

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***CAPPARIS OVATA*'DAN ELDE EDİLEN MSCOV, ALT  
EKSTRELERİ VE SAF BİLEŞİKLERİN MULTİPL SKLEROZ  
ÜZERİNE ETKİLERİ-MOLEKÜLER MEKANİZMALAR**

**DOKTORA TEZİ**

**ÖZDEN ÖZGÜN ACAR**

**DENİZLİ, ARALIK - 2017**

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



***CAPPARİS OVATA*'DAN ELDE EDİLEN MSCOV, ALT  
EKSTRELERİ VE SAF BİLEŞİKLERİN MULTİPL SKLEROZ  
ÜZERİNE ETKİLERİ-MOLEKÜLER MEKANİZMALAR**

**DOKTORA TEZİ**

**ÖZDEN ÖZGÜN ACAR**

**DENİZLİ, ARALIK - 2017**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

**ÖZDEN ÖZGÜN ACAR** tarafından hazırlanan “*CAPPARIS OVATA*’DAN ELDE EDİLEN MSCOV, ALT EKSTRELERİ VE SAF BİLEŞİKLERİN MULTİPL SKLEROZ ÜZERİNE ETKİLERİ-MOLEKÜLER MEKANİZMALAR” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 01.12.2017 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

PROF. DR. ALAATTİN ŞEN

.....

Üye

PROF. DR. GÜLAÇTI TOPÇU

.....

Üye

PROF. DR. BEKİR UĞUR ERGÜR

.....

Üye

PROF. DR. NAZİME MERCAN DOĞAN

.....

Üye

YRD. DOÇ. DR. ASLI SEMİZ

.....

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun  
..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. UĞUR YÜCEL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**Bu tez alışması TÜBİTAK VE PA-BAP tarafından 112S187 ve 2014FBE051 nolu projeler ile desteklenmiştir.**

**Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.**

**ÖZDEN ÖZGÜN ACAR**

## ÖZET

**CAPPARIS OVATA'DAN ELDE EDİLEN MSCOV, ALT EKSTRELERİ VE  
SAF BİLEŞİKLERİN MULTİPL SKLEROZ ÜZERİNE ETKİLERİ-  
MOLEKÜLER MEKANİZMALAR  
DOKTORA TEZİ  
ÖZDEN ÖZGÜN ACAR  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ALAATTİN ŞEN)

DENİZLİ, ARALIK - 2017

Multipl skleroz (MS) hala etiyolojisi tam olarak bilinmemekle beraber genetik ve çevresel faktörler tarafından tetiklenen, immün bozukluğunun neden olduğu, merkezi sinir sisteminin kronik, enflamatuvar ve demiyelinizan bir hastalığıdır. Günümüzde MS tedavisi için kullanılan mevcut ilaçların kullanımları ile karşılaşılan sıkıntı, tam tedavi etmeni olmamaları ve yan etkilerden dolayı MS için alternatif tedavi ajanlarının saptanması ve ilaç geliştirilmesi çalışmaları devam etmektedir. Bu çalışmada öncelikle *Capparis ovata*'dan elde edilen MSCov ekstresinin deneysel MS modeli olan Deneysel Alerjik Ensefalomiyelit (DAE) oluşturulan C57BL/6 farelerde, hem klinik skorlama hem de saptanan MS ilişkili 20 genin ifade düzeylerine olan etkileri analiz edildi. MSCov ile tedavi edilen DAE hayvanların hem klinik skorları ve hem de moleküler gen ifade düzeyleri, hastalığın kontrol hayvanlarına benzer şekilde geri döndüğünü teyit etti. Daha sonra saptanan bu etkinin ilişkili olduğu molekül ya da moleküllerin tanımlanması için MSCov ekstresinin fraksiyonlanması sürecinde saflaştırılan ve tanımlanan bileşiklerin SH-SY5Y nöroblastoma, CCRF-CEM lenfoblastoma ve fare primer oligodendrosit hücrelerinde moleküler gen ifade değişiklikleri analiz edildi. *Capparis ovata* bitkisinden ya da ana MSCov ekstresinden projede üç alt ekstre ve yedi saf bileşik (sekonder metabolit) saflaştırıldı ve karakterize edildi. Sonuçlar izole edilen ve saflaştırılan bileşikler arasından olean-12-en-28-ol, 3 $\beta$ -pentakosanoat (3 $\beta$ -hidroksi-olean-12-en-28-ol, 3- $\beta$ -pentakosanoik ester) (OPC) ve stigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -miristat (SDM) bileşiklerinin anti-nöroenflamatuvar ve miyelin oluşumunu uyarıcı etkiler göstermesi nedeniyle; MSCov ile gözlenen etkilerden sorumlu olabilecek, önemli terapötik ajan potansiyeli taşıdığını gösterdi. Diğer bileşiklerin MS için etkin olma özellikleri oluşturmadıkları saptandı.

**ANAHTAR KELİMELER:** Multipl skleroz, MSCov, *Capparis ovata*, Saf bileşik

## ABSTRACT

### EFFECTS OF THE MSCOV, SUB-EXTRACTS AND PURE COMPOUNDS OBTAINED FROM *CAPPARIS OVATA* ON MULTIPLE SCLEROSIS- MOLECULAR MECHANISMS

PH.D THESIS

ÖZDEN ÖZGÜN ACAR

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. ALAATTİN ŞEN)

DENİZLİ, DECEMBER 2017

Multiple sclerosis (MS), though its etiology is still unclear but is known to be triggered by genetic and environmental factors, is an autoimmune disorder with inflammation and demyelination of central nervous system. Today, due to the incomplete cure and side effects of current drugs used for the treatment of MS, studies for the development of new and alternative therapeutic agents for MS is in progress. In this study, first, the plant extract obtained from *Capparis ovata* (MSCov) was tested in the experimental animal model of MS, that is the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) on C57BL/6 mice, by studying both clinical scoring and the levels of the expression of 20 genes whose expression levels were shown to be associated with MS. EAE animals treated with the MSCov, the disease was ameliorated and returned almost back to normal status which was confirmed by both clinical scoring and molecular gene expression analysis. Then, in order to identify the molecule or molecules that are responsible for these observed outcomes, the effect of the purified compounds obtained during the fractionation of the MSCov extract on the gene expression at the molecular level in SH-SY5Y neuroblastoma, CCRF-CEM lymphoblastoma, and mouse primary oligodendrocyte cells were analyzed. Three sub-extracts and seven pure compounds (secondary metabolites) were purified either from MSCov or *Capparis ovata* plant parts and structurally elucidated. Results have shown that olean-12-en-28-ol, 3 $\beta$ -pentacosanoate (3 $\beta$ -hydroxy-oleane-12-en-28-ol, 3- $\beta$ -pentacosanoic ester) (OPC) and stigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -myristate (SDM) which are among the isolated and purified compounds analyzed exhibited anti-neuroinflammatory, immune suppressive and stimulate the regeneration of myelin. In conclusion, it is suggested that OPC and SDM were identified as being potentially important therapeutic agents for MS treatment. On the other hand, other compounds were found to be non-effective for MS treatment.

**KEYWORDS:** Multiple sclerosis, MSCov, *Capparis ovata*, Pure compound

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

|  |              |
|--|--------------|
| <b>ÖZET</b> .....  | <b>i</b>     |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>ii</b>    |
| <b>İÇİNDEKİLER</b> .....   | <b>iii</b>   |
| <b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....   | <b>vii</b>   |
| <b>TABLO LİSTESİ</b> .....   | <b>xxii</b>  |
| <b>SEMBOL LİSTESİ</b> .....  | <b>xxiii</b> |
| <b>ÖNSÖZ</b> .....   | <b>xxiv</b>  |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....  | <b>1</b>     |
| 1.1    Multipl Skleroz (MS) .....  | 2            |
| 1.2    Multipl Skleroz'un İnsidans ve Prevalansı.....  | 3            |
| 1.3    Multipl Skleroz'un Etiyolojisi.....   | 4            |
| 1.4    Multipl Skleroz Patogenezi .....  | 8            |
| 1.5    Multipl Skleroz Tedavisinde Kullanılan FDA Tarafından<br>Onaylanmış İlaçlar .....   | 10           |
| 1.6    Multipl Skleroz Tedavisinde Kullanılan Alternatif Yöntemler.....  | 13           |
| 1.7 <i>Capparis ovata</i> (Kapari).....  | 15           |
| 1.8    Tezin Amacı .....   | 16           |
| <b>2. MATERYAL VE METHOD</b> .....   | <b>17</b>    |
| 2.1    Materyal.....   | 17           |
| 2.1.1    Çalışmada Kullanılan Kimyasallar .....  | 17           |
| 2.1.1    Çalışmada Kullanılan Cihazlar .....   | 18           |
| 2.2    Method.....   | 18           |
| 2.2.1 <i>Capparis ovata</i> Su Ekstresinin (MSCov) Hazırlanması.....   | 18           |
| 2.2.2 <i>Capparis ovata</i> Su Ekstresinin (MSCov) Fraksiyonlanması.....   | 19           |
| 2.2.2.1 <i>Capparis ovata</i> Su Ekstresinin (MSCov) ve Bundan Organik<br>Çözücülerle Tüketilerek Geri Ekstraksiyon Yolu İle Diğer Ekstrelerin<br>Hazırlanması ..... | 19           |
| 2.2.3    Hayvan Deneyleri .....  | 20           |
| 2.2.3.1    MS Modeli (DAE) Çalışmaları .....   | 20           |
| 2.2.3.1.1    MSCov Ekstresinin DAE Oluşturulan Hayvanlara<br>Verilmesi .....   | 21           |
| 2.2.3.1.2    Dokuların Temini.....   | 21           |
| 2.2.3.2    MS Dizin (Array) Analizleri .....   | 22           |
| 2.2.3.2.1    Beyin Dokusundan RNA İzolasyonu.....  | 22           |
| 2.2.3.2.2    Total RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi İle<br>Görüntülenmesi .....  | 23           |
| 2.2.3.2.3    cDNA Sentezi .....  | 24           |
| 2.2.4    Hücre Kültürü Çalışmaları.....  | 25           |
| 2.2.4.1    Besiyeri Hazırlanışı ve Hücrelerin Büyütülmesi .....  | 25           |
| 2.2.4.2    Tripan Mavisi .....   | 25           |
| 2.2.4.3    Hücrelerin Pasajlanması.....  | 26           |
| 2.2.4.4    Sitotoksosite Çalışmaları .....   | 26           |
| 2.2.4.5    Hücrelere Bileşiklerin Uygulanması .....  | 27           |
| 2.2.4.6    Hücrelerden RNA İzolasyonu .....  | 28           |
| 2.2.4.7    cDNA Sentezi.....   | 29           |



|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.4.8 mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi: Gerçek Zamanlı PZR .....   | 29        |
| 2.2.5 İstatistiksel Analiz .....  | 32        |
| <b>3. SONUÇLAR.....</b>   | <b>33</b> |
| 3.1 <i>Capparis ovata</i> Saf Bileşik İzolasyonu .....  | 33        |
| 3.2 Deneysel Alerjik Ensefalomiyelit (DAE) Çalışmaları .....  | 35        |
| 3.2.1 Hayvanlarda DAE Oluşturulması .....   | 35        |
| 3.2.2 MS Dizin Analizleri.....  | 36        |
| 3.3 Hücre Kültürü Çalışmaları .....   | 41        |
| 3.3.1 SH-SY5Y Hücrelerinde Yapılan Çalışmalar .....   | 42        |
| 3.3.1.1 SH-SY5Y Hücrelerinde MSCov Ekstresi Çalışmaları.....  | 42        |
| 3.3.1.1.1 MSCov Sitotoksisite Çalışması .....   | 42        |
| 3.3.1.1.2 MSCov Ekstresinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi .....   | 43        |
| 3.3.1.2 SH-SY5Y Hücrelerinde MSCov Diklorometan Alt Ekstresi Çalışmaları .....  | 47        |
| 3.3.1.2.1 Diklorometan Alt Ekstresi Sitotoksisite Çalışması.....  | 47        |
| 3.3.1.2.2 Diklorometan Alt Ekstresinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi .....  | 48        |
| 3.3.1.3 SH-SY5Y Hücrelerinde Etil Asetat Alt Ekstresi Çalışmaları .....   | 54        |
| 3.3.1.3.1 Etil Asetat Alt Ekstresinin Sitotoksisite Çalışması.....  | 54        |
| 3.3.1.3.2 Etil Asetat Alt Ekstresinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi .....   | 55        |
| 3.3.1.4 SH-SY5Y Hücrelerinde n-bütanol Alt Ekstresi Çalışmaları.....  | 61        |
| 3.3.1.4.1 n-bütanol Alt Ekstresi Sitotoksisite Çalışması.....   | 61        |
| 3.3.1.4.2 n-bütanol Alt Ekstresinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi .....   | 62        |
| 3.3.1.5 SH-SY5Y Hücrelerinde 1H-indol-2-hidroksi, 3-karboksilik asit Saf Bileşiği Çalışmaları.....  | 68        |
| 3.3.1.5.1 1H-indol-2-hidroksi, 3-karboksilik asit Sitotoksisite Çalışması .....   | 68        |
| 3.3.1.5.2 1H-indol-2-hidroksi, 3-karboksilik asit Saf Bileşiğinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi .....                         | 69        |
| 3.3.1.6 SH-SY5Y Hücrelerinde Glukokapparin Saf Bileşiği Çalışmaları .....   | 75        |
| 3.3.1.6.1 Glukokapparin Sitotoksisite Çalışması.....  | 75        |
| 3.3.1.6.2 Glukokapparin Saf Bileşiğinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi .....   | 76        |
| 3.3.1.7 SH-SY5Y Hücrelerinde Olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat Saf Bileşiği Çalışmaları.....  | 82        |
| 3.3.1.7.1 Olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat Saf Bileşiği Sitotoksisite Çalışması.....   | 82        |
| 3.3.1.7.2 Olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat Saf Bileşiğinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi .....                             | 83        |
| 3.3.1.8 SH-SY5Y Hücrelerinde Olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat Saf Bileşiği ve Rutin Paralel Uygulaması Çalışmaları .....   | 89        |
| 3.3.1.8.1 Rutin Sitotoksisite Çalışması.....  | 89        |
| 3.3.1.8.2 Olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat Saf Bileşiği ve Rutin Paralel Uygulamasının SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi ..... | 90        |

|   |     |
|---|-----|
| 3.3.1.9 SH-SY5Y Hücrelerinde Oleanolik Asit Saf Bileşiği Çalışmaları .....  | 96  |
| 3.3.1.9.1 Oleanolik Asit Saf Bileşiği Sitotoksisite Çalışması.....  | 96  |
| 3.3.1.9.2 Oleanolik Asit Saf Bileşiğinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi .....                          | 97  |
| 3.3.1.10 SH-SY5Y Hücrelerinde Stigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -miristat Saf Bileşiği Çalışmaları .....   | 103 |
| 3.3.1.10.1 Stigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -miristat Saf Bileşiği Sitotoksisite Çalışması .....  | 103 |
| 3.3.1.10.2 Stigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -miristat Saf Bileşiğinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi ..... | 104 |
| 3.3.1.11 SH-SY5Y Hücrelerinde Ursolik Asit Saf Bileşiği Çalışmaları..   | 110 |
| 3.3.1.11.1 Ursolik Asit Saf Bileşiği Sitotoksisite Çalışması .....  | 110 |
| 3.3.1.11.2 Ursolik Asit Saf Bileşiğinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi .....                           | 111 |
| 3.3.1.12 SH-SY5Y Hücrelerinde $\beta$ -Sitosterol Saf Bileşiği Çalışmaları ..   | 117 |
| 3.3.1.12.1 $\beta$ -Sitosterol Saf Bileşiği Sitotoksisite Çalışması .....   | 117 |
| 3.3.1.12.2 $\beta$ -Sitosterol Saf bileşiğinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi .....                    | 118 |
| 3.3.2 CCRF-CEM Hücrelerinde Yapılan Çalışmalar .....  | 124 |
| 3.3.2.1 CCRF-CEM Hücrelerinde MSCov Ekstresi Çalışmaları.....   | 124 |
| 3.3.2.1.1 MSCov Sitotoksisite Çalışması .....   | 124 |
| 3.3.2.1.2 MSCov Ekstresinin CCRF-CEM Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi .....                                      | 125 |
| 3.3.2.2 CCRF-CEM Hücrelerinde Diklorometan Alt Ekstresi Çalışmaları .....   | 128 |
| 3.3.2.2.1 Diklorometan Alt Ekstresi Sitotoksisite Çalışması.....  | 128 |
| 3.3.2.2.2 Diklorometan Alt Ekstresinin CCRF-CEM Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi .....                           | 129 |
| 3.3.2.3 CCRF-CEM Hücrelerinde Etil Asetat Alt Ekstresi Çalışmaları .....  | 132 |
| 3.3.2.3.1 Etil Asetat Alt Ekstresi Sitotoksisite Çalışması.....   | 132 |
| 3.3.2.3.2 Etil Asetat Alt Ekstresinin CCRF-CEM Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi .....                            | 133 |
| 3.3.2.4 CCRF-CEM Hücrelerinde n-bütanol Alt Ekstresi Çalışmaları..  | 136 |
| 3.3.2.4.1 n-bütanol Alt Ekstresi Sitotoksisite Çalışması.....   | 136 |
| 3.3.2.4.2 n-bütanol Alt Ekstresinin CCRF-CEM Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi .....                              | 137 |
| 3.3.3 Fare Primer Oligodendrosit Hücrelerinde Yapılan Çalışmalar.....   | 140 |
| 3.3.3.1 Fare Primer Oligodendrosit Hücrelerinde MSCov Ekstresi Çalışmaları .....  | 140 |
| 3.3.3.1.1 MSCov Ekstresinin Fare Primer Oligodendrosit Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi .....                    | 140 |
| 3.3.3.2 Fare Primer Oligodendrosit Hücrelerinde Diklorometan Alt Ekstresi Çalışmaları .....   | 146 |
| 3.3.3.2.1 Diklorometan Alt Ekstresinin Fare Primer Oligodendrosit Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi .....         | 146 |
| 3.3.3.3 Fare Primer Oligodendrosit Hücrelerinde Etil Asetat Alt Ekstresi Çalışmaları .....  | 152 |

|  |            |
|--|------------|
| 3.3.3.3.1 Etil Asetat Alt Ekstresinin Fare Primer Oligodendrosit Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi ..... | 152        |
| 3.3.3.4 Fare Primer Oligodendrosit Hücrelerinde n-bütanol Alt Ekstresi Çalışmaları .....   | 158        |
| 3.3.3.4.1 n-bütanol Alt Ekstresinin Fare Primer Oligodendrosit Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi .....   | 158        |
| <b>4. TARTIŞMA .....</b>   | <b>164</b> |
| <b>5. SONUÇ .....</b>  | <b>191</b> |
| <b>6. KAYNAKLAR.....</b>   | <b>192</b> |
| <b>7. EKLER.....</b>   | <b>219</b> |
| <b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>  | <b>228</b> |

# ŞEKİL LİSTESİ

## Sayfa

|  |    |
|--|----|
| Şekil 1. MS tipleri ve zamansal seyirleri .....  | 3  |
| Şekil 2. 2013 yılı dünya Multipl Skleroz prevalansı.....   | 4  |
| Şekil 3. MS patolojisinde en önemli üç faktörün etkisi. ....   | 7  |
| Şekil 4. MS patojenezinde rol oynayan immün hücreler ve sitokinleri. ....  | 9  |
| Şekil 5. MSCov ekstresinden geri ekstraksiyon yöntemiyle alt ekstrelerin<br>eldesi.....  | 19 |
| Şekil 6. Sıvı azot ile beyin dokusu öğütme. ....   | 22 |
| Şekil 7. Kontrol ve DAE kontrol beyin dokularından optimize edilmiş yöntem<br>ile izole edilmiş total RNA agaroz jel elektroforez görüntüsü.....                 | 24 |
| Şekil 8. Kontrol ve MSCov muamele edilmiş SH-SY5Y hücrelerinden<br>optimize edilmiş yöntem ile izole edilmiş total RNA agaroz jel<br>elektroforez görüntüsü..... | 28 |
| Şekil 9. İzole edilen saf bileşik yapıları I.....  | 33 |
| Şekil 10. Çalışılan saf bileşik yapıları II. ....  | 34 |
| Şekil 11. DAE (hasta), PDAE (paralel hasta) ve MSCov tedavi grubu<br>farelerde gözlenen klinik skorlar.....  | 35 |
| Şekil 12. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.....  | 42 |
| Şekil 13. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA<br>seviyesine olan etkisi.....   | 44 |
| Şekil 14. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA<br>seviyesine olan etkisi.....   | 44 |
| Şekil 15. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA<br>seviyesine olan etkisi.....  | 44 |
| Şekil 16. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA<br>seviyesine olan etkisi.....   | 44 |
| Şekil 17. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA<br>seviyesine olan etkisi.....   | 45 |
| Şekil 18. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA<br>seviyesine olan etkisi.....  | 45 |
| Şekil 19. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA<br>seviyesine olan etkisi.....  | 45 |
| Şekil 20. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında GNAI mRNA<br>seviyesine olan etkisi.....  | 45 |
| Şekil 21. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA<br>seviyesine olan etkisi.....   | 46 |
| Şekil 22. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine<br>olan etkisi. ....  | 46 |
| Şekil 23. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA<br>seviyesine olan etkisi.....   | 46 |
| Şekil 24. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA<br>seviyesine olan etkisi.....   | 46 |
| Şekil 25. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA<br>seviyesine olan etkisi.....  | 47 |
| Şekil 26. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında NFKB mRNA<br>seviyesine olan etkisi.....  | 47 |

|   |    |
|---|----|
| Şekil 27. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 47 |
| Şekil 28. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 47 |
| Şekil 29. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 48 |
| Şekil 30. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 48 |
| Şekil 31. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 48 |
| Şekil 32. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında TNF- $\alpha$ mRNA seviyesine olan etkisi..... | 48 |
| Şekil 33. DKM alt ekstresi SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.....                                  | 47 |
| Şekil 34. DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 49 |
| Şekil 35. DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 49 |
| Şekil 36. DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....        | 49 |
| Şekil 37. DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 49 |
| Şekil 38. DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.....       | 50 |
| Şekil 39. DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.....      | 50 |
| Şekil 40. DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.....        | 50 |
| Şekil 41. DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.....        | 50 |
| Şekil 42. DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....       | 51 |
| Şekil 43. DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 51 |
| Şekil 44. DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 51 |
| Şekil 45. DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 51 |
| Şekil 46. DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.....        | 52 |
| Şekil 47. DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.....        | 52 |
| Şekil 48. DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 52 |
| Şekil 49. DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.....        | 52 |
| Şekil 50. DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 53 |
| Şekil 51. DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.....        | 53 |
| Şekil 52. DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.....       | 53 |

|   |    |
|---|----|
| Şekil 53. DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında TNF- $\alpha$ mRNA seviyesine olan etkisi..... | 53 |
| Şekil 54. Etil Asetat alt ekstresinin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi. ....                        | 54 |
| Şekil 55. EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 56 |
| Şekil 56. EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 56 |
| Şekil 57. EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 56 |
| Şekil 58. EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 56 |
| Şekil 59. EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 57 |
| Şekil 60. EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 57 |
| Şekil 61. EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 57 |
| Şekil 62. EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 57 |
| Şekil 63. EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 58 |
| Şekil 64. EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 58 |
| Şekil 65. EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 58 |
| Şekil 66. EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 58 |
| Şekil 67. EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 59 |
| Şekil 68. EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 59 |
| Şekil 69. EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 59 |
| Şekil 70. EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 59 |
| Şekil 71. EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 60 |
| Şekil 72. EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 60 |
| Şekil 73. EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 60 |
| Şekil 74. EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında TNF- $\alpha$ mRNA seviyesine olan etkisi.....  | 60 |
| Şekil 75. n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi. ....                          | 61 |
| Şekil 76. n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.....     | 63 |
| Şekil 77. n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.....     | 63 |
| Şekil 78. n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....    | 63 |
| Şekil 79. n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.....     | 63 |

|  |    |
|--|----|
| Şekil 80. n-bütanol alt ekstreinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 64 |
| Şekil 81. n-bütanol alt ekstreinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.....        | 64 |
| Şekil 82. n-bütanol alt ekstreinin SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 64 |
| Şekil 83. n-bütanol alt ekstreinin SH-SY5Y hücre hattında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 64 |
| Şekil 84. n-bütanol alt ekstreinin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 65 |
| Şekil 85. n-bütanol alt ekstreinin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 65 |
| Şekil 86. n-bütanol alt ekstreinin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 65 |
| Şekil 87. n-bütanol alt ekstreinin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 65 |
| Şekil 88. n-bütanol alt ekstreinin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 66 |
| Şekil 89. n-bütanol alt ekstreinin SH-SY5Y hücre hattında NFkB mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 66 |
| Şekil 90. n-bütanol alt ekstreinin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 66 |
| Şekil 91. n-bütanol alt ekstreinin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 66 |
| Şekil 92. n-bütanol alt ekstreinin SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 67 |
| Şekil 93. n-bütanol alt ekstreinin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 67 |
| Şekil 94. n-bütanol alt ekstreinin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 67 |
| Şekil 95. n-bütanol alt ekstreinin SH-SY5Y hücre hattında TNF- $\alpha$ mRNA seviyesine olan etkisi..... | 67 |
| Şekil 96. IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.....                                      | 68 |
| Şekil 97. IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.....                | 70 |
| Şekil 98. IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi. ....               | 70 |
| Şekil 99. IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....               | 70 |
| Şekil 100. IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.....               | 70 |
| Şekil 101. IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.....             | 71 |
| Şekil 102. IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 71 |
| Şekil 103. IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.....              | 71 |
| Şekil 104. IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.....              | 71 |
| Şekil 105. IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....             | 72 |

|  |    |
|--|----|
| Şekil 106. IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 72 |
| Şekil 107. IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 72 |
| Şekil 108. IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 72 |
| Şekil 109. IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 73 |
| Şekil 110. IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 73 |
| Şekil 111. IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 73 |
| Şekil 112. IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 73 |
| Şekil 113. IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 74 |
| Şekil 114. IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 74 |
| Şekil 115. IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 74 |
| Şekil 116. IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında TNF- $\alpha$ mRNA seviyesine olan etkisi..... | 74 |
| Şekil 117. GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi. ....                                 | 75 |
| Şekil 118. GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 77 |
| Şekil 119. GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 77 |
| Şekil 120. GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 77 |
| Şekil 121. GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 77 |
| Şekil 122. GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 78 |
| Şekil 123. GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 78 |
| Şekil 124. GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 78 |
| Şekil 125. GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 78 |
| Şekil 126. GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 79 |
| Şekil 127. GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 79 |
| Şekil 128. GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 79 |
| Şekil 129. GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 79 |
| Şekil 130. GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 80 |
| Şekil 131. GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 80 |



|   |    |
|---|----|
| Şekil 132. GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 80 |
| Şekil 133. GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 80 |
| Şekil 134. GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 81 |
| Şekil 135. GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 81 |
| Şekil 136. GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 81 |
| Şekil 137. GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında TNF- $\alpha$ mRNA seviyesine olan etkisi..... | 81 |
| Şekil 138. OPC saf bileşiminin hücre canlılığına etkisi.....  | 82 |
| Şekil 139. OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 84 |
| Şekil 140. OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 84 |
| Şekil 141. OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 84 |
| Şekil 142. OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 84 |
| Şekil 143. OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.....        | 85 |
| Şekil 144. OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.....       | 85 |
| Şekil 145. OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 85 |
| Şekil 146. OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 85 |
| Şekil 147. OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....        | 86 |
| Şekil 148. OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 86 |
| Şekil 149. OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 86 |
| Şekil 150. OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 86 |
| Şekil 151. OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 87 |
| Şekil 152. OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 87 |
| Şekil 153. OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 87 |
| Şekil 154. OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 87 |
| Şekil 155. OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 88 |
| Şekil 156. OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 88 |
| Şekil 157. OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.....        | 88 |

|   |    |
|---|----|
| Şekil 158. OPC saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında TNF- $\alpha$ mRNA seviyesine olan etkisi.....                              | 88 |
| Şekil 159. Rutin'in SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi. ....  | 89 |
| Şekil 160. OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 91 |
| Şekil 161. OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 91 |
| Şekil 162. OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 91 |
| Şekil 163. OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 91 |
| Şekil 164. OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 92 |
| Şekil 165. OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi. ....        | 92 |
| Şekil 166. OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 92 |
| Şekil 167. OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 92 |
| Şekil 168. OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 93 |
| Şekil 169. OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 93 |
| Şekil 170. OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 93 |
| Şekil 171. OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 93 |
| Şekil 172. OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 94 |
| Şekil 173. OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında NFKB mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 94 |
| Şekil 174. OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 94 |
| Şekil 175. OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 94 |
| Şekil 176. OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 95 |
| Şekil 177. OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 95 |
| Şekil 178. OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi. ....         | 95 |
| Şekil 179. OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında TNF- $\alpha$ mRNA seviyesine olan etkisi. .... | 95 |
| Şekil 180. OA saf bileşiğinin hücre canlılığına etkisi.....   | 96 |
| Şekil 181. OA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.....   | 98 |
| Şekil 182. OA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.....   | 98 |
| Şekil 183. OA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....  | 98 |
| Şekil 184. OA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.....   | 98 |

|   |     |
|---|-----|
| Şekil 185. OA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 99  |
| Şekil 186. OA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 99  |
| Şekil 187. OA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 99  |
| Şekil 188. OA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 99  |
| Şekil 189. OA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 100 |
| Şekil 190. OA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 100 |
| Şekil 191. OA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 100 |
| Şekil 192. OA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 100 |
| Şekil 193. OA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 101 |
| Şekil 194. OA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 101 |
| Şekil 195. OA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 101 |
| Şekil 196. OA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 101 |
| Şekil 197. OA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 102 |
| Şekil 198. OA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 102 |
| Şekil 199. OA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 102 |
| Şekil 200. OA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında TNF- $\alpha$ mRNA seviyesine olan etkisi..... | 102 |
| Şekil 201. SDM saf bileşiminin hücre canlılığına etkisi.....  | 103 |
| Şekil 202. SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 105 |
| Şekil 203. SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 105 |
| Şekil 204. SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 105 |
| Şekil 205. SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 105 |
| Şekil 206. SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.....        | 106 |
| Şekil 207. SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.....       | 106 |
| Şekil 208. SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 106 |
| Şekil 209. SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 106 |
| Şekil 210. SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....        | 107 |

|  |     |
|--|-----|
| Şekil 211. SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 107 |
| Şekil 212. SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 107 |
| Şekil 213. SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 107 |
| Şekil 214. SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 108 |
| Şekil 215. SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında NFkB mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 108 |
| Şekil 216. SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 108 |
| Şekil 217. SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 108 |
| Şekil 218. SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 109 |
| Şekil 219. SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 109 |
| Şekil 220. SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 109 |
| Şekil 221. SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında TNF- $\alpha$ mRNA seviyesine olan etkisi..... | 109 |
| Şekil 222. UA saf bileşiminin hücre canlılığına etkisi.....  | 110 |
| Şekil 223. UA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 112 |
| Şekil 224. UA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 112 |
| Şekil 225. UA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 112 |
| Şekil 226. UA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 112 |
| Şekil 227. UA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 113 |
| Şekil 228. UA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 113 |
| Şekil 229. UA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 113 |
| Şekil 230. UA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 113 |
| Şekil 231. UA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 114 |
| Şekil 232. UA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 114 |
| Şekil 233. UA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 114 |
| Şekil 234. UA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 114 |
| Şekil 235. UA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 115 |
| Şekil 236. UA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında NFkB mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 115 |

|   |     |
|---|-----|
| Şekil 237. UA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 115 |
| Şekil 238. UA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 115 |
| Şekil 239. UA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 116 |
| Şekil 240. UA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 116 |
| Şekil 241. UA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 116 |
| Şekil 242. UA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında TNF- $\alpha$ mRNA seviyesine olan etkisi..... | 116 |
| Şekil 243. SIT saf bileşiminin hücre canlılığına etkisi.....  | 117 |
| Şekil 244. SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 119 |
| Şekil 245. SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 119 |
| Şekil 246. SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 119 |
| Şekil 247. SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 119 |
| Şekil 248. SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.....        | 120 |
| Şekil 249. SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.....       | 120 |
| Şekil 250. SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 120 |
| Şekil 251. SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 120 |
| Şekil 252. SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....        | 121 |
| Şekil 253. SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi. ....         | 121 |
| Şekil 254. SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 121 |
| Şekil 255. SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 121 |
| Şekil 256. SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 122 |
| Şekil 257. SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 122 |
| Şekil 258. SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 122 |
| Şekil 259. SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 122 |
| Şekil 260. SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattındaSOD mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 123 |
| Şekil 261. SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 123 |
| Şekil 262. SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.....        | 123 |

|   |     |
|---|-----|
| Şekil 263. SIT saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında TNF- $\alpha$ mRNA seviyesine olan etkisi.....  | 123 |
| Şekil 264. MSCov ekstresinin CCRF-CEM hücre canlılığına etkisi .....                                  | 124 |
| Şekil 265. MSCov ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.....             | 126 |
| Şekil 266. MSCov ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 126 |
| Şekil 267. MSCov ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 126 |
| Şekil 268. MSCov ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 126 |
| Şekil 269. MSCov ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.....             | 127 |
| Şekil 270. MSCov ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında IL10 mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 127 |
| Şekil 271. MSCov ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 127 |
| Şekil 272. MSCov ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında TNF- $\alpha$ mRNA seviyesine olan etkisi.....   | 127 |
| Şekil 273. DKM alt ekstresinin CCRF-CEM hücre canlılığına etkisi. ....                                | 128 |
| Şekil 274. DKM alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 130 |
| Şekil 275. DKM alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 130 |
| Şekil 276. DKM alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 130 |
| Şekil 277. DKM alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.....        | 130 |
| Şekil 278. DKM alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 131 |
| Şekil 279. DKM alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında IL10 mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 131 |
| Şekil 280. DKM alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 131 |
| Şekil 281. DKM alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında TNF- $\alpha$ mRNA seviyesine olan etkisi..... | 131 |
| Şekil 282. EA alt ekstresinin CCRF-CEM hücre canlılığına etkisi .....                                 | 132 |
| Şekil 283. EA alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 134 |
| Şekil 284. EA alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 134 |
| Şekil 285. EA alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 134 |
| Şekil 286. EA alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 134 |
| Şekil 287. EA alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 135 |
| Şekil 288. EA alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında IL10 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 135 |
| Şekil 289. EA alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 135 |

|   |     |
|---|-----|
| Şekil 290. EA alt ekstreinin CCRF-CEM hücre hattında TNF- $\alpha$ mRNA seviyesine olan etkisi.....         | 135 |
| Şekil 291. n-bütanol alt ekstreinin CCRF-CEM hücre canlılığına etkisi .....                                 | 136 |
| Şekil 292. n-bütanol alt ekstreinin CCRF-CEM hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 138 |
| Şekil 293. n-bütanol alt ekstreinin CCRF-CEM hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi. ....         | 138 |
| Şekil 294. n-bütanol alt ekstreinin CCRF-CEM hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 138 |
| Şekil 295. n-bütanol alt ekstreinin CCRF-CEM hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi. ....        | 138 |
| Şekil 296. n-bütanol alt ekstreinin CCRF-CEM hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 139 |
| Şekil 297. n-bütanol alt ekstreinin CCRF-CEM hücre hattında NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 139 |
| Şekil 298. n-bütanol alt ekstreinin CCRF-CEM hücre hattında IL10 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 139 |
| Şekil 299. n-bütanol alt ekstreinin CCRF-CEM hücre hattında TNF- $\alpha$ mRNA seviyesine olan etkisi. .... | 139 |
| Şekil 300. MSCov ekstreinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde APP mRNA seviyesine olan etkisi. ....   | 141 |
| Şekil 301. MSCov ekstreinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde C1S mRNA seviyesine olan etkisi. ....   | 141 |
| Şekil 302. MSCov ekstreinin fare primer oligodendrosit CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....                | 141 |
| Şekil 303. MSCov ekstreinin fare primer oligodendrosit CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.....                 | 141 |
| Şekil 304. MSCov ekstreinin fare primer oligodendrosit CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.....               | 142 |
| Şekil 305. MSCov ekstreinin fare primer oligodendrosit CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.....              | 142 |
| Şekil 306. MSCov ekstreinin fare primer oligodendrosit GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.....                | 142 |
| Şekil 307. MSCov ekstreinin fare primer oligodendrosit GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.....                | 142 |
| Şekil 308. MSCov ekstreinin fare primer oligodendrosit HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....               | 143 |
| Şekil 309. MSCov ekstreinin fare primer oligodendrosit IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.....                 | 143 |
| Şekil 310. MSCov ekstreinin fare primer oligodendrosit MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....                 | 143 |
| Şekil 311. MSCov ekstreinin fare primer oligodendrosit MBP mRNA seviyesine olan etkisi.....                 | 143 |
| Şekil 312. MSCov ekstreinin fare primer oligodendrosit MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.....                | 144 |
| Şekil 313. MSCov ekstreinin fare primer oligodendrosit NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.....                | 144 |
| Şekil 314. MSCov ekstreinin fare primer oligodendrosit PLP mRNA seviyesine olan etkisi.....                 | 144 |
| Şekil 315. MSCov ekstreinin fare primer oligodendrosit PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.....                | 144 |

|  |     |
|--|-----|
| Şekil 316. MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit SOD mRNA seviyesine olan etkisi.....                           | 145 |
| Şekil 317. MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit STAT mRNA seviyesine olan etkisi.....                          | 145 |
| Şekil 318. MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.....                         | 145 |
| Şekil 319. MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit TNF- $\alpha$ mRNA seviyesine olan etkisi.....                 | 145 |
| Şekil 320. DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde APP mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 147 |
| Şekil 321. DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde C1S mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 147 |
| Şekil 322. DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 147 |
| Şekil 323. DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CD4 mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 147 |
| Şekil 324. DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi. ....         | 148 |
| Şekil 325. DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi. ....        | 148 |
| Şekil 326. DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde GFAP mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 148 |
| Şekil 327. DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde GNAI mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 148 |
| Şekil 328. DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerindeHIF1A mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 149 |
| Şekil 329. DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde IL6 mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 149 |
| Şekil 330. DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde MAG mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 149 |
| Şekil 331. DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde MBP mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 149 |
| Şekil 332. DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerindeMMP9 mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 150 |
| Şekil 333. DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde NFKB mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 150 |
| Şekil 334. DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde PLP mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 150 |
| Şekil 335. DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde PTPN mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 150 |
| Şekil 336. DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde SOD mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 151 |
| Şekil 337. DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde STAT mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 151 |
| Şekil 338. DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerindeTGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 151 |
| Şekil 339. DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde TNF- $\alpha$ mRNA seviyesine olan etkisi. .... | 151 |
| Şekil 340. EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde APP mRNA seviyesine olan etkisi. ....            | 153 |
| Şekil 341. EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde C1S mRNA seviyesine olan etkisi. ....            | 153 |



|   |     |
|---|-----|
| Şekil 342. EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 153 |
| Şekil 343. EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CD4 mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 153 |
| Şekil 344. EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi. ....         | 154 |
| Şekil 345. EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi. ....        | 154 |
| Şekil 346. EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde GFAP mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 154 |
| Şekil 347. EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde GNAI mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 154 |
| Şekil 348. EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi. ....         | 155 |
| Şekil 349. EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde IL6 mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 155 |
| Şekil 350. EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde MAG mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 155 |
| Şekil 351. EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde MBP mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 155 |
| Şekil 352. EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 156 |
| Şekil 353. EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde NFKB mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 156 |
| Şekil 354. EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde PLP mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 156 |
| Şekil 355. EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde PTPN mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 156 |
| Şekil 356. EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde SOD mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 157 |
| Şekil 357. EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde STAT mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 157 |
| Şekil 358. EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi. ....         | 157 |
| Şekil 359. EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde TNF- $\alpha$ mRNA seviyesine olan etkisi. .... | 157 |
| Şekil 360. n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde APP mRNA seviyesine olan etkisi. ....    | 159 |
| Şekil 361. n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde C1S mRNA seviyesine olan etkisi. ....    | 159 |
| Şekil 362. n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi. ....   | 159 |
| Şekil 363. n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CD4 mRNA seviyesine olan etkisi. ....    | 159 |
| Şekil 364. n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi. ....  | 160 |
| Şekil 365. n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi. .... | 160 |
| Şekil 366. n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde GFAP mRNA seviyesine olan etkisi. ....   | 160 |
| Şekil 367. n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde GNAI mRNA seviyesine olan etkisi. ....   | 160 |

|   |     |
|---|-----|
| Şekil 368. n-bütanol alt ekstreinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 161 |
| Şekil 369. n-bütanol alt ekstreinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde IL6 mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 161 |
| Şekil 370. n-bütanol alt ekstreinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 161 |
| Şekil 371. n-bütanol alt ekstreinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde MBP mRNA seviyesine olan etkisi.....            | 161 |
| Şekil 372. n-bütanol alt ekstreinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.....           | 162 |
| Şekil 373. n-bütanol alt ekstreinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde NFkB mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 162 |
| Şekil 374. n-bütanol alt ekstreinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde PLP mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 162 |
| Şekil 375. n-bütanol alt ekstreinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde PTPN mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 162 |
| Şekil 376. n-bütanol alt ekstreinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde SOD mRNA seviyesine olan etkisi. ....           | 163 |
| Şekil 377. n-bütanol alt ekstreinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde STAT mRNA seviyesine olan etkisi. ....          | 163 |
| Şekil 378. n-bütanol alt ekstreinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.....          | 163 |
| Şekil 379. n-bütanol alt ekstreinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde TNF- $\alpha$ mRNA seviyesine olan etkisi. .... | 163 |
| Şekil 380. Oleanolik asit (OA) ve ursolik asit (UA) karşılaştırmalı kimyasal yapıları.....                                  | 183 |
| Şekil 381. Çalışılan genlerin MSCov uygulaması ile ilişkili yolak .....   | 189 |

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

|   |     |
|---|-----|
| Tablo 1. DAE takibinde kullanılan skorlama tablosu. ....  | 20  |
| Tablo 2. Kullanılan deney grupları. ....  | 21  |
| Tablo 3. cDNA sentez karışımı. ....   | 29  |
| Tablo 4. qRT-PZR koşulları. ....  | 30  |
| Tablo 5. PZR sıcaklık, döngü ve zamanları. ....   | 30  |
| Tablo 6. SH-SY5Y ve CCRF-CEM hücre çalışmalarında kullanılan primer dizileri ve yapışma sıcaklıkları. ....  | 31  |
| Tablo 7. Fare primer oligodendrosit hücre çalışmalarında kullanılan primer dizileri ve yapışma sıcaklıkları. ....   | 32  |
| Tablo 8. MS PZR dizin (array) gen tablosu. ....   | 37  |
| Tablo 9. MS PZR dizin (array) sonuçları. ....   | 40  |
| Tablo 10. MSCov tedavi grubu hayvanların beyin dokularıyla yapılan çalışmalar ve MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücrelerinde seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine etkilerinin kat değişim sonuçları. ....          | 178 |
| Tablo 11. MSCov ekstresinin ve alt ekstrelerinin SH-SY5Y hücrelerinde seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine etkilerinin kat değişim sonuçları. ....  | 179 |
| Tablo 12. MSCov ekstresinden elde edilen IHK, GC, OPC saf bileşiklerinin ve OPC+Rutin kombine uygulamasının SH-SY5Y hücrelerinde seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine etkilerinin kat değişim sonuçları. .... | 181 |
| Tablo 13. MSCov ekstresinden elde edilen OA, SDM, UA ve SIT saf bileşiklerinin SH-SY5Y hücrelerinde seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine etkilerinin kat değişim sonuçları. ....                              | 182 |
| Tablo 14. MSCov ekstresinin ve alt ekstrelerinin CCRF-CEM hücrelerinde seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine etkilerinin kat değişim sonuçları. ....   | 187 |
| Tablo 15. MSCov ekstresinin ve alt ekstrelerinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine etkilerinin kat değişim sonuçları. ....   | 188 |

## SEMBOL LİSTESİ

|                                |   |  |
|--------------------------------|---|--|
| <b>APP</b>                     | : | Amiloid $\beta$ prekürsör protein                                    |
| <b>C1S</b>                     | : | Kompleman bileşenin 1, s alt bileşeni                                |
| <b>CCL5</b>                    | : | Kemokin (C-C motifi) ligandı 5                                       |
| <b>CD4</b>                     | : | CD4 antijeni   |
| <b>CXCL9</b>                   | : | Kemokin (C-X-C motifi) ligandı 9                                     |
| <b>CXCL10</b>                  | : | Kemokin (C-X-C motifi) ligandı 10                                    |
| <b>DAE</b>                     | : | Deneysel alerjik ensefalomyelit                                      |
| <b>DKM</b>                     | : | Diklorometan   |
| <b>DMSO</b>                    | : | Dimetil sulfoksit  |
| <b>EA</b>                      | : | Etil asetat  |
| <b>FBS</b>                     | : | Fetal dana serumu  |
| <b>FDA</b>                     | : | Amerikan İlaç Dairesi  |
| <b>GC</b>                      | : | Glukokapparin  |
| <b>GFAP</b>                    | : | Glial fibriller asidik protein                                       |
| <b>GNAI2</b>                   | : | Guanin nükleotid bağlayıcı protein (G proteini), alfa 2 inhibe edici |
| <b>HIF1A</b>                   | : | Hipoksi indüklenebilir faktör 1, alfa alt birimi                     |
| <b>IHK</b>                     | : | 1H-indol- 2-hidroksi, 3-karboksilik asit                             |
| <b>IL6</b>                     | : | İnterlökin 6   |
| <b>HIF1A</b>                   | : | Hipoksi indüklenebilir faktör 1, alfa alt birimi                     |
| <b>KBB</b>                     | : | Kan beyin bariyeri   |
| <b>LOEL</b>                    | : | En düşük gözlenen yan etki düzeyi                                    |
| <b>MAG</b>                     | : | Miyelin ilişkili glikoprotein  |
| <b>MBP</b>                     | : | Miyelin temel protein  |
| <b>MMP</b>                     | : | Matriks metalloproteinaz   |
| <b>MSCov</b>                   | : | <i>Capparis ovata</i> su ekstresi                                    |
| <b>MS</b>                      | : | Multipl skleroz  |
| <b>MSS</b>                     | : | Merkezi sinir sistemi  |
| <b>NFKB</b>                    | : | Nükleer faktör kappa B   |
| <b>NOEL</b>                    | : | Yan etki düzeyi olmayan doz  |
| <b>OA</b>                      | : | Oleanolik asit   |
| <b>OPC</b>                     | : | Olean-12-en-28-ol, 3 $\beta$ -pentakosanoat                          |
| <b>PDAE</b>                    | : | Paralel deneysel alerjik ensefalomyelit                              |
| <b>PLP</b>                     | : | Proteolipit protein  |
| <b>PTPN11</b>                  | : | Protein tirozin fosfataz, reseptör-dışı türü 11                      |
| <b>qPZR</b>                    | : | Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu                           |
| <b>SDM</b>                     | : | Stigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -miristat                               |
| <b>SOD</b>                     | : | Süperoksit dismutaz  |
| <b>STAT3</b>                   | : | Sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü 3                      |
| <b>TGFB1</b>                   | : | Transforme edici büyüme faktörü beta 1                               |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | : | Tümör nekroz faktörü alfa  |
| <b>UA</b>                      | : | Ursolik asit   |

## ÖNSÖZ

“*Capparis ovata*’dan Elde Edilen MSCov, Alt Ekstreleri ve Saf Bileşiklerin Multipl Skleroz Üzerine Etkileri-Moleküler Mekanizmalar” adlı çalışma 2014-2017 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Biyokimya ve Moleküler Toksikoloji Laboratuvarı’nda doktora tezi olarak hazırlanmıştır.

Laboratuvarının tüm imkânlarını sonuna kadar açan, lisans ve lisansüstü eğitimim süresince her zaman tecrübe ve eşsiz bilgilerinden yararlandığımı, maddi ve manevi desteğini hissettiğim, üzerimde çok büyük emeği olan, kendimi öğrencisi olduğum için hep şanslı hissettiğim, bilimsel etik anlayışını kendime örnek aldığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Alaattin ŞEN’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin düzenlenmesi ve değerlendirilmesi aşamasındaki yardımlarından ve katkılarından dolayı değerli jüri üyelerim Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU, Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR, Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN ve Yrd. Doç. Dr. Aslı SEMİZ’e teşekkür ederim.

Laboratuvarda birlikte çalıştığım arkadaşlarım Gurbet ÇELİK TURGUT, Elif KALE, Nazmiye ÖLMEZ, Hatice ORUÇ, Hajarat Abilo ALFA ve Fatma SANDAL’a; bu zorlu süreçte ne zaman yorulduğumu hissetsem elini omuzlarımda hissettiğim eşim Osman ACAR’a ve her zaman yanımda olan beni bu günlere özveriyle getiren, eğitim hayatım boyunca en büyük destekçilerim olan canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca maddi destek sağladığı için Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (2014FBE051) ve TÜBİTAK’a (112S187) teşekkür ederim.

# 1. GİRİŞ

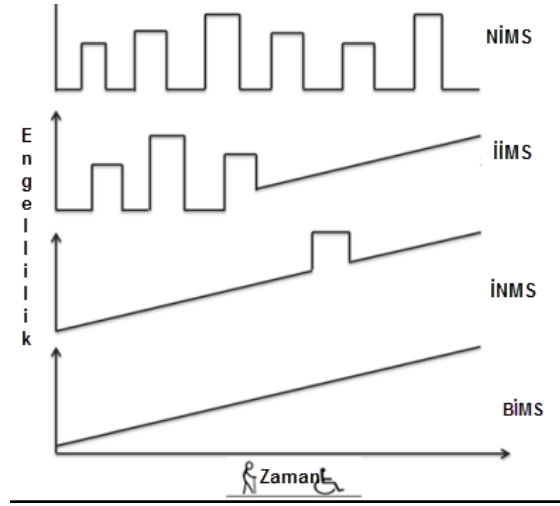
Multipl Skleroz (MS), merkezi sinir sisteminin (MSS), miyelinsizleştirilmesi (demyelinizasyon) ve enflamasyonunu içeren beyin ve omurilikte plakların oluşumuna neden olan bir otoimmün (özbağışıklık) hastalıktır. Özellikle ülkemizde, Avrupa'da ve Kuzey Amerika'da MS görülme sıklığı her geçen gün artmaktadır ve nörolojik engelliliğin önde gelen nedenlerinden birisi haline gelmiştir. MS sadece hasta ve hasta yakınlarının yaşam kalitesini etkilemekle kalmayıp ciddi sosyo-ekonomik olumsuzluklara neden olan bir hastalıktır.

Çevresel faktörler tarafından genetik olarak hassas olan kişilerde tetiklenen, "karmaşık karakterli" olarak kabul edilen MS için hala tamamen etkin bir tedavi yöntemi yoktur. Günümüzde MS'in semptomatik tedavisinde kullanılan yedi adet Amerikan İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış, hastalığı modifiye edici ilaç bulunmaktadır. Bununla birlikte, güncel MS tedavileri nöksleri azaltmak ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatma etkisine sahiptir, fakat bu tedavilerden hiçbirisi fonksiyonu geri kazandırıcı ya da koruyucu etkiye sahip değildir. Bu durumda maalesef MS halen önlenemez ya da tamamen tedavi edilebilir durumda değildir.

