda, MD, USA) firmasından; MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Kat. No: M6494] ise Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) firmasından temin edildi.

### RAW 264.7 Fare Makrofaj Hücre Hattı

Çalışmamızda kullanılan RAW 264.7 fare makrofaj hücre hattı Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı stoklarından temin edildi. Hücreler, 4mM L-glutamin + %1 penisilin-streptomisin solüsyonu ile %10 FBS içeren yüksek glukozlu DMEM besiyerinde kültüre edilerek 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren bir inkübatörde tutuldu. Hücreler iki günde bir *scrapper* ile pasajlandı ve %80-90 konfluense ulaştıklarında deneyler gerçekleştirildi.

### Hücre canlılığının değerlendirilmesi

UTP'nin RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromür] yöntemi kullanılarak belirlendi. RAW 264.7 hücreleri, 50 µL hücre kültürü ortamında 96 kuyucuklu mikropalakalara 15x10<sup>3</sup> hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi ve 24 saat inkübe edildi. Takiben steril salin (%0,9 NaCl; serum fizyolojik) içerisinde çözdürülen UTP, kültür ortamına 50 µL hacimde son konsantrasyonu 1, 10 veya 100 µM olacak şekilde eklendi. Kontrol olarak aynı hacimde salin kullanıldı. Salin (kontrol) veya UTP ile 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonun ardından her bir kuyucuğa 25 µL MTT (5 mg/mL) solüsyonu eklendi ve plakalar formazan kristallerinin canlı hücreler tarafından oluşturulmasına izin vermek için 4 saat

## UTP'nin Raw 264.7 Hücrelerinin Canlılığına Etkileri

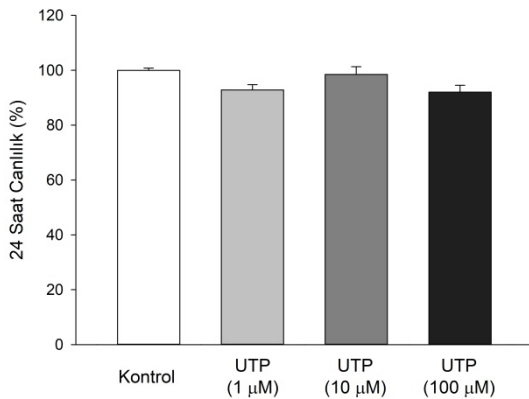
daha 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübe edildi. Daha sonra MTT içeren ortam uzaklaştırıldı ve formazan kristallerini çözmek için kuyucuklara 80 µL hacminde %23 SDS ve %45 DMF içeren lizis solüsyonu eklenerek hücreler bir gece inkübe edildi. Her bir kuyunun optik yoğunluğu (OD) spektrofotometrik olarak bir mikropilaya okuyucu (µQuant, Biotek, Winooski, VT, USA) ile 570 nm'de okundu. Hücre canlılığı, kontrol hücrelerinden elde edilen OD değerlerine kıyasla hesaplanan yüzde değişim olarak hesaplandı.

### İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler altı tekrarlı yapıldı ve sonuçlar ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel hesaplamalar, Sigma Plot V.12 yazılımı kullanılarak yapıldı. Verilerin dağılımı Shapiro Wilk Testi ile değerlendirildi. Normal dağılımlı veriler parametrik Tek-Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) testini takiben post-hoc Tukey testi ile analiz edildi. Normal dağılıma uymayan veriler nonparametrik Kruskal-Wallis testini takiben Bonferonni düzeltmesi ile post-hoc Dunn's testi kullanılarak değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi  $\alpha=0,05$  olarak belirlendi.

## Bulgular

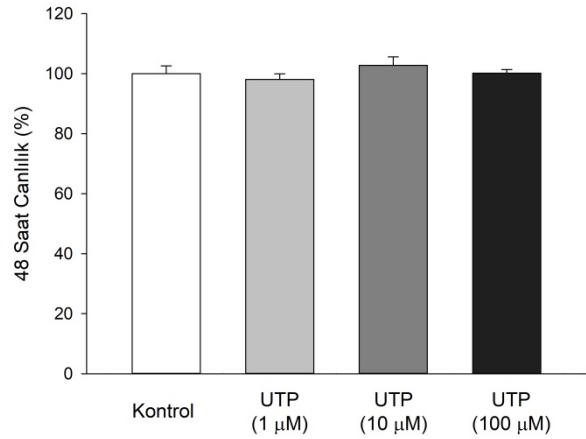
UTP uygulamasını takiben 24 saat inkübe edilen hücrelerin kontrole (%99,9±2,1) göre canlılığı 1, 10 ve 100 µM UTP için sırasıyla %92,8±1,9, %98,5±2,5 ve %92,1±2,4 olarak gerçekleşti (Şekil 1). Kontrol ve UTP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.