Bu kapsamda hazırlanan bu doktora tezinin amacı öncü çalışmalarımızda deneysel MS modeli üzerinde koruyucu ve iyileştirici etkilerini gördüğümüz *Capparis ovata* bitkisinin tomurcuk, çiçek ve meyvelerinden elde ettiğimiz ekstrenin, alt ekstrelerinin ve bu ekstreten elde edilen aktif bileşenlerin; SH-SY5Y ve CCRF-CEM hücre hatlarında ve primer fare oligodendrosit hücrelerinde iyileştirici etkisinin ne şekilde gerçekleştiği, olası etkileşimleri ve etken bileşenlerinin detaylı bir şekilde tanımlanması ve saptanmasıdır. Günümüzde bitki ve bitkisel bazlı alternatif tedavi ürünlere olan ilginin de oldukça arttığı göz önüne alındığında MS tedavisinde güçlü bir alternatif veya tamamlayıcı tedavi ajanı olarak yer alabilecek olan *Capparis ovata* sulu ekstresinin (MSCov) doğru bir şekilde kullanımını sağlayacak bilimsel veriler bu tezde ortaya konulmuştur. Ayrıca uzun vadeli hedefler arasında MSCov ekstresinin hastalığın tedavisindeki etkinliğinin içerdiği hangi bileşikten ya da bileşiklerden kaynaklandığının ortaya çıkarılması ve bu ajanın MS hastalığı için ilaç haline getirilmesi bulunmaktadır.

## 1.1 Multipl Skleroz (MS)

MS, beyin ve omurilikte lokal enflamasyon ve miyelin yıkımı ile karakterize edilen plakların oluşumuna neden olan MSS'nin kronik ve heterojen bir otoimmün (özbağıışıklık) hastalığıdır (Noseworthy ve diğ. 2000; Steinman 2001). Özellikle genç erişkinleri etkileyen MS; MSS bozuklukları, görme bozuklukları ve motor bozukluklar ile karakterizedir (Mathew ve diğ. 2013). MS ile ilgili ilk bilgiler, Charles Prosper Ollivierd'Angers'in 1824 yılında yaptığı bildiriye dayanmaktadır. MS ile ilgili ilk makroskopik değıışiklikler ise, "skleroz plak" tanımı Charcot tarafından 1868 yılında bildirilmiştir (Murray 2009). Charcot hastalığı tanımlamış ilk patolojik sürecin miyelin yıkımı ile ortaya çıktığını ve miyelin kaybı olan alanlarda skleroz plakların oluştuğunu göstermiş ve hastalığa "La Sclerose en Plaques" adını vermiştir. MS'in hayvan modeli olan Deneysel Alerjik Ensefalomyelitin (DAE) 1932 yılında geliştirilmesi ile birlikte MS'in immün sistemin bir hastalığı olduğuna karar verilmiştir. Multipl skleroz adı MSS'nde lokal enflamasyon sonucu oluşan karakteristik sklerotik plakları ifade eder. Bu enflamasyon, beyin ve omuriliğe lökosit infiltrasyonundan kaynaklanmaktadır ve miyelin kılıfının hedeflenmiş yıkımına neden olmaktadır. MSS'nde miyelin, oligodendrosit kaynaklı hücre zarlarından yapılmıştır ve yalıtım sağlayarak aksonal ilişkili nöronal iletişimi hızlandırır (Compston ve Coles 2002). Bu yalıtım, aksiyon potansiyellerinin akson boyunca hızlı ve korunmalı taşınmasını sağlamaktadır. Hastalık ilerledikçe ve oligodendrositlere olan hasar arttıkça, nöronal aksonların demiyelinizasyonu daha da kötüleşir ve akson kaybı ve nöronal atrofi frekansı artar (Compston ve Coles 2008). MS belirtileri demiyelinizasyondan etkilenen beynin bölümüne bağılı olarak değıışebilir. MS hastalığının klinik sınıflandırılması büyük ölçüde hastalığın seyrine dayanmaktadır ve genel olarak 4 tipi vardır (Stauffer 2006; Şekil 1).



**Şekil 1.** MS tipleri ve zamansal seyirleri (Stauffer 2006).

1. Nükseden-İyileşen MS (Relapsing-Remitting MS - NİMS)
2. İkincil İlerleyen MS (Secondary Progressive MS - İİMS)
3. İlerleyen-Nükseden MS (Progressive Relapsing MS – İNMS)
4. Birincil İlerleyen MS (Primary Progressive MS - BİMS)

Genellikle ilk aşama, birbirini takip eden ve kötüleşen, yineleme ve iyileşme (nüks-remisyon) nöbetleri ile karakterizedir (NİMS). Bunun sonucunda, ilerlemiş nörolojik özürülük (İİMS- ikincil ilerleyici MS) ortaya çıkar. Kalan grup hastalar birincil ilerleyen ve nükseden tipik hastalık seyirini gösterirler.

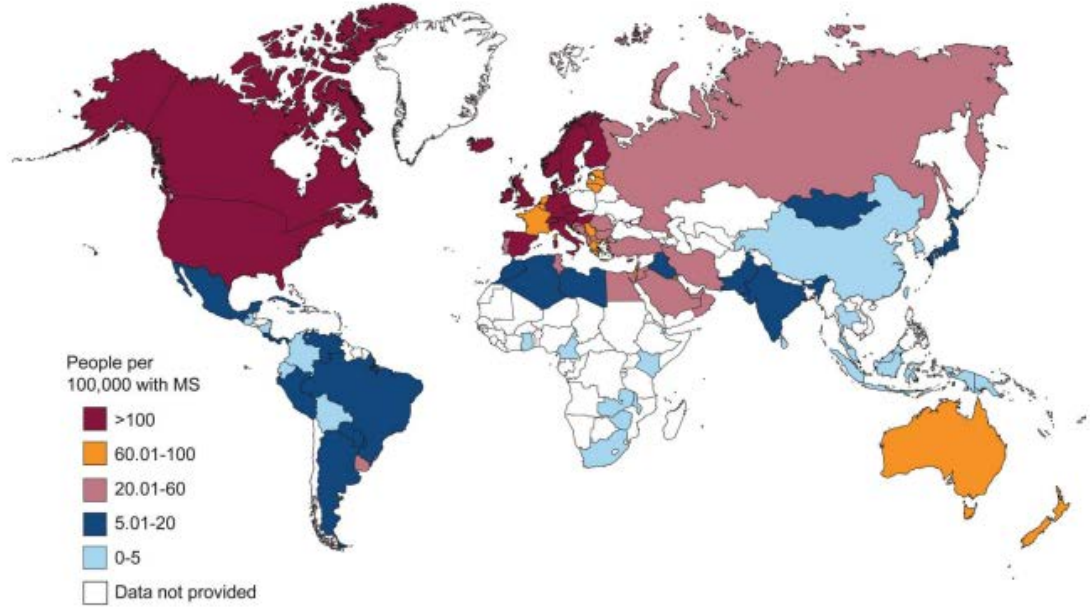
## 1.2 Multipl Skleroz'un İnsidans ve Prevalansı

MS dünya genelinde özellikle genç erişkinlerde nörolojik özürülüğe neden olan en yaygın nedendir. Özellikle gelişmiş ülkelerde görülme sıklığı daha yüksek olan bu hastalığın farklı toplumlardaki prevalans ve insidansını değerlendirmek, MS'e katkıda bulunan çevresel ve genetik faktörlerin ortaya çıkarılması çalışmalarında da yol gösterici olmaktadır (Kingwell ve diğ. 2013).

Uluslararası MS Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2008 yılında başlatılan ortak proje ile ilk dünya MS atlası oluşturulmaya başlanmıştır ve dünyadaki MS hastalarının yaşam kalitesini artırmak için çalışan farklı alanlardan kilit bilgi açığını doldurmaya başlamıştır (Browne ve diğ. 2014). 2008 yılında 2,1 milyon olan MS'li kişilerin tahmini sayısı 2013 yılında 200 bin kişi artarak 2,3



milyona yükselmiştir. MS'li kişilerin sayılarındaki değişikliklerin prevalansa göre daha iyi bir ölçüm sağlayan insidansın da arttığı tespit edilmiştir. Ortaya konulan bu artış seyrinin yükselerek devam ettiği düşünülmektedir (Browne ve diğ. 2014).



**Şekil 2.** 2013 yılı dünya Multipl Skleroz prevalansı (Browne 2014).

Dünya çapında bu artış göz önüne alındığında ülkemizde MS'li kişi sayısı ile ilgili hala net bir veri bulunmamaktadır. Orta Karadeniz Bölgesi'ni kapsayacak şekilde yapılan bir çalışmada 43.2/100.000 kişi olarak belirlenmiştir. İstanbul'un Maltepe ilçesinde yapılan MS prevalansı araştırmasında ise oran 101.4/100.000'dir. Çalışmalar yetersiz olmasına rağmen küçük bölgeleri kapsayacak şekilde yapılan çalışmalar Türkiye'deki nüfusun orta derecede MS riski taşıdığını düşündürmektedir (Turk 2006; Akdemir 2017).

### 1.3 Multipl Skleroz'un Etiyolojisi

MS'in etiyolojisi belirsiz olmakla birlikte, karmaşık bir genetik alt yapı ve çevresel faktörlerin birlikte hastalığın oluşumuna katkı sağladığı bilinmektedir. Genetik faktörlerin hastalığa katkısı MS'li ailelerde yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. Tek yumurta ikizleri ve kardeşler üzerinde yapılan çalışmalar genetik faktörlerin MS üzerine etkinliğini doğrular niteliktedir. Hastaların birinci derece

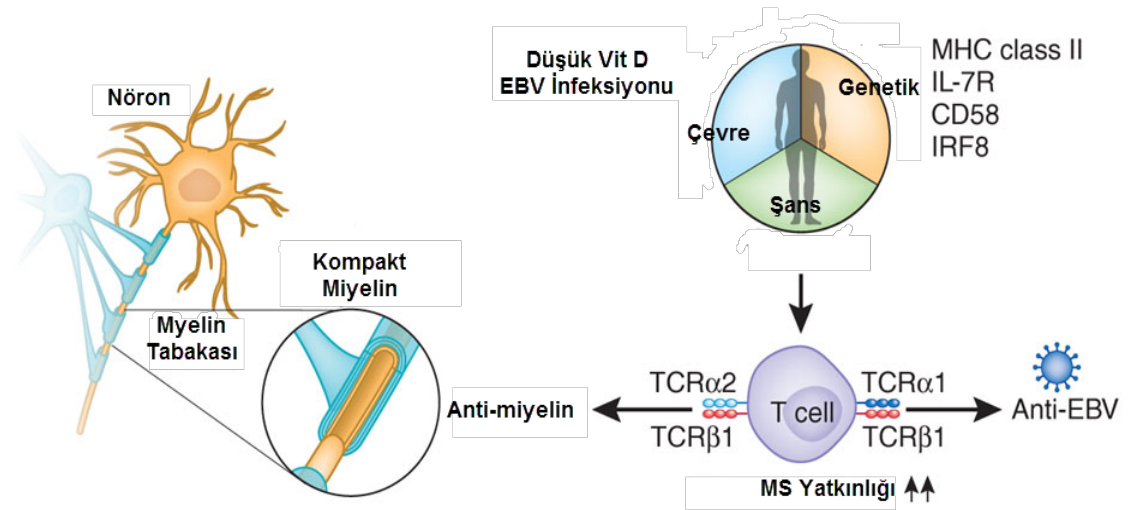
akrabalarında %5 yüksek risk olması ve tek yumurta ikizlerinde %25-30 daha yüksek oranda MS görülmesi bu durumu desteklemektedir (Hafler 2004; Compston 2005).

Son yirmi yılda, MS'e duyarlılık/yatkınlık kazandıran genleri tanımlamak için pek çok çalışma yapılmıştır. Yapılan tüm genom bağlantı analiz çalışmaları ile HLA sınıf II uzantılı HLA-DRB5\*0101, DRB1\*1501, DQA1\*0102 ve DQB1\*0602 haplotiplerinin MS için yaklaşık %50 genetik risk oluşturduğu tespit edilmiştir (Zheleznyakova ve diğ. 2017). Tüm genom tarama çalışmaları ile her ne kadar etkileri çok daha zayıf olsa da HLA bölgesi dışındaki MS'e yatkınlık/duyarlılık genleri de tespit edilmiştir (Hafler ve diğ. 2007; De Jager ve diğ. 2009). Bu yeni HLA olmayan genlerin çoğu immün düzenlenmesinde rol oynayan interlökin- 2 reseptör  $\alpha$  (IL-2RA) ve interlökin- 7 reseptör  $\alpha$  (IL-7RA), interferon düzenleyici faktör 8 (IRF8) ve tümör nekrozis faktör reseptör ailesi üyesi 1A (TNFRSF1A), interlökin 12 altünite  $\alpha$  (IL12A), G protein sinyal düzenleyici 1 (RGS1) gibi proteinleri kodlayan genlerdir. MS ile ilişkili bulunan genlerin çoğunun birincil olarak immün sistem ilişkili olması hastalığın immün aracılı olduğunun kanıtı niteliğindedir. Bu genlerin birçoğunun genetik varyasyonları ve fonksiyonel etkileri henüz tam tespit edilememiştir (De Jager ve diğ. 2009). Bunun yanında klinik heterojenlik ve tedaviye değişken yanıt hastalığın kapsamlı bir şekilde anlaşılması ve etkin tedavisi için ek zorluklar ortaya çıkarmaktadır (Zheleznyakova ve diğ. 2017).

Yapılan epidemiyolojik ve göç çalışmaları MS oluşumunda genetik etkinin yanı sıra çevresel faktörlerinde rolü olduğunu ortaya koymuştur. MS oluşumu için yüksek riskli olarak ifade edilen bölgelerden düşük riskli bölgelere göç halinde MS oluşum riskinin azaldığı; tam tersi durumda ise arttığı yapılan göç çalışmaları ile gösterilmiştir (Milo ve Kahana 2010). Viral ve bazı mikrobik moleküller hastalık için gerekli bir koşul olmamakla birlikte, MS risk faktörleri arasında gösterilmektedir. Örneğin Epstein-Barr virüsü (EBV) seropozitifliği MS hastalarında hemen hemen evrenseldir ve bu nedenle MS oluşumunda bir rol oynadığı kabul edilmektedir (Awwad ve diğ. 2017; Sundström ve diğ. 2004). Bulaşıcı olmayan risk faktörleri arasında, 25-hidroksivitamin D serum düzeyi koruyucu bir etki olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, doğum yeri ve ikamet yerinin yükseltisi MS riskinin önemli bir belirleyicisidir (Munger ve diğ. 2006). D vitamininin yanı sıra B-12 vitamini eksikliğinin de MS gelişiminde etkisi olabileceği görüşü son zamanlarda üzerinde durulan bir konudur. Çünkü B-12 vitamini, merkezi sinir sistemi

fonksiyonunda, özellikle de metionin sentaz aracılı homosisteinin metionine dönüştürülmesinde temel rol oynar ve DNA ve RNA sentezi için şarttır ve B12 vitamin eksikliği ciddi miyelin dejenerasyonlarına neden olur (Bagur ve diğ. 2017; Nemazannikova ve diğ. 2017). Ekvatorda hastalık prevalansının düşük olduğu, buna rağmen kutuplara doğru gidildikçe prevalansın yükseldiği bilinmektedir (Simpson ve diğ. 2011). Bir bölgedeki MS prevalansı ile bu bölgedeki güneş ışınları oranı arasındaki ters orantı enlemler ile MS prevalansı arasındaki bağlantıyı açıklayan en önemli delildir (Sloka ve diğ. 2011). Çocukluk ve ergenlik döneminde dışarıda geçirilen zamanın MS riski üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir: gençlik dönemlerinde daha fazla açık havada bulunan bu nedenle daha fazla ultraviyole B (UVB) alan kişiler, daha sonra MS için önemli ölçüde daha düşük bir riske sahiptirler (Laursen ve diğ. 2016a; Van Der Mei ve diğ. 2006). Genel olarak bakıldığında UVB ve MS riski arasındaki korelasyonun bağlantı noktasının D vitamini olduğu ortaya çıkmıştır. Vitamin D immün düzenleyici etkiye sahiptir. CD4<sup>+</sup> T hücre proliferasyonunu ve pro-enflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe ederken anti-enflamatuvar sitokinlerin üretimini uyarır (Smolders ve diğ. 2008a).

Sigara MS yatkınlığı için önemli bir başka çevresel risk faktörü olarak ortaya çıkmıştır (Handel ve diğ. 2011). Sigara ile vücuda alınan nitrik oksit (NO) ve karbon monoksit (CO) gazlarının bu yatkınlığa neden olduğu yönündedir. NO, yüksek konsantrasyonlarda nöronlara ve oligodendrositlere zarar verebilecek toksik çözüner bir gazdır. NO'den kaynaklanan lipid peroksidasyonu ve mitokondriyal hasar oligodendrositlerde apoptoz, aksonal dejenerasyon ve demiyelinizasyona yol açabilir (Dawson ve diğ. 1993; Merrill ve diğ. 1993; Mitrovic ve diğ. 1995). MS patolojisine etki eden faktörler Şekil 3'te görsel olarak verilmiştir.



**Şekil 3.** MS patolojisinde en önemli üç faktörün etkisi (Ransohoff 2010'dan revize edilmiştir).

Bunlara ek olarak MS risk faktörleri ile ilgili bağırsak geçirgenliğindeki değişiklikler son zamanlarda üzerinde durulan bir başka konudur. Ortaya atılan bu yeni spekülasyon, demiyelinizan hastalıkların patojenezinde mikrobiyotötik-bağırsak-beyin ekseninin potansiyel rolü ile ilgili deneysel alerjik ensefalomyelit (DAE=deneysel MS modeli) ve MS'deki bağırsak geçirgenliği değişiklikleri üzerine çalışmalara neden oldu. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla bağırsak geçirgenliğinin beyin fonksiyonları üzerindeki etkisi büyük ölçüde kanıtlanmıştır. Çalışmalar DAE oluşumundan önce artmış bir bağırsak geçirgenliği olduğunu ve hastalık ilerledikçe sıkı bağlantı (tight junction) yapılarının da bozulduğunu ortaya çıkarmıştır (Nouri ve diğ. 2014; Buscarinu ve diğ. 2017). Bu sonuçlar bağırsak mukozasında pro-enflamatuvar Th1-Th17 hücrelerinin prevalansında meydana gelen dengesizlik ile ilişkili görülmektedir (Nouri ve diğ. 2014). Ayrıca, son yapılan çalışmalarda, hastalığın nüksetmesi sırasında insan bağırsağının *Clostridium perfringens B tipi* bakterinin kolonize olduğunu göstermiştir. *Clostridium perfringens B tipi* bakterinin, nöronal ve oligodendrosit hasarıyla ilişkili kan-beyin bariyerinin (KBB) bozulmasına neden olan bir toksini ( $\epsilon$  toksin) ürettiği ve hastalıkla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Mete ve diğ. 2013; Finnie ve diğ. 1999; Bhargava ve Mowry 2014; Rumah ve diğ. 2013). Buradan yola çıkarak MS mikrobiota arasındaki ilişki varlığının tespiti diyet MS ilişkisini de göz önüne koymaktadır (David ve diğ. 2014; Saresella ve diğ. 2017).

#### 1.4 Multipl Skleroz Patojenezi

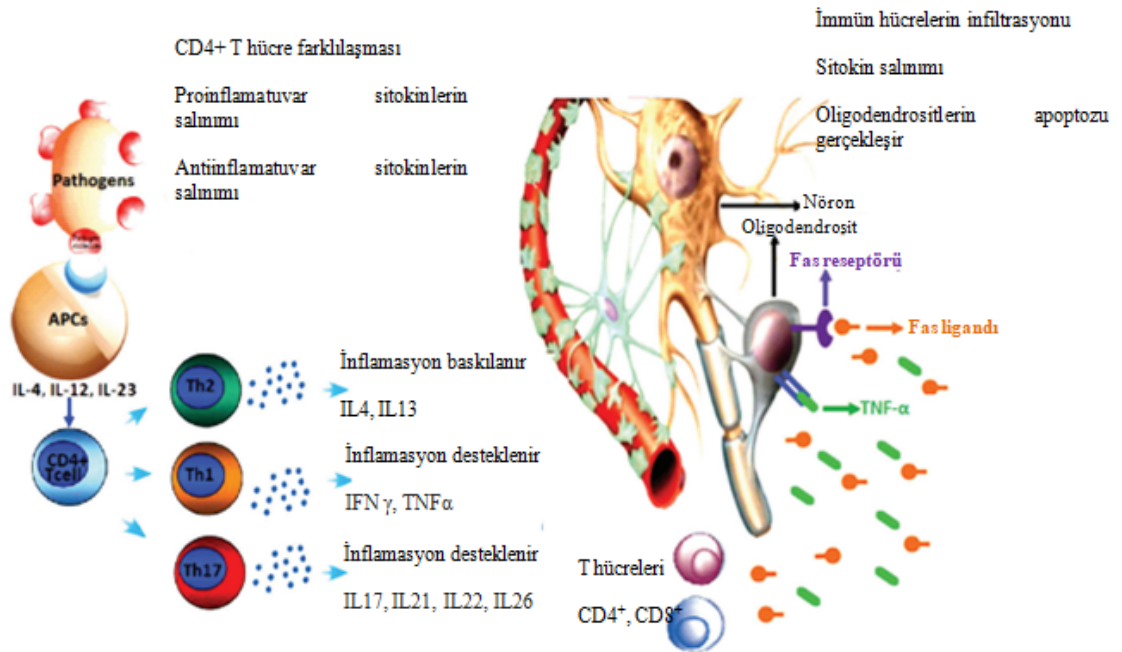
MSS beyaz ve gri cevher dokularının immün hücre infiltrasyonu ve sitokinlere bağlı iltihaplanması, MS'de oluşan hasarın başlangıç nedenidir. Yapılan pek çok çalışma T lenfositler ve antijen sunan hücrelerin (APC) etkileşimi ile oluşan miyelin spesifik CD4<sup>+</sup> T yardımcı (Th) hücrelerinin MS'in başlaması ve ilerlemesinde kritik rol oynadığını göstermiştir. Bununla birlikte sadece bu hücreler hedef alınarak yapılan tedavi çalışmaları etkili değildir (Gandhi ve diğ. 2009; Kasper ve Shoemaker 2010). Bu nedenle MS'in hayvan modeli olan DAE ve MS'li kişiler üzerinde yapılan çalışmalar interlökin 17 üreten Th 17 hücreleri, B hücreleri, CD8<sup>+</sup> T hücreleri ve hem CD8<sup>+</sup> hem de CD4<sup>+</sup> T hücreleri üzerinde araştırmalar yoğunlaştırılmış ve bu hücrelerin de MS patojenezi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Kasper ve Shoemaker 2010). Th 17 (Th17) hücreleri MS patofizyolojisinde önemli immünolojik katılımcıdır. Th17 hücreleri tarafından IL-17 ve IL-22'nin anormal üretilmesi ve KBB'yi geçmesi MSS'nde nöroenflamasyonun aktivasyonu yoluyla sinirsel iletme müdahale eder. Ayrıca B hücreleri de antikorların, sitokinlerin anormal düzenlenmesi ve antijen sunumuyla bu sürece katkı yapar (Qureshi ve diğ. 2017).

Patojenle ilişkili moleküller APC'lerdeki toll benzeri reseptörlere bağlanır ve IL-12, IL-23, IL-4 gibi spesifik sitokinlerin üretimi uyarılır ve bu sitokinlerde CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin özel bazı sitokinleri salma yeteneğine sahip olan Th1, Th2 ve Th17'ye farklılaşmasını indükler. Örneğin enflamatuvar sitokinler olan interferon gamma (IFN $\gamma$ ), tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) Th1 tarafından salınırlar ve Th2 farklılaşmasını baskılayarak enflamasyona teşviki sağlarlar (Schoenborn ve Wilson 2007). Th2 hücreleri ise anti-enflamatuvar sitokinler olan IL-4 ve IL-13 salınımını sağlar (Zhu ve Paul 2008; Minty ve diğ. 1993). Th17 diğer bir CD4<sup>+</sup> T hücrelidir ve enflamatuvar sitokinler olan IL-17, IL-21, IL-22, IL-26'yı indükler (Wynn 2003; Quyang ve diğ. 2008).

MS patojenezi ile ilişkili diğer faktörler arasında B lenfositler ve onların sitokinleri vardır. B lenfositleri tarafından salınan transforme edici büyüme faktörü beta (TGF $\beta$ ) enflamatuvar etki gösterirken başka bir sitokin olan ve yine bu hücrelerden üretilen IL-10 anti-enflamatuvar etkiye sahiptir. Dolayısıyla B

lenfositleri MS patojenezinde hem pozitif hem negatif etkiye sahiptirler (Duddy ve diğ. 2007).

Bunlara ek olarak MS lezyonlarında CD8<sup>+</sup> T hücreleri (sitotoksik T hücreleri) de bulunabilir (Kouchaki ve diğ. 2014). Bu hücreler perforin sitolitik proteinlerin üretimi yoluyla, CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin baskılanmasına ve inaktivasyonuna aracılık eder. Ayrıca bu hücreler vasküler geçirgenliğin artmasına neden olurken glial hücrelerinde ölümünü sağlar. MS patojenezindeki en önemli olaylardan bir tanesi miyelin tabakası yapımından sorumlu olan oligodendrosit hücrelerinin ölümüdür. Oligodendrosit hücrelerinin ölmesi ile birlikte miyelin yapım süreci bozulmuş olur (Kasper ve Shoemaker 2010) (Şekil 4).



**Şekil 4.** MS patojenezinde rol oynayan immün hücreler ve sitokinleri (Ghasemi, 2017'den revize edilmiştir).

Sonuç olarak aktif hale gelen CD8<sup>+</sup> T hücreleri, farklılaşmış CD4<sup>+</sup> yardımcı Th1 ve Th17 hücreleri, B hücreleri ve doğal bağışıklık hücrelerinin, KBB bozulması ile MSS'ne infiltrasyonu gerçekleşir ve infiltre olan hücreler enflamasyon ve doku hasarına yol açar (Bielekova ve diğ. 2004; Goverman 2009; Henaka ve diğ. 2014).

KBB bütünlüğünün bozulmasıyla birlikte MSS'ne infiltre olan T hücreleri burada mikroglia ve makrofajlarla etkileşime girerek sitokin ve kemokin salınımı uyarır ve nörodejenerasyonu başlatır (Steinman 1996; Kreutzberg 1996; Raivich ve Banati 2004a; Stevens ve diğ. 1994).

MS'in bir otoimmün hastalık olduğu hipotezi, temelde MS ve hayvan modeli (DAE) arasında gözlenen benzerlikten kaynaklanmaktadır. DAE proteolipid protein (PLP), miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG) veya miyelin temel protein (MBP) gibi miyelin türevli proteinler (veya peptidleri) ile hayvanların immunize edilmesiyle indüklenir ve büyük ölçüde miyelin spesifik CD4<sup>+</sup> T hücreleri tarafından yürütülür. Miyelin spesifik otreaktif T hücreleri, hücre yapışma moleküllerinin de katkısı ile KBB ile etkileşimlerini artırır ve MSS'nde miyeline karşı bir enflamatuvar yanıtı tetikler. Böylelikle hayvanlar, MS'e benzer şekilde patolojik olarak MSS enflamasyonu ve demiyelinasyonu ile karakterize olan nükseden-düzelen veya kronik-ilerleyici hastalık seyri geliştirirler (Friese ve diğ. 2006; Constantinescu ve diğ. 2011). MS hastalarında, reaktif T hücrelerinin periferal sistemde nasıl aktif hale geldikleri hala tartışma konusudur. Bu noktada; kendinden olmayan epitoplara (viral veya mikrobiyal antijenler) karşı oluşturulan T-hücrelerinin bir moleküler benzerlik sonucu kendi miyelin epitoplarına çapraz reaksiyon göstermesi genel kabul edilen bir mekanizmadır. Ayrıca servikal lenf nodlarında sürekli olarak miyelin antijenlerinin bulunması ile T-hücrelerinin aktivasyonu da bir diğer potansiyel mekanizma olarak ileri sürülmektedir (Wucherpfennig ve Strominger 1995; Zhang ve diğ. 2008; Münz ve diğ. 2009; Comabella ve Khouryb 2012). Hastalık, periferde oluşan bu otreaktif T-lenfositlerin adezyon molekülleri, sitokinler, kemokinler ve matriks metalloproteinazların (MMP) sıralı ve komplike bir mekanizma ile aracılık ettiği KBB'ini geçişi ve MSS'ne göçü ile gerçekleşir. Bu nedenle, bu proteinler de MS immünopatolojisinde çok önemlidirler (Holman ve diğ. 2011).

### **1.5 Multipl Skleroz Tedavisinde Kullanılan FDA Tarafından Onaylanmış İlaçlar**

Çevresel faktörler tarafından genetik olarak hassas olan kişilerde tetiklenen “karmaşık karakterli” olarak kabul edilen MS için hala tamamen etkin bir tedavi yöntemi yoktur. Bununla birlikte, günümüzde MS'in semptomatik tedavisinde kullanılan yedi adet FDA tarafından onaylanmış, hastalığı modifiye edici ilaç bulunmaktadır. Hastalık için yapılan tedavilerin çoğunluğu esas olarak bağışıklık sistemini baskılayan uzun vadeli tedaviler olmakla birlikte, bu bağışıklık sistemini baskılayıcı tedaviler enfeksiyonlar ve kanser için artmış riskler ortaya koymaktadır

(Inglese ve Petracca 2015). Alternatif tedavi seçenekleri ise, interferonlar, glatiramer asetat (GA), monoklonal antikolar ve sfingozin-1-fosfat reseptör modülatörleri gibi hastalık modifiye edici terapileri içerir. Bu tedaviler atak sayısını azaltmış ve hastalık ilerlemesini yavaşlatmış olsa da kesin tedavi sağlamamaktadır (Inglese ve Petracca 2015).

İnterferon beta (IFN $\beta$ ) son 20 yılda NİMS tedavisi için en yaygın olarak kullanılan ajan olmuştur. IFN $\beta$  beyindeki pro ve anti-enflamatuvar sitokinlerin ifadelerini dengeleyerek kan beyin bariyerini aşan hücrelerin sayısını azaltarak nöronal sağ kalımı artırır. Bu ilaçtan beklenen etki; nüks oranı, süresi ve ciddiyetini azaltması iken IFN $\beta$  bu ihtiyaçlara tam anlamıyla karşılık vermemektedir. Yani sakatlık-engellilik oluşumunu azaltması açısından uzun vadeli faydası tartışmalıdır (Mitsdoerffer ve Kuchroo 2009; Inglese ve Petracca 2015).

GA, MBP yapısındaki 4 aminoasit olan L-glutamik asit, lizin, alanin ve tirozin içeren bir peptittir. GA, başlangıçta DAE'yi indüklemek yani hastalık oluşturmak için tasarlanmıştır ancak DAE'yi baskıladığı ortaya çıkmıştır. Tedavi etkinliği ortaya çıkınca MS hastaları tarafından kullanılmaya başlanmıştır. GA hastalığa bağlı özürülüğün ilerlemesi üzerinde uzun vadeli etkinlikte herhangi bir iyileşme göstermese de, NİMS'de hastalık semptomlarını ve yeni lezyonların gelişmesini % 30'a kadar azaltmıştır (Wolinsky ve diğ. 1995; Wolinsky ve diğ. 2007; Neuhaus ve diğ. 2001; Ragheb ve diğ. 2001). GA, minör (ateş, titreme) ile daha ciddi (kardiyovasküler, sindirim sistemi, kas, solunum sorunları) yan etkilere neden olabilmektedir (Johnson ve diğ. 1995).

Kullanılan diğer bir ilaç fumarik asitin metil esteri olan bağışıklık tepkilerini modüle eden ve 2013'te FDA tarafından onaylanan oral ilaç dimetil fumarat (DF)'tir (Gold ve diğ. 2012). Nöronların glutatyon seviyesini arttırarak ve enflamatuvar sitokinleri baskılayarak oksidatif stresten koruyucu etki gösterdiği savunulmaktadır. Yan etkileri arasında diyare, karın ağrısı, mide bulantısı, azalmış lenfosit sayıları ve anormal karaciğer enzim seviyesi sayılabilir. Ancak çok yeni olması nedeniyle yan etki ve tedavi etkinliği için yapılan çalışmalar dışında bağımsız kullanıcılar tarafından üretilmiş yeterli veri yoktur (Albrecht ve diğ. 2012).

Teriflunomid bir immün supresif ilaç olan ve romatoit artrit tedavisinde kullanılan leflunomidin aktif bir bileşenidir (Palmer 2010). DNA sentezini inhibe



ederek T ve B hücrelerinin proliferasyonunu bloke eder. Teriflunomid enjeksiyon uygulama yerine oral kullanım avantajı sağlar ve nüks oranı IFN $\beta$  ve glatiramer asetata benzer etkilere sahiptir (O'Connor ve diğ. 2011; Miller ve diğ. 2012). Yan etkileri arasında, azalmış lökosit sayısı, hepatik etkileri, mide bulantısı, diyare, el ve ayaklarda uyuşma, alerjik reaksiyonlar, solunum sorunları ve artmış kan basıncı sayılabilir.

Fingolimod 2010 yılında FDA tarafından onaylanmış *Isarias inclairii* mantarından izole edilmiş MS tedavisinde kullanılan ilk oral ilaçtır. Fingolimod lenf nodlarından lenfosit çıkmasını engelleyen sfingozin 1-fosfat (S1P) reseptörünü modüle eder, doğal sfingozinin yapısal bir analogudur. S1P, enflamasyon ve onarımda önemli rol oynayan doğal bir bioaktif sfingolipittir. Fingolimod lenfositler üzerindeki S1P reseptörlerini baskılayarak, lenf nodlarından lenfositlerin çıkışını önler. Bu da otoreaktif T ve B-lenfositlerinin MSS gibi enflamasyon bölgelerine göçünü engeller (Massberg ve von Andrian 2006; Mehling ve diğ. 2011). Hastalarda nüks oranı yaklaşık %50 azalmıştır ve engellilik ilerlemesini yavaşlattığı bildirilmektedir (Kappos ve diğ. 2010). Kalp krizi riski, yüksek karaciğer enzim düzeyleri, hipertansiyon ve cilt kanseri önemli yan etkileridir (Kappos ve diğ. 2010; Cohen ve diğ. 2010).

Mitoksantron ilk olarak belirli kanser tedavileri için kullanılmaya başlanmıştır. Kanserli hücrelerde DNA sentezini ve DNA tamirini bozan tip-II topoizomeraaz inhibitörüdür, ancak normal hücreleri de etkilemektedir (Lenk ve diğ. 1987; Huang ve diğ. 2012). Bunun yanında T, B hücrelerini ve makrofajları ve pro-enflamatuvar sitokinlerini (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ve IL-2) azaltan güçlü bir bağışıklık sistemi baskılayıcıdır. İkincil ilerleyen MS (İİMS) hastalarında 2 yıla kadar intravenöz enjeksiyonunun hastalık ilerlemesini ciddi oranda azalttığı rapor edilmiştir. Ancak yan etkileri arasında kardiyotoksisite ve lösemi oluşumu gibi ciddi durumların varlığı ilacın kullanımı hakkında ciddi soru işaretleri ortaya koymuştur (Hartung ve diğ. 2002; Martinelli ve diğ. 2009).

Bir monoklonal antikor olarak üretilen natalizumab, bugüne kadar nükseden iyileşen MS (NİMS) tedavisi için bulunan en etkili tedavi ajanı olmuştur. Natalizumab, lenfositlerin KBB'den MSS'ne ve diğer dokulara göçü için gerekli olan  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 ve  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 integrinlerinin önemli bir bileşeni olan  $\alpha$ 4-integrin altbirimine

bağlanır. Natalizumabın, ayda bir kez intravenöz olarak kullanımı (Rice ve diğ. 2005), MSS'nde aktive olan T hücrelerini azaltır ve böylece anti-enflamatuvar yanıt ve nöroprotektif etki sağlar (Yong ve diğ. 2007). İlaç MSS'nde lezyon oluşumunda ve hastalık ilerlemesinde azalma göstermiştir (Pucci ve diğ. 2011). KBB genelinde lenfosit trafiğini devre dışı bırakmanın önemli bir yan etkisi olarak, fırsatçı enfeksiyonlar ortaya çıkmıştır. Bunların en önemlileri arasında özellikle John Cunningham (JC) virüsü yer alır. Ayrıca natalizumab tedavisinde NİMS hastalarında progresif multifokal lökoensefalopati (PML) ciddi yan etki olarak ortaya çıkmıştır. 2012 Mayıs itibarıyla, natalizumab ile tedavi edilen 100.000 hastada 212 PML olgusu rapor edilmiştir (Bloomgren ve diğ. 2012). Bu oldukça ciddi bir yan etki olarak karşımıza çıkmaktadır.

Ayrıca, kortikosteroidler bazen atak sırasında bağışıklık baskılayıcı olarak NİMS için kullanılmaktadır. Şu anda onaylanmış tüm MS terapilerinin bir şekilde bağışıklık düzenleyici etkisi vardır ve bağışıklık aracılı miyelin yıkımını engelleme odaklıdır. Halbuki nörodejenerasyonu önlemeye veya onarımı arttırmaya özgün herhangi bir tedavi yöntemi halen mevcut değildir. Buradan yola çıkarak şu ana kadar kullanılan ilaçlar arasında etkinliği iyi olup yan etkisi az olan bir ilaç halen yoktur (Coles 2015).

## **1.6 Multipl Skleroz Tedavisinde Kullanılan Alternatif Yöntemler**

MS hastalığında ilaç tedavisinde karşılaşılan yan etkiler ve ekonomik nedenler hastaların alternatif ve tamamlayıcı tıp arayışlarına yönelmesine neden olmaktadır. Kullanılan tıbbi ilaçların yanında yapılan bilimsel çalışmalar MS hastalarının ciddi oranlarda bitkisel ve alternatif ürünlere yöneldiklerini ve kullandıklarını göstermektedir. Bitkisel tedaviler arasında *Capparis ovata*, berberin, curcumin, üfol,  $\Delta^9$ -tetrahidrakannabinoid, ginseng, kannabinoidler sayılabilir. Diğer alternatif tedaviler olarak ise mineral (Zn, Ca, Fe, Mg, Se) ve vitamin takviyeleri (E, A, B1, B2, B6, C, D, Folik asit), morinak yağı ve balık yağı gibi yağlar ve arı sokması gibi yöntemler sayılabilir (Apel ve diğ. 2005; Leong ve diğ. 2009; Shinto ve diğ. 2009; Yadav ve diğ. 2010; Bowling; 2011; Ozgun-Acar ve diğ. 2016).

Özellikle kannabinoidler, üfol ve berberinin MS semptomlarını azaltıcı etki gösterdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Ma ve diğ. 2010; Zajicek 2011; Dutra ve diğ. 2012). Kannabinoidlerin anti-enflamatuvar ve nöroprotektif etkileri MS (Baker ve diğ. 2001; Moreno Torres ve diğ. 2014), Alzheimer, Parkinson (Fernández-Ruiz ve diğ. 2015a) gibi hastalıklarda gösterilmiştir. Endokannabinoid sistem; G protein bağlı kannabinoid 1 ve 2 reseptörlerine (CB1 ve CB2) sahiptir. Kannabinoidler ayrıca G protein bağlı reseptör 55 (GPR-55) ve bazı adenozin reseptörleri ile de etkileşim kurabilir (Ryberg ve diğ. 2007; Begg ve diğ. 2002). CB1 reseptörleri MSS'nde en yaygın bulunan G protein bağlı reseptörken, CB2 reseptörü de bağışıklık sistemi hücrelerinde bol bulunur (Galiegue ve diğ. 1995). DAE'de yapılan çalışmalar kannabinoidlerin CB1 ve CB2 reseptörleri aracılıklı mekanizmalar ile semptomları azalttığı ve remiyelinizasyonu desteklediğini göstermiştir. Bununla birlikte, birçok kannabinoidin terapötik etki potansiyeli, CB1 reseptörlerinin aracılık ettiği psikotrop etkileri nedeniyle sınırlıdır. Ayrıca psikiyatrik yan etki potansiyeli ve şizofreni potansiyeli oluşturması dolayısıyla kullanımında soru işaretleri ortaya koymaktadır (Rog ve diğ. 2005; Fernández-Ruiz ve diğ. 2008; Klein ve Newton 2007; Ibeas ve diğ. 2015). Yapılan çalışmalarda kannabinoid tedavisinin aktif DAE şiddetini azalttığı bildirilmesine rağmen hastalığın aktif fazı üzerine etkisiyle ilgili bilgi sınırlıdır (Kozela ve diğ. 2011; González-García ve diğ. 2017).

Berberin özellikle geleneksel Çin tıbbında kullanılan bir saf bileşiktir (Kumar ve diğ. 2015). Yapılan çalışmalar berberinin enflamasyonu baskılar özellikler gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (Dinesh ve diğ. 2017; Liu ve diğ. 2016). DAE fareler üzerinde yapılan çalışmada berberinin semptomları azaltıcı etki gösterdiği ve bu etkileri fingolimod benzeri etki ederek sfizgozin 1 fosfat reseptörlerini inhibe ederek gerçekleştirdiğini göstermiştir (Luo ve diğ. 2017).

Özellikle Türkiye'de MS hastalarının tedavisi için en çok tercih ettiği bitki de *Capparis ovata*'dır.

## 1.7 *Capparis ovata* (Kapari)

Halk arasında gebere, gebre otu, karga kavunu, deve diken, gevil, bubuşebellah gibi isimlerle bilinen kapari (*Capparis ovata* Desf.) Ege ve Akdeniz bölgelerinde yaygın olarak yetişen, çok yıllık çalimsı yapıda, yatık veya yarı yatık yapıda büyüyen bir bitkidir (Akgül 1996; Anonim 1995 ve 1998; Inocencio ve diğ. 2006; Ölmez 2011). Kapari, Capparidaceae familyasının en geniş iki cinsinden biri olup, dünya üzerinde 350 tür ile temsil edilmektedir. Türkiye’de *Capparis ovata* ve *Capparis spinosa* türleri bulunmaktadır. Arkeolog Krügerin araştırmasına göre, 7800 yıldan beri bu bitki bilinmektedir. Aristo ve Hipokrat zamanlarında da (M.Ö. 384-322, M.Ö. 400), bu bitkiden söz edilmektedir. Kapari Akdeniz mutfağının mevsimsel malzemelerinden olup özellikle İspanya, Fas ve İtalya tarafından ihraç edilmektedir. Son yıllarda Türkiye’den de Avrupa ülkelerine kapari ürünlerinin ihracatı başlamıştır. Halk arasında analjezik, diüretik, yara iyileştirici ve hücre yenileyici olarak kullanılan kapari bitkisinin tomurcuk ve yaprakları da ilaç ve kozmetik sanayide kullanılmaktadır (Bağcı ve Şimşek 1998).

Kaparinin tomurcuklarında lipid, alkaloid, bazı glukozinolatlar ve antioksidan özelliği bulunan flavonoid ve diğ.er polifenoller bulunur. Rutin ise en sık rastlanan flavonoiddir. Ayrıca yapılan çalışmalarda metanolik ekstralarının de antioksidan özellikleri gösterilmiştir (Tesoriere ve diğ. 2007). Kapari ile yapılan çalışmalarda yan etki olarak epikondilit nedeni ile cilt üzerine *Capparis spinosa* solüsyonundan ıslak kompres yapan bir kadında alerjik kontakt dermatit oluştuğunu bildiren bir olgu sunumunun haricinde herhangi bir yan etki veya toksisiteye rastlanmamıştır (Ghule ve diğ. 2006; Angelini ve diğ. 1991).

Yapılan çalışmalarda kapari ekstralarının hidrojen donörü olarak görev yaptığı, lipid radikallerle reaksiyon vererek antioksidan özellik gösterdiği kanıtlanmıştır. Ayrıca metanolik ekstraların demir oto-oksidasyonunu artırarak ferröz demiri ferrik hale dönüştürerek hidroksil radikal oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir ve antioksidan özelliğinin içerdiği fenollere bağlı olduğu düşünülmektedir (Germano ve diğ. 2002). Bunun yanısıra Kapari ekstresinin anti-enflamatuvar özellikleri çeşitli çalışmalarda kanıtlanmıştır (Al Said ve diğ. 1988, Ozgun-Acar ve diğ. 2016).

## 1.8 Tezin Amacı

Günümüzde MS tedavisi için oral olarak kullanılabilen ilaçların dahi geliştirilmesi ancak, mevcut ilaçların kullanımında karşılaşılan yan etkilerden ve bunun yanında ekonomik nedenlerden dolayı halen yeni ilaç araştırma ve geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Bunun yanında yukarıda belirtildiği gibi güncel MS tedavileri nüksleri azaltmak ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatmada etkilidir. Ancak şu ana kadar kullanılan hiçbir tedavi tüm MS formları için nöroprotektif veya remiyelinizasyon özelliklerine sahip değildir. Bu nedendir ki MS tedavisinde temelde var olan ihtiyaç nöroprotektif etkiye sahip, bunun yanında gelişmiş etkinlik ve güvenlik profilleri gösteren yeni ajanlardır. Bu noktada 2011 yılında KOSGEB projesi [KOSGEB Proje No: 2011/1-3] kapsamında geliştirdiğimiz MSCov ekstresinin C57BL/6 deney hayvanlarında oluşturulan DAE modelinde etkinliğini saptadığımız koruyucu ve iyileştirici etkisinin tüm yönleriyle detaylı bir şekilde ortaya konması amaçlanmıştır. Tespit edilen koruyucu ve iyileştirici etkinin ne şekilde gerçekleştiğini anlamak için moleküler düzeyde MS oluşumu ve ilerlemesinde rol alan genler üzerine etkileri tespit edilmiştir. Bununla birlikte, elde edilen ekstrenin gösterdiği etkiden sorumlu fraksiyon yada etken bileşenlerin de ortaya çıkarılması temel bir amaçtır. MS hastalığı bilindiği üzere karmaşık karakterli bir hastalıktır; nöronlar, T hücreleri ve oligodendrositler hastalık patojenezinden doğrudan etkilenen hücrelerdir. Buradan yola çıkarak seçilen hücre hatlarından elde edilen sonuçların DAE oluşturulan hayvanlardan elde edilen sonuçlarla karşılaştırılıp MS çalışmaları için uygunluğunun tespit edilmesi diğer bir amaçtır. Bu tezde, 3 farklı hücre türü ile çalışıldı. Bunlardan SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı, CCRF-CEM insan lenfoblastoma hücre hattıdır. Bunun yanı sıra primer hücreler olan fare oligodendrosit hücreleri kullanıldı. Böylelikle, MSCov ekstresinin, alt ekstrelerinin ve ekstreden elde edilen saf bileşiklerin MS hastalığında alternatif ürün olarak kullanımını ve bu etkinin kaynağı ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır.

## 2. MATERYAL VE METHOD

### 2.1 Materyal

#### 2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco), Miyelin oligodendrocyte glycoprotein peptide fragment 35-55 Rat-Mouse (Anaspec, 60130-5), Pertussis toxin from *Bordetella pertussis* (Sigma, P7208), Freund's adjuvant complete (Sigma, F5881), Fetal dana serumu (Sigma-Aldrich, F9665), Tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich, T4049), Modified eagle medium: nutrient mixture F-12 (DMEM:F-12) (Sigma, D6421), Roswell park memorial institute 1640 medium (Sigma, R8758), Penisilin-Streptomisin (Sigma-Aldrich, P4333), Mouse oligodendrocytes primary cell culture serum free media (Celprogen, M11004-02), Mouse oligodendrocytes primary cell complete media w/serum (Celprogen, M11004-02S), Mouse oligodendrocytes cell culture extracellular matrix 6 well plates (Celprogen, M11004-02-6well), Sodyum fosfat monobazik (Riedel, 04269), Sodyum fosfat dibazik (Sigma, S9390), Sodyum klorür (NaCl, Sigma, 13423), Qiagen RNeasy lipid tissue mini kit (74804), Qiagen RNeasy plus universal cit (73404), Easy Script plus cDNA sentez kiti (ABM, G236), RT2 First strand kit (Qiagen, 330401), GM SYBR qPCR kit (QPSY01), 100 bç DNA ladder (Fermentas, SM0323), 1 kb DNA ladder (Fermentas, SM0311), 6X DNA izleme boyası (10 mM Tris-HCL, % 0,03 Bromfenol Blue, % 0,03 Ksilen Siyanol FF, % 60 Gliserol, 60 mM EDTA ile 10 ml olacak şekilde hazırlandı), Agaroz (Sigma, A9539), DEPC (Sigma, D5758), Ethanol (Riedel, 071029) (% 70 konsantrasyonunda etanol kullanılmıştır), Etidyum bromür (Sigma, E8751), Ketamin, Kloroform (Sigma, C2432), Ksilazin, Bromfenol mavisi (Sigma, B6131), Trizma base (Sigma, A2264), Ksilen siyanol FF (Sigma, X4126), EDTA (Sigma, 03620), Kloroform (Sigma, C2432), Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma, D4550), Kristal viyole (Fluka, 61135), Sodyum sitrat (Sigma, S1804), Hidroklorik asit (HCl) (Riedel, 7102), Rutin hidrat (95%, Sigma-Aldrich).

### 2.1.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Agaroz jel elektroforez aparatı (Thermo, EC320), CO<sub>2</sub> inkübatörü (Nuaire, NU-5510E), Gerçek zamanlı PZR cihazı (Bioneer, Exicycler 96), Güç kaynağı (Thermo, EC250-90), İverted mikroskop (Best scope, BS2090), Laminar flow kabini (ESCO, Class2 BSC), Bitki ekstraksiyon cihazı (Gerharth), Liyofilizatör (Labconco, 7382020), Nano spektrofotometre (Maestrogen, MN913), PZR cihazı (Bioneer, My Genie 96); Santrifüj (Sigma 1-15K ve Sigma 3-30K), Terazi (Precisa, XB 220A ve Mettler Toledo, PB 602-L), Isı bloğu (Biosan, TDB-100), UV jel görüntüleme kabini (DNR, LB 0605, İsrail), Vakumlu etüv (Binder, VD23), -80°C buzdolabı (Nuaire, NU-6382E).

## 2.2 Method

### 2.2.1 *Capparis ovata* Su Ekstresinin (MSCov) Hazırlanması

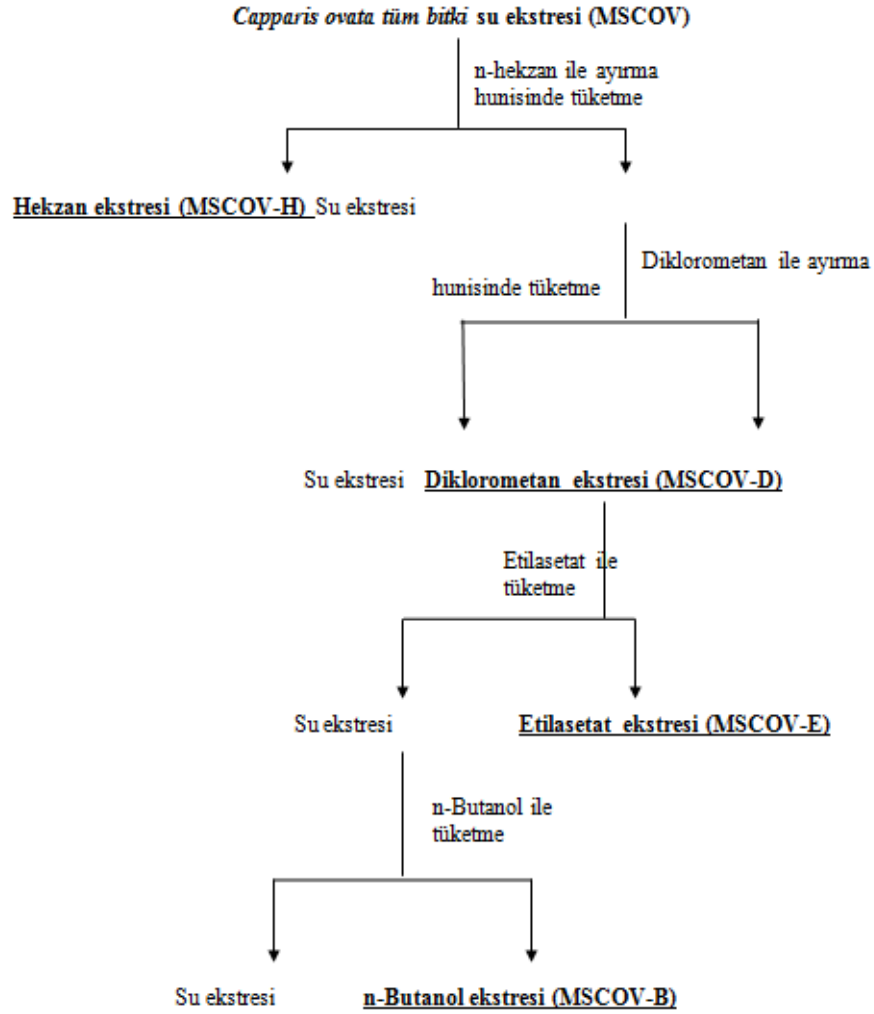
Deneyleerde kullanılan *Capparis ovata* meyve, tomurcuk ve çiçek materyali Aşçı Murat Kapari Tatlı Dondurma Turşu İml. ve İhr. Ltd. Şirketi tarafından sağlandı. Bu bitkisel ürünler 2014 ve 2015 yıllarında Mayıs ayı başlangıcından Eylül sonuna kadar ki süreçte hem doğal ortamlardan hem de bitkinin tarımı yapılan arazilerden toplanmıştır. Toplanan örnekler Dr. Mehmet Çiçek tarafından teşhis edilmiş ve Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbariumuna kayıt edilmiştir (PAMUH 2012000006300). Kapari su ekstresinin hazırlanması Türkiye Patent Enstitüsü, PT 2012/04 093 belge de tanımlandığı şekilde yapıldı. Hiçbir kimyasal kullanmadan, insanların kullandığı şekliyle %100 doğal ekstre hazırlandı.

## 2.2.2 *Capparis ovata* Su Ekstresinin (MSCov) Fraksiyonlanması

### 2.2.2.1 *Capparis ovata* Su Ekstresinin (MSCov) ve Bundan Organik Çözücülerle Tüketilerek Geri Ekstraksiyon Yolu İle Diğer Ekstrelerin Hazırlanması

Çalışmanın MSCov fraksiyonlama ve saf bileşik izolasyonu kısmı 112S187 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU'nun laboratuvarında gerçekleştirildi.

MSCov ekstresi hazırlandıktan sonra bu ekstreden geri ekstraksiyon yöntemi ile hekzan, diklorometan, etilasetat ve n-bütanol ekstraktları hazırlandı (Şekil 5) ve bu ekstraktlardan saf maddelerin izolasyonu yapıldı.



Şekil 5. MSCov ekstresinden geri ekstraksiyon yöntemiyle alt ekstraktların elde edilmesi.



## 2.2.3 Hayvan Deneyleri

### 2.2.3.1 MS Modeli (DAE) Çalışmaları

C57BL/6 farelerde deneysel hayvan modeli olan deneysel alerjik ensefalomyelit (DAE) oluşturmak için %95 saflıktaki Miyelin Oligodendrosit Glikoprotein 35-55 aminoasit peptid (MOG35-55), *Mycobacterium tuberculosis* (ısı inaktive edilmiş) toksini ve Freund adjuvan kullanıldı. Freund adjuvant ile emülsifiye edilmiş 250 µg MOG 35-55 ve 400 µg ısı inaktive edilmiş *Mycobacterium tuberculosis* toksini karışımı, her hayvanın deri altına enjekte edildi. Bu işlemden hemen sonra ve 48 saat sonra 400 ng pertussis toksin karın boşluğuna enjekte edildi. 14 gün boyunca deney hayvanları her gün kontrol edildi ve farelerin gösterdikleri davranışlar 5 basamaklı bir ölçek kullanılarak belirlendi ve video ile kayıt edildi. Kullanılan ölçek Tablo 1'deki gibidir.

**Tablo 1.** DAE takibinde kullanılan skorlama tablosu (Zheng ve diğ. 2008).

| Skor | Gözlenen Etki                                       |
|------|---|
| 0    | Herhangi bir etki yok                               |
| 1    | Kuyruk zayıflığı                                    |
| 2    | Arka uzuvlarda zayıflık ve anormal yürüme           |
| 3    | Arka uzuvlardan 1 ya da 2 tanesinin tamamen felci   |
| 4    | Ön ve arka uzuvların felci; 4 uzuvda da felç durumu |
| 5    | Can çekişme-ölüm                                    |

### 2.2.3.1.1 MSCov Ekstresinin DAE Oluşturulan Hayvanlara Verilmesi

Hayvanlarda DAE oluşturulduktan sonra deney hayvanları DAE induksiyonu gerçekleştirilenler ve kontrol grubu olarak toplamda 4 gruba ayrıldı. Bu gruplar Tablo 2'deki gibidir.

**Tablo 2.** Kullanılan deney grupları.

| Grup Adı                            | Örnek Sayısı | Açıklama  |
|-------------------------------------|--------------|---|
| <b>Kontrol</b>                      | 8            | Bu gruptaki hayvanlara herhangi bir deneysel işlem yapılmadı.   |
| <b>DAE (Hasta)</b>                  | 8            | Deneysel alerjik ensefalomyelit: Bu gruptaki hayvanlarda yukarıda verilen prosedür ile deneysel alerjik ensefalomyelit oluşturuldu; hayvanlar deneysel işlemlerin başlangıcından itibaren 3 hafta (21 gün) süreyle takibe alındı ve izlendi.                  |
| <b>PDAE (Paralel Hasta Kontrol)</b> | 8            | Paralel Deneysel alerjik ensefalomyelit: Bu gruptaki hayvanlarda yukarıda verilen prosedür ile deneysel alerjik ensefalomyelit oluşturuldu; hayvanlar deneysel işlemlerin başlangıcından itibaren yaklaşık 6 hafta (38 gün) süreyle takibe alındı ve izlendi. |
| <b>DAE MSCov (Tedavi)</b>           | 8            | Bu gruptaki hayvanlarda DAE oluşturulduktan sonra (Antijen Enjeksiyonundan yaklaşık 14 gün sonra) MSCov ekstresi intragastrik gavaj ile 21 gün boyunca hayvan başına 500 mg/kg ağırlık olacak şekilde verildi ve takip edildi.                                |

### 2.2.3.1.2 Dokuların Temini

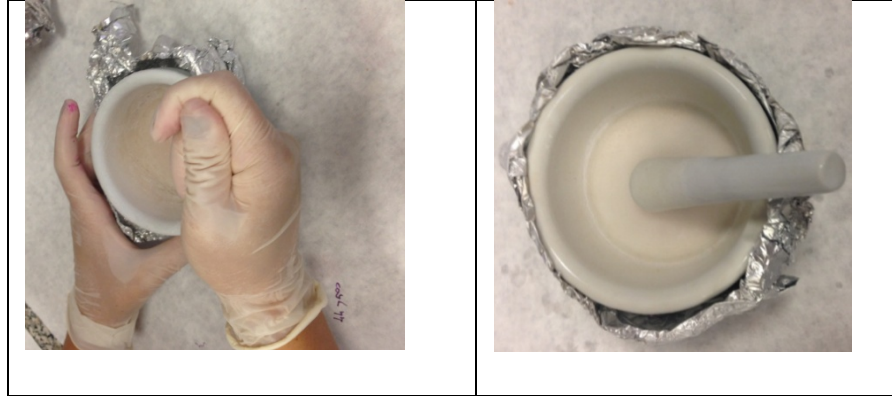
Deney işlemleri süreci sonunda anestezi (ksilazin/ketamin) ile ötenazi edilen farelerden beyin dokusunun yanı sıra karaciğer, dokuları steril bir şekilde alındı. Alınan dokuların moleküler etki belirleme çalışmaları için steril 2ml'lik eppendorf tüplere alınıp etiketlendi ve sıvı azotta donduruldu. Ardından Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyokimya ve Moleküler Toksikoloji Laboratuvarına getirilen dokular -80°C'ye kaldırıldı.

### 2.2.3.2 MS Dizin (Array) Analizleri

MS dizin analizi için laboratuvarımızda bulunan 96 örneklilik blokluk cihaza (Bioneer) uygun olması için “Customdesign” dizin oluşturuldu. Ayrıca hem cihazımızla uyumlu olması hem de daha ekonomik olması nedeniyle Bioneer firmasının Türkiye temsilcisi Gen Plaza firmasının da yardımları ile firma ile doğrudan iletişime girilerek bu dizinlerin siparişi ve sentezi sağlandı. MS dizini ile 96 genin analizi kontrol, DAE kontrol, MSCov tedavi grubundan örnekler seçilerek her biri için ayrı ayrı yapıldı. MS dizin genleri sonuçlar kısmında verilmiştir. MS dizin çalışmaları ile gruplar arasında farklılık olan genler belirlendi ve bundan sonraki çalışmalarda bu genler çalışıldı.

#### 2.2.3.2.1 Beyin Dokusundan RNA İzolasyonu

Beyin dokusundan total RNA izolasyonu “Qiagen RNeasy Lipid Tissue Mini Kit” kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı. -80°C’de bulunan fare beyin dokuları diethylpyrocarbonate (DEPC) ile muamele edilmiş havanda sıvı azotla öğütüldü (Şekil 6).



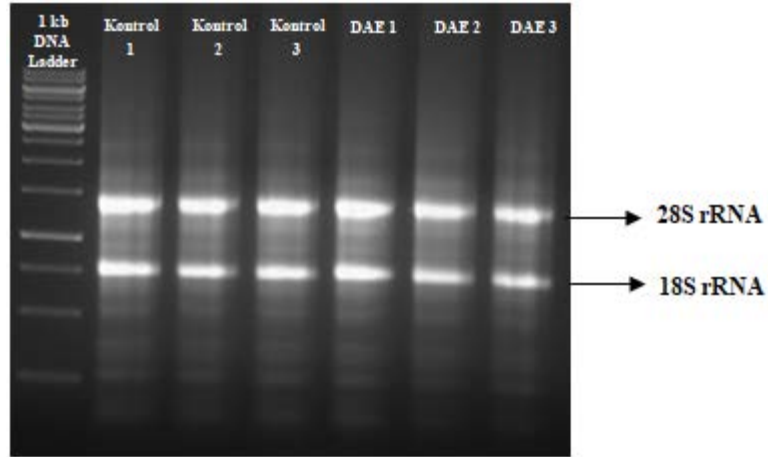
**Şekil 6.** Sıvı azot ile beyin dokusu öğütme.

2ml’lik eppendorf tüplere 1 ml Qiazol Lysis Solüsyonundan eklendi. Darası alınan eppendorf tüplere 50 mg olacak şekilde öğütülen beyin dokusu tartıldı ve iyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dak. inkübe edildikten sonra üzerine 200 µl kloroform eklendi ve iyice karıştırıldı. 3 dak. oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 12.000 xg’de 4°C’de 15 dak. santrifüj edildi. Üst faz alınıp yeni 2 ml’lik eppendorf tüpe alındı ve alınan üst fazın üzerine eşit miktarda %70 etanol eklendi ve iyice

karıştırıldı. Karışım RNeasy mini spin kolona eklendi ve 30 saniye 9.000 *xg*'de santrifüj edildi alta geçen kısım döküldü. Kolonun üzerine 700 µl kitin içinde bulunan yıkama tamponu (RW1) eklendi ve 30 saniye 9.000 *xg*'de santrifüj edildi. Alta geçen kısım döküldü ve kolonun üzerine kitin içinde bulunan RPE tamponundan 500 µl eklendi ve 30 saniye 9.000 *xg*'de santrifüj edildi, alta geçen kısım döküldü. Kolonun üzerine 500 µl RPE tamponu eklendi ve 2 dak. 15 saniye 9.000 *xg*'de santrifüj edildi. Alta geçen kısım döküldü. Kolon yeni tüpe alındı ve üzerine 50 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 1 dak. 15 saniye 9.000 *xg*'de santrifüj edilerek RNA'ların alta geçmesi sağlandı. Elde edilen RNA kalitesi agaroz jel elektroforezinde görüntüledi ve konsantrasyonları NanoDrop (MaestroNano) cihazında ölçüldü. RNA izolasyonundan sonra konsantrasyonları hesaplanan RNA'lardan cDNA sentezi yapıldı (aşağıda anlatılmıştır).

#### **2.2.3.2.2 Total RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi İle Görüntülenmesi**

İzole edilen RNA'lar %1'lik agaroz jel hazırlanarak Thermo yatay agaroz jel elektroforezi ile yürütüldü. %1'lik agaroz jel, Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponu ile hazırlandı. Agaroz çözünene kadar mikrodalga fırında kontrollü bir şekilde ısıtma işlemi yapıldı. Çözünme işleminden sonra agaroz solüsyonu soğutularak üzerine 1 µL Etidyum bromür (EtBr) eklendi ve elektroforez tablasına dökülerek katı hal oluşuncaya kadar beklendi. Katı hal alan agaroz jel, elektroforez tankına, kuyucuklar RNA'nın '- den +' ya yürüyebilmesi için elektroforezin (-) kutbuna doğru yerleştirildi. Elektroforez tankı RNA'yı yürütmek için 1X TAE yürütme tamponuyla dolduruldu. 3 µL RNA örneği, 5 µL steril su ve 2µl yürütme boyası ile muamele edilerek mikropipet ile jelde bulunan kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlandı ve 90 Volt, maksimum 500 mA'de 45 dak. süre ile yürütüldü. Yürütme bitince jel UV transilluminatörde görüntülenip DNR LightBis ProImage Analysis System (DNR BioImaging System Ltd. Jerusalem, Israel) cihazında fotoğraflandı (Şekil 7).



**Şekil 7.** Kontrol ve DAE kontrol beyin dokularından optimize edilmiş yöntem ile izole edilmiş total RNA agaroz jel elektroforez görüntüsü.

### 2.2.3.2.3 cDNA Sentezi

MS dizin çalışmaları için elde edilen RNA'lar nükleaz içermeyen ve DEPC muamele edilmiş yüksek kaliteli su kullanılarak aşağıdaki karışım hazırlandı (her bir dizin analizi için yeterli olacak şekilde):

a) Genomik DNA Uzaklaştırma Reaksiyon Karışımı (aşağıdakiler steril bir PCR tüpü içinde birleştirildi)

|                       |                    |
|-----------------------|--------------------|
| Total RNA             | 3.2 µg             |
| gDNA yok etme tamponu | 2.0 µl             |
| Yüksek kalite su      | 10.0 µl son hacime |

Vortekslenip 10-15 saniye santrifüj edildi. Karışım 42 ° C'de 6 dak. inkübe edildikten sonra en az bir dakika boyunca buz üzerinde soğutuldu.

b) Bu arada RT kokteyli aşağıdaki şekilde hazırlandı:

|                  |                  |
|------------------|------------------|
| RT tamponu       | 4 µl             |
| Primer           | 1 µl             |
| RT enzim         | 2 µl             |
| Yüksek kalite su | 10 µl son hacime |

RT kokteyli (b) yukarıda (a) elde edilen genomik DNA uzaklaştırma reaksiyonu ile karıştırıldıktan sonra 42°C'de 20 dak. inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi. Süre sonunda enzimin inhibisyonu için karışım 95 °C'de 5 dak. inkübe edildi.

İnkübasyon süre ve sıcaklıkları, RNA miktarları laboratuvarımız koşullarında optimize edildi. Eğer elde edilen cDNA aynı gün kullanılacaksa buz üzerinde tutuldu, aksi halde -80 ° C'de saklandı. Elde edilen cDNA 91 µl yüksek kalite su ile seyreltilerek dizinlerde her bir kuyu için 1.1 µl olacak şekilde kullanıldı (Not: İlk aşamalarda cDNA kalite kontrolü bilinen bir primer seti ile kontrol edildi).

## **2.2.4 Hücre Kültürü Çalışmaları**

### **2.2.4.1 Besiyeri Hazırlanışı ve Hücrelerin Büyütülmesi**

Çalışmalarımızda ATCC (American Type Culture Collection) firmasından alınan SH-SY5Y, CCRF-CEM hücre hatları ve yine ticari olarak alınan primer fare oligodendrosit hücreleri kullanıldı. Çalışma boyunca kullanılmış olan insan nöroblastoma hücreleri için (SH-SY5Y) %10 fetal dana serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM:F-12) besi ortamı, lenfoma T hücreleri olan CCRF-CEM hücreleri için ise yine %10 fetal dana serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içeren Roswell Park Memorial Enstitü (RPMI-1640) besi ortamı kullanıldı. Bunun yanında primer fare oligodendrosit hücreleri için ise Mouse oligodendrocytes primary cell culture media kullanıldı ve tüm hücreler çalışma boyunca 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren ortamda inkübe edildi.

### **2.2.4.2 Tripan Mavisi**

Deneylerimizde hücre saymak için kullandığımız tripan mavisi 1:1000 sulandırılarak kullanıldı. 0,05 gr tripan mavisi 10 ml dH<sub>2</sub>O'da çözülüp 0.22 mikronluk filtrelerden süzülerek kullanıldı.

### 2.2.4.3 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler çoğaltıldıkları kültür kaplarında hücreler tek tabaka olduklarında pasajları yapıldı. Pasaj işlemi için öncelikle kültür besiyeri uzaklaştırıldı. Daha sonra hücreler % 0,25'lik tripsin ile yaklaşık 5 dak. muamele edildi ve hücrelerin yüzeyden ayrılmaları sağlandı. Süspansiyon haline getirilen hücreler steril santrifüj tüpüne alındıktan sonra tripsinin inaktif hale gelmesi için üzerine 2 ml uygun besi ortamı eklendi ve hücreler 200 xg hızda 5 dak. santrifüj edildikten sonra supernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 1 ml besiyeri eklenerek, ependorfta hazırlanan tripan mavisi ve hücre karışımı (1:1) thoma lamında sayıldı ve hücreler deney planına göre ekim için hazır hale getirildi. Süspansiyon hücreler olan CCRF-CEM hücreleri ise doğrudan steril tüplere alındı. 200 xg hızda 5 dak. santrifüj edildikten sonra supernatant uzaklaştırıldı ve hücre sayısı yine tripan mavisi ile tespit edildikten sonra ekim için hazır hale getirildi.

### 2.2.4.4 Sitotoksosite Çalışmaları

Hücrelerin büyüme ve gelişmesi sağlandıktan sonra sitotoksosite çalışmaları gerçekleştirildi. MSCov ekstresi ve bundan elde edilen diklorometan, etil asetat ve n-bütanol ekstraktları (hekzan ekstresinde herhangi bir madde elde edilemediği için diklorometan, etil asetat ve n-bütanol ekstraktları ana fraksiyonlar olarak kullanıldı) ve bunun yanında SH-SY5Y hücrelerinde 1H-indol-2-hidroksi 3-karboksilik asit, glukokapparin, olean-12-en-28-ol, 3 $\beta$  pentakosanoat (3 $\beta$ -hidroksi-olean-12-en-28-ol, 3- $\beta$ -pentakosanoik ester), oleanolik asit, stigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -miristat, ursolik asit ve  $\beta$ -sitosterol saf bileşikleri sitotoksosite deneyleri için uygun çözücülerle çözüldükten sonra steril etmek için 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi.

Sitotoksosite testi için farklı konsantrasyonlarda MSCov ekstresi suda çözüldü. 96'lık plakaya ekilecek olan hücrelerin sayısı hesaplandı. Bunun için adherent hücreler tripsin ile kaldırıldı. 15 ml'lik steril Falcon tüplere besiyeri içinde olan hücreler alınıp, 200 xg'de 24°C'de 5 dak. santrifüj edildi. Süpernatant atılıp, dibe çöken hücreler 1 ml besiyeri içinde çözüldü. Eppendorfta hazırlanan tripan mavisi ve hücre karışımı (1:1) thoma lamında sayıldı. Hücre sayısı hesaplandıktan sonra her kuyucukta  $1 \times 10^3$  hücre olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekildi ve

plakaların üzeri toplamda 200 µl olacak şekilde besiyeri ile tamamlandı. Hücrelerin plakaya yapışması için 24 saat %5'lik CO<sub>2</sub> inkübatöründe, %95 nem ortamında bekletildi. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda MSCov ekstresi hücrelere uygulandı. 24 saatin sonunda 96 kuyulu plakadaki besiyeri uzaklaştırıldı. Her kuyucuk 100 µl kristal viyole ile boyanıp 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Plaka çeşme altında tutularak boya uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 100 µl 0,1 M % 50 etanol içindeki sodyum-sitrat eklendi ve 15 dak. 100 rpm'de çalkalandı. Oluşan renk 630 nm'de ELISA okuyucuda okundu. Süspanse olan CCRF-CEM hücrelerinde ise sitotoksisite testi farklı konsantrasyonlarda MSCov ekstresi uygulanmış hücreler tripan mavisi ile boyanarak ve otomatik hücre sayıcı (Eve NanoEntek, Kore) ile sayılarak gerçekleştirildi.

MSCov ekstresinden elde edilen diklorometan (DKM), etil asetat (EA) ve n-bütanol (B) alt ekstreleri oleanolik asit (OA), ursolik asit (UA), olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat (OPC), glukokapparin (GC), Stigmast-5,22-dien-3β-miristat (SDM), 1H-indol-2-hidroksi 3-karboksilik asit (IHK) ve β-sitosterol (SIT) saf bileşikleri ve rutin suda çözünmediği için hücre kültürü işlemlerinde iyi bir çözücü olarak bilinen dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldü ve sitotoksisite testi yukarıda anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. DMSO ile çözülen alt fraksiyonlar ve saf bileşiklerin sitotoksisite çalışmalarında kontrol grubu uygulamada kullanılan dozda DMSO'ya maruz bırakıldı.

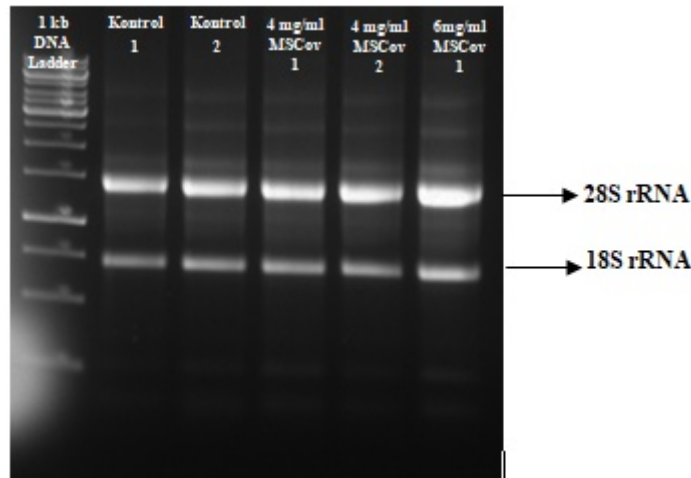
#### **2.2.4.5 Hücrelere Bileşiklerin Uygulanması**

Hücrelerde MSCov ekstresi, DKM, EA, n-bütanol alt ekstreleri, OA, UA, OPC, GC, SDM, IHK ve SIT saf bileşikleri EC05 ve EC10 değerleri sitotoksisite deneyi ile belirlendikten sonra bu dozların hücrelerde belirlenen genlerin ekspresyon düzeylerindeki etkisini test etmek için hücre kültürü ortamında steril şartlarda hücrelere uygulandı. Bunun için 10 mm petrilere 10<sup>6</sup> hücre ekildi ve 24 saat inkübasyonun ardından belirlenen dozlar bu hücrelere uygulandı. İkinci bir 24 saatin sonunda hücreler RNA izolasyonu için 600 µl "Qiazol Lysis" reaktifi ile toplandı.



#### 2.2.4.6 Hücrelerden RNA İzolasyonu

“Qiazol Lysis” reaktifi ile toplanan hücrelerden ayrı ayrı total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA izolasyonu ‘QIAGEN RNeasy Plus Universal’ kit kullanılarak üretici firmanın talimatları baz alınarak ve hücreden RNA izole etmek için kendi laboratuvarımızda optimize ettiğimiz prosedür ile yapıldı. “Qiazol Lysis” reaktifi ile toplanan hücreler 5 dak. oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra üzerine 100 µl kit içinde bulunan gDNA eliminatör solüsyonundan eklendi ve 15 saniye karıştırıldı. Daha sonra 180 µl kloroform eklendi ve tekrar karıştırıldıktan sonra 3 dak. oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda 12.000 xg’de ve +4°C’de 30 dak. santrifüj edildi. Üst faz alınıp 2 ml’lik steril eppendorf tüpe toplandı ve alınan üst faza eşit miktarda %70 etanol eklenip iyice karıştırıldı. Karışım “RNeasy mini spin” kolona yüklendi ve 30 saniye 9.000 xg’de santrifüj edildi ve alta geçen kısım döküldü. Kolunun üzerine 700 µl kit içinde bulunan yıkama tamponu “RWT” eklendi ve 30 saniye 9.000 xg’de santrifüj edildi. Alta geçen kısım dökülüp kolonun üzerine 500 µl kit içinde bulunan yıkama tamponu “RPE” eklendi ve 30 saniye 9.000 xg’de santrifüj edilerek alta geçen kısım döküldü. Kolon üzerine tekrar “RPE” tamponu eklendi ve 150 saniye 9.000 xg’de santrifüj edilerek alta geçen kısım tekrar döküldü. Son olarak kolan yeni tüpe alındı ve üzerine 40 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 75 saniye 9.000 xg’de santrifüj edildi. Elde edilen RNA kalitesi agaroz jel elektroforezinde görüntüledi (Şekil 8) (Bölüm 2.2.3.2.2’de anlatılmıştır) ve konsantrasyonları NanoDrop (MaestroNano) cihazında ölçüldü.



**Şekil 8.** Kontrol ve MSCov muamele edilmiş SH-SY5Y hücrelerinden optimize edilmiş yöntem ile izole edilmiş total RNA agaroz jel elektroforez görüntüsü.

### 2.2.4.7 cDNA Sentezi

cDNA sentezi Easy Script Plus cDNA sentez kiti ile oligo d(T) primeri ve Ters Transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. cDNA sentezi için 2,5 µg RNA kullanıldı. Karışım (Tablo 3) hazırlandıktan sonra cDNA sentezi için 50°C’de 50 dak. inkübe edildi ve süre sonunda, enzimi inhibe etmek için 85°C’de 5 dak. bekletildi. Sentezlenen cDNA’lar, RT-PZR yapmak üzere -80 °C muhafaza edildi.

**Tablo 3.** cDNA sentez karışımı.

|   | <b>Hacim</b> | <b>Son konsantrasyon</b> |
|---|--------------|--------------------------|
| <b>Total RNA</b>                                  | Değişken     | 2.5 µg                   |
| <b>Oligo(dT) primer</b>                           | 1µl          | 0.5 µM                   |
| <b>dNTP karışımı (10 mM)</b>                      | 1 µl         | 500 µM                   |
| <b>65°C 5 dakika inkübasyon</b>                   |              |                          |
| <b>5 X RT tamponu</b>                             | 4 µl         | 1 X                      |
| <b>RNaseOFF ribonukleaz inhibitorü (40 U/ µl)</b> | 0.5 µl       | 20 ünite                 |
| <b>Easyscript plus RTaz (200U/µL)</b>             | 1 µl         | 200 ünite                |
| <b>RNAaz içermeyen su</b>                         | Değişken     | -                        |
| <b>Son hacim</b>                                  | 20 µl        | -                        |

### 2.2.4.8 mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi: Gerçek Zamanlı PZR

Gerçek zamanlı PZR reaksiyonları ABM Kilogreen qPCR Mastermix kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği talimatlara göre gerçekleştirildi. Primer ve cDNA miktarları laboratuvarımızda optimize edildi. Gerçek zamanlı PZR sonucunda elde edilen sonuçlar Exicycler 3 programı kullanılarak hesaplandı ve normalizasyon (housekeeping) geni olan beta aktin (ACTB)’e göre normalize edildi. Her gen için kopya sayısı döngü sayısı ilişkisinin doğrusal olması için döngü sayısı 35 olarak belirlendi. PZR koşulları Tablo 4’de; sıcaklık, döngü ve zamanları ise Tablo 5’de verilmiştir.

**Tablo 4.** qRT-PZR koşulları.

| PZR                           | Reaksiyon Karışımı |
|-------------------------------|--------------------|
| Kilo Green 2X qPCR Master Mix | 12.5 µl            |
| İleri Primer (10 pm)          | 0.6 µl             |
| Geri Primer (10 pm)           | 0.6 µl             |
| cDNA (1:5 seyreltilmiş)       | 5 µl               |
| dH <sub>2</sub> O             | 6.3 µl             |

**Tablo 5.** PZR sıcaklık, döngü ve zamanları.

|                 | PCR Koşulları               |
|-----------------|-----------------------------|
| Ön Denatürasyon | 95 <sup>0</sup> C 5 dakika  |
| Denatürasyon    | 95 <sup>0</sup> C 20 saniye |
| Yapışma         | X <sup>0</sup> C 20 saniye  |
| Uzama           | 72 <sup>0</sup> C 25 saniye |
| Döngü Sayısı    | 35 döngü                    |

PZR reaksiyonu için ABM firmasının ürettiği ‘KiloGreen 2X qPCR Mastermix’ kullanıldı. Her gen için ayrı ayrı amplifikasyon analizi ile standart kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve erime eğrisi analizleri yapıldı. Amplifikasyon sonucunda elde edilen Ct (threshold) değerleri kullanılarak seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde uygulamalar sonucunda meydana gelen değişimler belirlendi. Deneylerde kullanılan primer dizileri SH-SY5Y ve CCRF-CEM hücreleri için insan, fare primer oligodendrosit hücreleri için ise fare genomuna uygun olarak seçildi. Primer sekansları Tablo 6 ve Tablo 7’de verilmiştir.

**Tablo 6.** SH-SY5Y ve CCRF-CEM hücre çalışmalarında kullanılan primer dizileri ve yapışma sıcaklıkları.

| Gen Kodu  | Gen Adı        | F_Dizisi (5'→3')       | R_Dizisi (5'→3')        | Yapışma Sıcaklığı (°C) |
|-----------|----------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| NM_000484 | hAPP           | GCCCTGCGGAATTGACAAG    | CCATCTGCATAGTCTGTGTCTG  | 61                     |
| NM_001734 | hC1S           | TTTGCCATGGGTTTATGCTGA  | GGGTGAAGTAGAGGTGAATCCC  | 51                     |
| NM_002985 | hCCL5          | CAGTCGTCTTTGTCACCCGA   | AGAGCAAGCAGAAACAGGCA    | 62                     |
| NM_000616 | hCD4           | ATCGGGCTTCTGTCTCTCT    | ACCTGAGCCCACAGAAATGG    | 62                     |
| NM_002416 | hCXCL9         | GGCTCTTTCTGGCTACTCC    | TCCCTGGTCCCTGTAGTGAG    | 61                     |
| NM_001565 | hCXCL10        | ACCAGAGGGGAGCAAAATCG   | GGAAGTGATGGGAGAGGCAG    | 62                     |
| NM_002055 | hGFAP          | GTGTCAGAAGGCCACCTCAA   | TCAGGTCTGGGAAATGTGC     | 62                     |
| NM_002070 | hGNAI2         | TGATCGACAAGAACCTGCGG   | TGCTTGACGATGGTGCTCTT    | 61                     |
| NM_001530 | hHIF1A         | GGCGCAACGACAAGAAAAA    | GTGGCAACTGATGAGCAAGC    | 61                     |
| NM_000600 | hIL6           | ACTCACCTTTCAGAACGAATTG | CCATCTTTGGAAGGTTTCAGTTG | 59                     |
| NM_000572 | hIL10          | TCTCCGAGATGCCTTCAGCAGA | TCAGACAAGGCTTGCCAACCCA  | 51                     |
| NM_002361 | hMAG           | CCAAGTAGTCCACGAGAGCTT  | CAGGTCCCCACGGAAGTAGT    | 62                     |
| NM_002385 | hMBP           | TCGGCTCACAAGGGATTCAAG  | TGATCCAGAGCGACTATCTCTTC | 51                     |
| NM_004994 | hMMP9          | GGGACGCAGACATCGTCATC   | TCGTCATCGTCGAAATGGGC    | 62                     |
| NM_003998 | hNFkB1         | TCGCGCTGAGTATAAAAAGCC  | GGCAAAGTTTCGTGGATGCG    | 61                     |
| NM_000533 | hPLP1          | GAAAGCCCTTTTCATTGCAGGA | GGCTAGTCTGCTTTGTGGCT    | 56                     |
| NM_002834 | hPTPN11        | GACGTTCCCAAAACCATCCA   | TCTTCTTCAATCCTGCGCTGT   | 56                     |
| NM_003150 | hSTAT3         | AACAGGATGGCCCAATGGAA   | GAAGCGGCTATACTGCTGGT    | 61                     |
| NM_000454 | hSOD1          | TAAAGTAGTCGCGGAGACGG   | CTTCGTCGCCATAACTCGCT    | 62                     |
| NM_000660 | hTGFB1         | TACCTGAACCCGTGTGCTCTC  | GTTGCTGAGGTATCGCCAGGAA  | 51                     |
| NM_000594 | hTNF- $\alpha$ | TGGGATCATTGCCCTGTGAG   | GGTGTCTGAAGGAGGGGGTA    | 62                     |
| NM_001101 | hACTB          | GCCGCCAGCTCACCAT       | GATGCCTCTCTGCTCTGGG     | 59                     |

**Tablo 7.** Fare primer oligodendrosit hücre çalışmalarında kullanılan primer dizileri ve yapışma sıcaklıkları.

| GenAdı    | Kodu           | F_Dizisi (5'→3')          | R_Dizisi (5'→3')     | Yapışma Sıcaklığı (°C) |
|-----------|----------------|---------------------------|----------------------|------------------------|
| NM_007471 | mAPP           | GTCCGAGTTCCCACGACAG       | GGGACATTCTCTCTCGGTGC | 63                     |
| NM_144938 | mC1s           | GAGGGAAAGACAAGGAACCA      | AGGACCAAACACCACATCCC | 61                     |
| NM_013653 | mCCL5          | GCCCTCACCATCATCTCAC       | GGGAGAGGTAGGCAAAGCAG | 64                     |
| NM_013488 | mCD4           | GCACAGCTATCACGGCCTAT      | GAGTGGGAGCGTTTCCTTCA | 62                     |
| NM_021274 | mCXCL10        | GAGAGACATCCCAGCCAAC       | CCAGCAGGATGAGGCAGAAA | 63                     |
| NM_008599 | mCXCL9         | AAGTTAGCCTGTGTGGGAGC      | TACCGAAGGGAGGTGGACAA | 62                     |
| NM_008138 | mGNAI2         | ACAACCTGAAGGACTGTGGC      | CATGGTCTTCTTGCCCCAT  | 62                     |
| NM_010277 | mGFAP          | GACTCGAAGCAGGAGCACAA      | CAGCACACAGGCAGAAAACC | 62                     |
| NM_010431 | mHIF1A         | GCCTTAACCTGTCTGCCACT      | GCTGCTTGAAAAAGGGAGCC | 62                     |
| NM_031168 | mIL6           | GGAGTCACAGAAGGAGTGGC      | CGCACTAGGTTTGCCGAGTA | 63                     |
| NM_010758 | mMAG           | AGGTCAGTTGTATGGTGCCG      | CGAACTGCAAGGTGGTGTG  | 62                     |
| NM_010777 | mMBP           | CCAAGT TCACCCTACTCCA      | TAAGTCCCCGTTTCTGTG   | 61                     |
| NM_013599 | mMMP9          | CGCTCATGTACCCGCTGTAT      | CCGTGGGAGGTATAGTGGGA | 63                     |
| NM_008689 | mNFKB1         | ATGTAGTTGCCACGCACAGA      | GGGGACAGCGACACCTTTTA | 61                     |
| NM_011123 | mPLP1          | CAGGCTCCTGCTAGA AATGG     | TCCGTTCTGCTCTCCTCAGT | 60                     |
| NM_011202 | mPTPN11        | ATGACTTCTGGCGGATGGTG      | CCTGGAGTAGAGCTTGCCG  | 63                     |
| NM_011434 | mSOD1          | AGACCTGGGCAATGTGACTG      | CGGCCAATGATGGAATGCTC | 62                     |
| NM_011486 | mSTAT3         | ACCATTTCATTGATGCAGTTTGGGA | ATATGGGGTTCGGCTGCTTA | 64                     |
| NM_011577 | mTGFB1         | AGGGCTACCATGCCAACTTC      | CCACGTAGTAGACGATGGGC | 63                     |
| NM_013693 | mTNF- $\alpha$ | CGTCAGCCGATTTGCTATCT      | CGGACTCCGCAAAGTCTAAG | 60                     |
| NM_007393 | mACTB          | AGCCATGTACGTAGCCATCC      | GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA | 60                     |

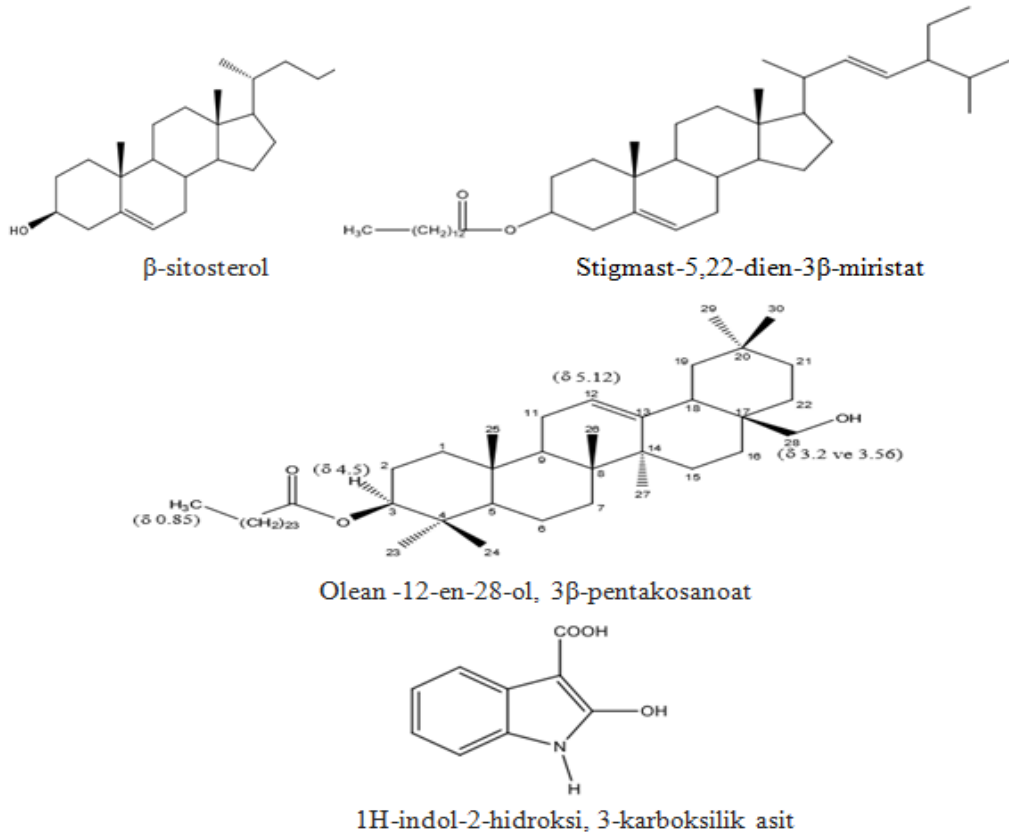
### 2.2.5 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Minitab 13 istatistiksel yazılım paketi (Minitab, Inc., State College, PA, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar her biri veri için Ortalama  $\pm$  Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Gruplar arası karşılaştırma Student's t-testi kullanılarak yapıldı ve istatistiksel anlamlılık seviyesi olarak  $p < .05$  seçildi. Üç grup arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Mikroarray analizi için, farklı şekilde eksprese edilen genlerin tüm veri analizleri R 3.1.2 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) kullanılarak gerçekleştirildi.

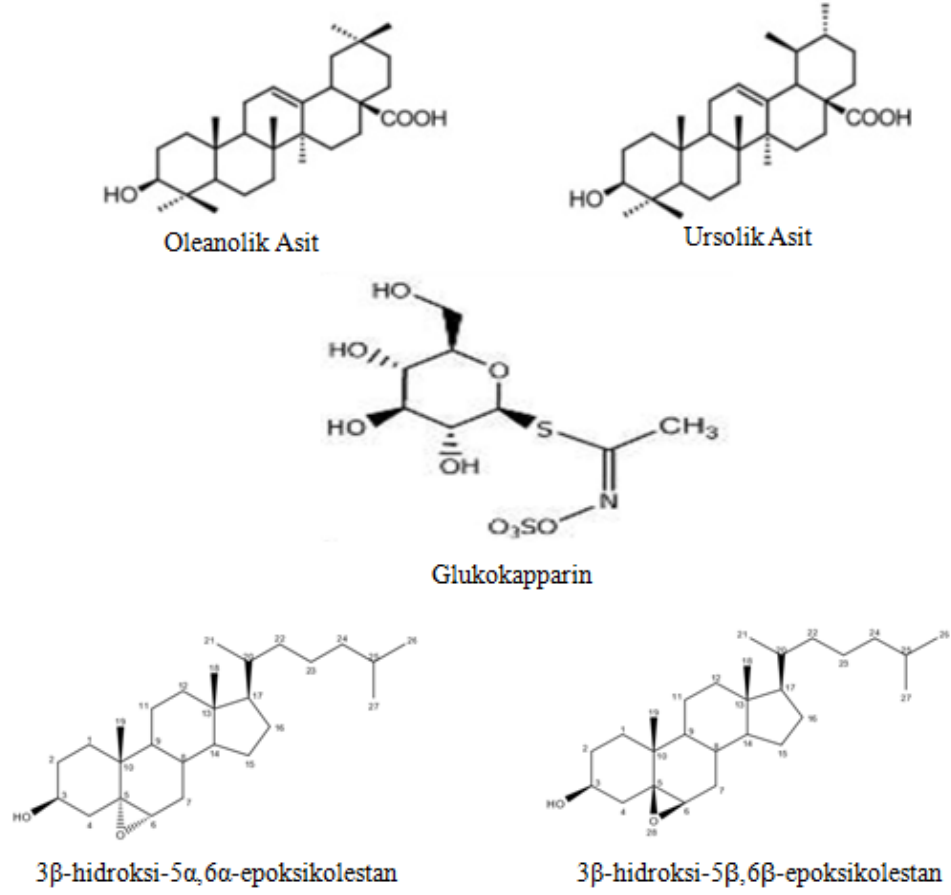
### 3. SONUÇLAR

#### 3.1 *Capparis ovata* Saf Bileşik İzolasyonu

Çalışmamızda *Capparis ovata* bitkisinden sadece su kullanılarak MSCov ekstresi hazırlandı ve bu ekstreden geri ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen 3 farklı alt ekstre (diklorometan, etil asetat ve n-bütanol) her 3 hücre grubunda da çalışmalarımızda kullanıldı. Bunun yanı sıra bitkinin tomurcuk ve meyve kısımlarının diklorometan: hekzan ekstresinden 8 tane saf bileşik izole edildi. Ayrıca MSCov ekstresinden geri ekstraksiyonla diklorometan alt ekstresinden 1 tane saf bileşik izole edildi (1H-indol-2-hidroksi-3-karboksilik asit). İzole edilen 7 tane saf bileşiğin MS genleri üzerine etkisi SH-SY5Y hücrelerinde çalışıldı. Kalan 2 tane saf madde karışım olarak izole edildiği için çalışmaya dahil edilemedi. İzole edilen saf bileşik yapıları Şekil 9 ve 10'da verilmiştir.



Şekil 9. İzole edilen saf bileşik yapıları I.



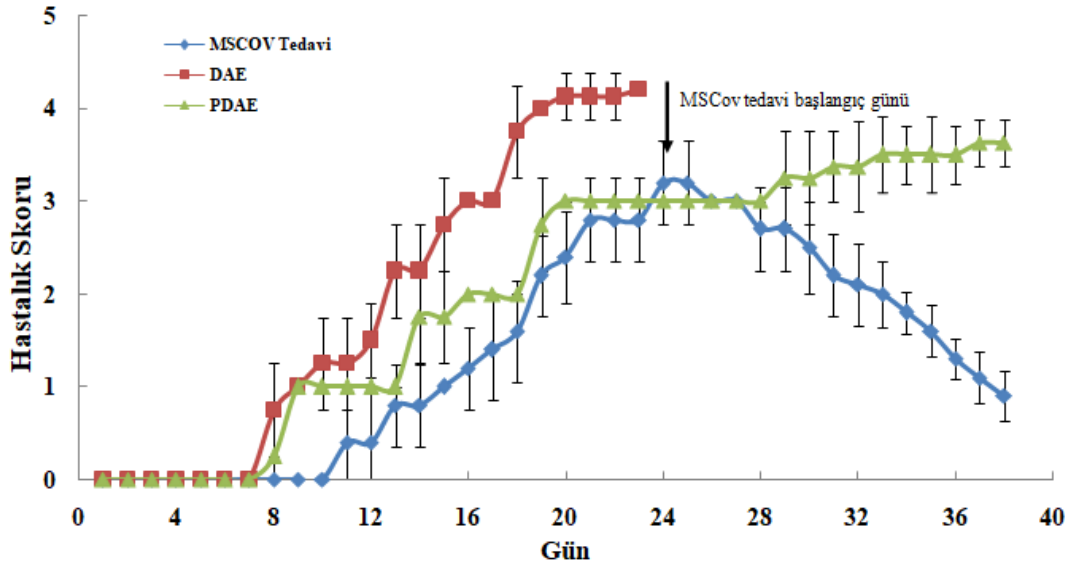
**Şekil 10.** Çalışılan saf bileşik yapıları II.

Bu 9 bileşikten 1'i triterpenoid yapıya sahip, doğadan ilk kez izole edilen yeni bir bileşik olan olean-12-en-28-ol, 3β-pentakosanoattır. İzole edilen tek alkaloid bileşik ise 1H-indol-2-hidroksi, 3-karboksilik asit'tir ve bu bileşik literatür için yeni bir bileşiktir. Epoksili iki stereoizomerik bileşik 3β-hidroksi-5α,6α-epoksikolestan ve 3β-hidroksi-5β,6β-epoksikolestan karışım halinde izole edildi. Bu iki bileşik doğadan ilk kez izole edildi. Çalışılan bir diğer saf bileşik steroid yapıdaki stigmast-5,22-dien-3β-miristat'ta doğadan ilk kez bu çalışmada izole edildi.

## 3.2 Deneysel Alerjik Ensefalomyelit (DAE) Çalışmaları

### 3.2.1 Hayvanlarda DAE Oluşturulması

Hayvanlarda deneysel MS hayvan modeli oluşturmak için %95 saflıktaki Miyelin Oligodendrosit Glikoprotein 35-55 aminoasit peptit (MOG35-55), *Mycobacterium tuberculosis* toksin (ısı inaktive edilmiş) ve Freund adjuvant kullanıldı. Freund adjuvant ile emülsifiye edilmiş 250 µg MOG 35-55 ve 400 µg ısı inaktive edilmiş *Mycobacterium tuberculosis* toksin karışımı, her hayvanın deri altına enjekte edildi. Bu işlemden hemen sonra ve 48 saat sonra 400 ng *Bordetella pertussis* toksin karın boşluğuna enjekte edildi. Hayvanlarda hastalık oluşuktan sonra hayvanlar hasta kontrol grubu (DAE), deney sonuna kadar (38 gün) takip edilen paralel hasta grubu (PDAE) ve tedavi grupları olarak ayrıldı. Tedavi grubuna 21 gün boyunca MSCov ekstresi 500 mg/kg olacak şekilde verildi. Hastalık oluşumunun takibinde kullanılan skorlama grafiği Şekil 11’de verilmiştir (skorlama Tablo 1’de verildiği gibi yapılmıştır). Bu grafik 3 kez tekrar edilen deneylerin ortalama ± standart sapma verilerini içermektedir.



**Şekil 11.** DAE (hasta), PDAE (paralel hasta) ve MSCov tedavi grubu farelerde gözlenen klinik skorlar.

Elde edilen sonuçlar göstermiştir ki; hayvanlara MSCov tedavisi başladığı günden itibaren hastalık skorlarında ciddi geri gidışler söz konusudur. Bunun



yanında PDAE grubundaki halen devam eden hastalık bulguları bu geri gidişin zamanla alakalı kendiliğinden değil MSCov tedavisi ile gerçekleştiğini göstermektedir.

### 3.2.2 MS Dizin Analizleri

Anlamlı sayıda örnekte (8) çok sayıda genin (84 adet MS patojenezinde rol oynadığı tespit edilmiş gen) ifade düzeyini analiz etmek ve taramak için hazır diziler kullanılmıştır. Böylelikle, öncelikle değişiklik gösteren genler kolaylıkla saptandı ve daha sonraki deneylerimizde değişen genler üzerinde detaylı çalışılmak için veri elde edildi.

Çalışılan genler 13 grup altında incelenmiştir. Bu gruplama aşağıda verildiği gibidir. Genlerin açık isimleri ise Tablo 8’de verilmiştir.

Myelinizasyon: Cd9, Hexb, Ifng, Mal, Mbp, Ntf3, Plp1, Pmp22, Sod1, Tgfb1.

T HücreAktivasyonu/Sinyali: Apc, Cd28, Cd4, Egr1, Foxp3, Icam1, Ifng, Il10, Il18, Il1B, Il2ra, Il6, Il6st (Gp130), Mapk1 (Erk2), Sod1, Tgfb1, Vcam1.

Adaptif Bağışıklık: C1s, Cd40 (Tnfrsf5), Foxp3, Icam1, Ifng, Il10, Il18, Il1b, Il6st (Gp130), Tgfb1, Vegfa.

Sitokin/Kemokin: Ccl12, Ccl3 (Mip-1a), Ccl5 (Rantes), Ccl7 (Mcp-3), Csf1 (Mcsf), Cxcl10 (Inp10), Cxcl11 (I-TAC/IP-9), Cxcl9 (Mig), FasL (Tnfsf6), Ifng, Il10, Il18, Il1B, Il6, Lta (Tnfb), Tgfb2, Tnf, Vegfa.

İnflamasyon Kontrol: Ccl5 (Rantes), Ednra, Gpx1, Il6, Il6st (Gp130), Jak2, Tnfrsf1a.

İnflamasyon Tepkisi: C1s, Ccl12, Ccl3 (Mip-1a), Ccl7 (Mcp-3), Ccr1, Ccr5, Cd40 (Tnfrsf5), Cd44, Cxcl10 (Inp10), Cxcl11 (I-TAC/IP-9), Cxcl9 (Mig), Fn1, Hif1a, Il10, Il13, Il1b, Il2ra, Itgb2, NFκB1, Stat3, Tgfb1, Tnf, Tnfrsf1b.

Nöral Apoptoz: Akt1s1, Bax, Bcl2, Bcl2l1 (Bcl-x), Erbb3, Gpx1, Jak2, Jun, Ntf3, Sod1, Tgfb2, Tnf-α.

Genel Apoptoz: Il10, Mapk1 (Erk2), Tnfrsf1b, Il6st (Gp130), Hdac1, Raf1, Apc, App, Ccl12, Cd28, Fas1 (Tnfsf6), Ifng, Il1b, Il2ra, Il6, Itgb2, Mmp9 (Gelatinase B), NFkB1, Tgfb1, Tnfrsf1a, Adm, Cd44, Lta (Tnfb), Mal, Vegfa.

Hücre Adhezyonu: Apc, App, Bcl2, Ccl12, Ccl5 (Rantes), Ccr1, Cd4, Cd44, Cd9, Csf1 (Mcsf), Cxcr3, Erbb3, Ezr, FN1, Icam1, Il18, Il1b, Itgb2, Jak2, Mag, Map2k1 (Mek1), Tgfb1, Tgfb2, Tnf- $\alpha$ , Vcam1.

Hücre Stresi: Adm, Bcl2, Gpx1, Hif1a, Ifng, Il1b, Jak2, Jun, Ptpn11, Sod1, Tgfb2, Tnf.

Reseptörler: Ccr1, Ccr5, Cd28, Cd4, Cd40 (Tnfrsf5), Cd44, Cxcr3, Ednra, Eph1, H2-Eb1, Icam1, Il2ra, Il6st (Gp130), Itgb2, Nr2f1, Tnfrsf1a, Tnfrsf1b.