### Şekil 1.

Farklı konsantrasyonlarda UTP uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde 24 saat sonra canlılık analizi.

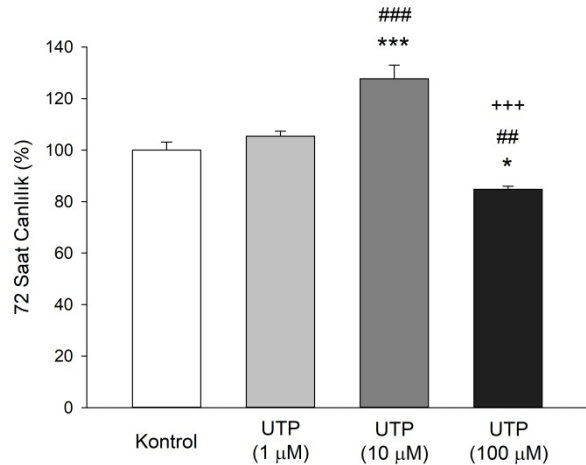
UTP uygulamasını takiben 48 saat inkübe edilen hücrelerin kontrole (%100±2,5) göre canlılığı 1, 10 ve 100 µM UTP için sırasıyla %98,1±1,8, %102,8±2,8 ve %100,2±1,1 olarak gerçekleşti (Şekil 2). Kontrol ve UTP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir bulunamadı.



### Şekil 2.

Farklı konsantrasyonlarda UTP uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde 48 saat sonra canlılık analizi.

UTP uygulamasını takiben 72 saat inkübe edilen hücrelerin kontrole (%99,9±3,1) göre canlılığı 1, 10 ve 100 µM UTP için sırasıyla %105,5±1,8, %127,7±5,2 ve %84,7±1,2 olarak gerçekleşti (Şekil 3). Bu sonuçlara göre 10 µM UTP uygulamasının hücre canlılığını kontrole ( $p<0,001$ ) ve 1 µM UTP uygulamasına ( $p<0,001$ ) kıyasla anlamlı olarak artırdığı tespit edildi. Bunun yanı sıra, 100 µM UTP uygulamasının hücre canlılığını kontrole ( $p<0,05$ ), 1 µM UTP uygulamasına ( $p=0,001$ ) ve 10 µM UTP uygulamasına ( $p<0,001$ ) göre anlamlı olarak azalttığı bulundu.



### Şekil 3.

Farklı konsantrasyonlarda UTP uygulanan RAW 264.7 hücrelerinde 72 saat sonra canlılık analizi. \* $p<0,05$  ve \*\*\* $p<0,001$ , kontrole kıyasla; ## $p<0,01$  ve ### $p<0,001$  UTP'nin 1 µM konsantrasyonuna kıyasla; +++ $p<0,001$  UTP'nin 10 µM konsantrasyonuna kıyasla.

## Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada literatürde ilk kez farklı konsantrasyonlarda uygulanan UTP'nin RAW264.7 makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri zamana dayalı olarak incelenmiştir. Sonuçlarımız UTP uygulamasından 24 ve 48 saat sonra makrofaj hücre canlılığında anlamlı bir değişikliğin olmadığını ancak 72 saat sonra 10 µM UTP ile hücre canlılığının kontrole kıyasla %27,7 oranında arttığını göstermiştir. İlginç olarak 100 µM konsantrasyonda uygulanan UTP 72 saat sonra hücre canlılığını kontrole göre %15,3 oranında azaltmıştır. Bu sonuçlar UTP'nin RAW264.7 makrofaj hücrelerinin canlılığını doza ve zamana bağlı olarak artırdığını ancak kullanılan yüksek dozda sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

İmmün sistem birbiriyle ilişkili pek çok elemandan oluşan karmaşık bir yapıdır. İmmün sistem bileşenleri olan lenfoid organlar, immün hücreler, antikorlar ve sitokinler birlikte görev yaparak vücudun patojenik mikroorganizmalara karşı kendisini korumak ya da yabancı maddeleri veya kanser hücrelerini yok etmek amacıyla çeşitli yanıtlar oluştururlar<sup>1</sup>. Makrofajlar bu sistemin önemli bileşenlerinden biridir ve özellikle dokularda zararlı organik ya da inorganik maddelere/organizmalara karşı ilk savunma hattını oluştururlar<sup>5</sup>. Makrofaj sayısı ya da fonksiyonu çeşitli hastalık ya da kronik ilaç kullanımı gibi durumlardan etkilenmektedir<sup>7</sup> ve makrofaj eksikliği hastalıkların daha ölümcül seyretmesine neden olabilir<sup>8</sup>. Dolayısıyla vücutta makrofaj sayısı ve fonksiyonunun optimum düzeylerde korunması hastalıkların önlenmesi ve ortadan kaldırılması için önemli bir faktördür.

Pirimidinler endojen olarak bulunan bir grup aromatik heterosiklik organik bileşiktir. Pirimidin bileşikleri azotlu baz (sitozin, timin veya urasil), bu baza eklenen riboz halkası ile oluşan nükleozid (sitidin, timidin veya üridin) ve nükleozide eklenen fosfat grupları ile oluşan nükleotidleri (örneğin, üridin-5'-trifosfat) kapsar. Üridin-5'-trifosfat (UTP) dokularda bulunup RNA'nın yapısına katılan ve aynı zamanda bir enerji kaynağı ve metabolik reaksiyonlarda substrat aktivatörü olarak görev alan bir pirimidin nükleotididir<sup>9</sup>. Bu özelliklerinin yanı sıra hücre membranlarında lokalize P2Y2<sup>10</sup> ve P2Y4<sup>11</sup> reseptörlerini uyarmak suretiyle çeşitli biyolojik fonksiyonların ortaya çıkmasını indükler. Bu reseptörlerin aktivasyonu aracılığıyla UTP'nin arteriyel vazodilatasyon sağladığı<sup>17</sup>, kardiyomiyositlerde pozitif inotropik etkiler gösterdiği<sup>18</sup>, sinir hücrelerinin dallanmalarını artırdığı<sup>19</sup>, beyin hücrelerinden asetilkolin salıverilmesini teşvik ettiği<sup>20</sup> ve havayolu epitelinde iyon transportunu düzenlediği<sup>21</sup> bildirilmiştir.

İmmün sistem ile ilişkili önceki çalışmalarda UTP'nin makrofajlarda iç ve dış elektriksel akımları indüklediği<sup>14</sup>, doku kalıntılarının fagositik temizlenmesi için bir sinyal molekülü gibi davranarak makrofajların toplanmasını sağladığı<sup>15</sup> ve kandaki monositlerin hasar alanına doğru yönlendirilmesini teşvik ettiği<sup>16</sup> bildirilmiş olmasına rağmen makrofaj canlılığı üzerine etkileri henüz incelenmemiştir. Dolayısıyla çalışmamızda literatürde ilk defa UTP'nin RAW 264.7 fare makrofaj hücre kültüründe makrofaj canlılığı üzerine etkileri incelenmiş, etkinin doza ve zamana göre değişimleri analiz edilmiştir.

Kültürdeki RAW 264.7 fare makrofaj hücre canlılığı kolorimetrik MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid] testi ile tespit edilmiştir. Bu test hücre canlılığı, proliferasyonu ve toksisitenin bir göstergesi olarak hücre metabolik aktiviteyi ölçmek için kullanılır<sup>22</sup>. Sarı renkli MTT boyasının hücre metabolizması tarafından mor renkli formazana indirgenmesi prensibine dayanır<sup>23</sup>. MTT testinde herhangi bir girişim ya da tedaviye dayalı optik yoğunluk artışı hücre metabolizmasında veya proliferasyonunda bir artışa işaret ederken, optik yoğunluk azalması ise sitotoksikite göstergesidir<sup>24</sup>. Hücre sayısı, MTT konsantrasyonu ve inkübasyon süresi gibi faktörler bu testin geçerlilik ve güvenilirliğini bir miktar etkiliyor olsa da, MTT testi halen hücre canlılığı, proliferasyon ve toksisite analizleri için en yaygın kullanılan testlerdendir<sup>24</sup>.