Transkripsiyon Faktörleri: Egr1, Foxp3, Hdac1, Hif1a, Jun, Myc, NFkB1, Nr2f1, Stat3.

Diğerleri: Aspa, Edc4, Gfap, Gnai2, Grb2, Jak1, Phgdh, Rangap1, Top1, Tubb4, Ywhah

**Tablo 8.** MS PZR dizin (array) gen tablosu.

| Genin Sembolü | Genin Açık İsmi                       | Genin Kodu |
|---------------|---------------------------------------|------------|
| <b>ADM</b>    | Adrenomedullin                        | NM_009627  |
| <b>AKT1S1</b> | AKT1 substrat 1 (prolin zengin)       | NM_026270  |
| <b>APC</b>    | Adenomatöz poliposis koli             | NM_007462  |
| <b>APP</b>    | Amiloid beta (A4) öncü proteini       | NM_007471  |
| <b>ASPA</b>   | Aspartoaçilaz                         | NM_023113  |
| <b>BAX</b>    | Bcl2 ilişkili X proteini              | NM_007527  |
| <b>BCL2</b>   | B-hücre lösemi/lenfoma 2              | NM_009741  |
| <b>BCL2L1</b> | Bcl2 benzeri 1                        | NM_009743  |
| <b>C1S</b>    | Kompleman bileşenin 1, s alt bileşeni | NM_144938  |
| <b>CCL12</b>  | Kemokin (C-C motifi) ligandı 12       | NM_011331  |
| <b>CCL3</b>   | Kemokin (C-C motifi) ligandı 3        | NM_011337  |
| <b>CCL5</b>   | Kemokin (C-C motifi) ligandı 5        | NM_013653  |
| <b>CCL7</b>   | Kemokin (C-C motifi) ligand 7         | NM_013654  |
| <b>CCR1</b>   | Kemokin (C-C motifi) reseptörü 1      | NM_009912  |
| <b>CCR5</b>   | Kemokin (C-C motifi) reseptörü 5      | NM_009917  |
| <b>CD28</b>   | CD28 antijeni                         | NM_007642  |
| <b>CD4</b>    | CD4 antijeni                          | NM_013488  |
| <b>CD40</b>   | CD40 antijeni                         | NM_011611  |

|               |  |           |
|---------------|--|-----------|
| <b>CD44</b>   | CD44 antijeni  | NM_009851 |
| <b>CD9</b>    | CD9 antijeni   | NM_007657 |
| <b>CSF1</b>   | Koloni uyarıcı faktör 1 (makrofaj)                                   | NM_007778 |
| <b>CXCL10</b> | Kemokin (C-X-C motifi) ligandı 10                                    | NM_021274 |
| <b>CXCL11</b> | Kemokin (C-X-C motifi) ligandı 11                                    | NM_019494 |
| <b>CXCL9</b>  | Kemokin (C-X-C motifi) ligandı 9                                     | NM_008599 |
| <b>CXCR3</b>  | Kemokin (C-X-C motifi) reseptörü 3                                   | NM_009910 |
| <b>EDC4</b>   | mRNA 4 Dekapaj güçlendirici  | NM_181594 |
| <b>EDNRA</b>  | Endotelin reseptör tip A   | NM_010332 |
| <b>EGR1</b>   | Erken büyüme yanıtı 1  | NM_007913 |
| <b>EPHA1</b>  | Eph reseptör A1  | NM_023580 |
| <b>ERBB3</b>  | V-erb-B2 eritroblastik lösemi, viral onkogen homologu 3              | NM_010153 |
| <b>EZR</b>    | Ezrin  | NM_009510 |
| <b>FASL</b>   | Fas ligand (TNF süper ailesi, 6)                                     | NM_010177 |
| <b>FN1</b>    | Fibronektin 1  | NM_010233 |
| <b>FOXP3</b>  | Forkhead kutu P3   | NM_054039 |
| <b>GFAP</b>   | Glial fibriller asidik protein                                       | NM_010277 |
| <b>GNAI2</b>  | Guanin nükleotid bağlayıcı protein (G proteini), alfa 2 inhibe edici | NM_008138 |
| <b>GPX1</b>   | Glutasyon peroksidaz 1   | NM_008160 |
| <b>GRB2</b>   | Büyüme faktörü reseptör protein 2 bağlanmış                          | NM_008163 |
| <b>H2-EB1</b> | Doku 2, sınıf II antijen E beta                                      | NM_010382 |
| <b>HDAC1</b>  | Histon deasetilaz 1  | NM_008228 |
| <b>HEXB</b>   | Heksosaminidaz B   | NM_010422 |
| <b>HIF1A</b>  | Hipoksi indüklenebilir faktör 1, alfa alt birimi                     | NM_010431 |
| <b>ICAM1</b>  | Adezyon molekülü 1   | NM_010493 |
| <b>IFNG</b>   | Interferon gamma   | NM_008337 |
| <b>IL10</b>   | İnterlökin 10  | NM_010548 |
| <b>IL13</b>   | İnterleukin 13   | NM_008355 |
| <b>IL18</b>   | İnterlökin 18  | NM_008360 |
| <b>IL1B</b>   | İnterlökin 1 beta  | NM_008361 |
| <b>IL2RA</b>  | interlökin 2 reseptörü, alfa zinciri                                 | NM_008367 |
| <b>IL6</b>    | İnterlökin 6   | NM_031168 |
| <b>IL6ST</b>  | İnterlökin 6 sinyal dönüştürücü                                      | NM_010560 |
| <b>ITGB2</b>  | İntegrin beta 2  | NM_008404 |
| <b>JAK1</b>   | Janus kinaz 1  | NM_146145 |
| <b>JAK2</b>   | Janus kinaz 2  | NM_008413 |
| <b>JUN</b>    | Jun onkogen  | NM_010591 |
| <b>LTA</b>    | Lenfotoksin A  | NM_010735 |
| <b>MAG</b>    | Miyelin ilişkili glikoprotein  | NM_010758 |
| <b>MAL</b>    | Miyelin ve lenfosit proteini, T-hücre farklılaşması proteini         | NM_010762 |
| <b>MAP2K1</b> | Mitojenin aktive ettiği protein kinaz kinaz 1                        | NM_008927 |
| <b>MAPK1</b>  | Mitojenin aktive ettiği protein kinaz 1                              | NM_011949 |

|                 |  |           |
|-----------------|--|-----------|
| <b>MBP</b>      | Miyelin temel protein  | NM_010777 |
| <b>MMP9</b>     | Matriks metaloproteinaz 9  | NM_013599 |
| <b>MYC</b>      | Myelocytomatosis onkogen   | NM_010849 |
| <b>NFKB1</b>    | B-hücreleri 1, p 105 kappa hafif polipeptid gen arttırıcı nükleer faktör               | NM_008689 |
| <b>NR2F1</b>    | Nükleer reseptör alt ailesi 2, F grubu, üye 1  | NM_010151 |
| <b>NTF3</b>     | Nörotropin 3   | NM_008742 |
| <b>PHGDH</b>    | 3-fosfoglisarat dehidrojenaz   | NM_016966 |
| <b>PLP1</b>     | Proteolipid protein (miyelin) 1  | NM_011123 |
| <b>PMP22</b>    | Periferal miyelin proteini 22  | NM_008885 |
| <b>PTPN11</b>   | Protein tirozin fosfataz, reseptör-dışı tipi 11  | NM_011202 |
| <b>RAF1</b>     | V-raf-lösemi, viral onkogen 1  | NM_029780 |
| <b>RANGAP1</b>  | RAN GTPaz aktive edici protein 1   | NM_011241 |
| <b>SOD1</b>     | Süperoksit dismutaz 1, çözülebilir   | NM_011434 |
| <b>STAT3</b>    | Sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü 3  | NM_011486 |
| <b>TGFB1</b>    | Transforme edici büyüme faktörü beta 1   | NM_011577 |
| <b>TGFB2</b>    | Transforme edici büyüme faktörü, beta 2  | NM_009367 |
| <b>TNF-a</b>    | Tümör nekrozis faktör alfa   | NM_013693 |
| <b>TNFRSF1A</b> | Tümör nekroz faktör reseptörü süper ailesi, 1a   | NM_011609 |
| <b>TNFRSF1B</b> | Tümör nekroz faktör reseptörü süper ailesi, 1b   | NM_011610 |
| <b>TOP1</b>     | Topoizomeraz (DNA) I   | NM_009408 |
| <b>TUBB4</b>    | Tübülün, p 4   | NM_009451 |
| <b>VCAM1</b>    | Vasküler hücre yapışma molekülü 1  | NM_011693 |
| <b>VEGFA</b>    | Vasküler endotelial büyüme faktörü A   | NM_009505 |
| <b>YWHAH</b>    | Tirozin 3-monooksijenaz/triptofan 5-monooksijenaz aktivasyon proteini, beta polipeptit | NM_011738 |
| <b>GUSB</b>     | Glukuronidaz, beta   | NM_010368 |
| <b>HPRT</b>     | Hipoksantin guanin fosforibozil transferaz   | NM_013556 |
| <b>HSP90AB1</b> | Isı şok proteini 90 alfa (sitozolik), B sınıfı elemanı 1                               | NM_008302 |
| <b>GAPDH</b>    | Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz  | NM_002046 |
| <b>ACTB</b>     | Aktin, beta  | NM_001101 |

MS dizi analiz çalışmaları için her gruptan (Kontrol, DAE, MSCov tedavi) 8'er örnek triplike olarak çalışıldı. Çalışmalar sonucunda her grubun ortalamaları alındı ve analiz yapıldı. Verilerin analizleri Qiagen firmasının ücretsiz olarak sağladığı RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Data Analysis v3.4 ile web üzerinden çevirim içi gerçekleştirildi. Gen ekspresyon düzeyleri normalizasyon geni (housekeeping gen) olan ACTB ( $\beta$  aktin) kullanılarak normalize edildi. (\*) ile işaretlenen genler  $P < .05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren genlerdir. MS dizin analiz sonuçları Tablo 9'da sunulmaktadır.

**Tablo 9.** MS PZR dizin (array) sonuçları.

| Gen Sembolü | Kontrol | DAE   | MSCov Tedavi | Gen Sembolü   | Kontrol | DAE   | MSCov Tedavi |
|-------------|---------|-------|--------------|---------------|---------|-------|--------------|
| ADM         | 1       | -1.35 | -1.542       | HSP90AA1      | 1       | -1.16 | -1.21        |
| AKT1S1      | 1       | -1.26 | -1.5         | ICAM1         | 1       | -1.11 | -1.52        |
| APC         | 1       | -1.94 | -1.98        | IFNG          | 1       | 1.47  | -1.38        |
| APP         | 1       | 2.47  | 1.43         | IL10          | 1       | -1.95 | -1.63        |
| ASPA        | 1       | -1.76 | -1.21        | IL13          | 1       | 1.21  | -1.33        |
| BAX         | 1       | -1.23 | 1.09         | IL18          | 1       | -1.12 | -1.11        |
| BCL2        | 1       | -1.81 | -1.96        | IL1B          | 1       | -1.41 | -1.55        |
| BCL2L1      | 1       | -1.06 | -1.22        | IL2RA         | 1       | -1.50 | -1.83        |
| C1S         | 1       | 7.03  | -1.27        | IL6           | 1       | 5.56  | 1.68         |
| CCL12       | 1       | 1.86  | -1.90        | IL6ST         | 1       | -1.54 | -1.89        |
| CCL3        | 1       | -1.51 | -1.51        | ITGB2         | 1       | -1.03 | -1.59        |
| CCL5        | 1       | 78.2  | 4.94         | JAK1          | 1       | -1.42 | -1.35        |
| CCL7        | 1       | 1.25  | -1.34        | JAK2          | 1       | -1.65 | -1.30        |
| CCR1        | 1       | -1.18 | -1.12        | JUN           | 1       | -1.55 | -1.36        |
| CCR5        | 1       | -1.94 | -1.30        | LTA           | 1       | 1.00  | -1.46        |
| CD28        | 1       | -1.10 | -1.55        | MAG           | 1       | -2.20 | 1.15         |
| CD4         | 1       | 3.96  | 1.87         | MAL           | 1       | -1.42 | -1.33        |
| CD40        | 1       | 1.60  | -1.76        | MAP2K1        | 1       | -1.14 | -1.53        |
| CD44        | 1       | 1.38  | -1.74        | MAPK1         | 1       | -1.43 | -1.22        |
| CD9         | 1       | -1.76 | 1.16         | MBP           | 1       | -2.8  | 1.21         |
| CSF1        | 1       | 1.84  | -1.33        | MMP9          | 1       | 2.83  | -1.47        |
| CXCL10      | 1       | 79.67 | 6.26         | MYC           | 1       | -1.98 | -1.27        |
| CXCL11      | 1       | -1.68 | -1.65        | NFKB1         | 1       | 4.48  | -1.41        |
| CXCL9       | 1       | 13.43 | 2.44         | NR2F1         | 1       | -1.48 | -1.31        |
| CXCR3       | 1       | 1.08  | -1.44        | NTF3          | 1       | 1.11  | -1.27        |
| EDC4        | 1       | 1.10  | -1.58        | PHGDH         | 1       | -1.79 | -1.85        |
| EDNRA       | 1       | -1.34 | -1.19        | PLP1          | 1       | -2.63 | 1.53         |
| EGR1        | 1       | -1.51 | -1.52        | PMP22         | 1       | -1.31 | -1.40        |
| EPHA1       | 1       | 1.01  | -1.06        | PTPN11        | 1       | -2.25 | -1.31        |
| ERBB3       | 1       | -1.41 | -1.52        | RAF1          | 1       | -1.45 | -1.21        |
| EZR         | 1       | -1.24 | -1.51        | RANGAP1       | 1       | -1.65 | -1.12        |
| FASL        | 1       | -1.64 | -1.46        | SOD1          | 1       | -2.35 | 1.56         |
| FN1         | 1       | 1.63  | -1.97        | STAT3         | 1       | 2.78  | -1.38        |
| FOXP3       | 1       | -1.11 | -1.57        | TGFB1         | 1       | 2.7   | -1.43        |
| GFAP        | 1       | 5.42  | 1.59         | TGFB2         | 1       | -1.73 | -1.61        |
| GNAI2       | 1       | 2.85  | -1.83        | TNF- $\alpha$ | 1       | 26.33 | 5.42         |
| GPX1        | 1       | -1.46 | -1.09        | TNFRSF1A      | 1       | 1.86  | -1.29        |
| GRB2        | 1       | -1.89 | -1.46        | TNFRSF1B      | 1       | -1.54 | -1.02        |
| GUSB        | 1       | -1.23 | -1.38        | TOP1          | 1       | -1.90 | -1.99        |
| H2-EB1      | 1       | 1.56  | 1.12         | TUBB4         | 1       | -1.91 | -1.51        |
| HDAC1       | 1       | -1.15 | -1.48        | VCAM1         | 1       | -1.22 | -1.21        |
| HEXB        | 1       | -1.91 | -1.27        | VEGFA         | 1       | -1.17 | -1.63        |
| HIF1A       | 1       | 4.95  | 1.28         | YWHAH         | 1       | 1.20  | -1.19        |

Kırmızı renk anlamlı olarak artan genleri; mavi ise anlamlı olarak baskılanan genleri vermektedir (Sonuçlar kat değişim olarak verilmiştir ve kontrol gen olarak ACTB kullanılmıştır).

MS dizin çalışmaları ile ekspresyon düzeylerinde anlamlılık görülen genler belirlendi ve takip eden çalışmalar bu yönde devam ettirildi. Bu genler; APP, C1S, CCL5, CD4, CXCL9, CXCL10, GFAP, GNAI, HIF1A, IL6, MBP, MAG, MMP9, NFKB, PLP, PTPN11, STAT, SOD, TGFB1 ve TNF- $\alpha$ 'dır (Bu genlerle ilgili detaylı bilgi Bölüm 7'de ekler kısmında verilmiştir). Bu genlerden CXCL10 79 kat gibi yüksek bir değerde artarak DAE grubunda ekspresyonu en fazla yükselen gen olmuştur. Benzer şekilde CCL5 78 kat artış göstererek ciddi anlamda fark görülen bir diğer gen dir. Bunları DAE grubunda TNF- $\alpha$  ve CXCL9 genleri 26 ve 13 kat artarak izlemektedir. Çıkan sonuçlar MSCov tedavi ile neredeyse tüm genlerde kontrol değerlerine geri dönüşlerin olduğunu gösterdi. Bunun yanında DAE grubunda MAG, MBP ve PLP genlerinin ekspresyon düzeyleri 2 ve 2.8 kat aralığında baskılanmıştır.

### **3.3 Hücre Kültürü Çalışmaları**

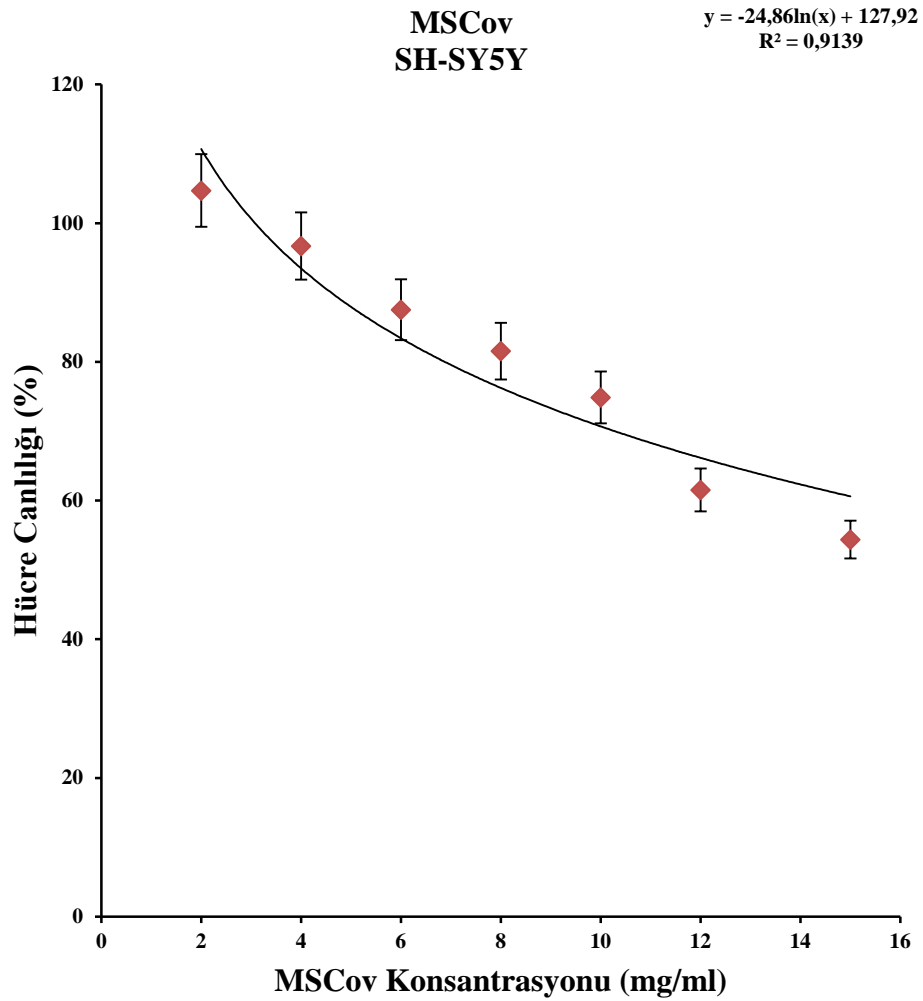
Çalışmalarımızda insan nöroblast hücreleri (SH-SY5Y), insan T lenfoma hücreleri (CCRF-CEM) ve fare primer oligodendrosit hücreleri kullanıldı. Hücreler uygun ortam ve şartlar sağlanarak büyütüldü ve ilk olarak sitotoksisite deneyleri yapıldı. Her madde için uygun dozlar belirlendikten sonra hücrelere uygulandı ve RNA izolasyonu yapıldıktan sonra, belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri tayin edildi. Bu bölüm çalışmalarda tüm sonuçlar, aksi belirtilmedikçe, 3 bağımsız tekrarın triplike ölçümlerin ortalama  $\pm$  standard sapma şeklinde verilmektedir.

### 3.3.1 SH-SY5Y Hücrelerinde Yapılan Çalışmalar

#### 3.3.1.1 SH-SY5Y Hücrelerinde MSCov Ekstresi Çalışmaları

##### 3.3.1.1.1 MSCov Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda MSCov ekstresi suda çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya ( $1 \times 10^3$ /kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda MSCov ekstresinin bu hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 12).



Şekil 12. MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.

Her ne kadar hücre çalışmaları ile NOEL ve LOEL gibi değerlerin saptanması mümkün değilse de ilerleyen çalışmalar için toksik olmayan doz, kullanılmaya çalışıldı. Sitotoksosite testi sonunda  $y=ax+b$  denkleminde yola çıkarak yaklaşık EC05 ve EC10 değerleri hesaplandı. Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 4 mg/ml ve 6 mg/ml MSCov konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi.

### **3.3.1.1.2 MSCov Ekstresinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi**

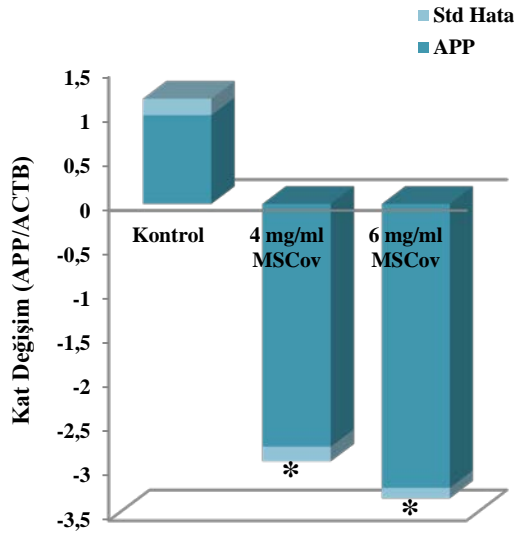
Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücrelere bu belirlenen dozlarda MSCov ekstresi uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar ile belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı.

Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (\*) ile işaretlenen gruplar  $P < .05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

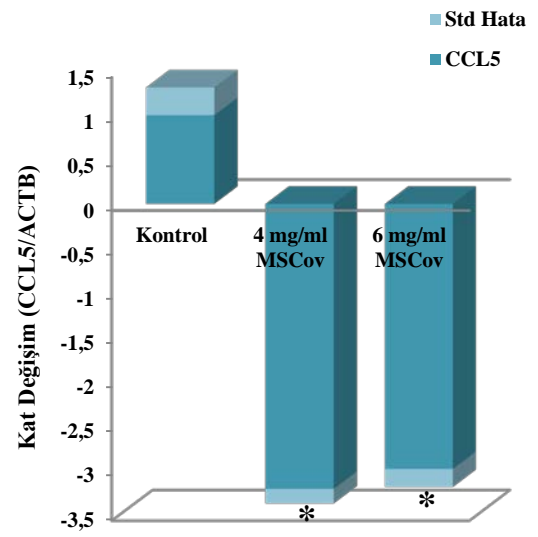
SH-SY5Y hücrelerinde MSCov ile yapılan çalışmalarda APP EC05 ve EC10 dozunda sırasıyla 2.7 ve 3.2 kat, CCL5 3.2 ve 2.9 kat, CXCL9 3.3 ve 2.9 kat, CXCL10 2.3 ve 2.8 kat, son olarak TNF- $\alpha$  2.3 ve 2.9 kat baskılanma söz konusudur. Bunun yanında EC05 dozunda GFAP 2.5, HIF1A 3.2, NFKB 2.1, PTPN 2.6 kat; EC10 dozunda ise IL6 2.5 ve MMP9 2.4 kat baskılanmıştır. MAG ve PLP genlerinde ise EC10 dozunda sırasıyla 2.3 ve 3.8 kat anlamlı olarak artış gözlemlendi. Bu sonuçlar bize MSCov'un SH-SY5Y hücre hattında anti enflamatuvar etkisini ve miyelin rejenerasyonu edici etkisi olduğunu gösterdi.

SH-SY5Y hücrelerinde MSCov ekstresinin seçilen 20 tane gen üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 13-32'de sunulmaktadır.

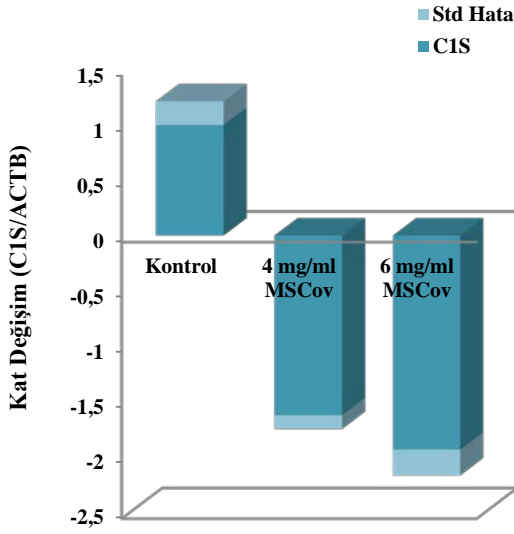




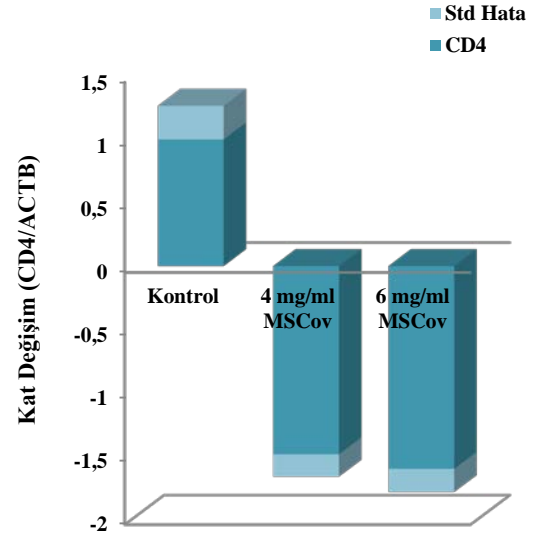
**Şekil 13.** MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.



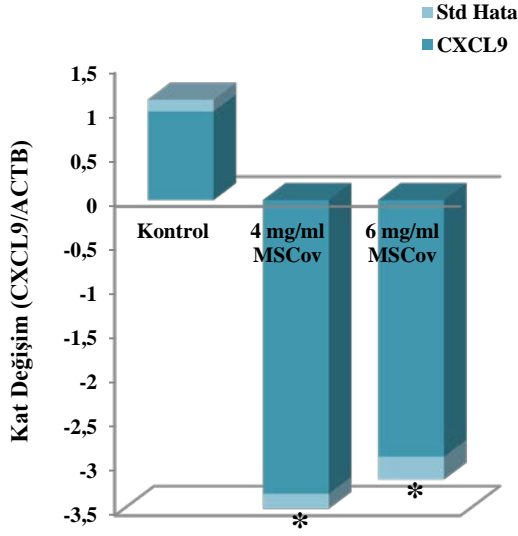
**Şekil 15.** MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.



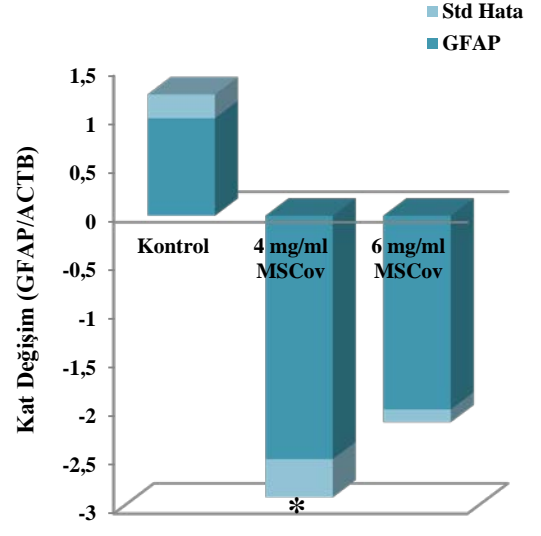
**Şekil 14.** MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.



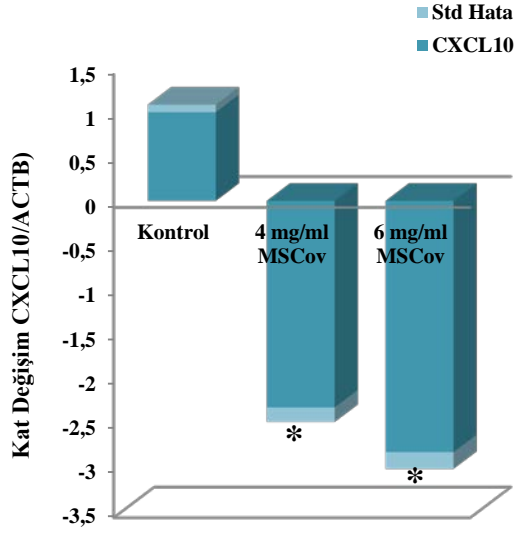
**Şekil 16.** MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.



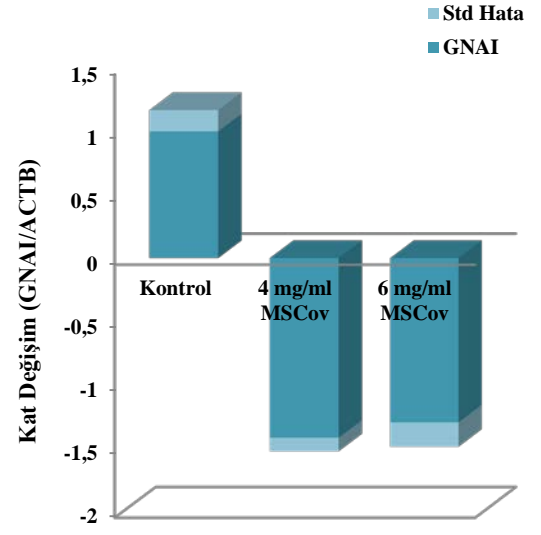
**Şekil 17.** MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.



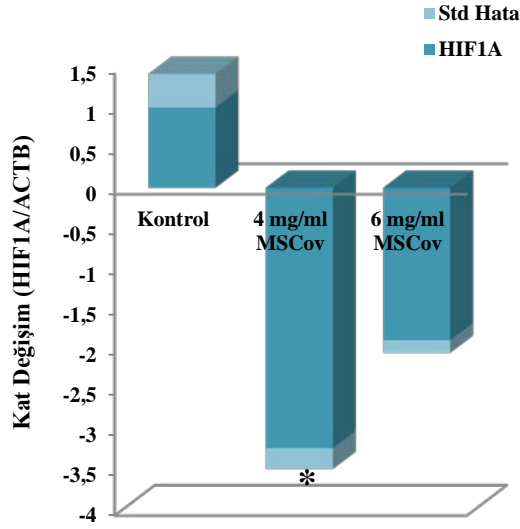
**Şekil 19.** MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.



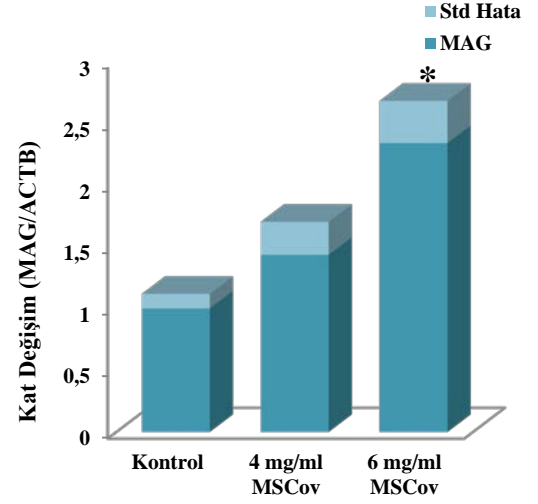
**Şekil 18.** MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.



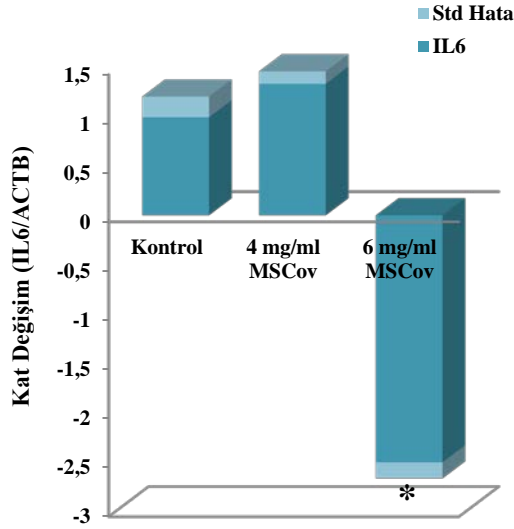
**Şekil 20.** MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.



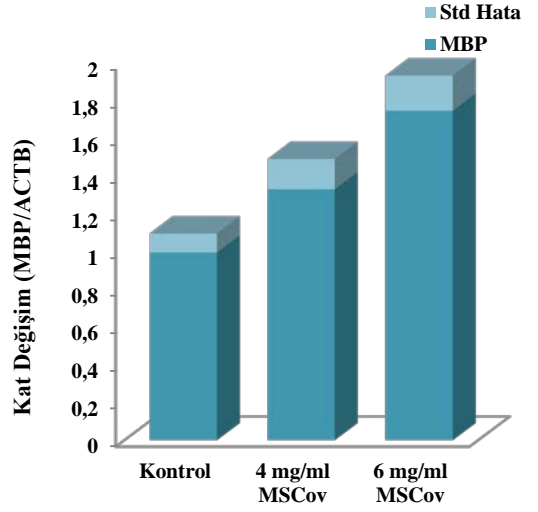
**Şekil 21.** MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.



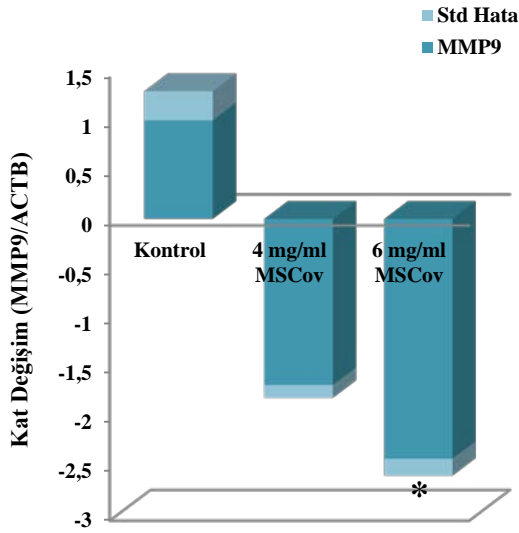
**Şekil 23.** MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.



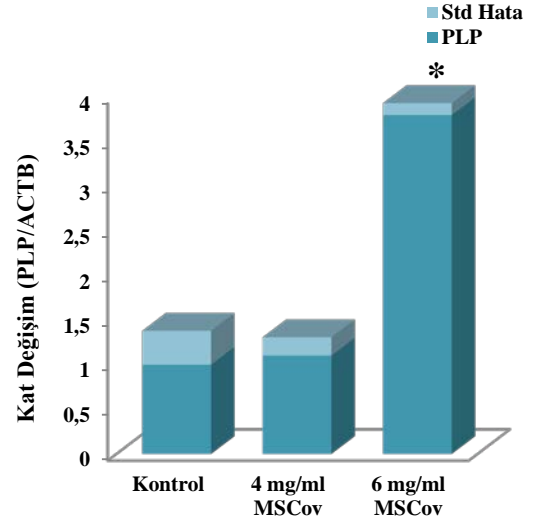
**Şekil 22.** MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.



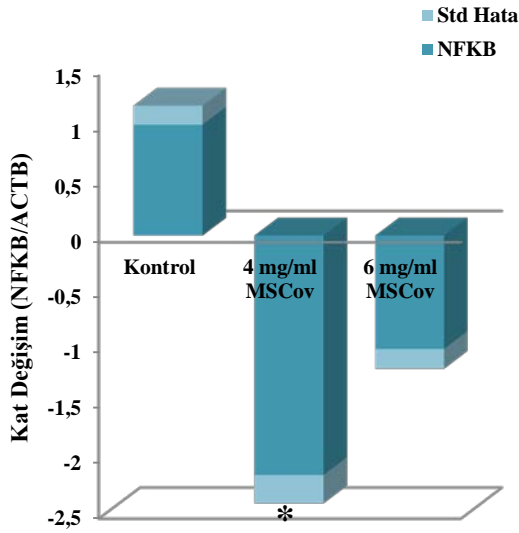
**Şekil 24.** MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.



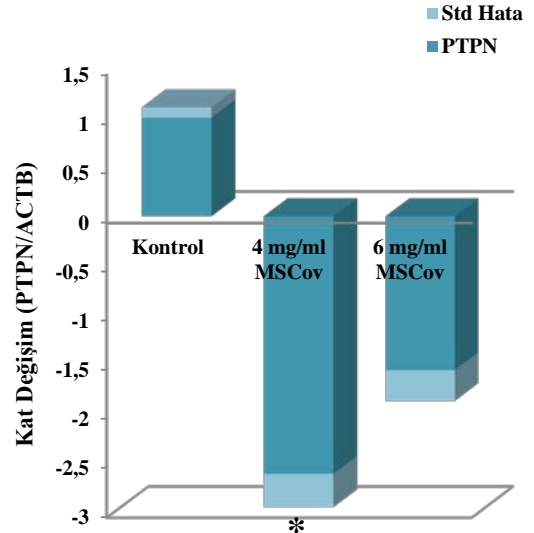
**Şekil 25.** MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.



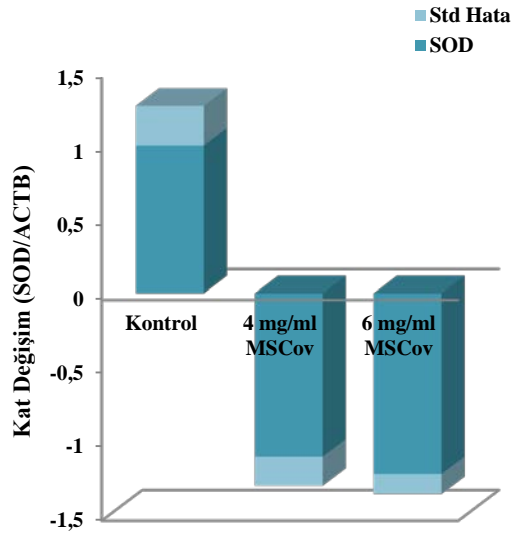
**Şekil 27.** MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.



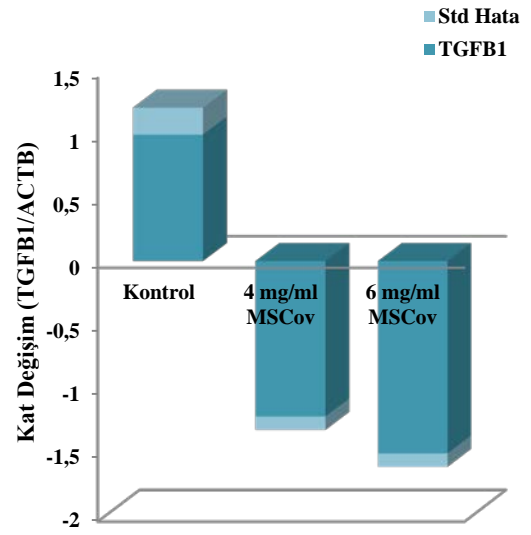
**Şekil 26.** MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında NFkB mRNA seviyesine olan etkisi.



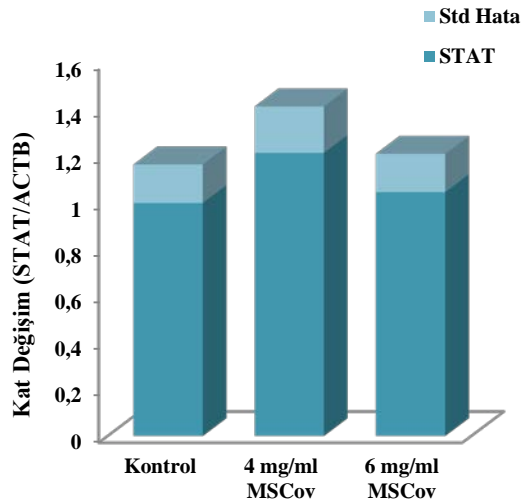
**Şekil 28.** MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.



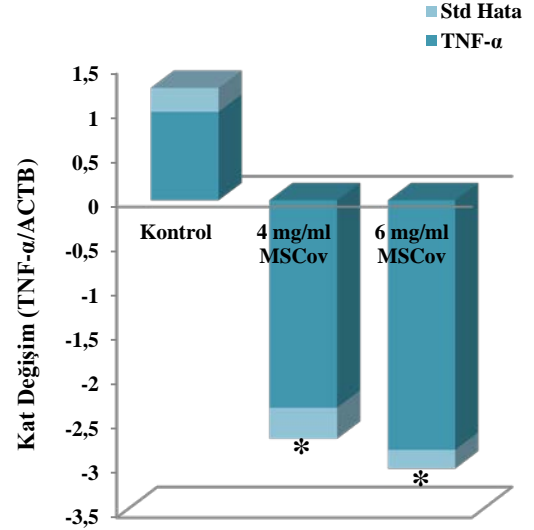
**Şekil 29.** MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 31.** MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 30.** MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.

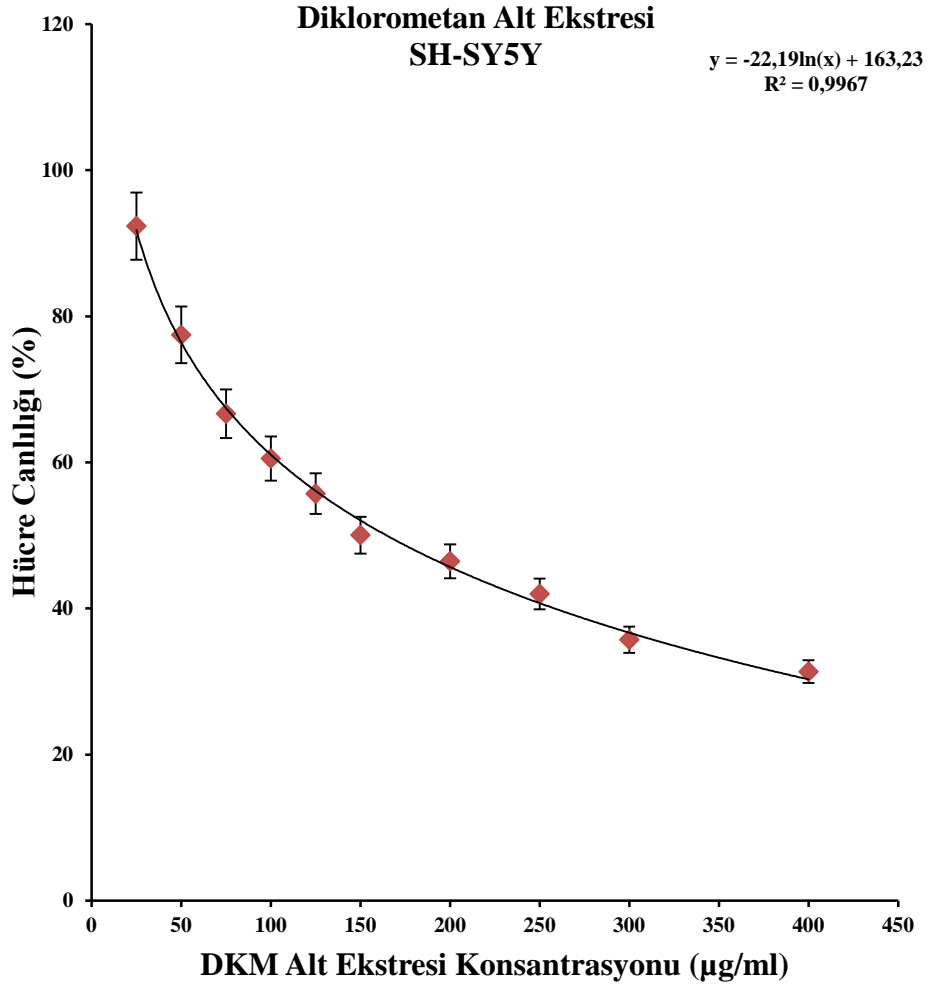


**Şekil 32.** MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında TNF-α mRNA seviyesine olan etkisi.

### 3.3.1.2 SH-SY5Y Hücrelerinde MSCov Diklorometan Alt Ekstresi Çalışmaları

#### 3.3.1.2.1 Diklorometan Alt Ekstresi Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda Diklorometan (DKM) alt ekstresi %20 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya ( $1 \times 10^3$ /kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda DKM alt ekstresinin hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 33).



Şekil 33. DKM alt ekstresi SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.

Sitotoksosite testi sonunda  $y=ax+b$  denkleminde yola çıkarak yaklaşık EC05 ve EC10 değerleri hesaplandı. Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 22 µg/ml ve 27 µg/ml DKM alt ekstresi konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi.

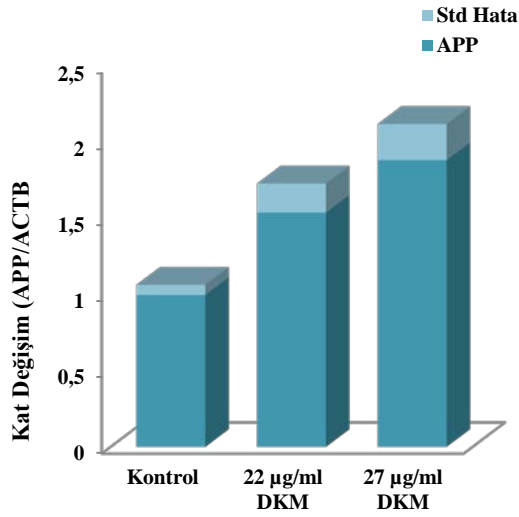
### **3.3.1.2.2 Diklorometan Alt Ekstresinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi**

Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücrelere bu belirlenen dozlarda DKM alt ekstresi uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı.

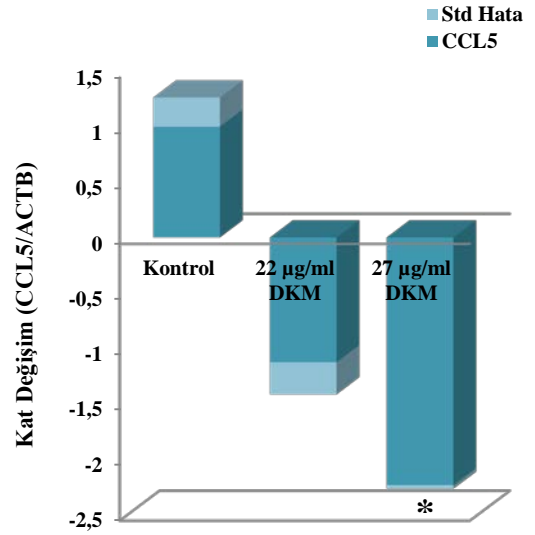
Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar ACTB ile normalize edilip; kontrol değerleri 1 alındı. (\*) ile işaretlenen gruplar  $P < .05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

Seçilen 20 adet genden SH-SY5Y hücrelerinde DKM alt ekstresi uygulanması sonucunda EC10 dozunda CCL5 2.3 kat ve CXCL9 2.2 kat; EC05 ve EC10 dozunda ise HIF1A sırasıyla 3.1 ve 3.8 kat, TNF- $\alpha$  ise 2.1 ve 2.4 kat baskılanmıştır. DKM alt ekstresi anti-enflamatuvar ve kemokin/sitokin baskılayıcı etki gösterdi. Her ne kadar anlamlı bir fark olmasa da CXCL10, NFKB, C1S ve CD4 gibi genlerin ekspresyon düzeyleri de baskılandı.

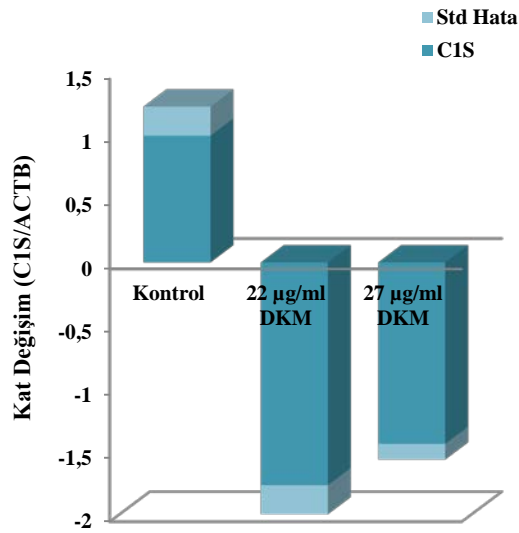
SH-SY5Y hücrelerinde DKM alt ekstresinin seçilen 20 tane gen üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 34-53'de verilmiştir.



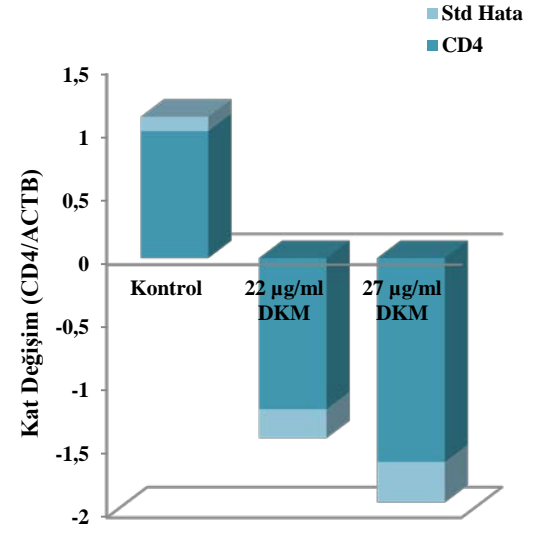
**Şekil 34.** DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 36.** DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.

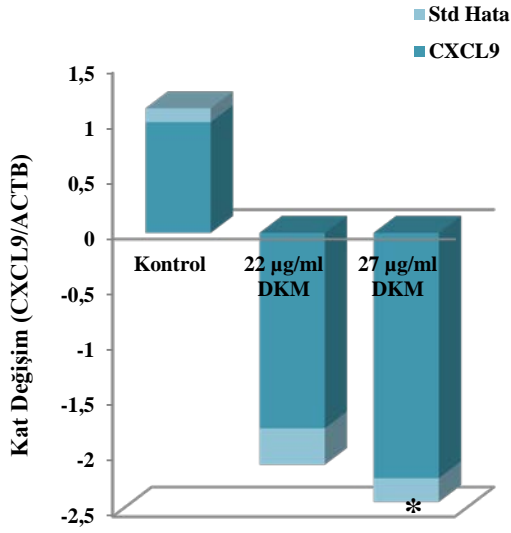


**Şekil 35.** DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.

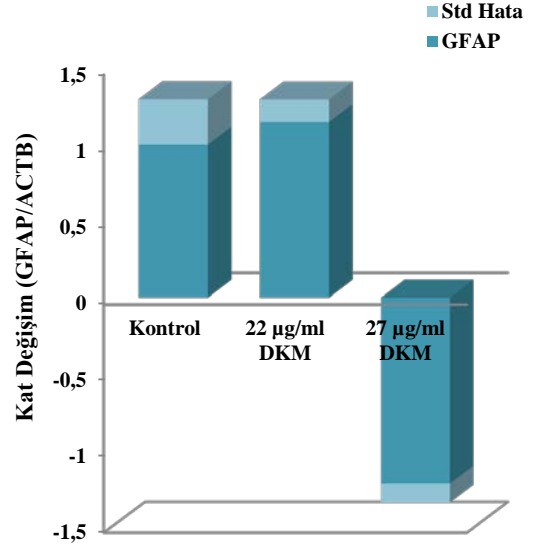


**Şekil 37.** DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.

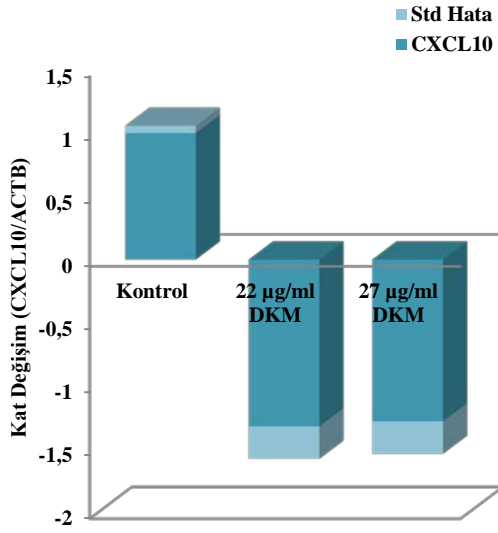




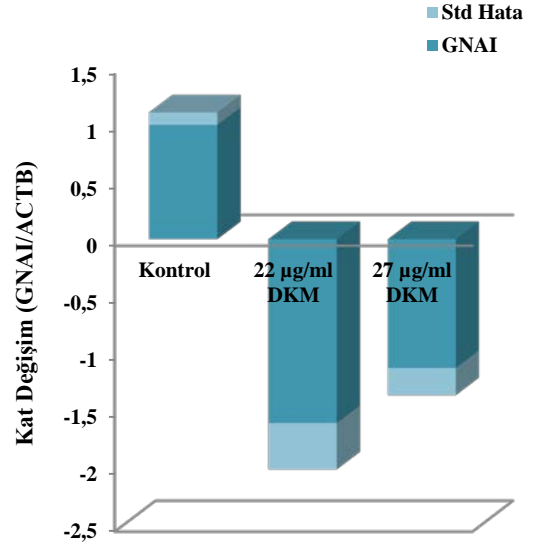
**Şekil 38.** DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.



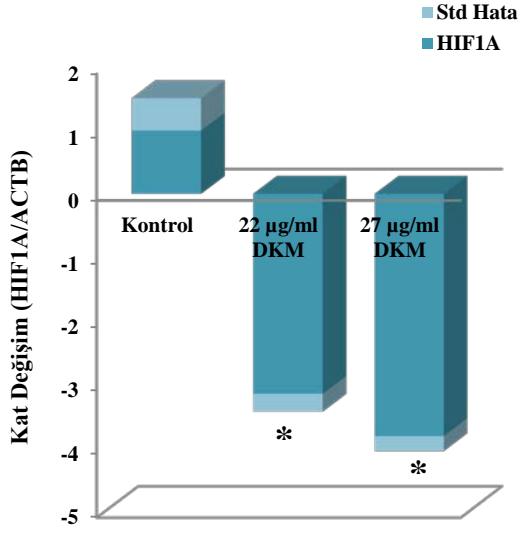
**Şekil 40.** DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.



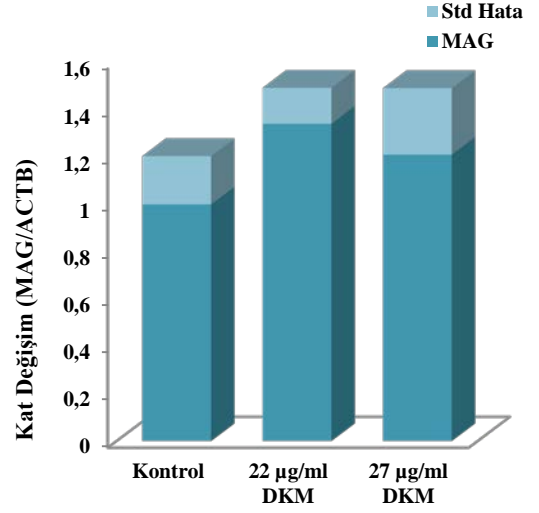
**Şekil 39.** DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.



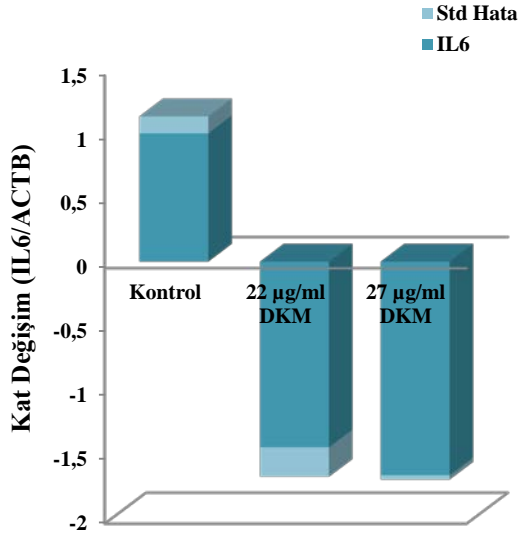
**Şekil 41.** DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.



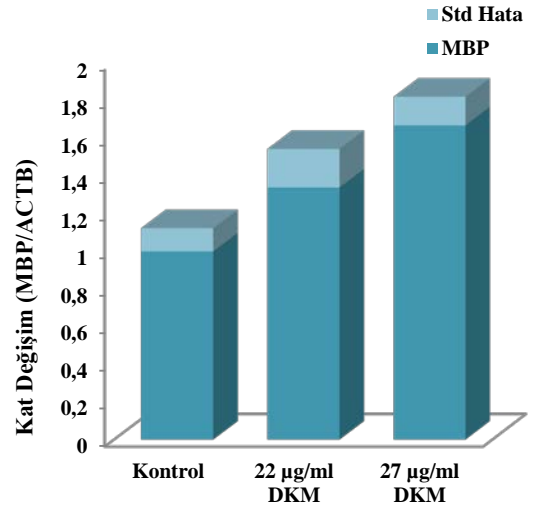
**Şekil 42.** DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.



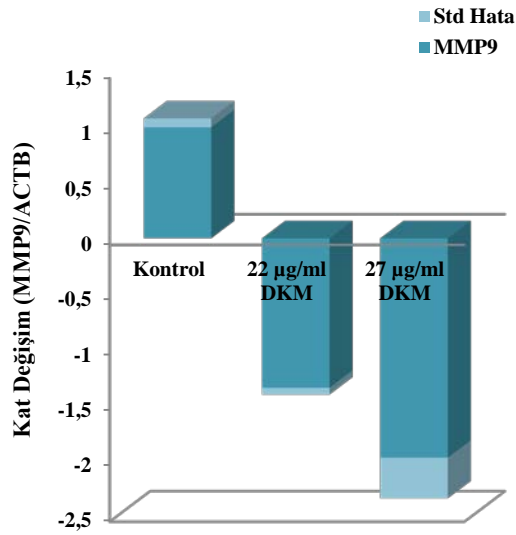
**Şekil 44.** DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.



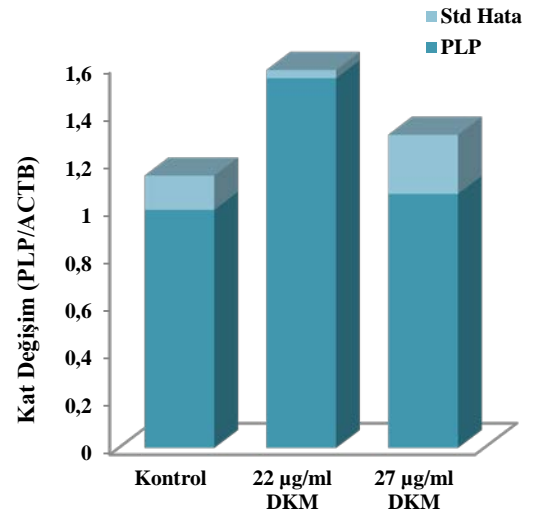
**Şekil 43.** DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.



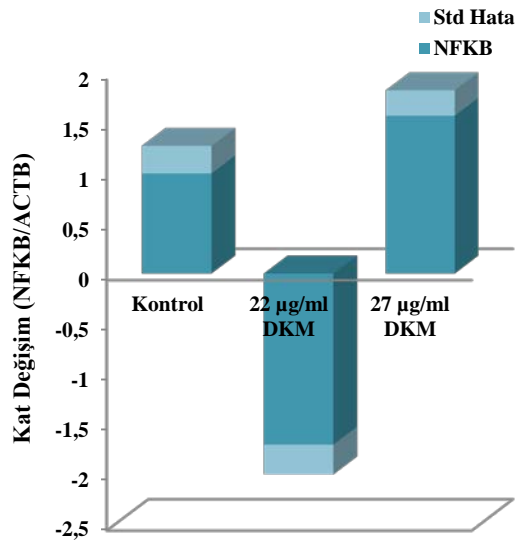
**Şekil 45.** DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.



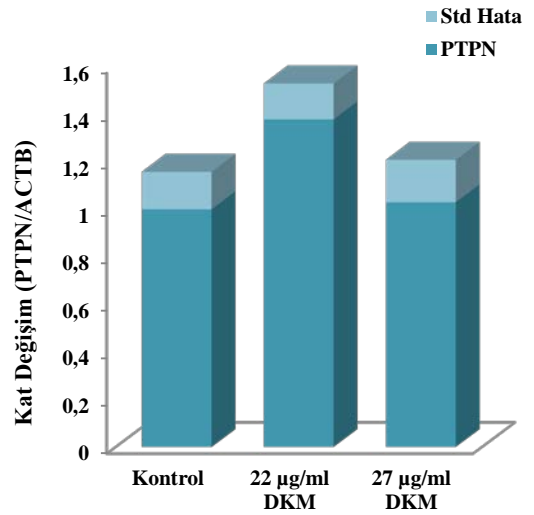
**Şekil 46.** DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.



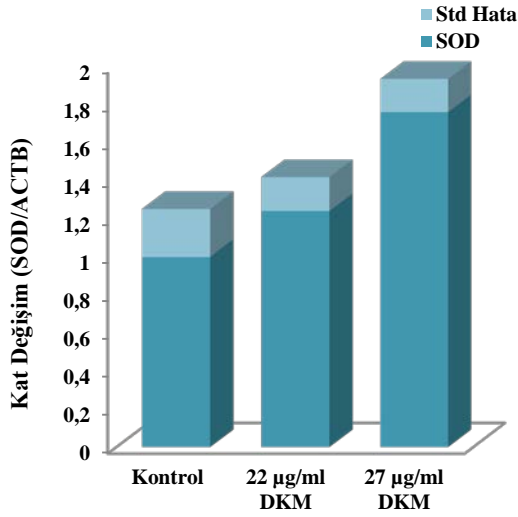
**Şekil 48.** DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.



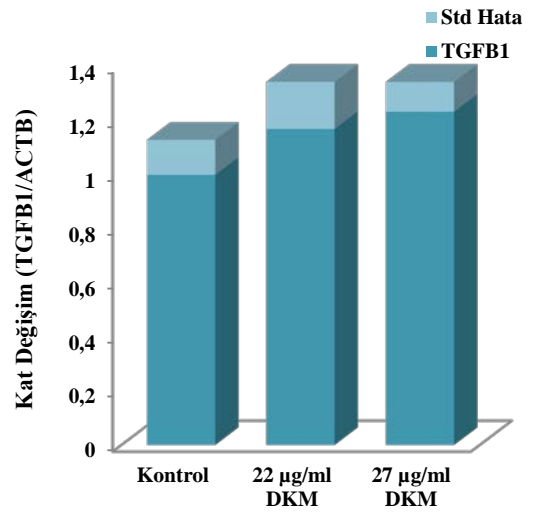
**Şekil 47.** DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.



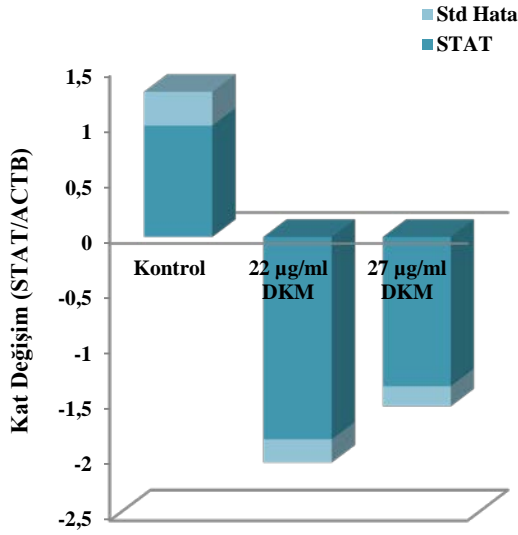
**Şekil 49.** DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.



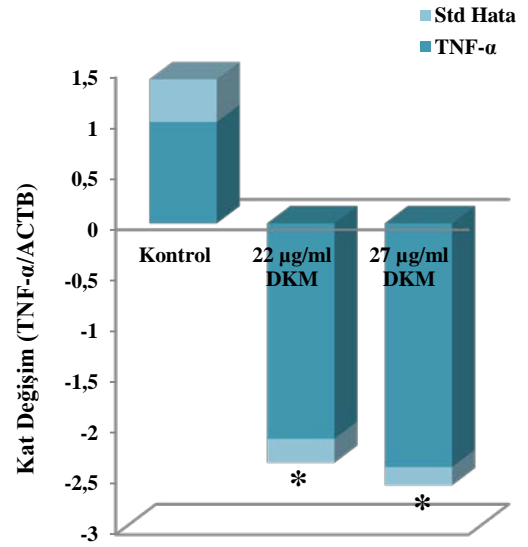
**Şekil 50.** DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 52.** DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 51.** DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.

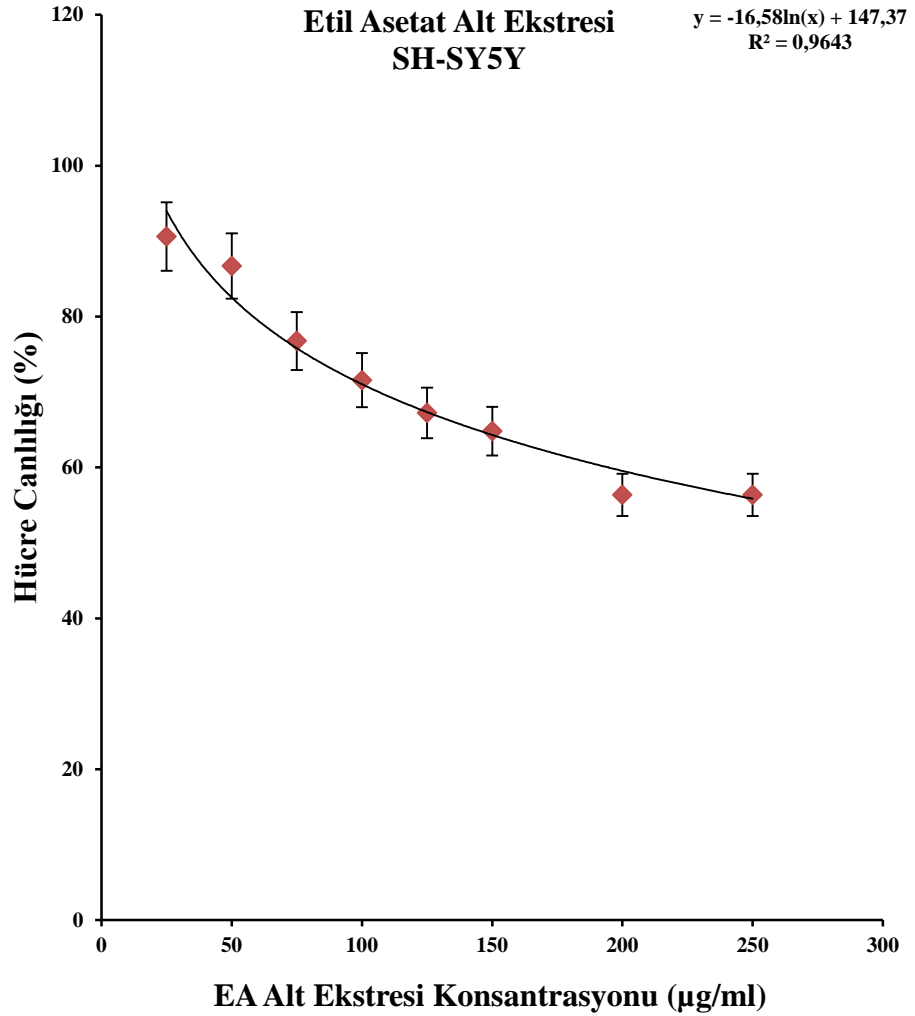


**Şekil 53.** DKM alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında TNF-α mRNA seviyesine olan etkisi.

### 3.3.1.3 SH-SY5Y Hücrelerinde Etil Asetat Alt Ekstresi Çalışmaları

#### 3.3.1.3.1 Etil Asetat Alt Ekstresinin Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda Etil Asetat (EA) alt ekstresi %20 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya ( $1 \times 10^3$ /kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda EA alt ekstresinin hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 54).



Şekil 54. Etil Asetat alt ekstresinin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.

Sitotoksisite testi sonunda  $y=ax+b$  denkleminde yola çıkarak yaklaşık EC05 ve EC10 değerleri hesaplandı. Bu sitotoksisite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 24 µg/ml ve 32 µg/ml EA alt ekstresi konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi.

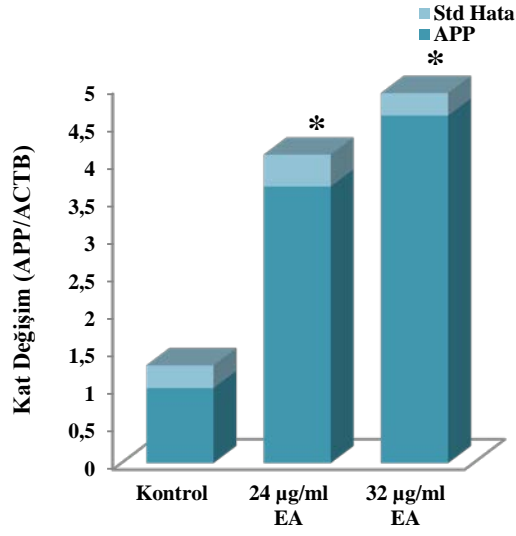
### **3.3.1.3.2 Etil Asetat Alt Ekstresinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi**

Sitotoksisite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücrelere bu belirlenen dozlarda EA alt ekstresi uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı.

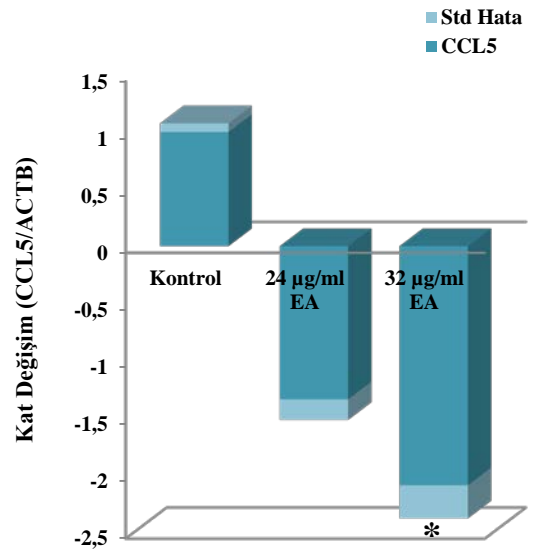
Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar ACTB ile normalize edilip; kontrol değerleri 1 alındı. (\*) ile işaretlenen gruplar  $P < .05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

Seçilen 20 adet genden SH-SY5Y hücrelerinde EA alt ekstresi uygulanması sonucunda EC05 ve EC10 dozunda APP 3.7 ve 4.6, PLP 2.1 ve 2.3 ve PTPN 2.1 ve 2.2 kat anlamlı olarak artmıştır. Bunun yanında EC10 dozunda; CCL5 2.1 kat, CXCL9 2 kat anlamlı olarak baskılanmıştır. GFAP geninde ise EC05 dozunda yaklaşık 2.5 kat anlamlı olarak artış gözlenmiştir. Sonuçlardan yola çıkarak EA alt ekstresinde ana ekstre ile çok örtüşen sonuçlar elde edilemediği görülmektedir.

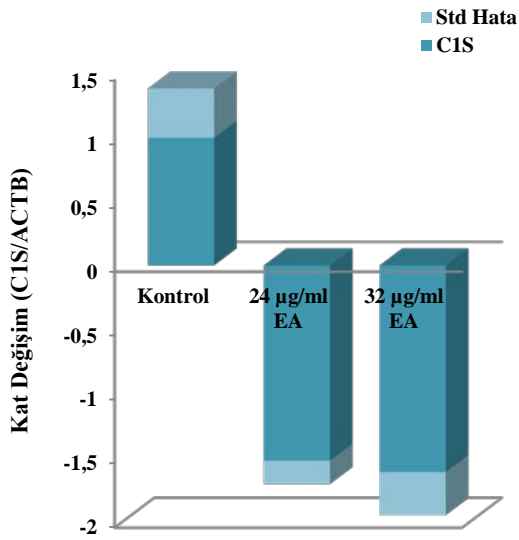
SH-SY5Y hücrelerinde EA alt ekstresinin seçilen 20 tane gen üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 55-74'de verilmiştir.



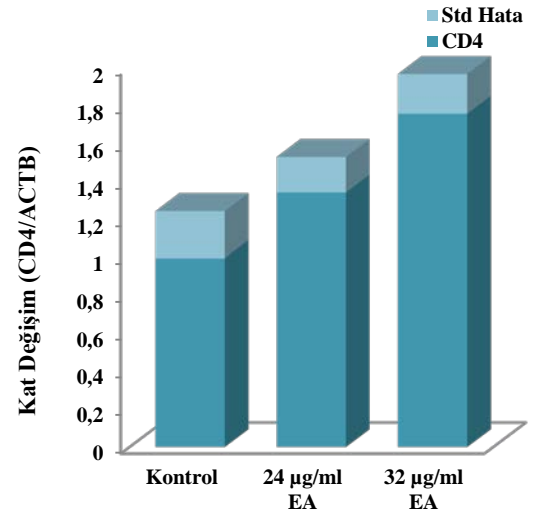
**Şekil 55.** EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.



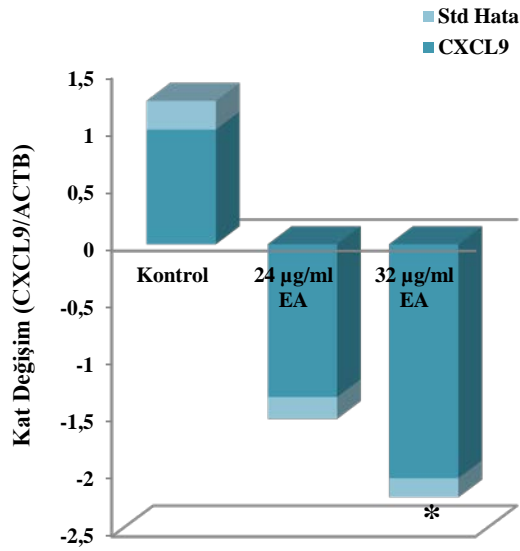
**Şekil 57.** EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.



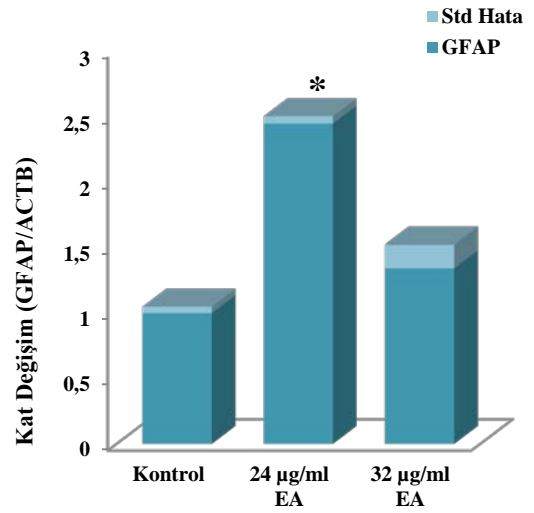
**Şekil 56.** EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.



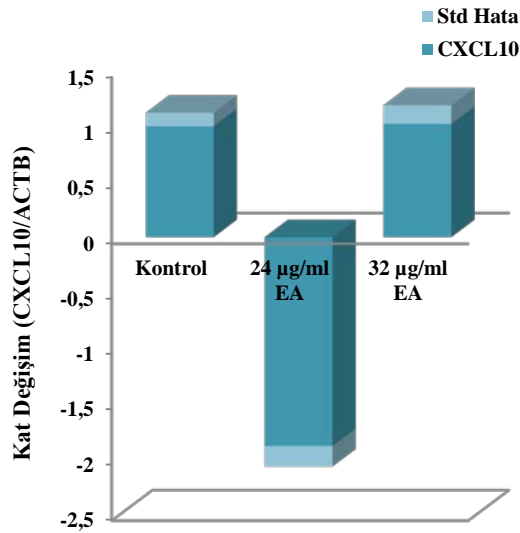
**Şekil 58.** EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.



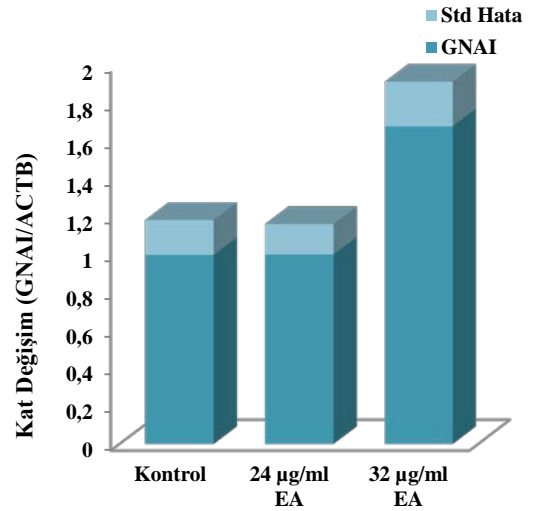
**Şekil 59.** EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 61.** EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.

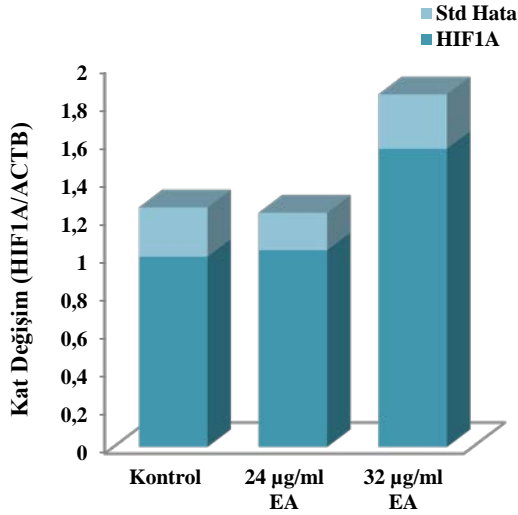


**Şekil 60.** EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.

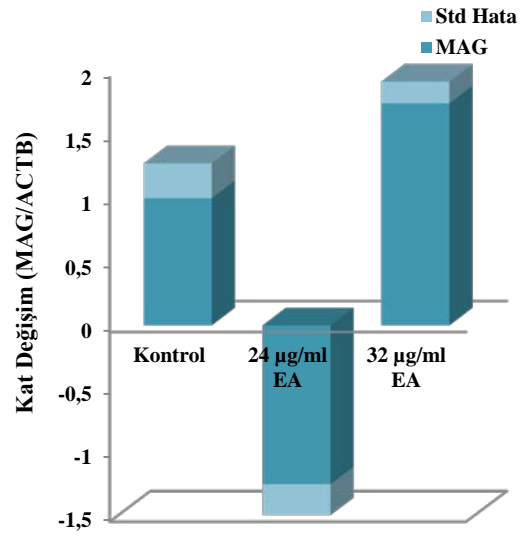


**Şekil 62.** EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.

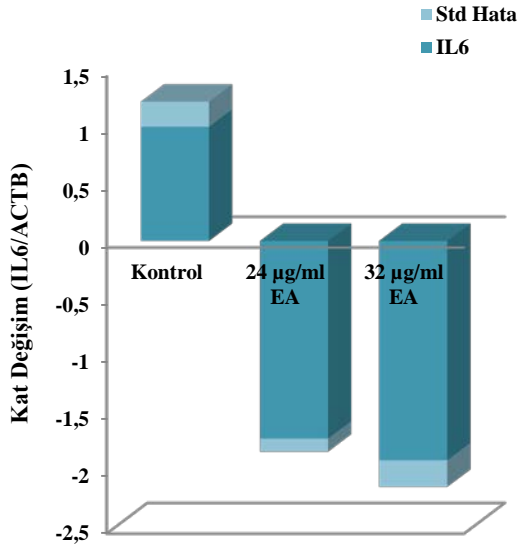




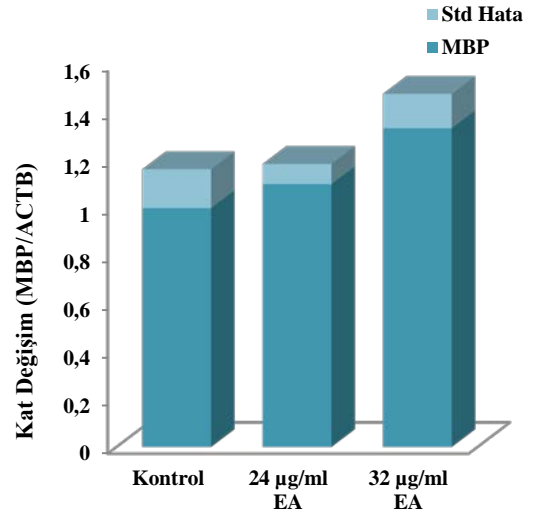
**Şekil 63.** EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.



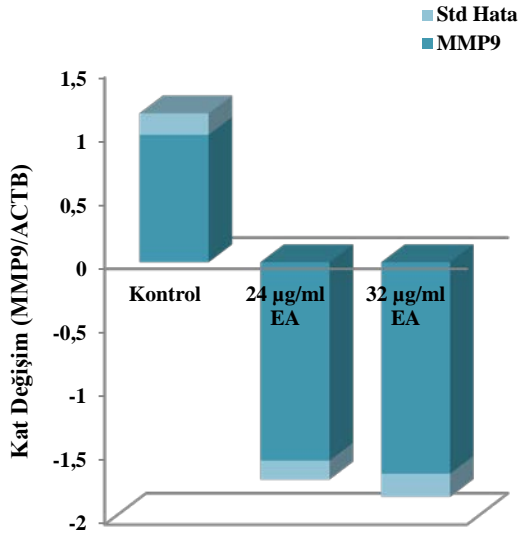
**Şekil 65.** EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.



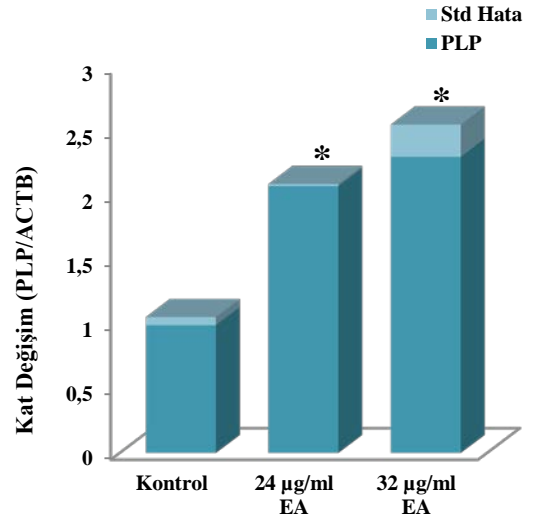
**Şekil 64.** EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.



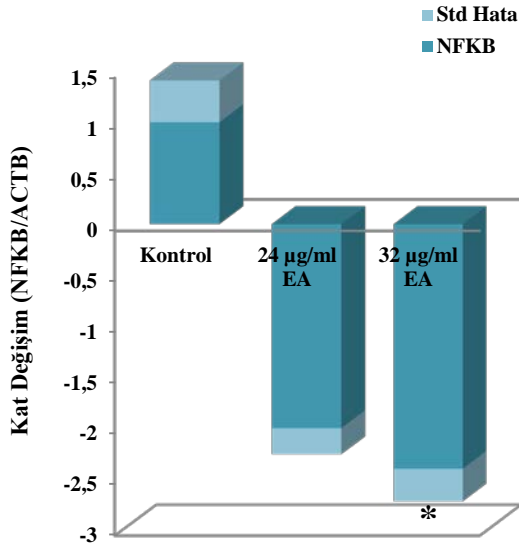
**Şekil 66.** EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.



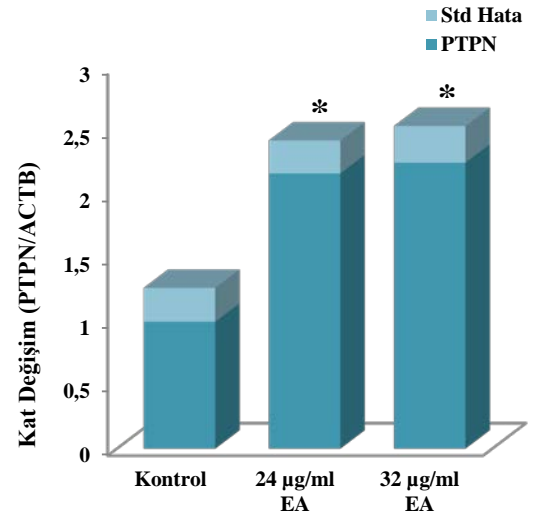
**Şekil 67.** EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.



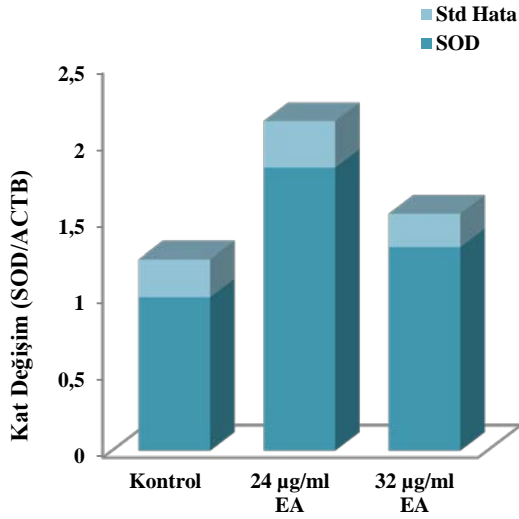
**Şekil 69.** EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.



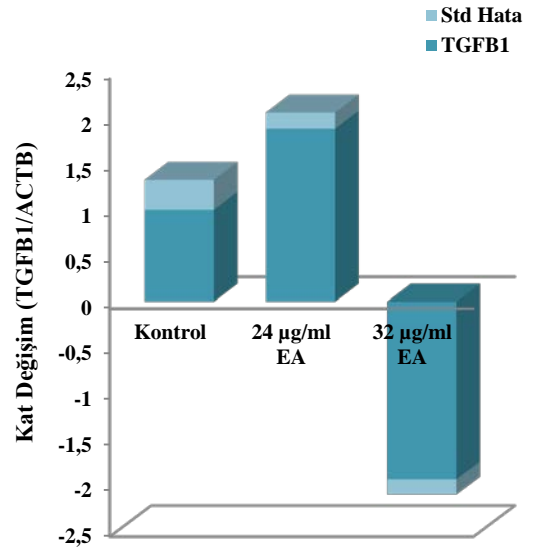
**Şekil 68.** EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında NFkB mRNA seviyesine olan etkisi.



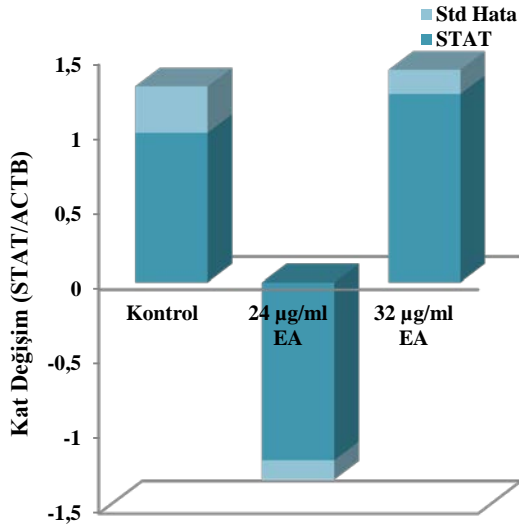
**Şekil 70.** EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.



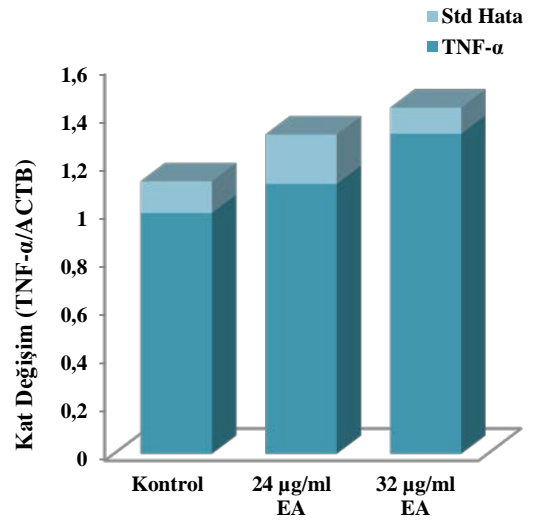
**Şekil 71.** EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 73.** EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 72.** EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.

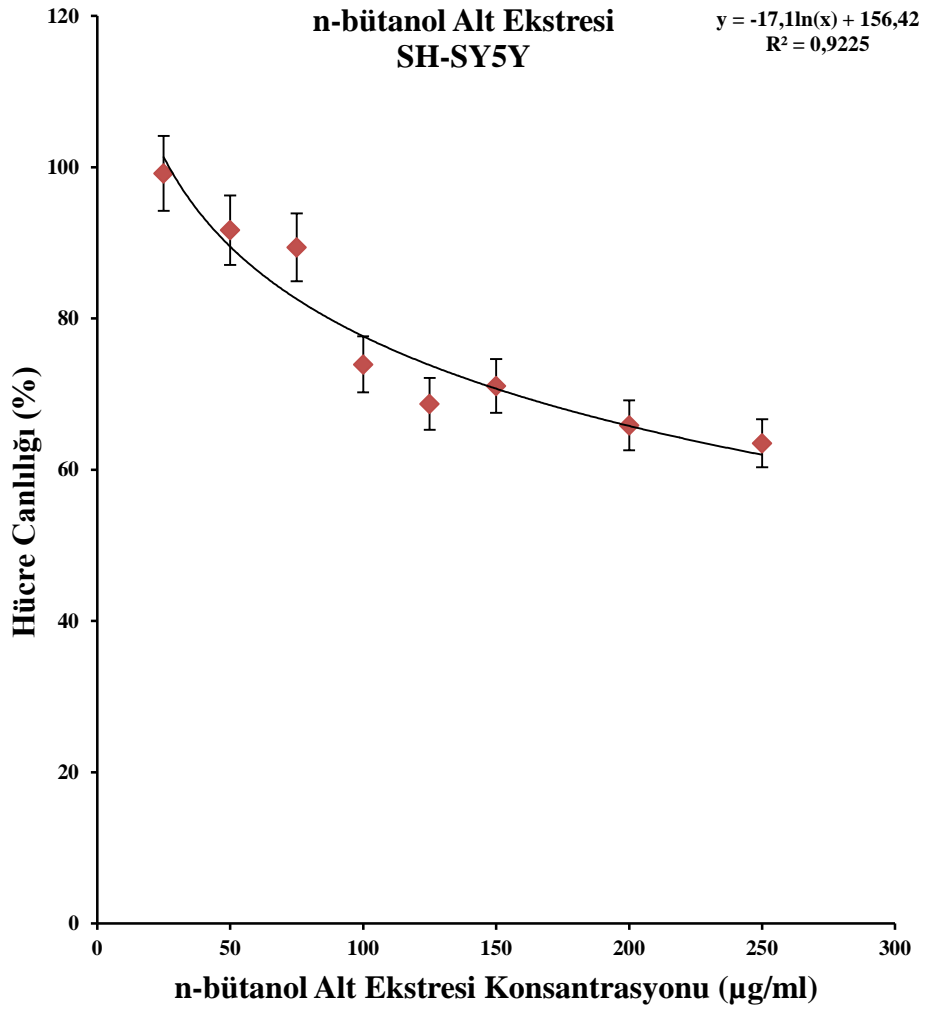


**Şekil 74.** EA alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında TNF-α mRNA seviyesine olan etkisi.

### 3.3.1.4 SH-SY5Y Hücrelerinde n-bütanol Alt Ekstresi Çalışmaları

#### 3.3.1.4.1 n-bütanol Alt Ekstresi Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda n-bütanol alt ekstresi %20 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya ( $1 \times 10^3$ /kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda n-bütanol alt ekstresinin hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 75).



Şekil 75. n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.

Sitotoksosite testi sonunda  $y=ax+b$  denkleminde yola çıkarak yaklaşık EC05 ve EC10 değerleri hesaplandı. Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 37 µg/ml ve 50 µg/ml n-bütanol alt ekstresi konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi.

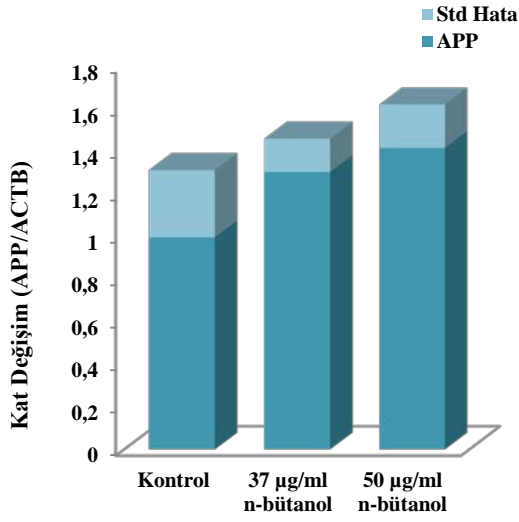
### **3.3.1.4.2 n-bütanol Alt Ekstresinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi**

Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücelere bu belirlenen dozlarda n-bütanol alt ekstresi uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı.

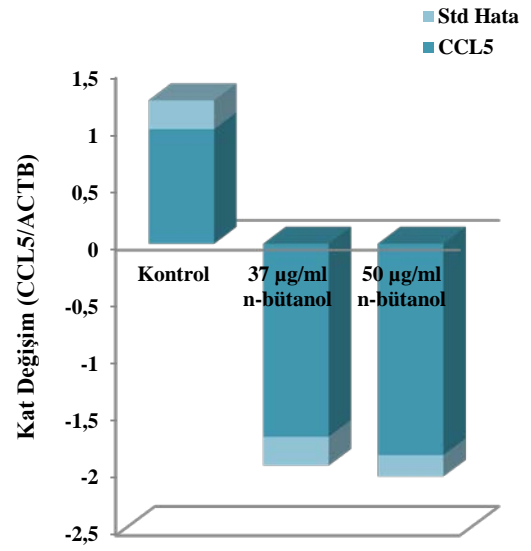
Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar ACTB ile normalize edilip; kontrol değerleri 1 alındı. (\*) ile işaretlenen gruplar  $P < .05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

Seçilen 20 adet genden SH-SY5Y hücrelerinde n-bütanol alt ekstresi uygulanması sonucunda EC05 ve EC10 dozunda C1S 2 ve 2.7 kat, CXCL10 6.4 ve 3.5 kat, IL6 2.5 ve 2 kat, MAG 3.6 ve 6.4 kat, MMP9 4.7 ve 3.2 kat son olarak PTPN 3.2 ve 2.2 kat baskılanan genlerdir. EC05 dozunda NFkB 2.8 kat; EC10 dozunda ise TNF- $\alpha$  2.7 kat anlamlılık düzeyinde baskılanan genlerdir. PLP ise n-bütanol alt ekstresi uygulaması ile EC10 dozunda ekspresyon düzeyi 2.5 kat olarak artan tek genidir. Her ne kadar C1S, CXCL10, IL6, MMP9 ve PTPN baskılanması anti-enflamatuvar etkiyi işaret etse de MAG geninin ekspresyon düzeyindeki ciddi düşüş tezatlık olarak karşımıza çıktı.

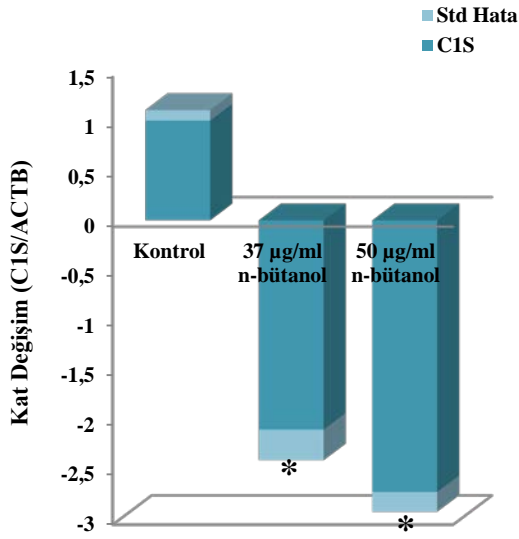
SH-SY5Y hücrelerinde n-bütanol alt ekstresinin seçilen 20 tane gen üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 76-95'de verilmiştir.



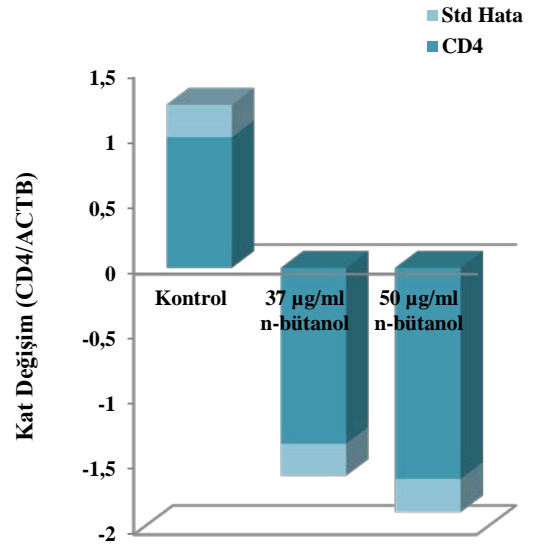
**Şekil 76.** n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.



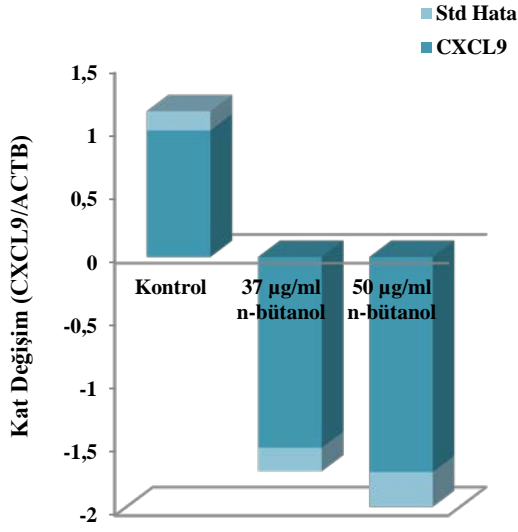
**Şekil 78.** n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.



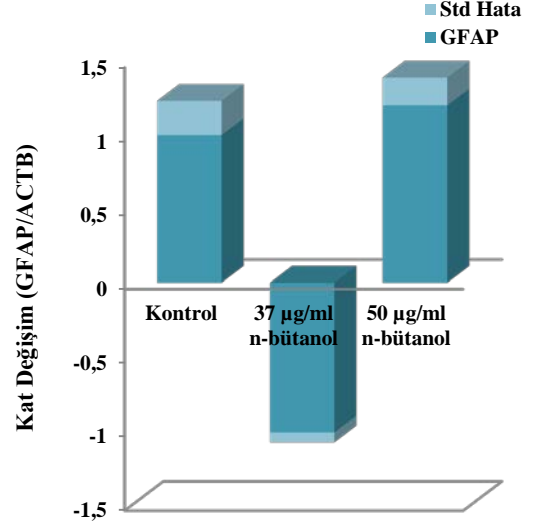
**Şekil 77.** n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.



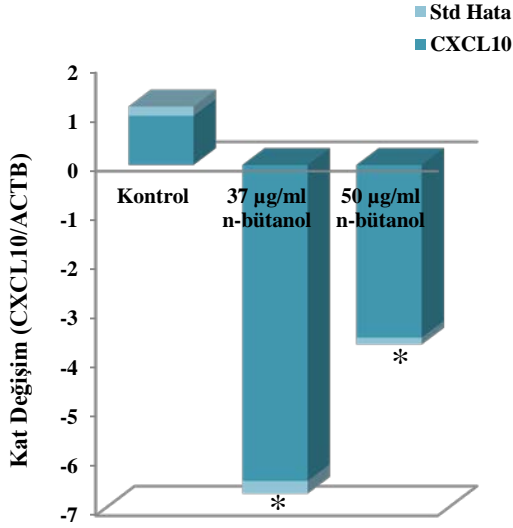
**Şekil 79.** n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.



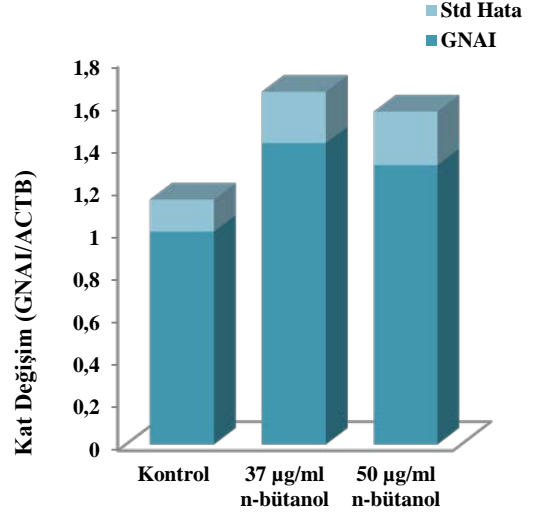
**Şekil 80.** n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.



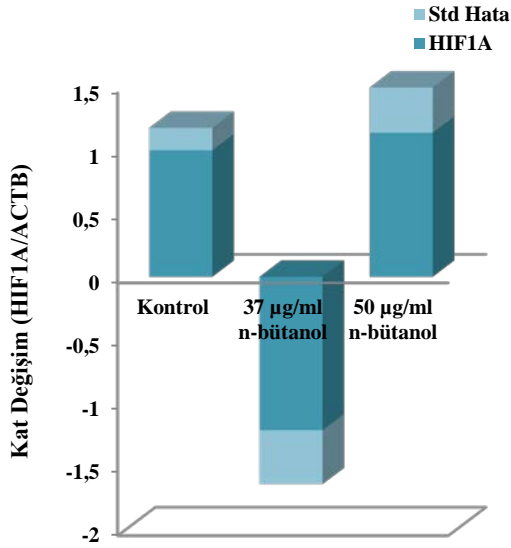
**Şekil 82.** n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.



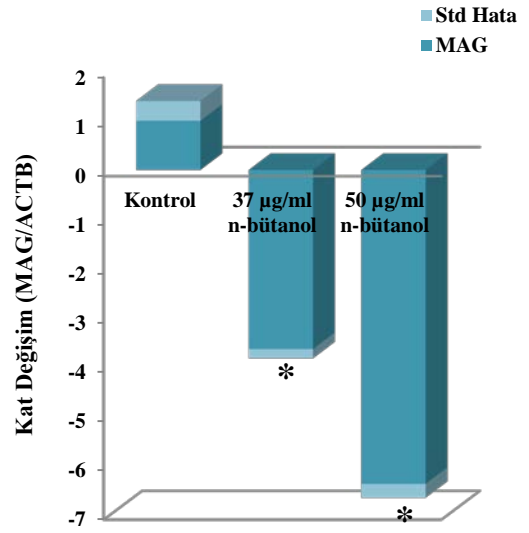
**Şekil 81.** n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.



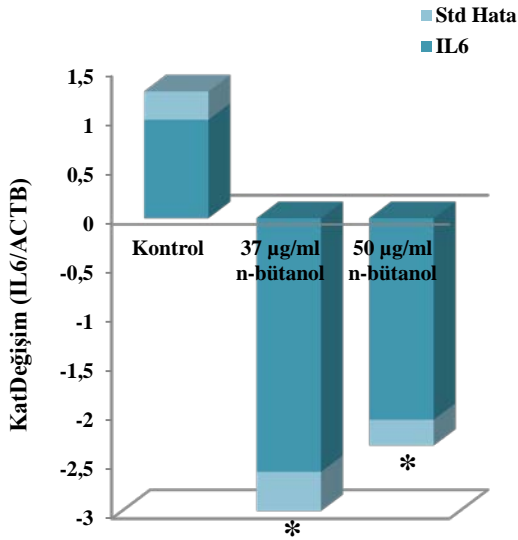
**Şekil 83.** n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında GNAI1 mRNA seviyesine olan etkisi.