Önceki çalışmalarda çeşitli ajanların RAW 264.7 makrofaj hücreleri üzerinde sitotoksikite ve canlılığa etkileri araştırılmıştır. Platin nanopartiküller<sup>25</sup>, beyaz dut yaprak ekstresi<sup>26</sup>, bafilomisin A1 ve konkanamisin A<sup>27</sup> gibi ajanların canlılık/sitotoksikite etkileri kültürdeki makrofajları aktive edecek herhangi bir müdahale yapılmadan çalışılmıştır. Potansiyel tedavi ajanlarının antiinflamatuvar etkinliklerinin araştırıldığı çalışmalarda<sup>28,29</sup> ise kültürdeki RAW 264.7 makrofaj hücreleri bakteriyel lipopolisakkarit<sup>30</sup> (LPS) gibi ajanlarca aktive edilmiştir. Monosit ve makrofajlar üzerindeki etkilerine dair önceki bilinenlerin<sup>14-16</sup> ışığında bu çalışmanın temel amacı UTP'nin makrofaj canlılığı ve dolayısıyla hücre metabolizması veya proliferasyonunu incelemek olduğundan bizim çalışmamızda makrofajlar LPS ile indüklenmemiştir. Ancak ileriki çalışmalarda UTP'nin bu anlamda incelenmesi literatüre önemli katkılar sağlayacaktır. Ayrıca diğer pirimidin nükleozid ve nükleotidlerinin benzer etkinliklerinin araştırılması yeni ve önemli bilgiler ortaya çıkaracaktır.

Sonuç olarak bu çalışmada literatürde ilk kez kültürdeki RAW 264.7 makrofaj hücreleri kullanılmak suretiyle farklı dozlarda uygulanan UTP'nin canlılık üzerine etkileri farklı zaman aralıklarında incelenmiştir. Çalışmada elde edilen bulgular 72 saatlik inkübasyon sonrası 10 µM konsantrasyonda uygulanan UTP'nin hücre canlılığını kontrole kıyasla

## UTP'nin Raw 264.7 Hücrelerinin Canlılığına Etkileri

anamlı olarak artırdığını ancak 100 µM konsantrasyonda uygulanan UTP'nin aynı zaman aralığında hücreler üzerinde toksik etkisi olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar UTP'nin RAW264.7 makrofaj hücrelerinin canlılığını doza ve zamana bağlı olarak artırdığını ancak kullanılan yüksek dozda sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Dolayısıyla elde ettiğimiz veriler, doğru dozda uygulanan UTP'nin dokularda makrofaj hücre metabolizmasını ya da proliferasyonunu artırarak immün sistem fonksiyonlarına katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

### Etik Kurul Onay Bilgisi:

Hücre kültürü çalışması olduğundan dolayı etik kurul izni gerekmemektedir.

### Araştırmacı Katkı Beyanı:

Fikir ve tasarım: E.E., D.Y.E., H.B.O.; Veri toplama ve işleme: E.E., Z.C. O.E., D.Y.E.; Analiz ve verilerin yorumlanması: E.E., D.Y.E., H.B.O.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: E.E., D.Y.E., H.B.O.

### Destek ve Teşekkür Beyanı:

Hücre kültürü çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Dr. İzel Yılmaz'a teşekkür ederiz.

### Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarlarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