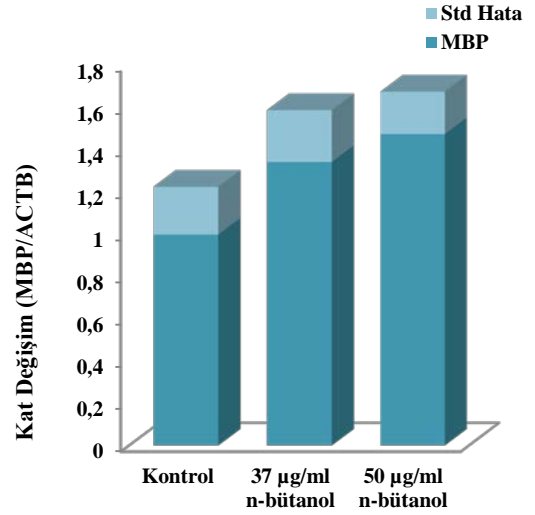
**Şekil 84.** n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 86.** n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.

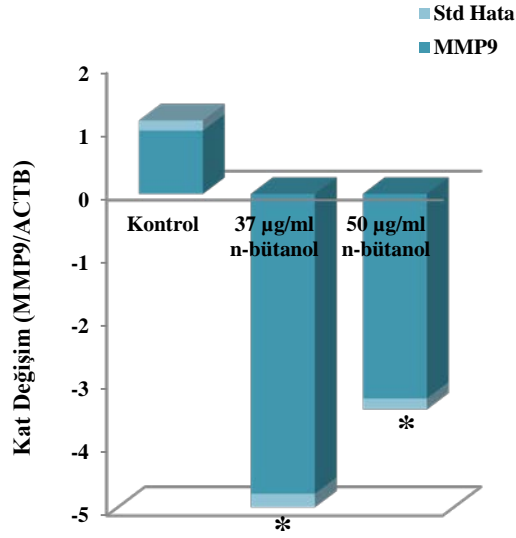


**Şekil 85.** n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.

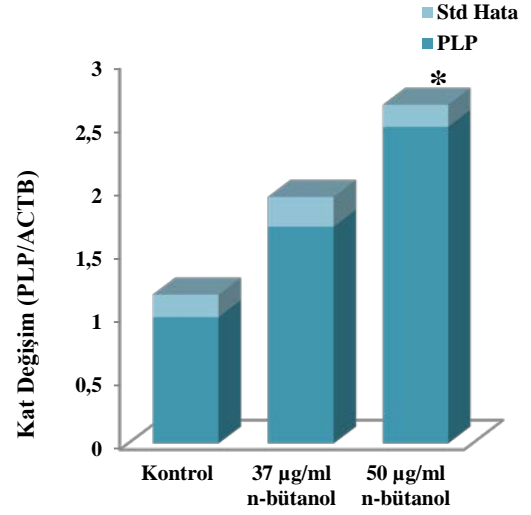


**Şekil 87.** n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.

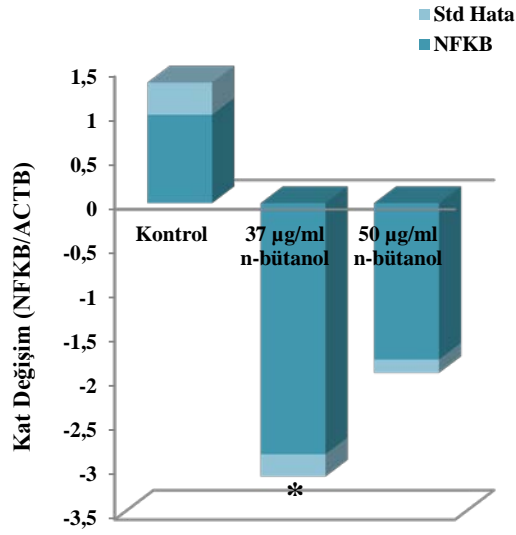




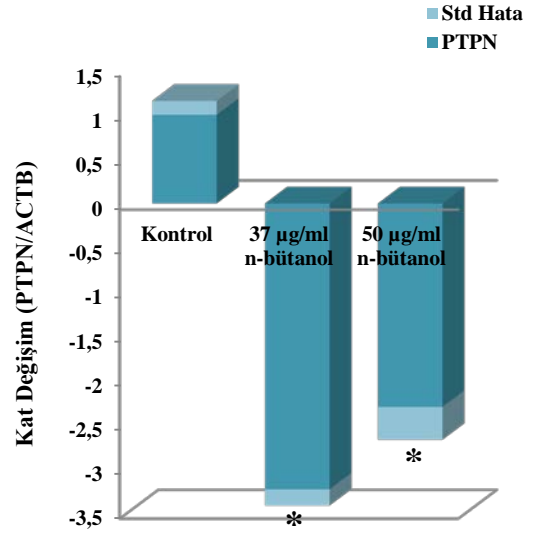
**Şekil 88.** n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.



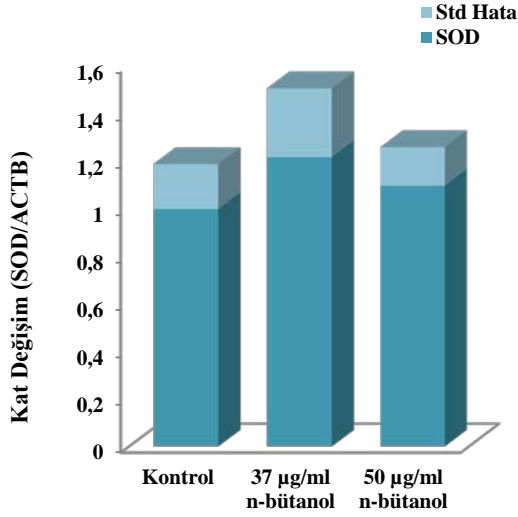
**Şekil 90.** n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.



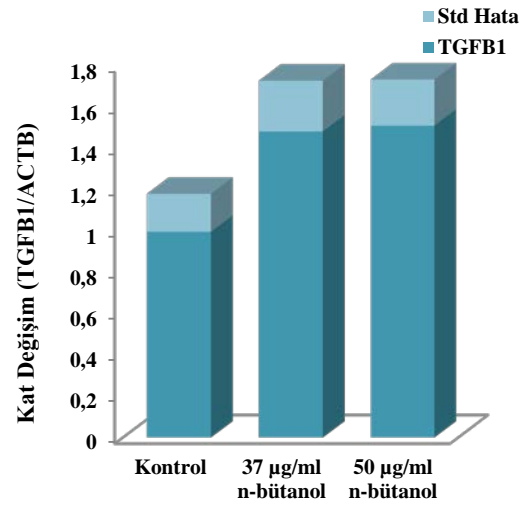
**Şekil 89.** n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.



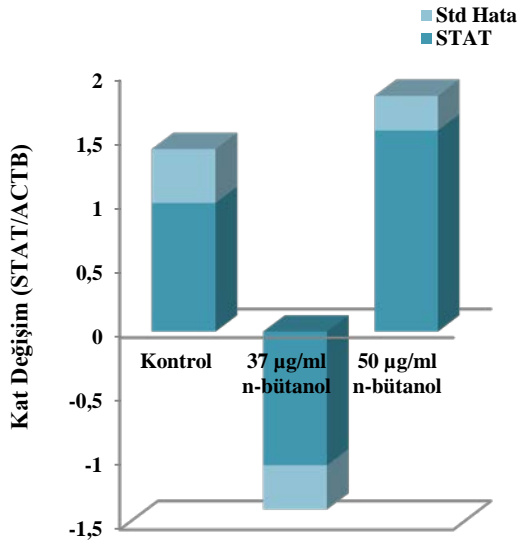
**Şekil 91.** n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.



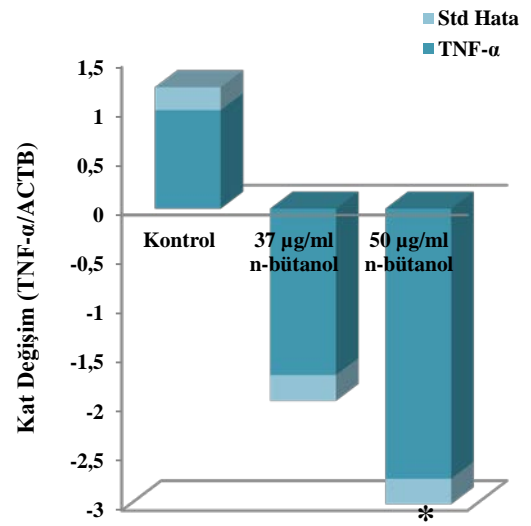
**Şekil 92.** n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 94.** n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 93.** n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.

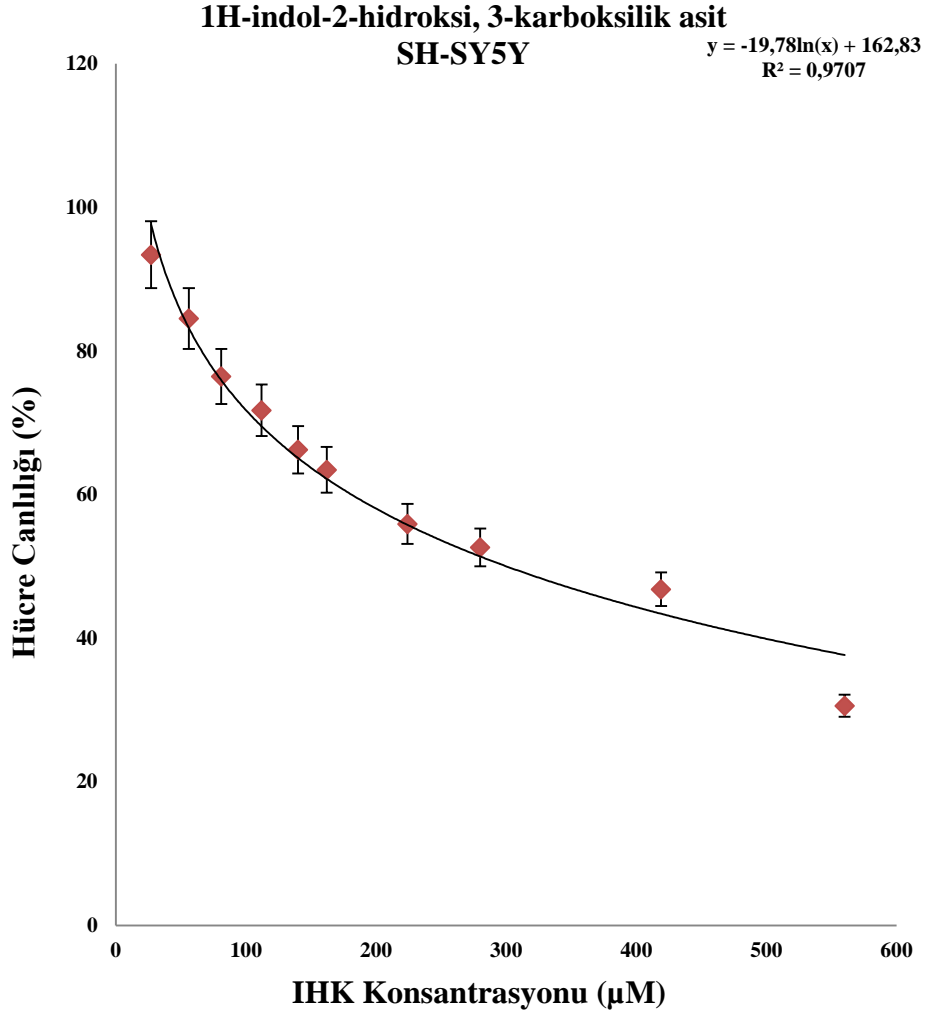


**Şekil 95.** n-bütanol alt ekstresinin SH-SY5Y hücre hattında TNF-α mRNA seviyesine olan etkisi.

### 3.3.1.5 SH-SY5Y Hücrelerinde 1H-indol-2-hidroksi, 3-karboksilik asit Saf Bileşiği Çalışmaları

#### 3.3.1.5.1 1H-indol-2-hidroksi, 3-karboksilik asit Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda 1H-indol-2-hidroksi, 3-karboksilik asit (IHK) %20 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya ( $1 \times 10^3$ /kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda IHK'in hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 96).



Şekil 96. IHK saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.

Sitotoksosite testi sonunda  $y=ax+b$  denkleminde yola çıkarak yaklaşık EC05 ve EC10 değerleri hesaplandı. Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 36  $\mu$ M ve 45  $\mu$ M IHK konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi.

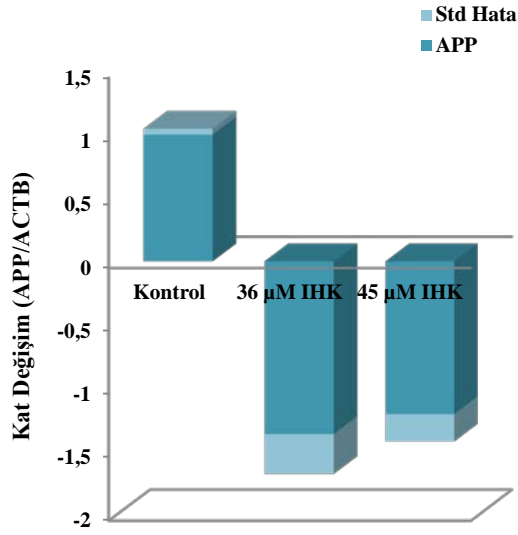
### **3.3.1.5.2 1H-indol-2-hidroksi, 3-karboksilik asit Saf Bileşiminin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi**

Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücrelere bu belirlenen dozlarda IHK uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı.

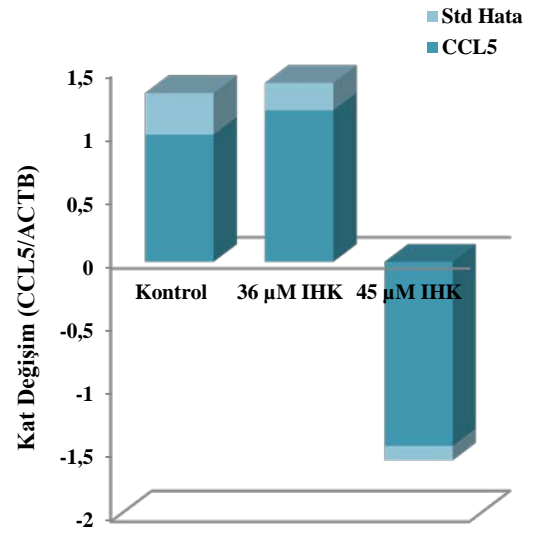
Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar ACTB ile normalize edilip; kontrol değerleri 1 alındı. (\*) ile işaretlenen gruplar  $P < .05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

Seçilen 20 adet genden SH-SY5Y hücrelerinde IHK uygulanması sonucunda EC05 ve EC10 dozunda GFAP 2.8 ve 2.2 kat artarken; GNAI her iki dozda da 2.1 kat baskılanmıştır. Bunun yanımda MMP9 geni sadece EC05 dozunda 2 kat anlamlı olarak baskılanmıştır.

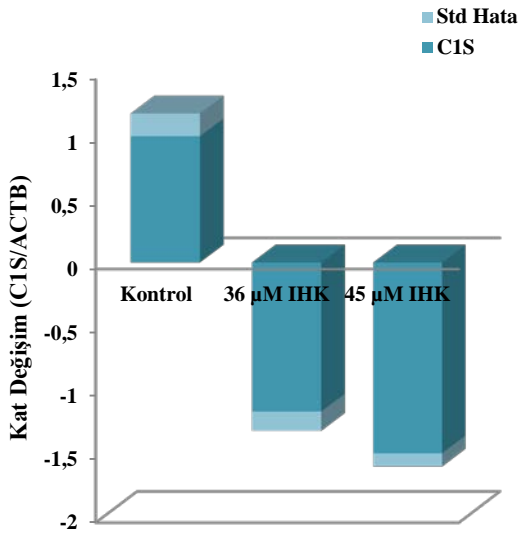
SH-SY5Y hücrelerinde IHK saf bileşiminin seçilen 20 tane gen üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 97-116'da verilmiştir.



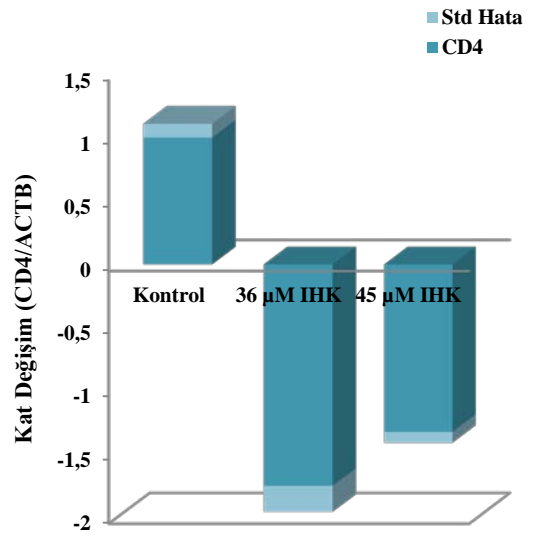
**Şekil 97.** IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.



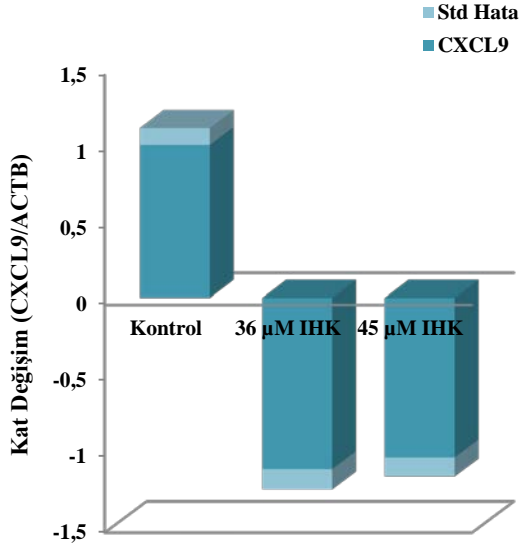
**Şekil 99.** IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.



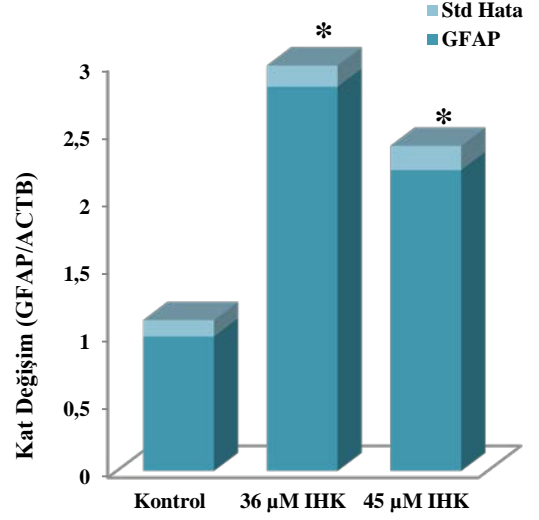
**Şekil 98.** IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.



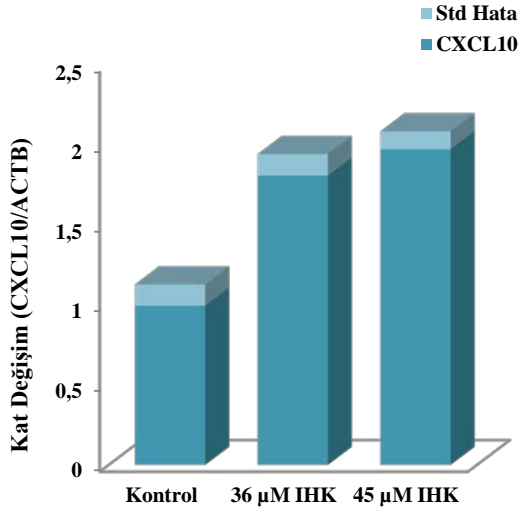
**Şekil 100.** IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.



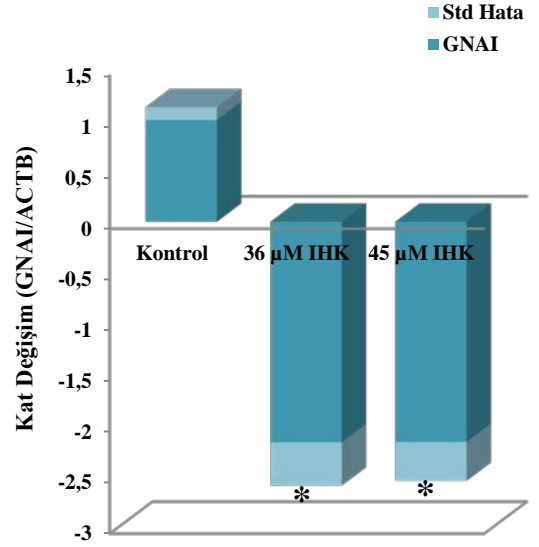
**Şekil 101.** IHK saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.



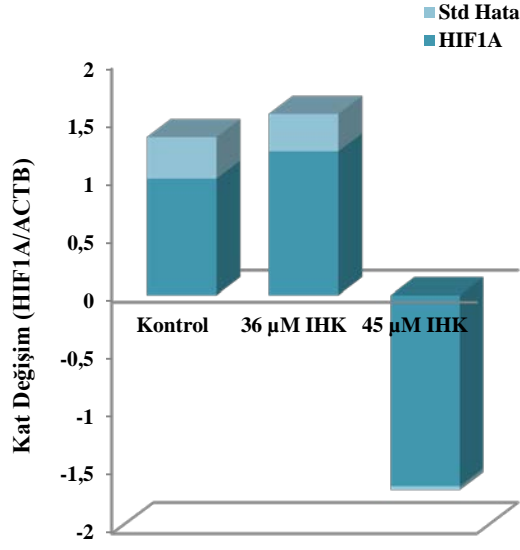
**Şekil 103.** IHK saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.



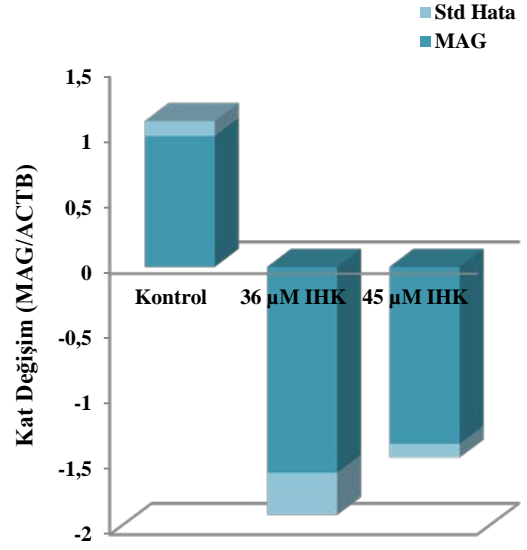
**Şekil 102.** IHK saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.



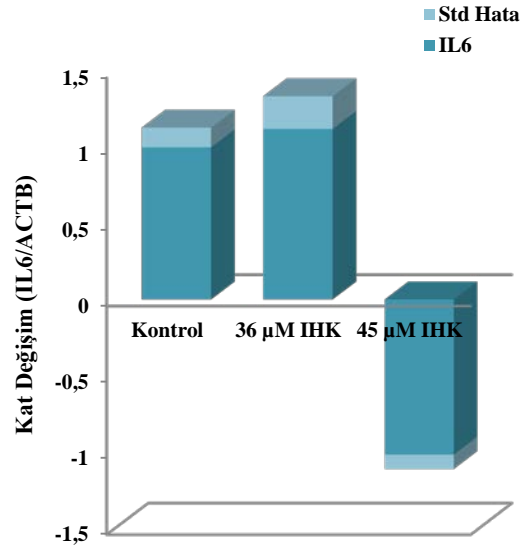
**Şekil 104.** IHK saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.



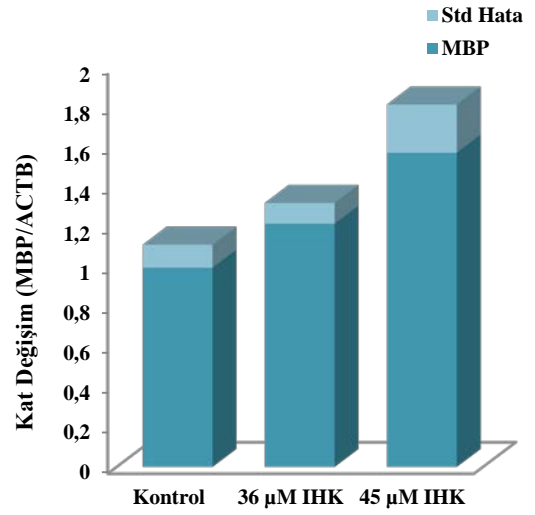
**Şekil 105.** IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.



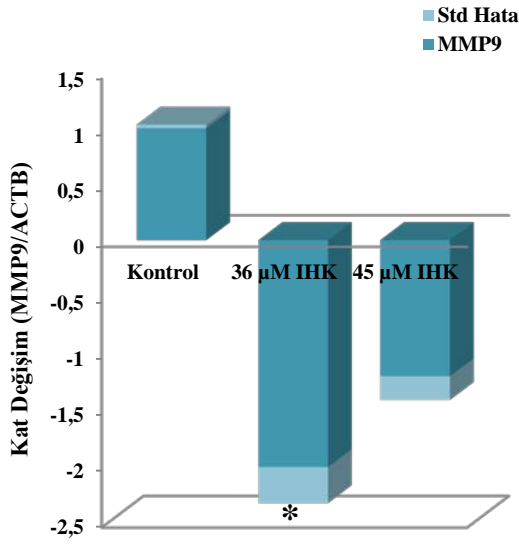
**Şekil 107.** IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.



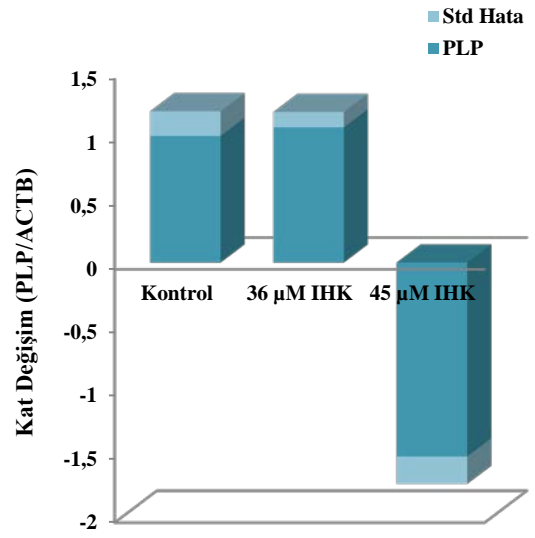
**Şekil 106.** IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.



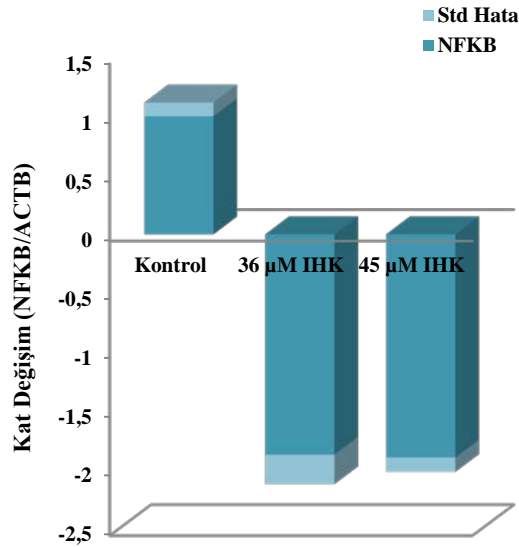
**Şekil 108.** IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.



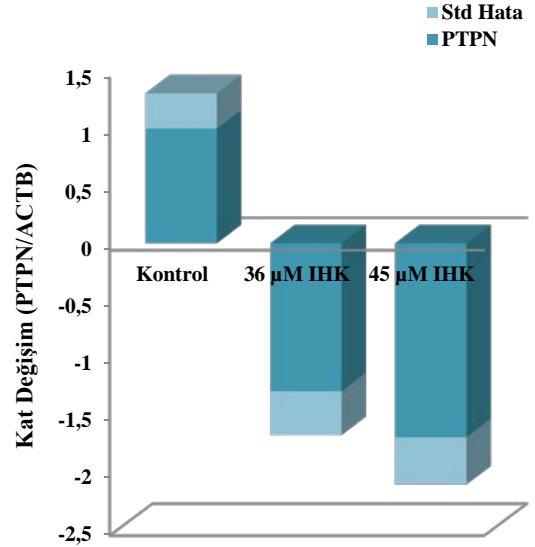
**Şekil 109.** IHK saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 111.** IHK saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.

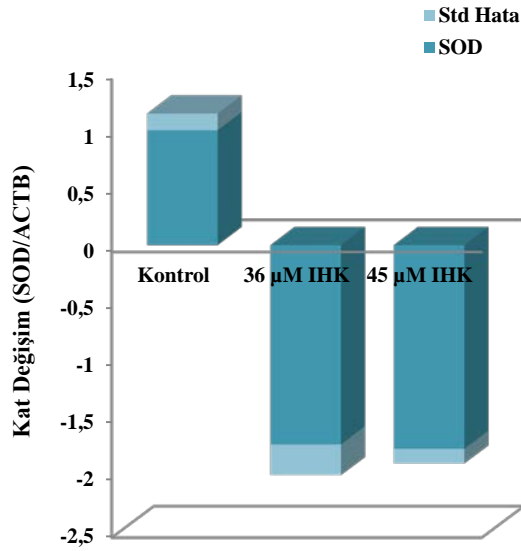


**Şekil 110.** IHK saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında NFκB mRNA seviyesine olan etkisi.

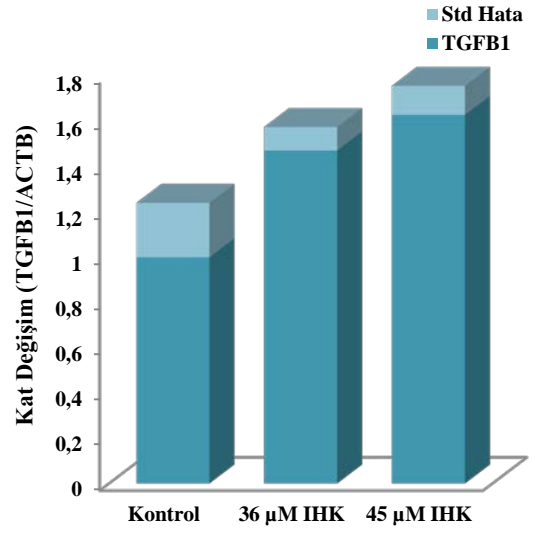


**Şekil 112.** IHK saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.

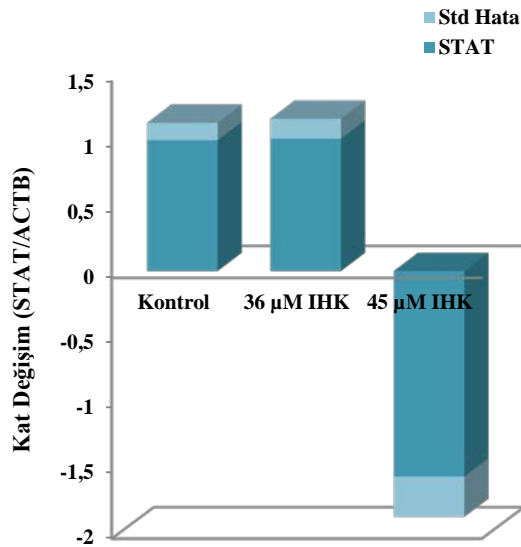




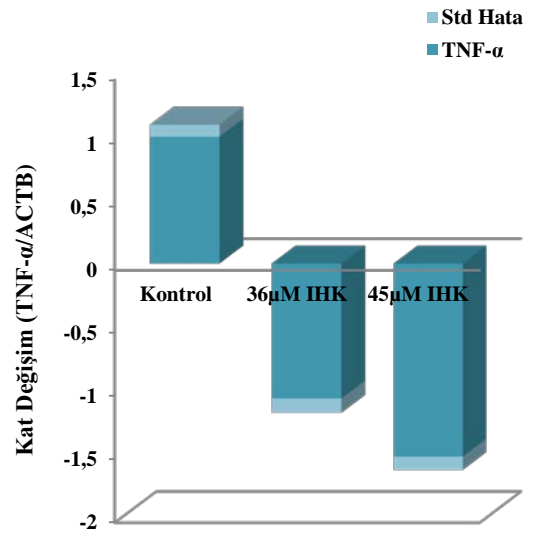
**Şekil 113.** IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 115.** IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 114.** IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.

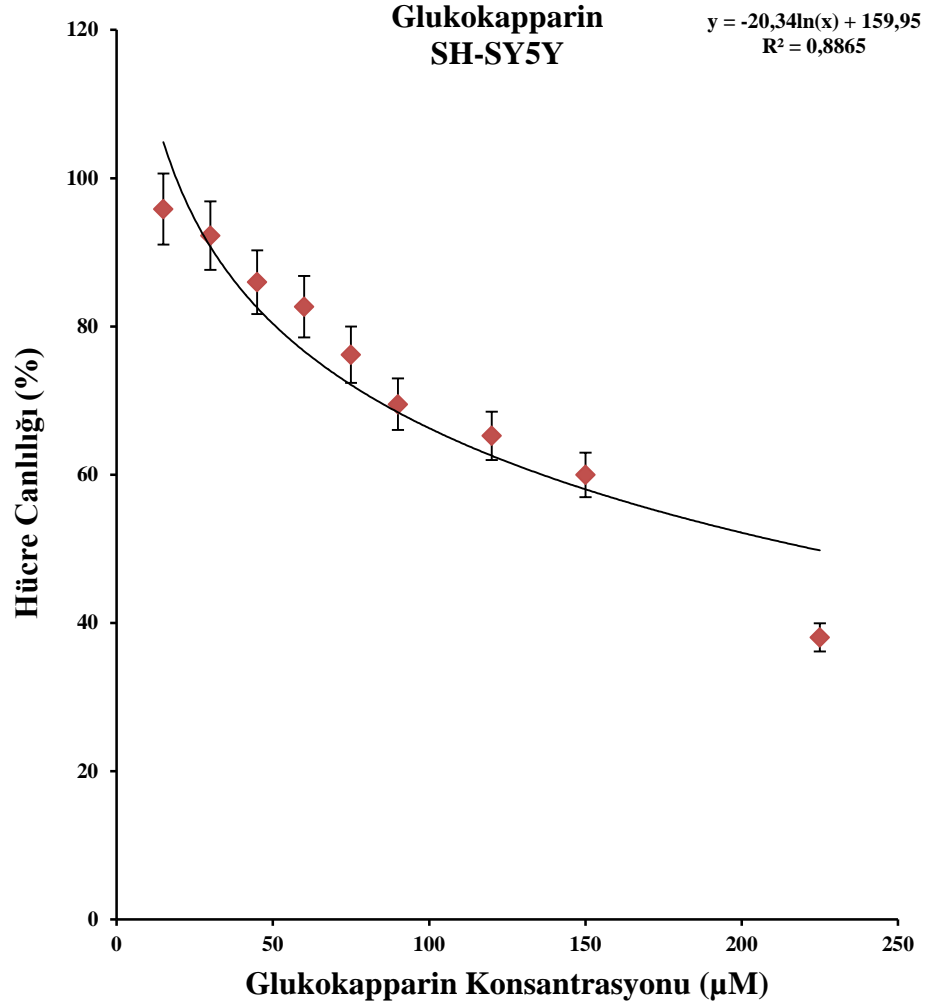


**Şekil 116.** IHK saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında TNF-α mRNA seviyesine olan etkisi.

### 3.3.1.6 SH-SY5Y Hücrelerinde Glukokapparin Saf Bileşigi Çalışmaları

#### 3.3.1.6.1 Glukokapparin Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda glukokapparin (GC) %20 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya ( $1 \times 10^3$ /kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda GC'in hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 117).



Şekil 117. GC saf bileşığının SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.

Sitotoksosite testi sonunda  $y=ax+b$  denkleminde yola çıkarak yaklaşık EC05 ve EC10 değerleri hesaplandı. Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 24 µM ve 31 µM GC saf bileşiği konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi.

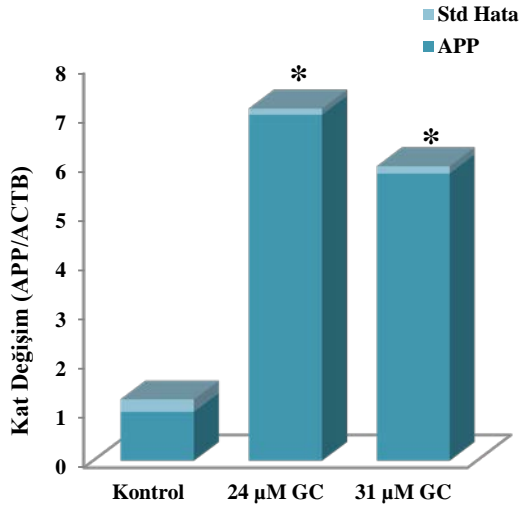
### **3.3.1.6.2 Glukokapparin Saf Bileşiğinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi**

Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücrelere bu belirlenen dozlarda GC saf bileşiği uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı.

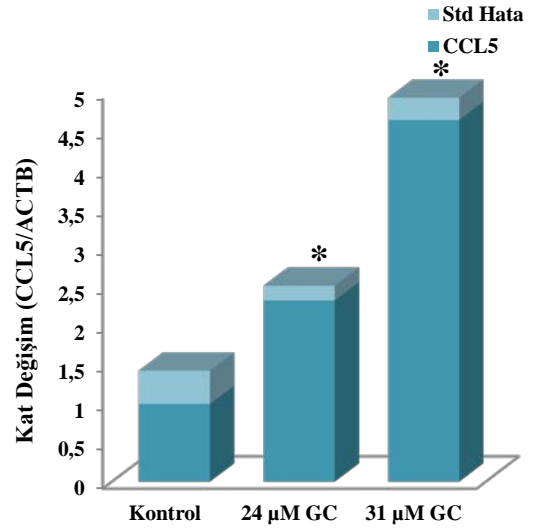
Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar ACTB ile normalize edilip; kontrol değerleri 1 alındı. (\*) ile işaretlenen gruplar  $P < .05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

Seçilen 20 adet genden SH-SY5Y hücrelerinde GC saf bileşiği uygulanması sonucunda EC05 ve EC10 dozunda sırayla APP 7 ve 5.8 kat, C1S 2.2 ve 2.7 kat, CCL5 2.3 ve 4.6 kat, CXCL10 2.2 ve 2.6 kat, GFAP 3.2 ve 4 kat, MMP9 3.1 ve 3.5 kat ve SOD 27 ve 24 kat artarken; EC05 dozunda HIF1A 3.1 kat; EC10 dozunda ise MAG 2.2, MBP 2.7 ve PLP 3.1 kat ekspresyonu artan genlerdir. Bunun yanında EC10 dozunda GNAI 21.1 kat ve NFkB 12.5 kat baskılanan genlerdir. GC özellikle çoğu kemokin ve sitokinin ekspresyonunu artırarak enflamatuvar etki gösterdi.

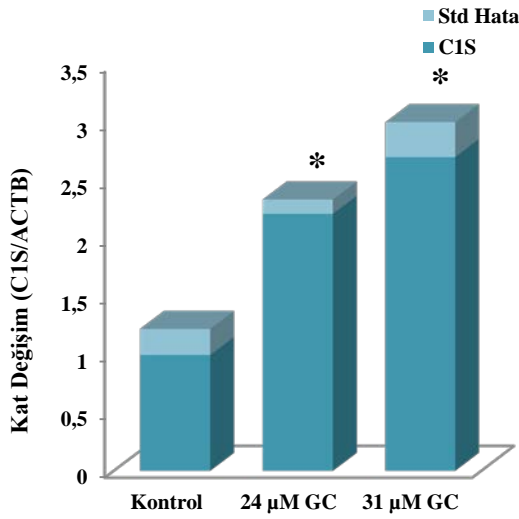
SH-SY5Y hücrelerinde GC saf bileşiğinin seçilen 20 tane gen üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 118-137'de verilmiştir.



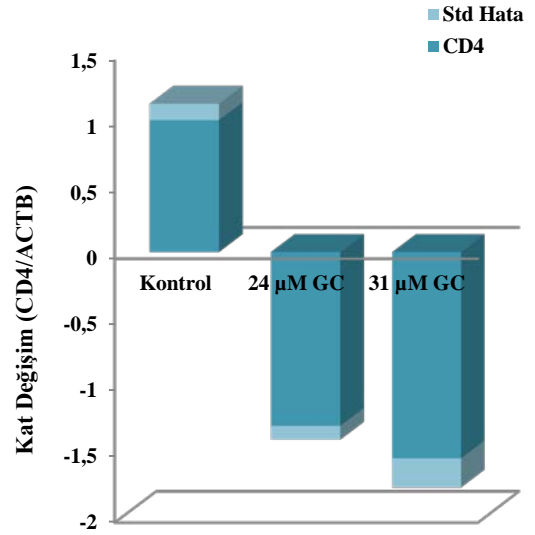
**Şekil 118.** GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.



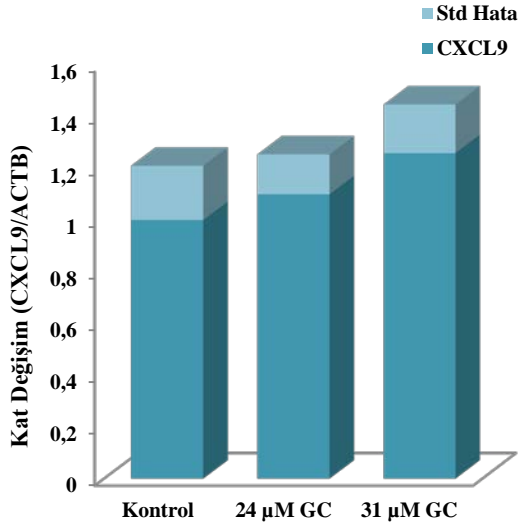
**Şekil 120.** GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.



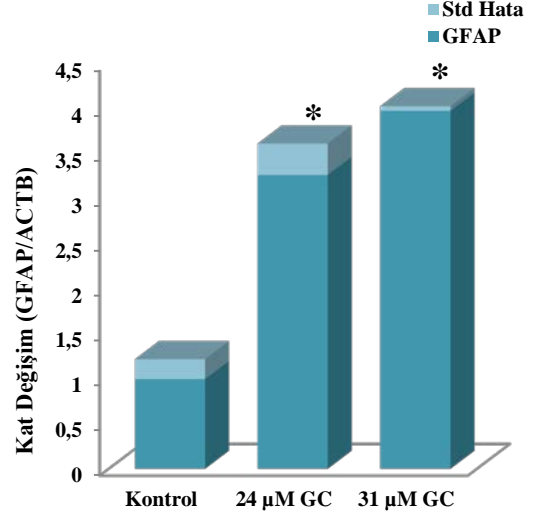
**Şekil 119.** GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.



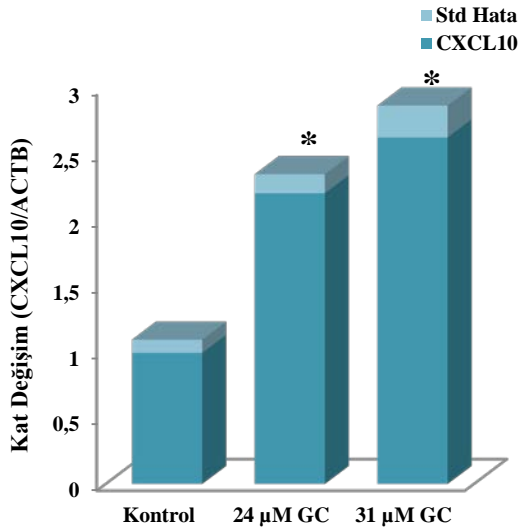
**Şekil 121.** GC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.



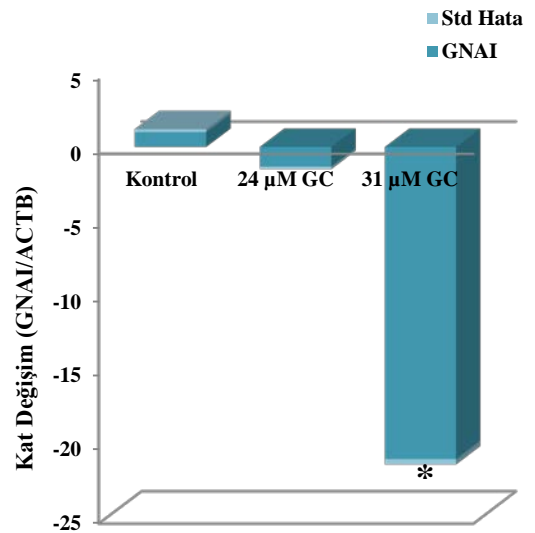
**Şekil 122.** GC saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.



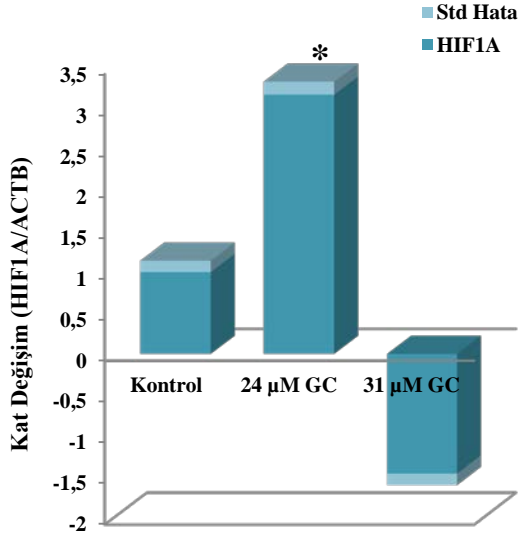
**Şekil 124.** GC saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.



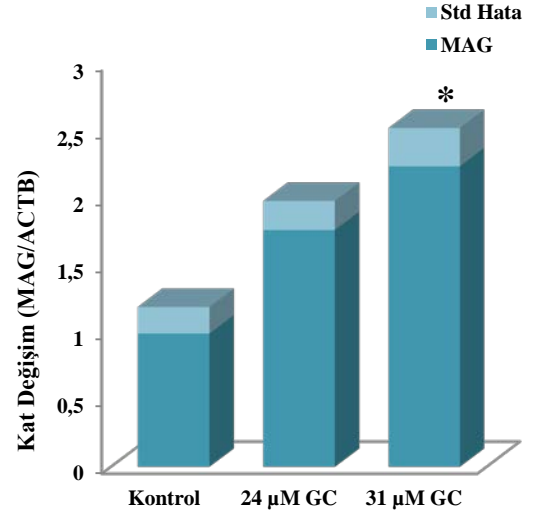
**Şekil 123.** GC saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.



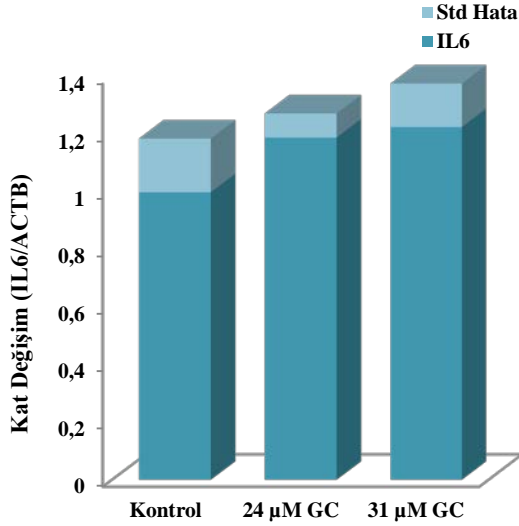
**Şekil 125.** GC saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.



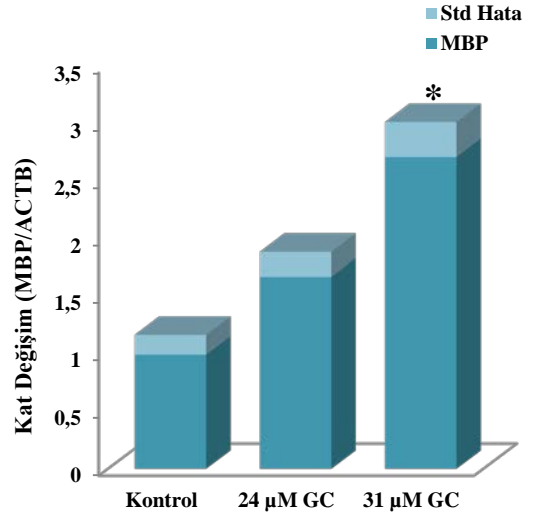
**Şekil 126.** GC saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.



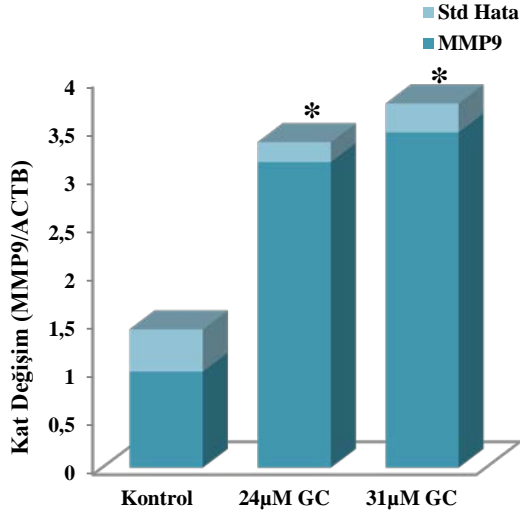
**Şekil 128.** GC saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.



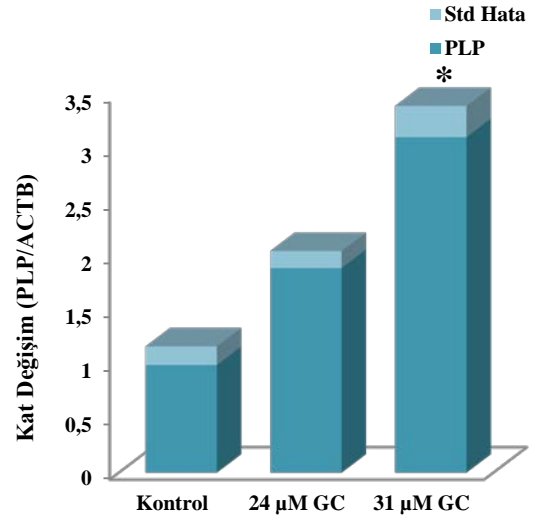
**Şekil 127.** GC saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.



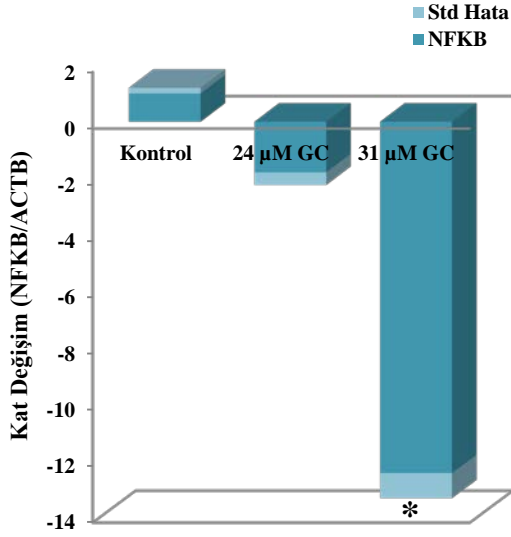
**Şekil 129.** GC saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.



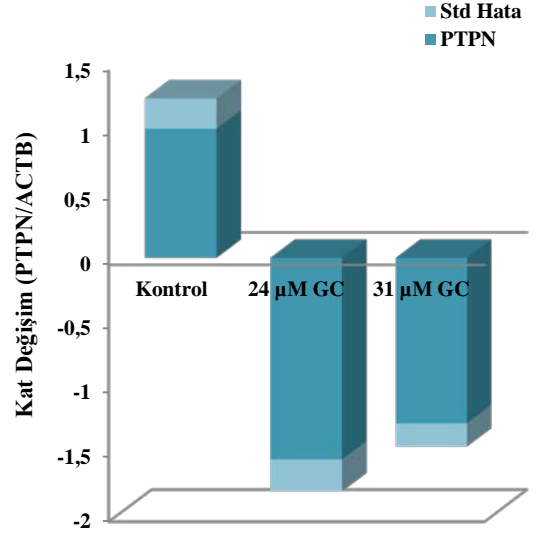
**Şekil 130.** GC saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.



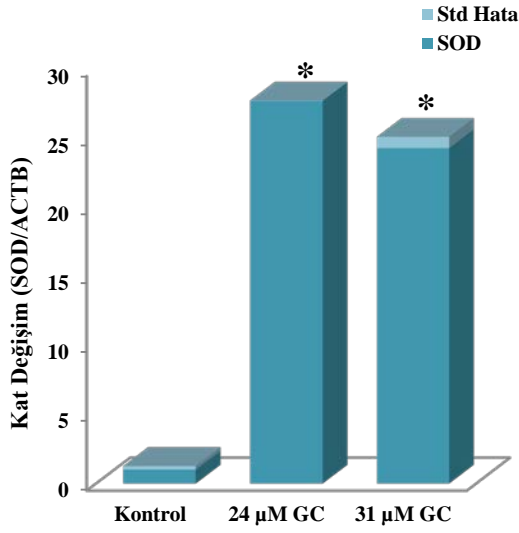
**Şekil 132.** GC saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.



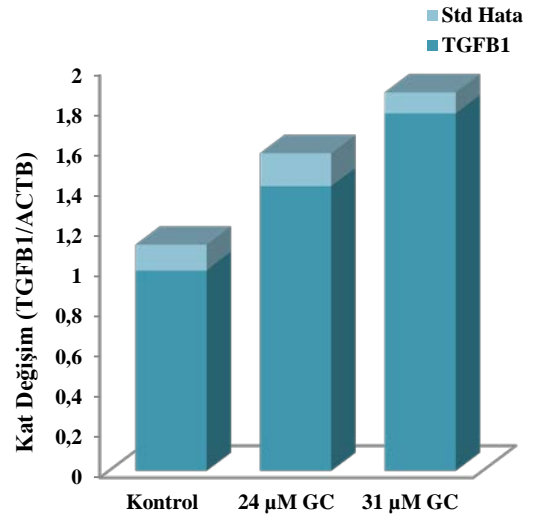
**Şekil 131.** GC saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.



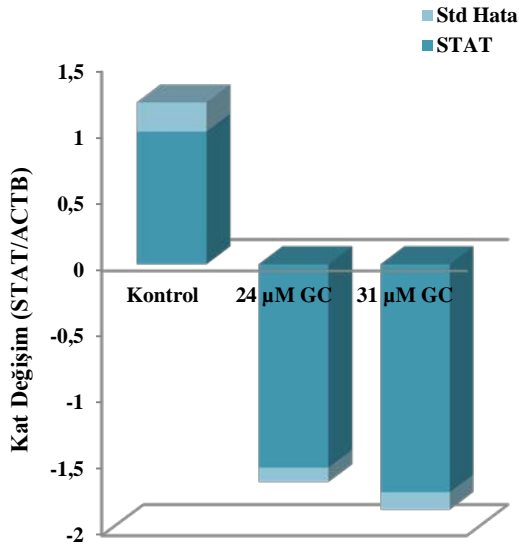
**Şekil 133.** GC saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.



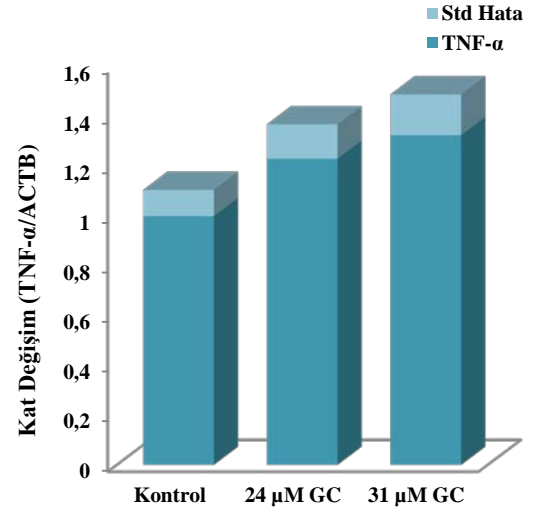
**Şekil 134.** GC saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 136.** GC saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 135.** GC saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.



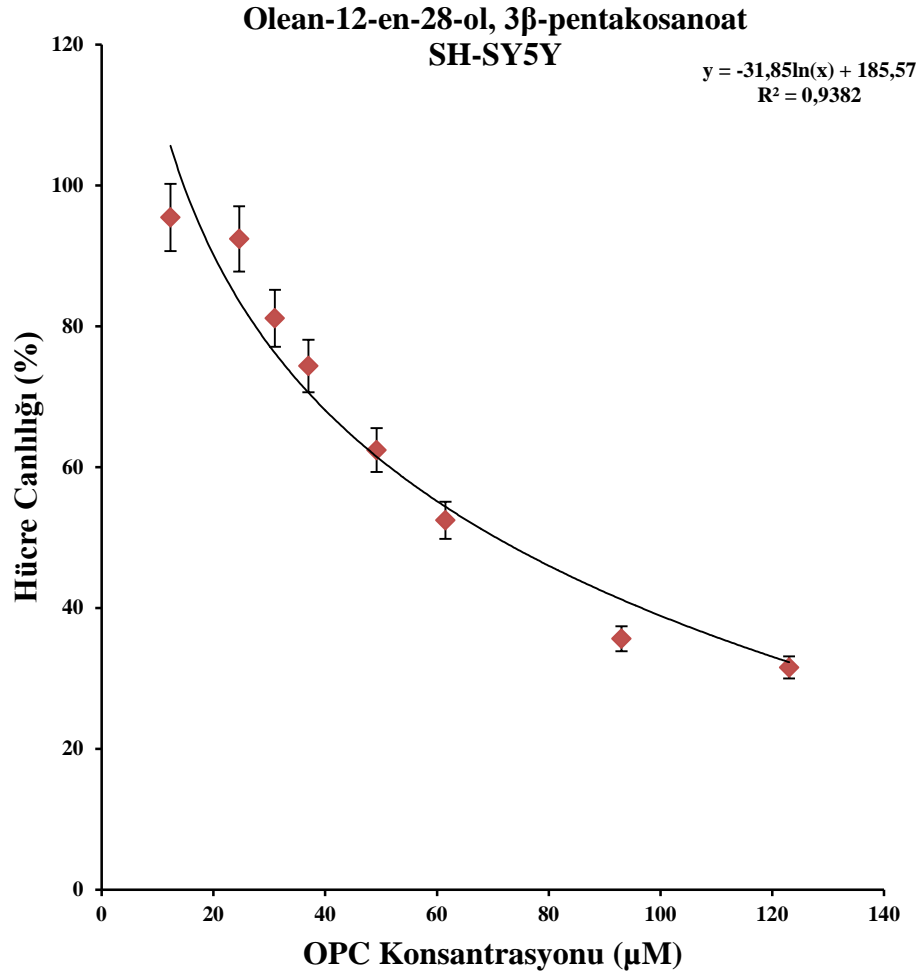
**Şekil 137.** GC saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında TNF-α mRNA seviyesine olan etkisi.



### 3.3.1.7 SH-SY5Y Hücrelerinde Olean-12-en-28-ol, 3 $\beta$ pentakosanoat Saf Bileşiği Çalışmaları

#### 3.3.1.7.1 Olean-12-en-28-ol, 3 $\beta$ pentakosanoat Saf Bileşiği Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda Olean-12-en-28-ol, 3 $\beta$  pentakosanoat (OPC) saf bileşiği %20 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya ( $1 \times 10^3$ /kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda OPC'ın hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 138).



Şekil 138. OPC saf bileşiğinin hücre canlılığına etkisi.

Sitotoksisite testi sonunda  $y=ax+b$  denkleminde yola çıkarak yaklaşık EC05 ve EC10 değerleri hesaplandı. Bu sitotoksisite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 17  $\mu$ M ve 20  $\mu$ M OPC konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi.

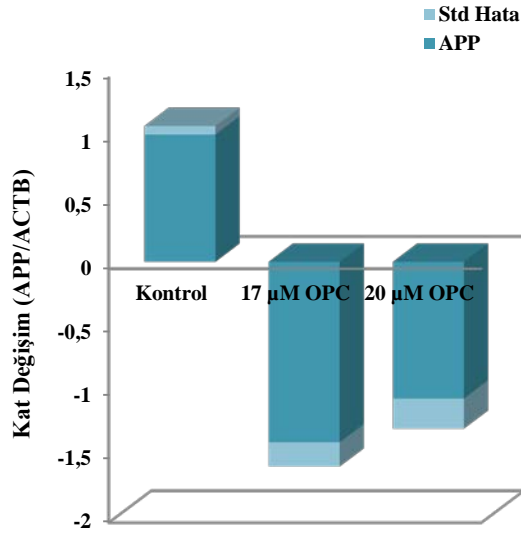
### **3.3.1.7.2 Olean-12-en-28-ol, 3 $\beta$ pentakosanoat Saf Bileşiminin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi**

Sitotoksisite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücrelere bu belirlenen dozlarda OPC uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı.

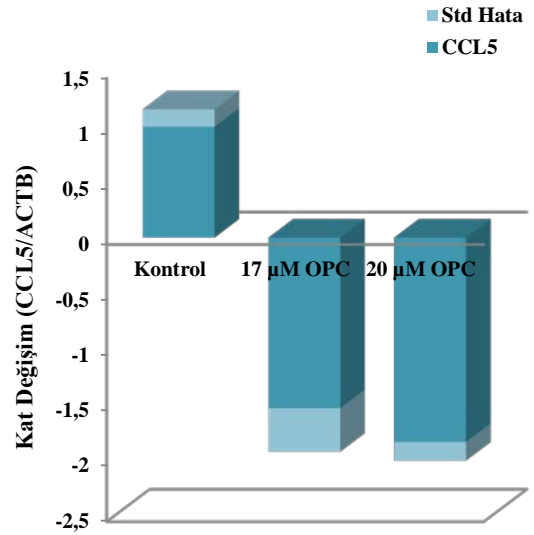
Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar ACTB ile normalize edilip; kontrol değerleri 1 alındı. (\*) ile işaretlenen gruplar  $P < .05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

Seçilen 20 adet genden SH-SY5Y hücrelerinde OPC saf bileşiği uygulanması sonucunda EC05 ve EC10 dozunda CXCL10 2.2 ve 2.1 kat, GNAI 2.8 ve 3 kat ve HIF1A 4.5 ve 2.6 kat; EC10 dozunda ise MMP9 3.5 kat, NFKB 2.5 kat ve TNF- $\alpha$  4.5 kat mRNA ekspresyon düzeyi baskılanan genlerdir. CXCL10, HIF1A, NFKB ve TNF- $\alpha$  enflamatuvar cevapta rol alan gen grubudur ve bunların OPC uygulanması sonucu baskılanması anti-enflamatuvar etkiyi gösterir.

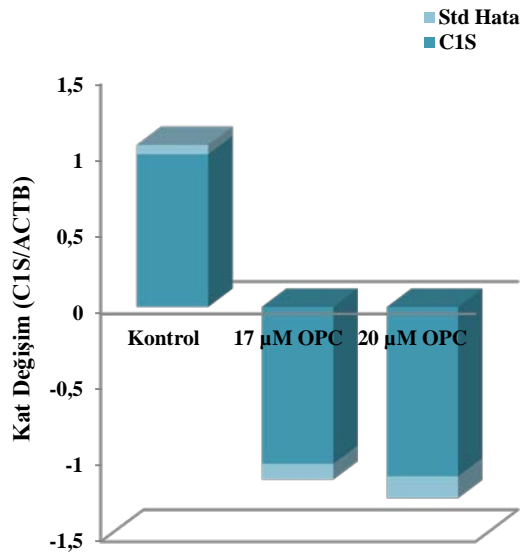
SH-SY5Y hücrelerinde OPC saf bileşiminin seçilen 20 tane gen üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 139-158'de verilmiştir.



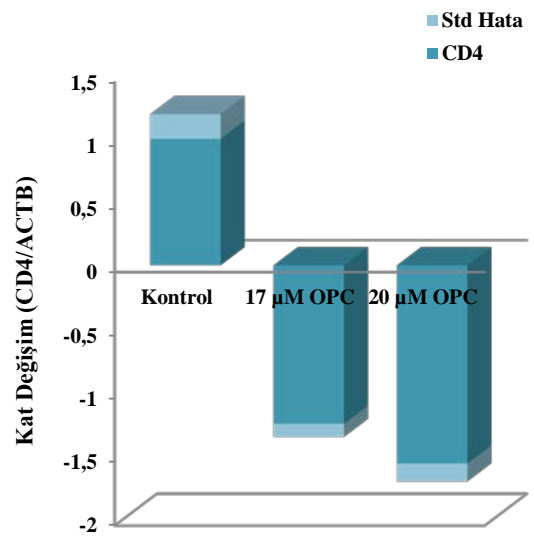
**Şekil 139.** OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.



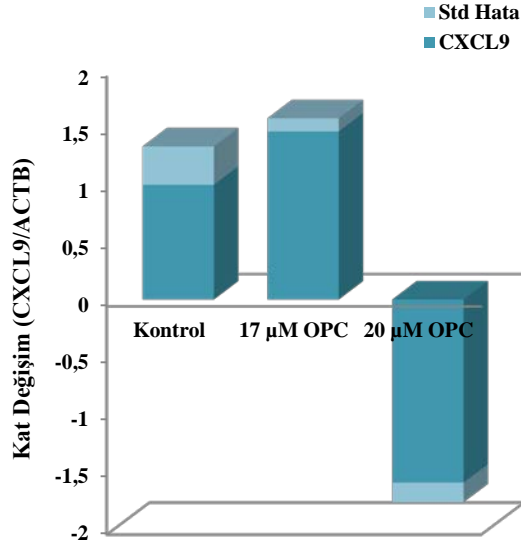
**Şekil 141.** OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.



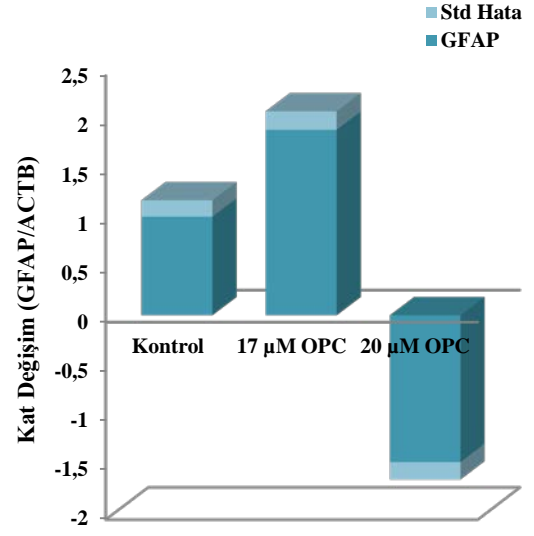
**Şekil 140.** OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.



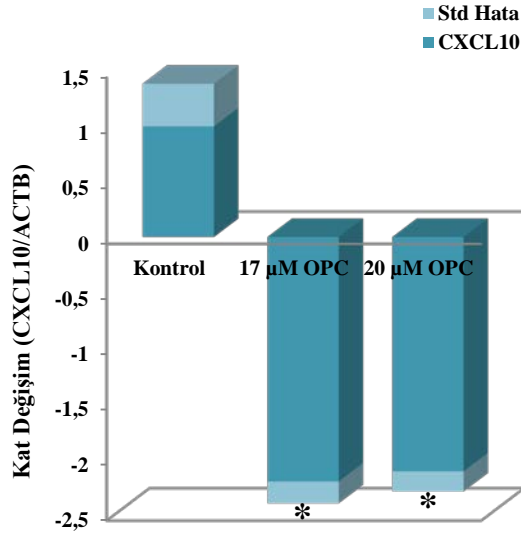
**Şekil 142.** OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.



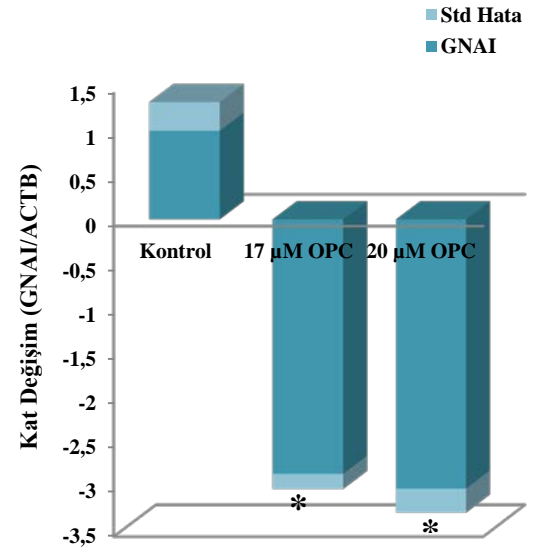
**Şekil 143.** OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.



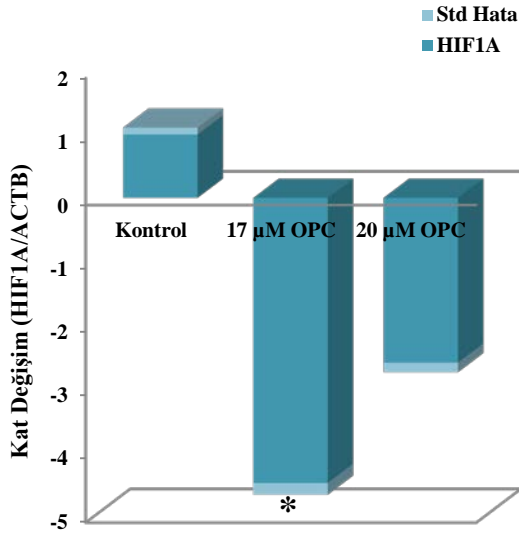
**Şekil 145.** OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.



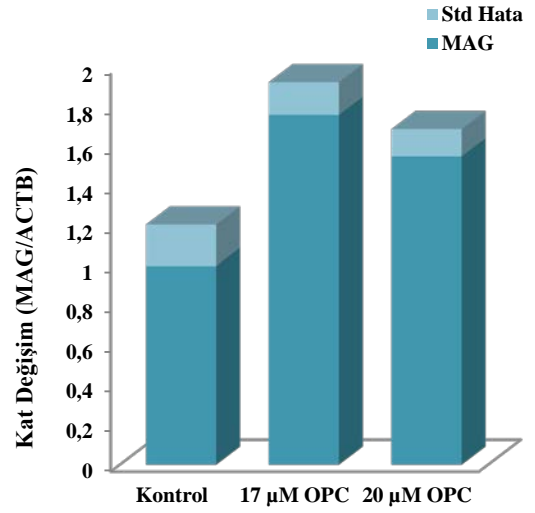
**Şekil 144.** OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.



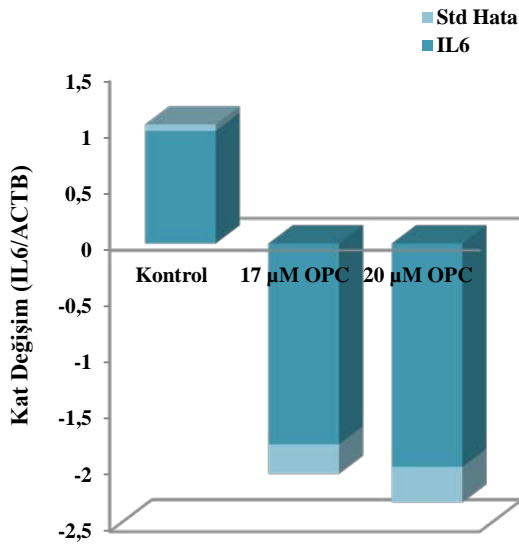
**Şekil 146.** OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.



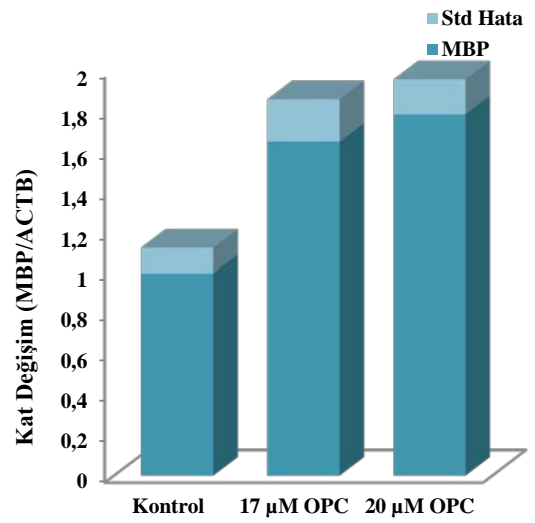
**Şekil 147.** OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.



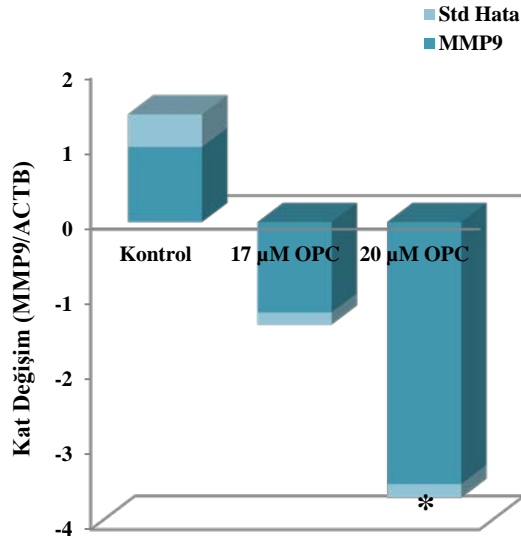
**Şekil 149.** OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.



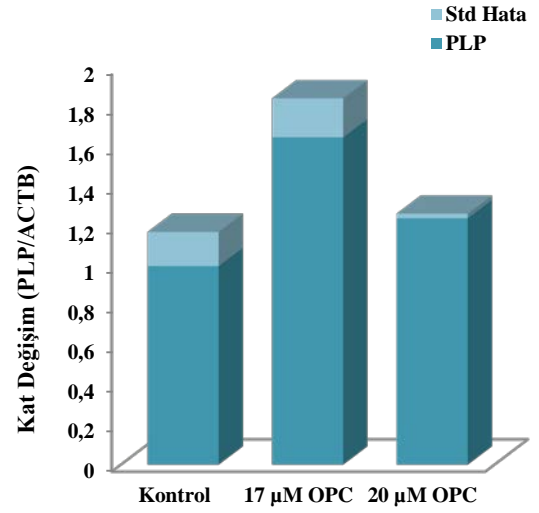
**Şekil 148.** OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.



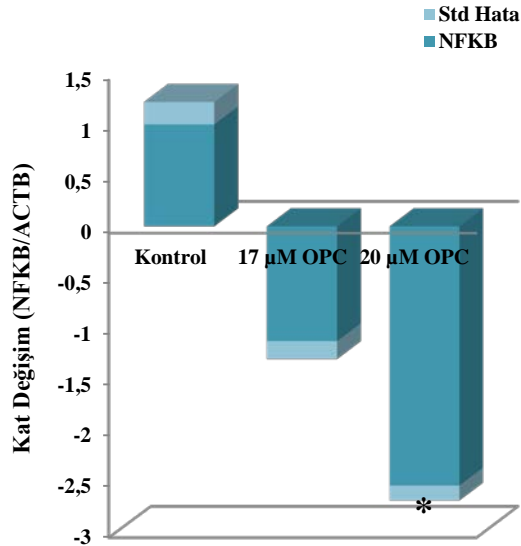
**Şekil 150.** OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.



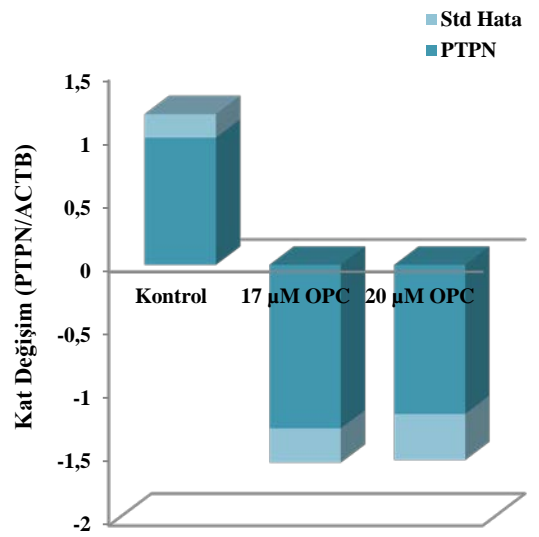
**Şekil 151.** OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.



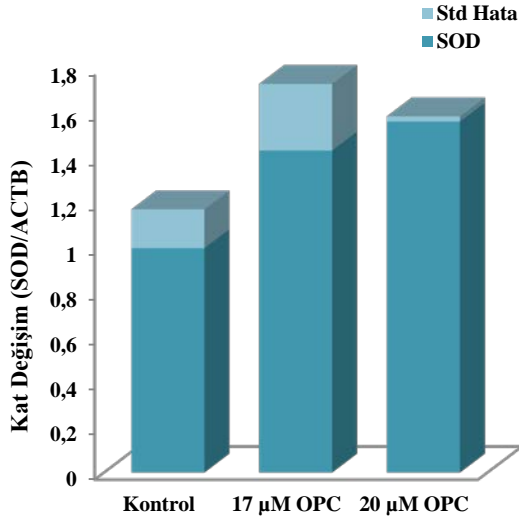
**Şekil 153.** OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.



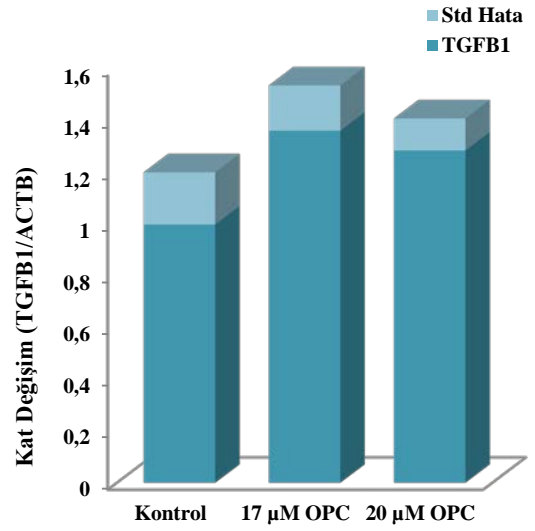
**Şekil 152.** OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.



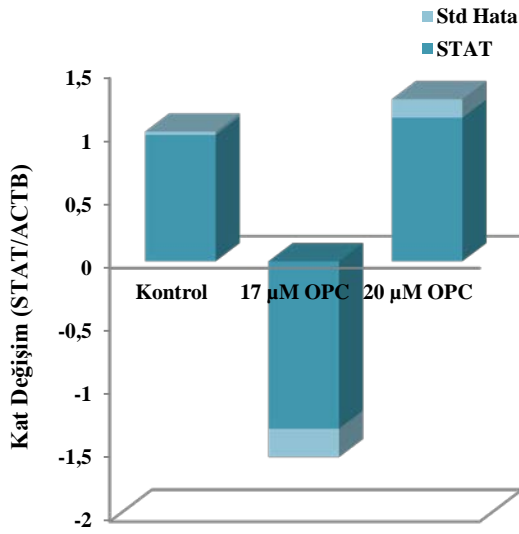
**Şekil 154.** OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.



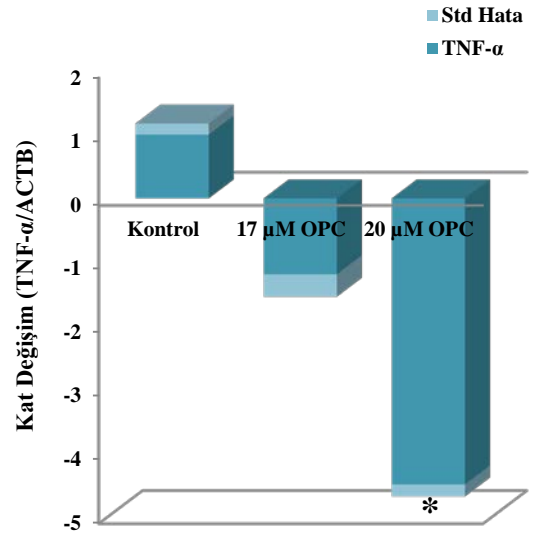
**Şekil 155.** OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 157.** OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 156.** OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.

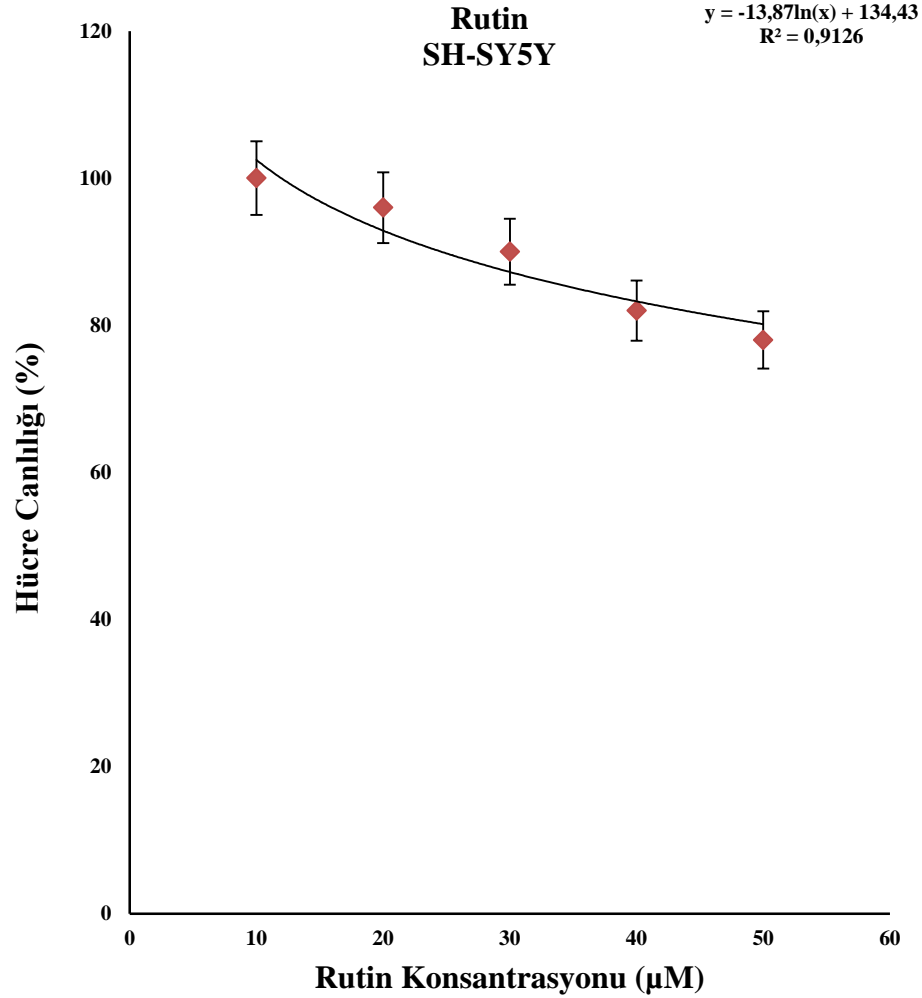


**Şekil 158.** OPC saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında TNF-α mRNA seviyesine olan etkisi.

### 3.3.1.8 SH-SY5Y Hücrelerinde Olean-12-en-28-ol, 3 $\beta$ pentakosanoat Saf Bileşiği ve Rutin Paralel Uygulaması Çalışmaları

#### 3.3.1.8.1 Rutin Sitotoksisite Çalışması

Sitotoksisite testi için değişik konsantrasyonda rutin %20 DMSO'da çözümlenerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya ( $1 \times 10^3$ /kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda rutin hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 159).



Şekil 159. Rutin'in SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.



Sitotoksisite testi sonunda  $y=ax+b$  denkleminde yola çıkarak yaklaşık EC05 ve EC10 değerleri hesaplandı. Bu dozlardan yola çıkarak OPC saf bileşiği ile birlikte paralel olarak 20 µM rutin hücrelere uygulanmasına karar verildi.

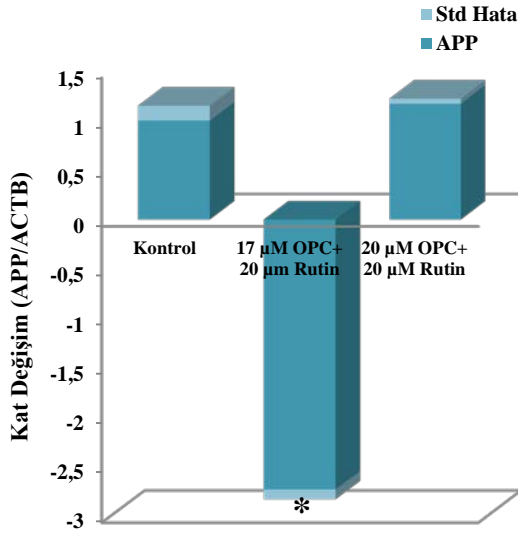
### **3.3.1.8.2 Olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat Saf Bileşiği ve Rutin Paralel Uygulamasının SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi**

Sitotoksisite çalışmasıyla kullanılacak olan rutin dozu belirlendikten sonra hücrelere bu belirlenen dozda rutin OPC saf bileşiği ile birlikte uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı.

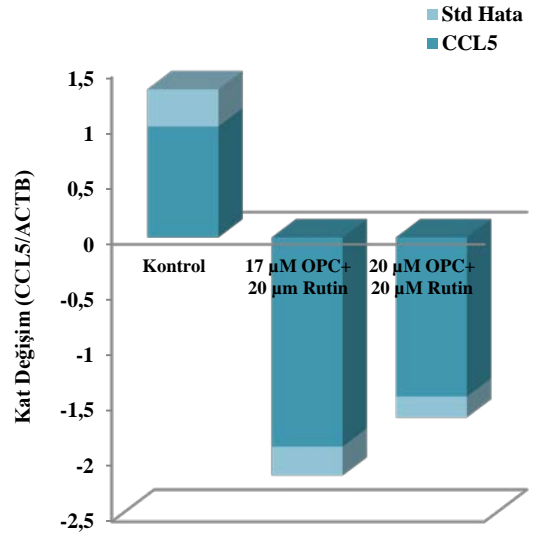
Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar ACTB ile normalize edilip; kontrol değerleri 1 alındı. (\*) ile işaretlenen gruplar  $P < .05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

Seçilen 20 adet genden SH-SY5Y hücrelerinde rutin-OPC saf bileşiği uygulanması sonucunda EC05 dozunda APP 2.7 kat; EC10 dozunda TNF- $\alpha$  2.7 kat ve her iki dozda da CXCL10 sırayla 5.2 ve 8.4 kat baskılanmıştır. EC05 ve EC10 dozlarında MAG 3.9 ve 4.2 ve PLP 2.7 ve 2.6 kat anlamlı olarak artmıştır. Diğer çalışılan genlerde ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

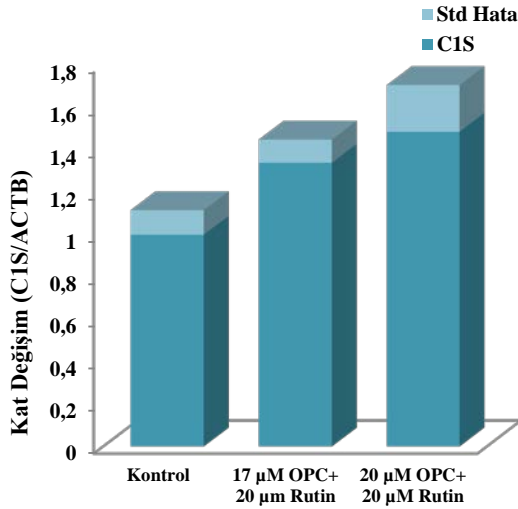
SH-SY5Y hücrelerinde rutin ve OPC saf bileşiğinin birlikte seçilen 20 tane gen üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 160-179'da verilmiştir.



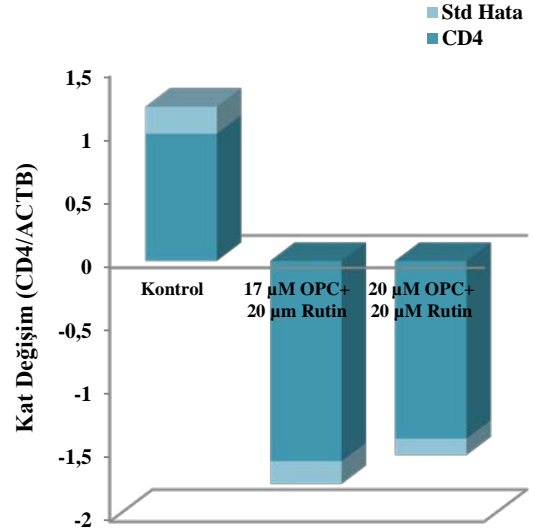
**Şekil 160.** OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.



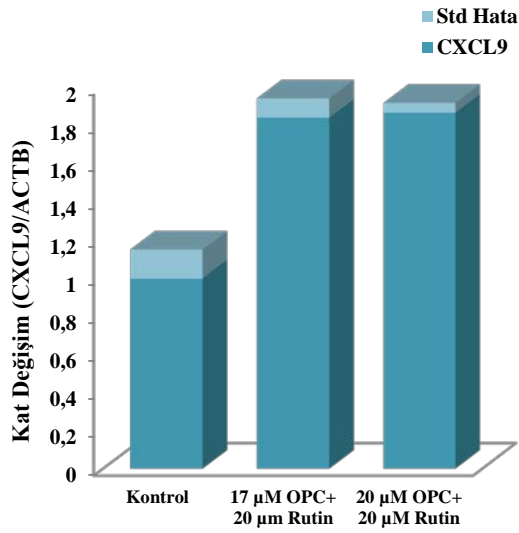
**Şekil 162.** OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.



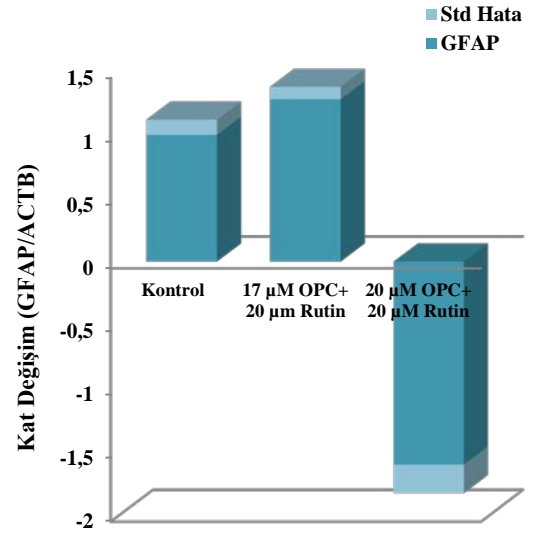
**Şekil 161.** OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.



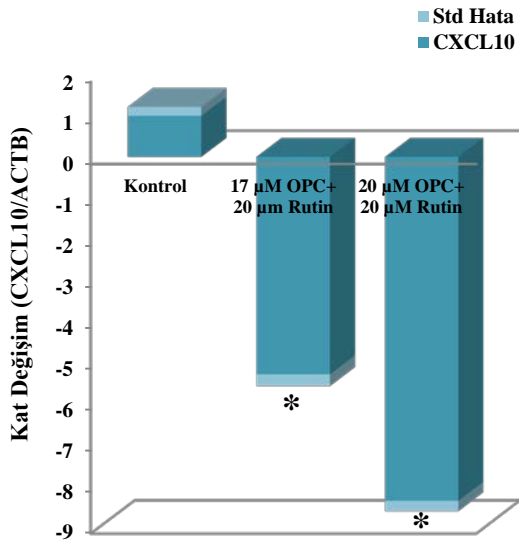
**Şekil 163.** OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.



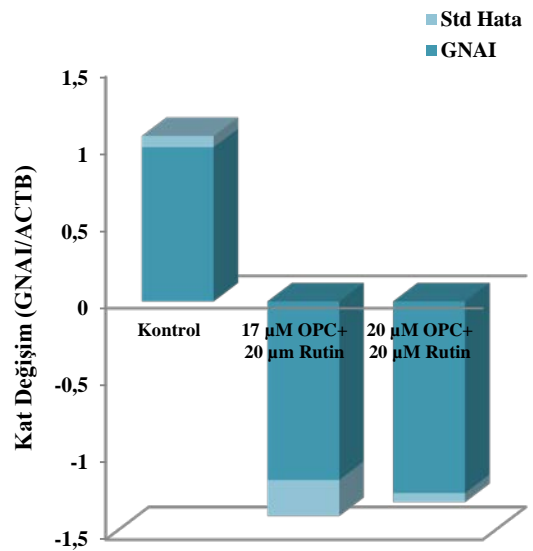
**Şekil 164.** OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.



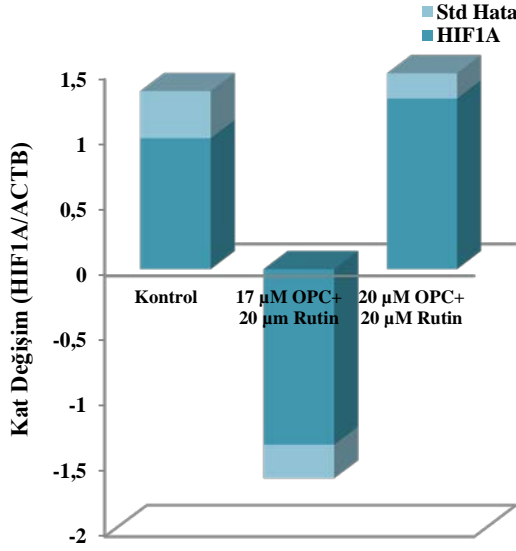
**Şekil 166.** OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.



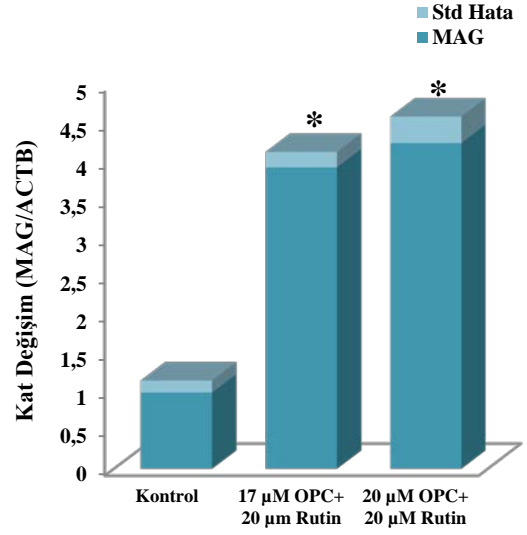
**Şekil 165.** OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.



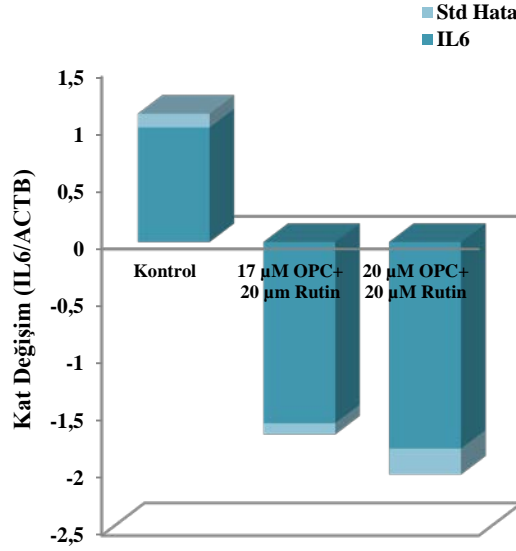
**Şekil 167.** OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.



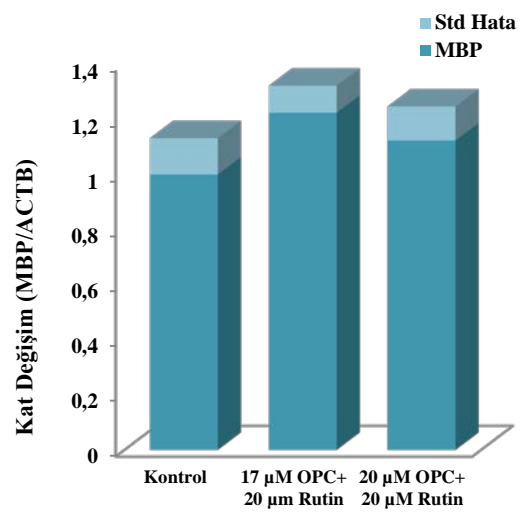
**Şekil 168.** OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.



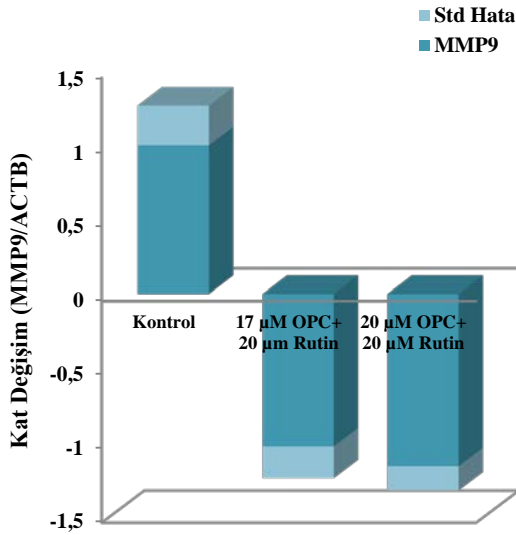
**Şekil 170.** OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.



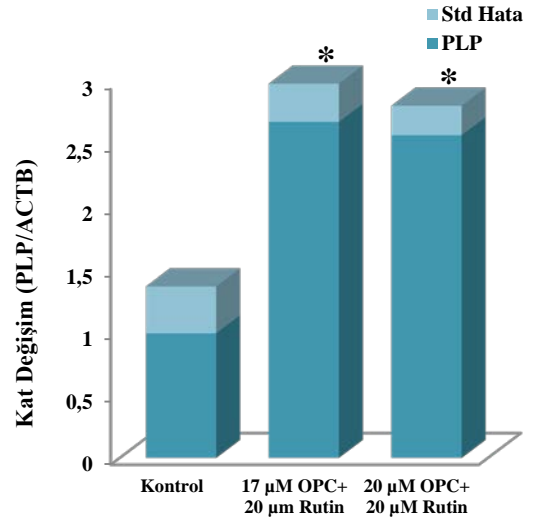
**Şekil 169.** OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.



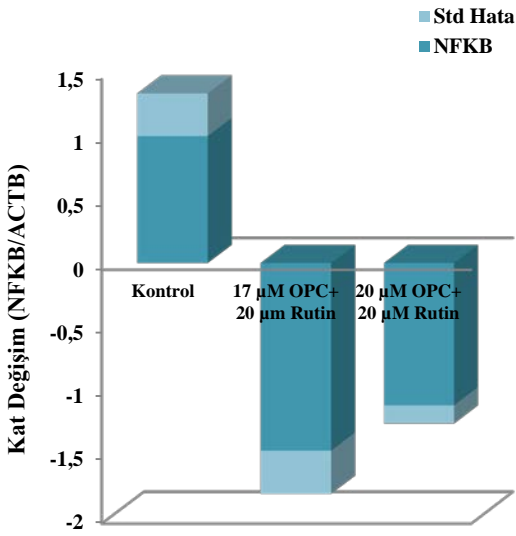
**Şekil 171.** OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.



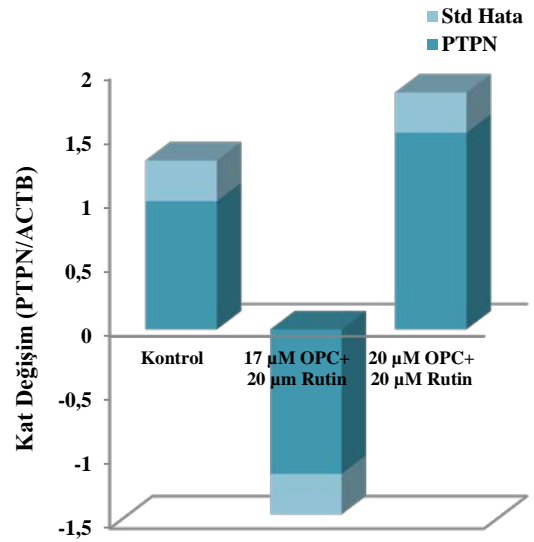
**Şekil 172.** OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.



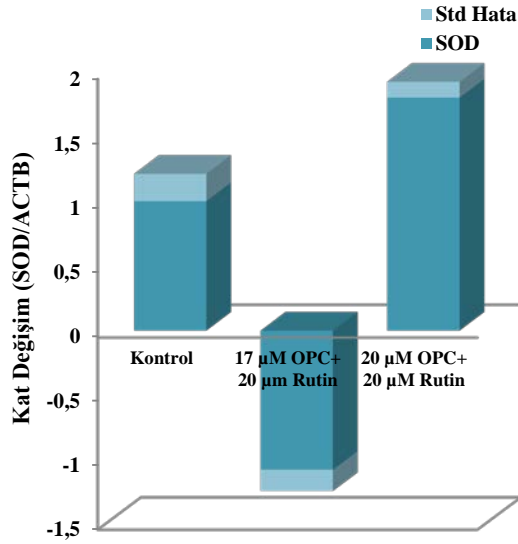
**Şekil 174.** OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.



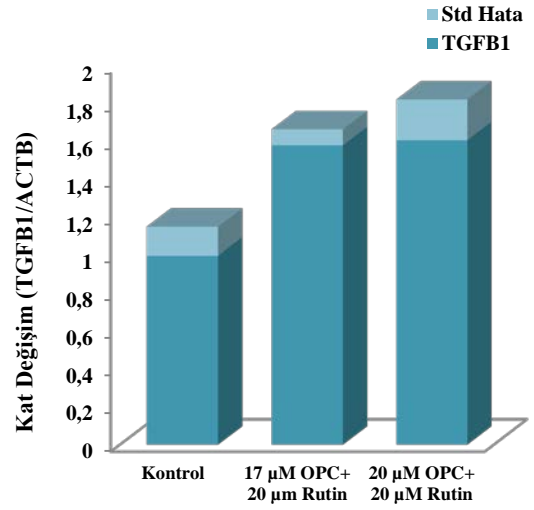
**Şekil 173.** OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.



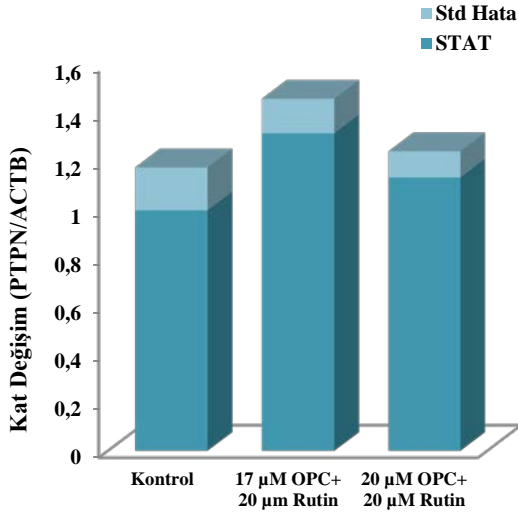
**Şekil 175.** OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.