## Kaynaklar

1. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet* 2001;357(9270):1777–1789.
2. Netea MG, Schlitzer A, Placek K, Joosten LAB, Schultze JL. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host Microbe* 2019;25(1):13–26.
3. Perdiguer EG, Geissmann F. The development and maintenance of resident macrophages. *Nat Immunol* 2016;17(1):2–8.
4. Pittet MJ, Nahrendorf M, Swirski FK. The journey from stem cell to macrophage. *Ann N Y Acad Sci* 2014;1319(1):1–18.
5. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* 2014;41(1).
6. Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol* 2003;15(5):578–584.
7. Nazir T, Taha N, Islam A, Abraham S, Mahmood A, Mustafa M. Monocytopenia; induction by vinorelbine, cisplatin and doxorubicin in breast, non-small cell lung and cervix cancer patients. *Int J Heal Sci* 2016;10(4).
8. Tumpey TM, García-Sastre A, Taubenberger JK, Palese P, Swayne DE, Pantin-Jackwood MJ, Schultz-Cherry S, Solórzano A, Van Rooijen N, Katz JM, et al. Pathogenicity of Influenza Viruses with Genes from the 1918 Pandemic Virus: Functional Roles of Alveolar Macrophages and Neutrophils in Limiting Virus Replication and Mortality in Mice. *J Virol* 2005;79(23).
9. Traut TW. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem* 1994;140(1):1–22.
10. Lustig KD, Shiau AK, Brake AJ, Julius D. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 90. 1993. p. 5113–5117.
11. Communi D, Piroton S, Parmentier M, Boeynaems JM. Cloning and functional expression of a human uridine nucleotide receptor. *J Biol Chem* 1995;270(52):30849–30852.
12. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, et al. International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: From molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 2006;58(3):281–341.
13. Merz J, Nettesheim A, von Garlen S, Albrecht P, Saller BS, Engelmann J, Hertle L, Schäfer I, Dimanski D, König S, et al. Pro- and anti-inflammatory macrophages express a sub-type specific purinergic receptor profile. *Purinergic Signal* 2021;17(3):481–492.
14. Albuquerque C, Oliveira SMC, Coutinho-Silva R, Oliveira-Castro GM, Persechini PM. ATP- and UTP-induced currents in macrophages and macrophage polykaryons. *Am J Physiol - Cell Physiol* 1993;265(6 34-6):C1663-73.
15. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 2009;461(7261):282–286.
16. Higgins KR, Kovacevic W, Stokes L. Nucleotides regulate secretion of the inflammatory chemokine CCL2 from human macrophages and monocytes. *Mediators Inflamm* 2014;2014(2014):293925.
17. Wihlborg AK, Malmjö M, Eyjolfsson A, Gustafsson R, Jacobson K, Erlinge D. Extracellular nucleotides induce vasodilatation in human arteries via prostaglandins, nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarising factor. *Br J Pharmacol* 2003;138(8):1451–1458.
18. Wihlborg AK, Balogh J, Wang L, Borna C, Dou Y, Joshi B V., Lazarowski E, Jacobson KA, Arner A, Erlinge D. Positive inotropic effects by uridine triphosphate (UTP) and uridine diphosphate (UDP) via P2Y2 and P2Y6 receptors on cardiomyocytes and release of UTP in man during myocardial infarction. *Circ Res* 2006;98(7):970–976.
19. Pooler AM, Guez DH, Benedictus R, Wurtman RJ. Uridine enhances neurite outgrowth in nerve growth factor-differentiated pheochromocytoma cells. *Neuroscience* 2005;134(1):207–214.
20. Cansev M, Orhan F, Yaylagul EO, Isik E, Turkyilmaz M, Aydın S, Gumus A, Sevinc C, Coskun N, Ulus IH, et al. Evidence for the existence of pyrimidineric transmission in rat brain. *Neuropharmacology* 2015;91.
21. Namkung W, Finkbeiner WE, Verkman AS. CFTR-adenylyl cyclase I association responsible for UTP activation of CFTR in well-differentiated primary human bronchial cell cultures. *Mol Biol Cell* 2010;21(15):2639–2648.
22. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65(1–2):55–63.
23. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem* 2018;120(3):159–167.
24. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *Int J Mol Sci* 2021;22(23):12827.
25. Loan TT, Do LT, Yoo H. Platinum Nanoparticles Induce Apoptosis on Raw 264.7 Macrophage Cells. *J Nanosci Nanotechnol* 2017;18(2):861–864.
26. Kwon DH, Cheon JM, Choi E-O, Jeong JW, Lee KW, Kim KY, Kim SG, Kim S, Hong SH, Park C, et al. The Immunomodulatory Activity of Mori folium, the Leaf of Morus alba L., in RAW 264.7 Macrophages In Vitro. *J Cancer Prev* 2016;21(3):144–151.
27. Hong J, Nakano Y, Yokomakura A, Ishihara K, Kim S, Kang YS, Ohuchi K. Nitric oxide production by the vacuolar-type (H<sup>+</sup>)-ATPase inhibitors bafilomycin A1 and concanamycin A

- and its possible role in apoptosis in RAW 264.7 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;319(2):672–681.
28. Soromou LW, Zhang Z, Li R, Chen N, Guo W, Huo M, Guan S, Lu J, Deng X. Regulation of inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage by 7-O-methyl-naringenin. *Molecules* 2012;17(3):3574–3585.
29. Yang EJ, Kim JG, Kim JY, Kim SC, Lee NH, Hyun CG. Anti-inflammatory effect of chitosan oligosaccharides in RAW 264.7 cells. *Cent Eur J Biol* 2010;5(1):95–102.
30. Yoon S Bin, Lee YJ, Park SK, Kim HC, Bae H, Kim HM, Ko SG, Choi HY, Oh MS, Park W. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol* 2009;125(2):286–290.