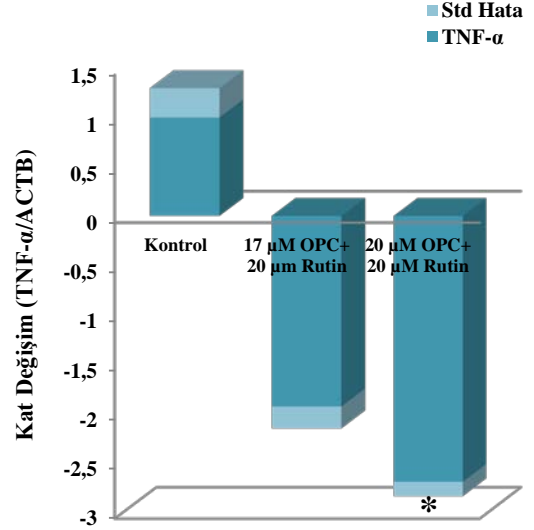
**Şekil 176.** OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 178.** OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 177.** OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.

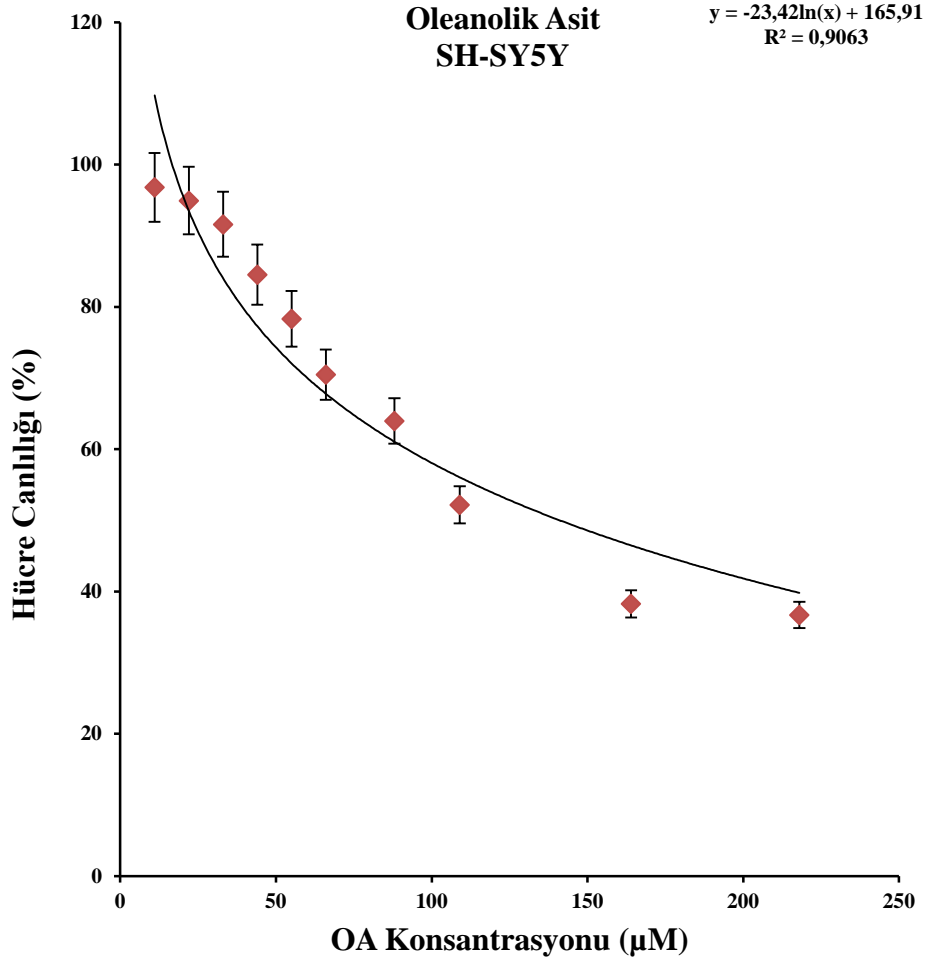


**Şekil 179.** OPC saf bileşiği ve Rutin paralel uygulamasının SH-SY5Y hücre hattında TNF-α mRNA seviyesine olan etkisi.

### 3.3.1.9 SH-SY5Y Hücrelerinde Oleanolik Asit Saf Bileşiği Çalışmaları

#### 3.3.1.9.1 Oleanolik Asit Saf Bileşiği Sitotoksisite Çalışması

Sitotoksisite testi için değişik konsantrasyonda Oleanolik asit (OA) saf bileşiği %20 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya ( $1 \times 10^3$ /kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda OA'in hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 180).



Şekil 180. OA saf bileşiğinin hücre canlılığına etkisi.

Sitotoksosite testi sonunda  $y=ax+b$  denkleminde yola çıkarak yaklaşık EC05 ve EC10 değerleri hesaplandı. Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 20 µM ve 26 µM OA saf bileşiği konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi.

### **3.3.1.9.2 Oleanolik Asit Saf Bileşiğinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi**

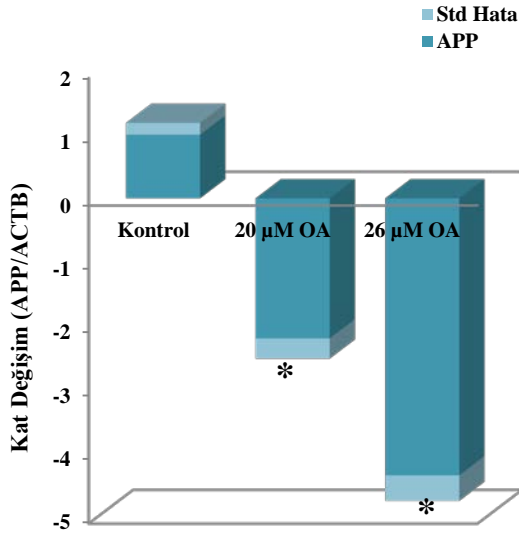
Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücrelere bu belirlenen dozlarda OA uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı.

Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar ACTB ile normalize edilip; kontrol değerleri 1 alındı. (\*) ile işaretlenen gruplar  $P < .05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

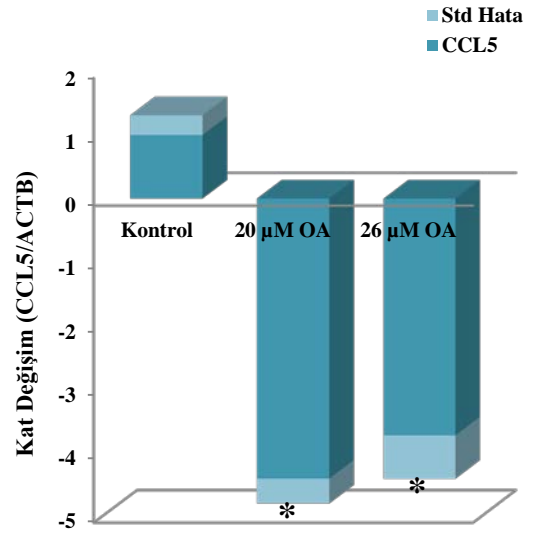
Seçilen 20 adet genden SH-SY5Y hücrelerinde OA saf bileşiği uygulanması sonucunda EC05 ve EC10 dozlarında sırayla APP 2.2 ve 4.4 kat, C1S 3.2 ve 2.7 kat, CCL5 4.4 ve 3.7 kat, CXCL9 13.4 ve 19.3 kat, CXCL10 6.1 ve 8.1 kat, GFAP 6.4 ve 5 kat, HIF1A 2.7 ve 6.1 kat, MMP9 24 ve 48.5 kat, NFkB 2.6 ve 4.5 kat, PTPN 3.4 ve 4.1 kat, TNF 15.4 ve 18.6 kat; EC10 dozunda GNAI 2.5 kat, IL6 2.2 kat baskılanan genlerdir. SOD geni ise EC05 dozunda ekspresyonu 2.7 kat artan tek genidir. OA çalışılan genlerin büyük bir çoğunluğunun ekspresyon düzeyini ciddi anlamda baskılamıştır.

SH-SY5Y hücrelerinde OA saf bileşiğinin seçilen 20 tane gen üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 181-200'de verilmiştir.

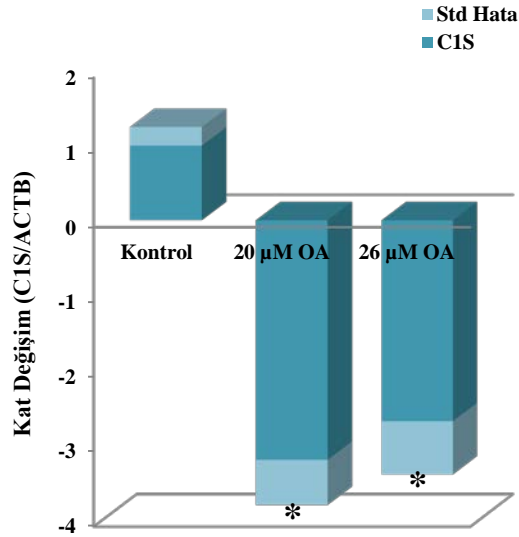




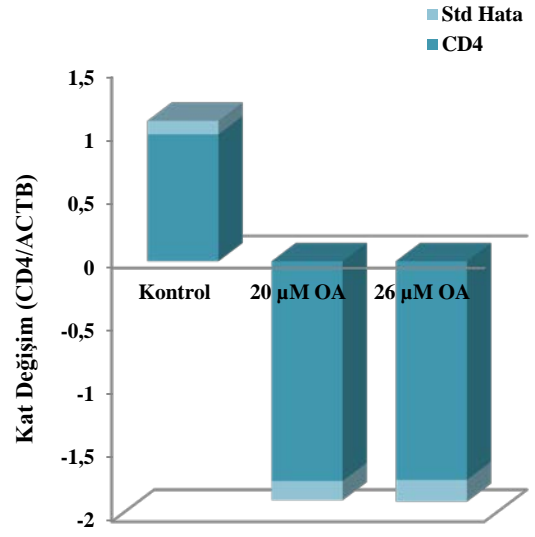
**Şekil 181.** OA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.



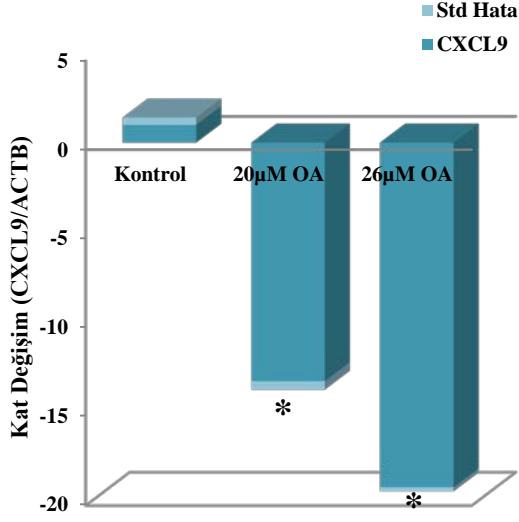
**Şekil 183.** OA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.



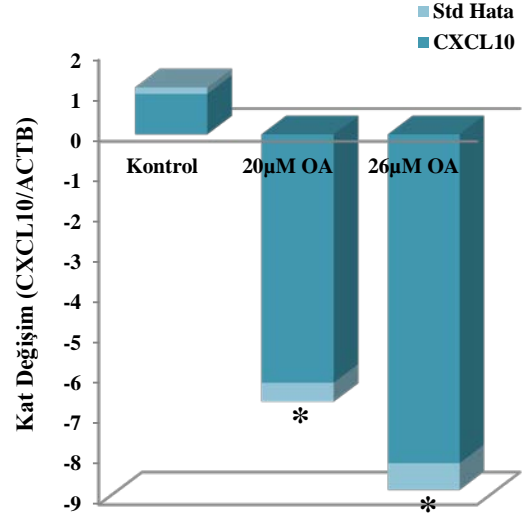
**Şekil 182.** OA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.



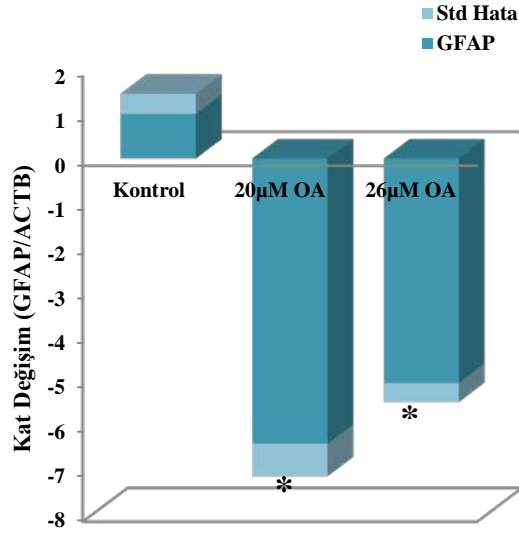
**Şekil 184.** OA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.



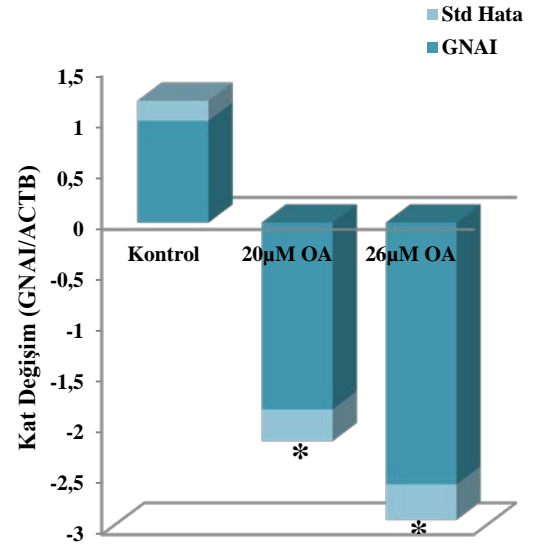
**Şekil 185.** OA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.



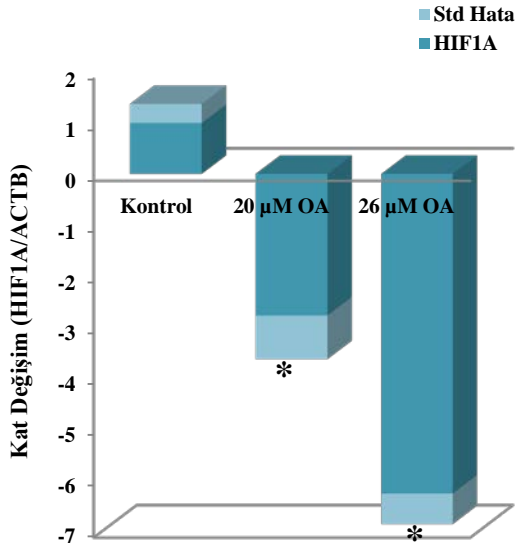
**Şekil 187.** OA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.



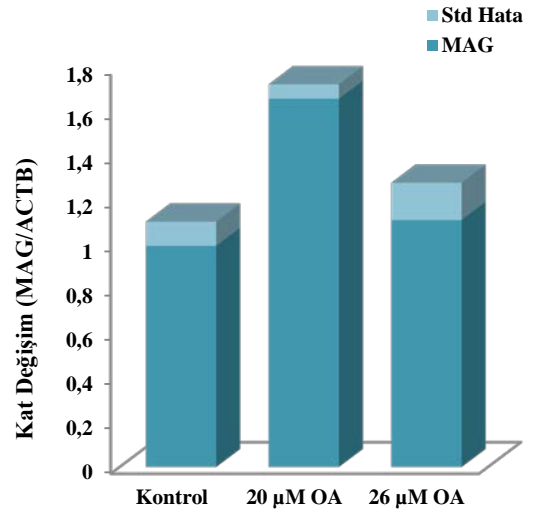
**Şekil 186.** OA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.



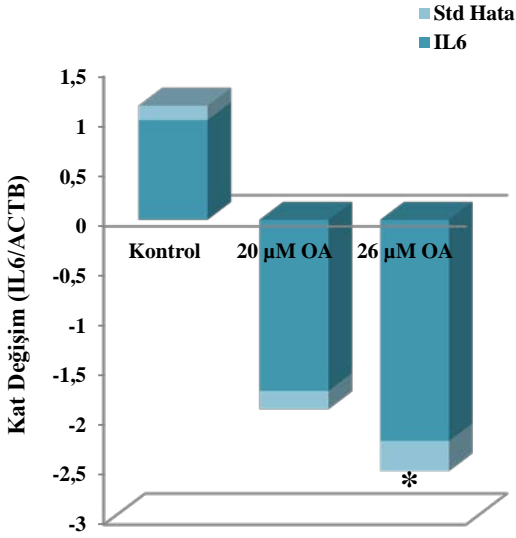
**Şekil 188.** OA saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.



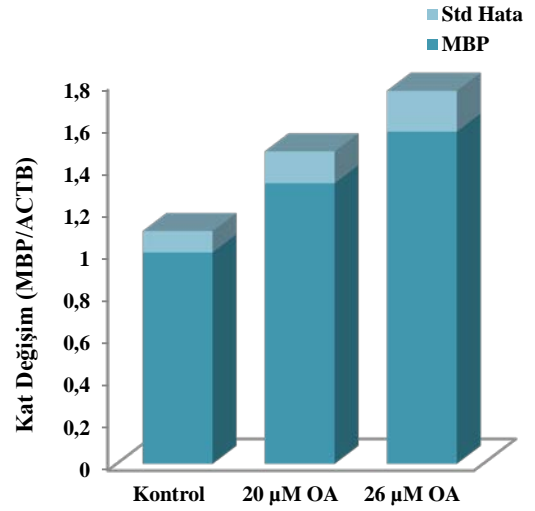
**Şekil 189.** OA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.



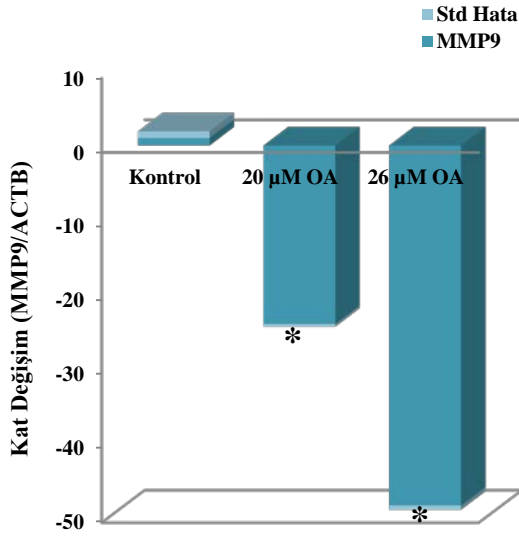
**Şekil 191.** OA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.



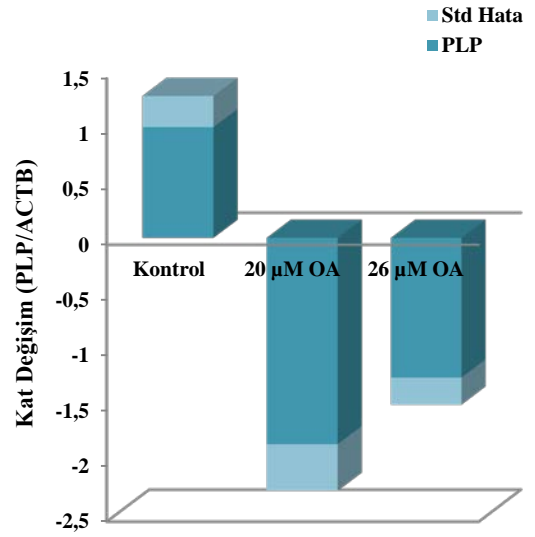
**Şekil 190.** OA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.



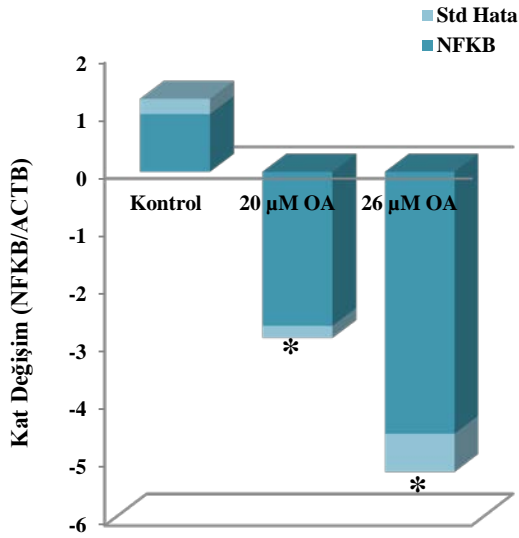
**Şekil 192.** OA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.



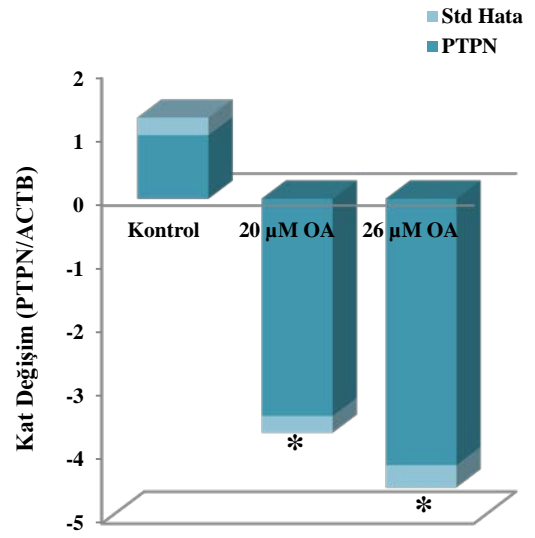
**Şekil 193.** OA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.



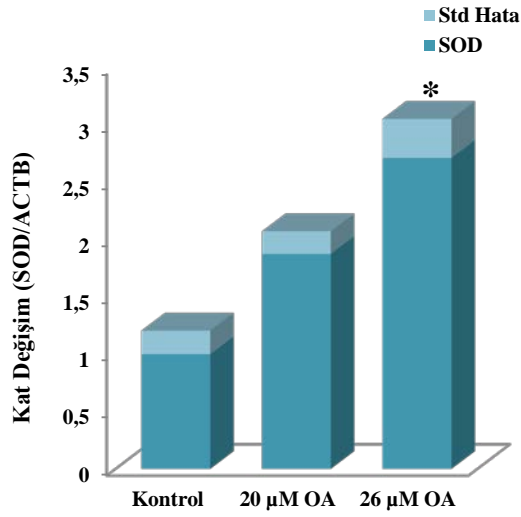
**Şekil 195.** OA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.



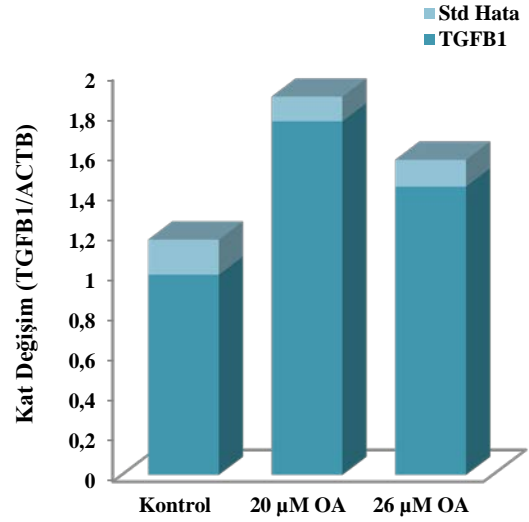
**Şekil 194.** OA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.



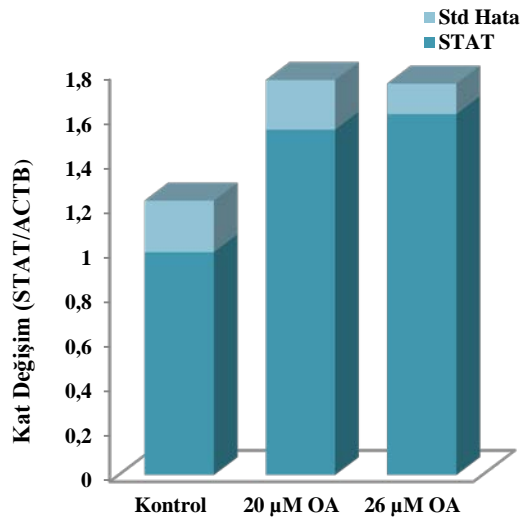
**Şekil 196.** OA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.



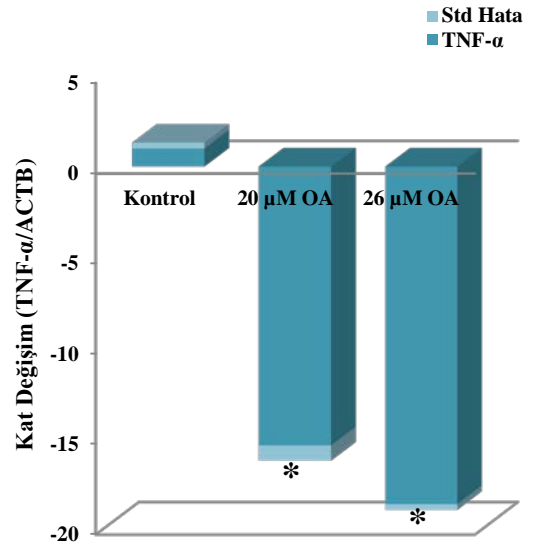
**Şekil 197.** OA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 199.** OA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 198.** OA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.

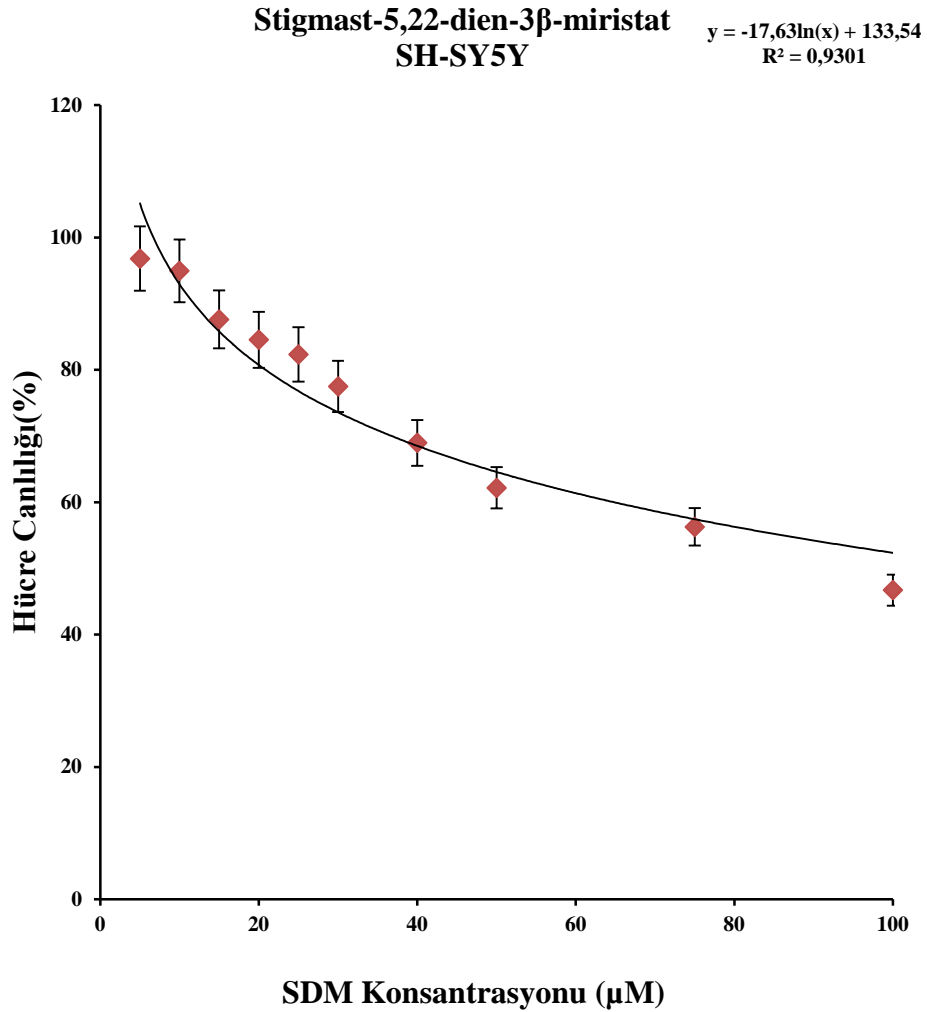


**Şekil 200.** OA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında TNF-α mRNA seviyesine olan etkisi.

### 3.3.1.10 SH-SY5Y Hücrelerinde Stigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -miristat Saf Bileşiği Çalışmaları

#### 3.3.1.10.1 Stigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -miristat Saf Bileşiği Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda Stigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -miristat (SDM) saf bileşiği %20 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya ( $1 \times 10^3$ /kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda SDM'in hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 201).



Şekil 201. SDM saf bileşiğinin hücre canlılığına etkisi.

Sitotoksosite testi sonunda  $y=ax+b$  denkleminde yola çıkarak yaklaşık EC05 ve EC10 değerleri hesaplandı. Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 8  $\mu$ M ve 12  $\mu$ M SDM konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi.

### **3.3.1.10.2 Stigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -miristat Saf Bileşiminin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi**

Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücrelere bu belirlenen dozlarda SDM saf bileşiği uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı.

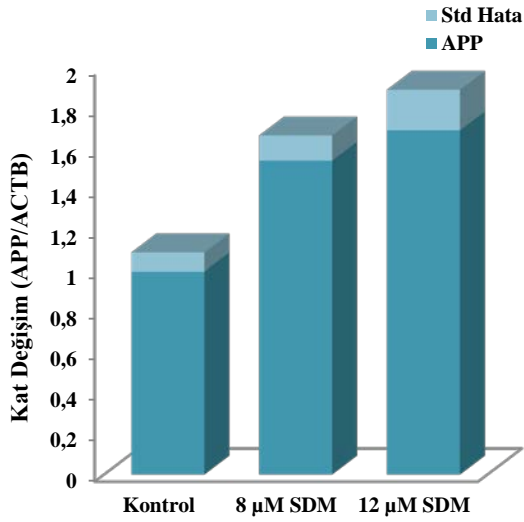
Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar ACTB ile normalize edilip; kontrol değerleri 1 alındı. (\*) ile işaretlenen gruplar  $P < .05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

Seçilen 20 adet genden SH-SY5Y hücrelerinde SDM saf bileşiği uygulanması sonucunda EC05 ve EC10 dozunda PLP 2 ve 2.2 kat, MAG 3 ve 2.9 kat, MBP 2 ve 2.8 kat; EC10 dozunda SOD 2.1 kat anlamlı olarak artan genlerdir.

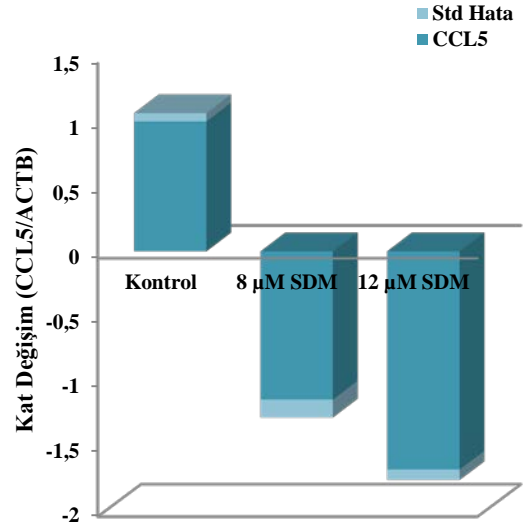
EC05 ve EC10 dozunda PTPN 2.6 ve 2.4 kat; EC10 dozunda CXCL10 2.5 kat, GFAP 2.2 kat, HIF1A 2 kat ve MMP9 2.8 kat anlamlı olarak baskılanan genlerdir.

SDM miyelin ilişkili genler olarak grupladığımız tüm genlerin ekspresyonunu arttırarak miyelin oluşumunu destekleyici etki göstermektedir. Bunun yanında bazı enflamatuvar genlerin ekspresyonunu baskıladığı için de anti-enflamatuvar etkisinin olduğundan bahsedilebilir.

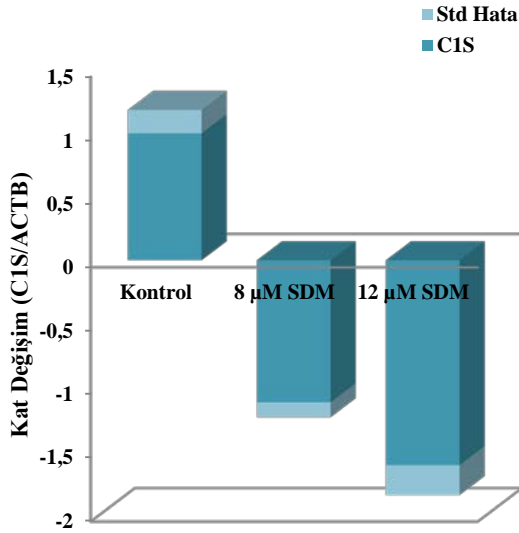
SH-SY5Y hücrelerinde SDM saf bileşiminin seçilen 20 tane gen üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 202-221'de verilmiştir.



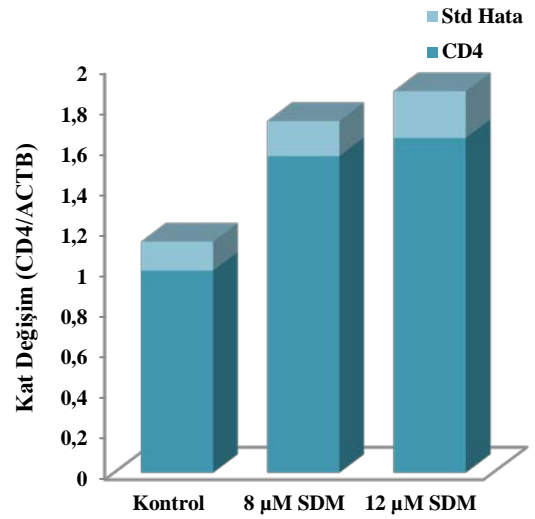
**Şekil 202.** SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 204.** SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.

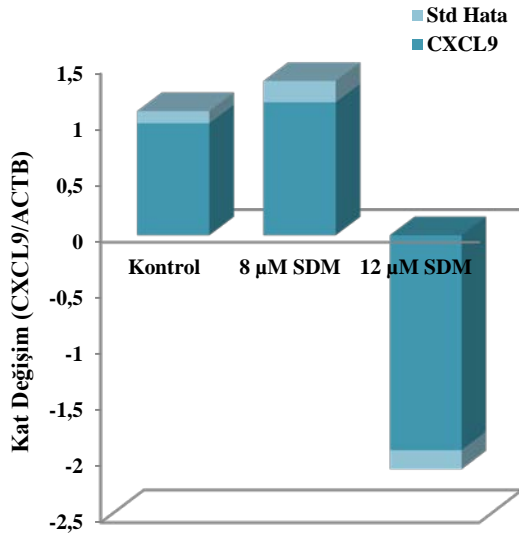


**Şekil 203.** SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.

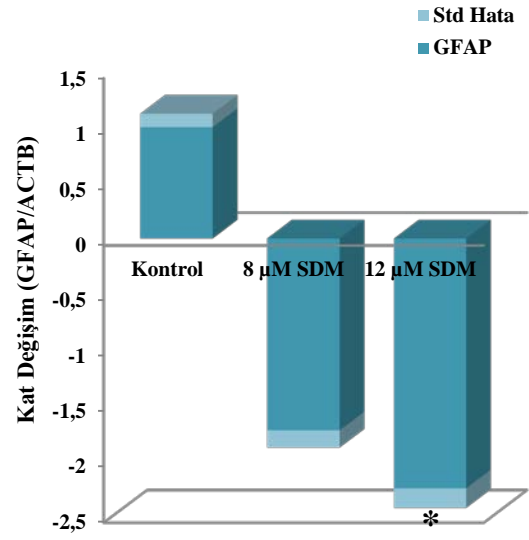


**Şekil 205.** SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.

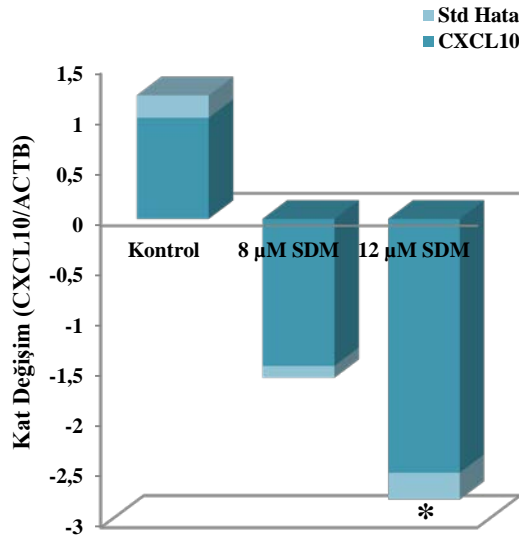




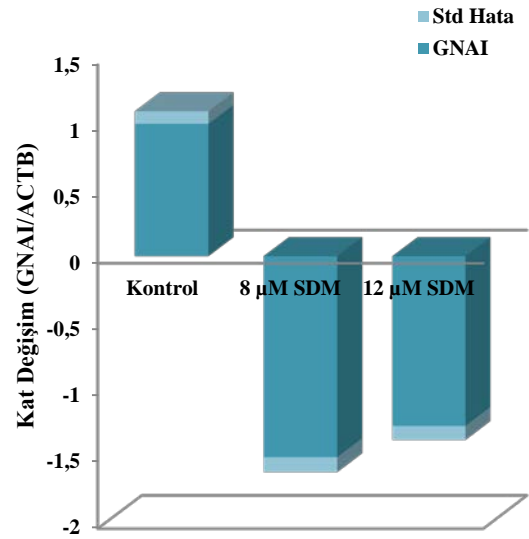
**Şekil 206.** SDM saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.



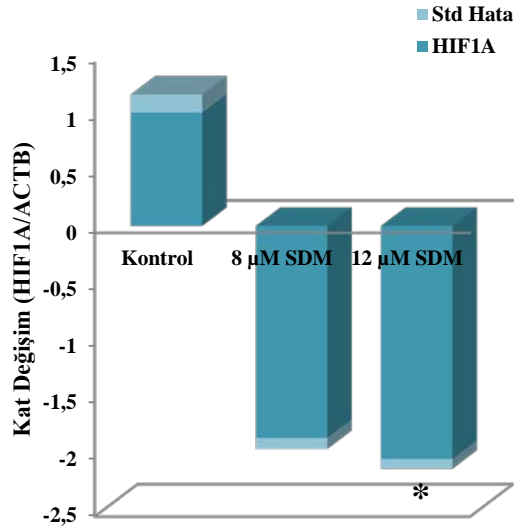
**Şekil 208.** SDM saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.



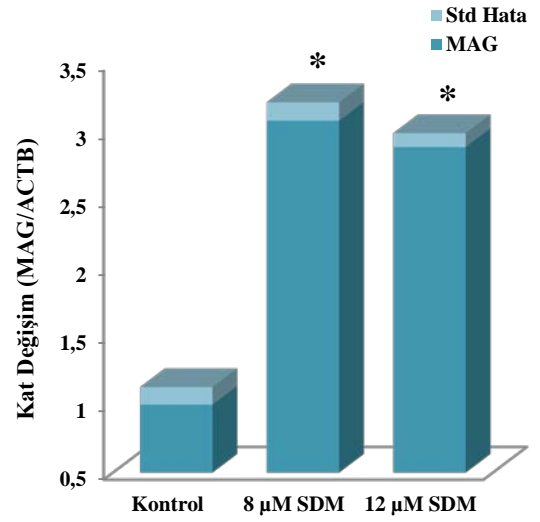
**Şekil 207.** SDM saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.



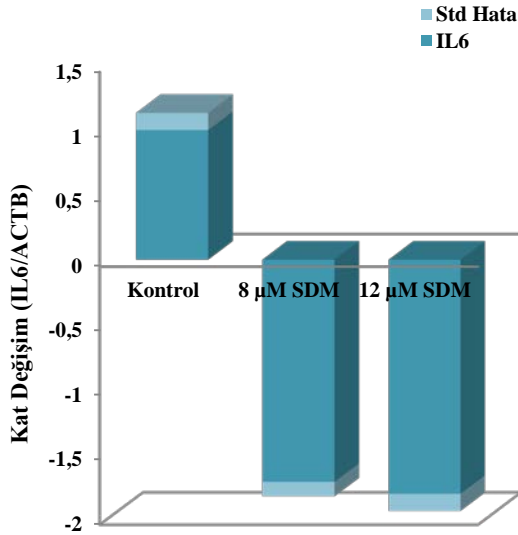
**Şekil 209.** SDM saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.



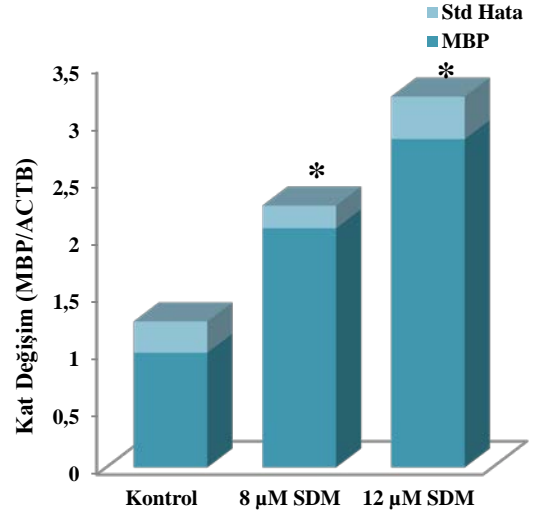
**Şekil 210.** SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.



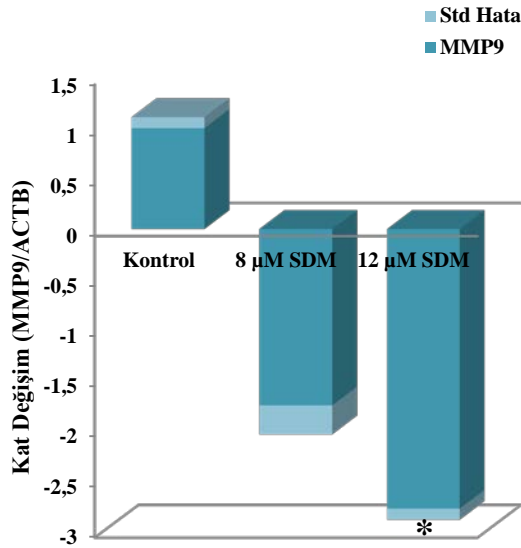
**Şekil 212.** SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.



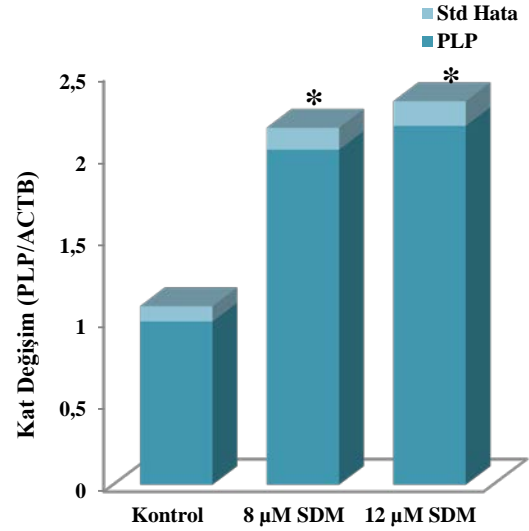
**Şekil 211.** SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.



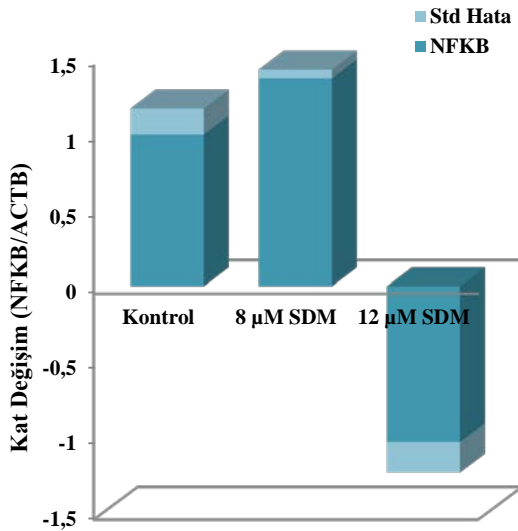
**Şekil 213.** SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.



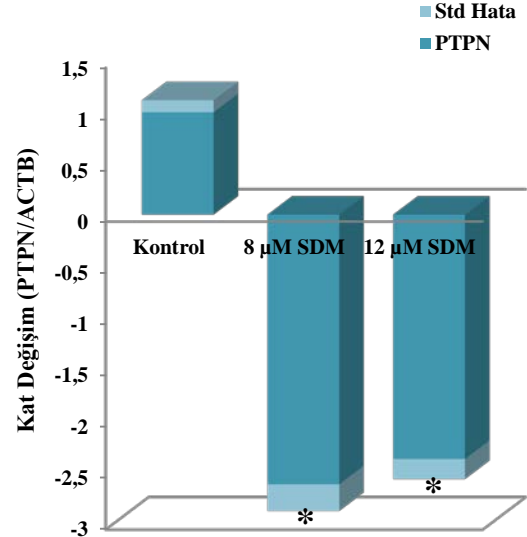
**Şekil 214.** SDM saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.



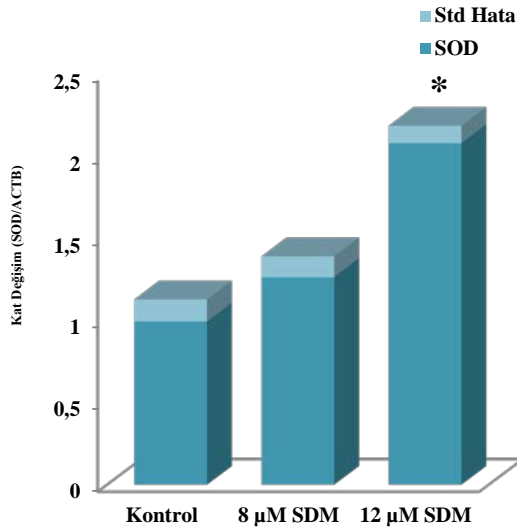
**Şekil 216.** SDM saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.



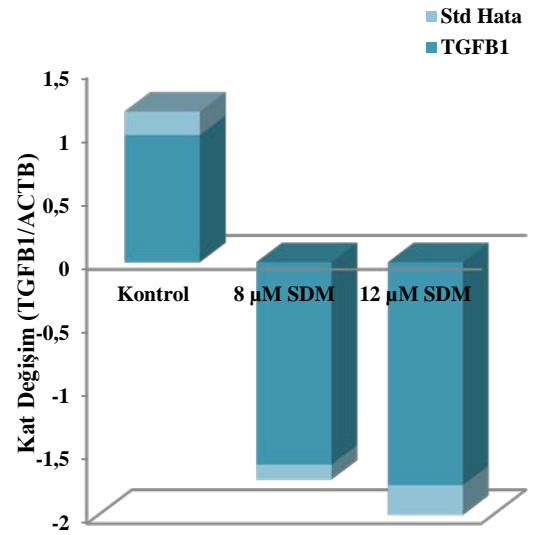
**Şekil 215.** SDM saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.



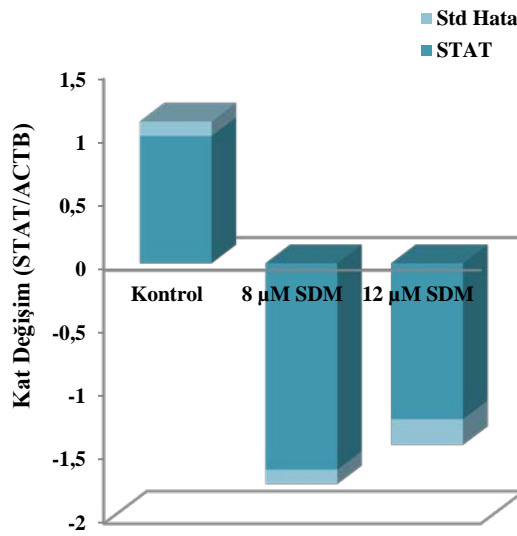
**Şekil 217.** SDM saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.



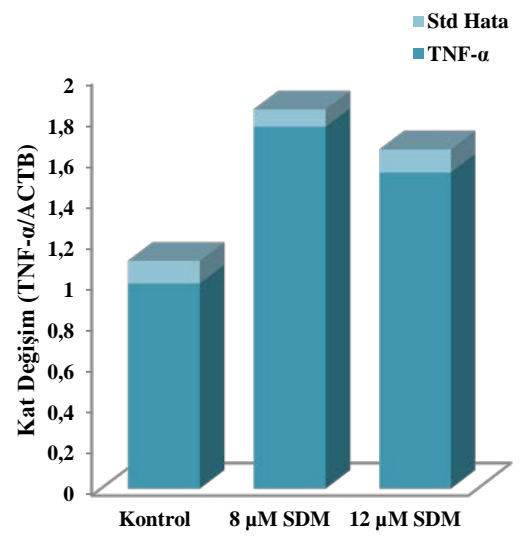
**Şekil 218.** SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 220.** SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 219.** SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.

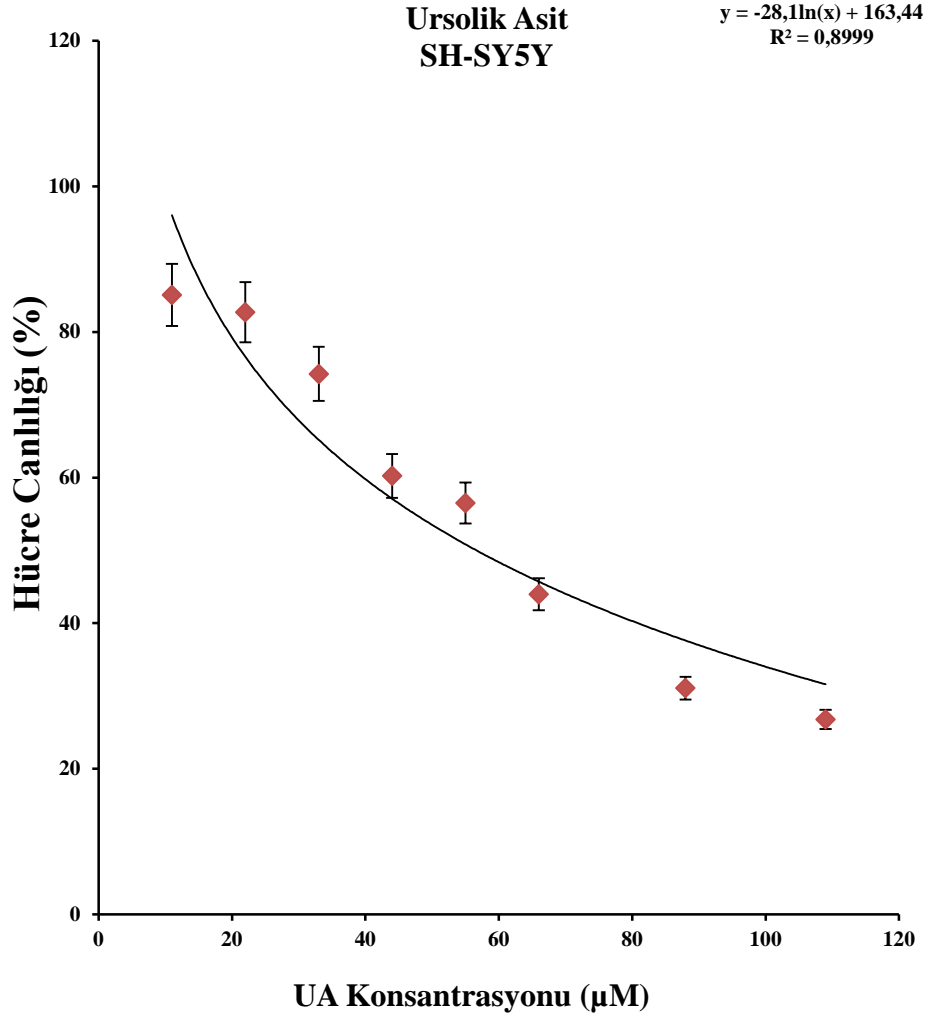


**Şekil 221.** SDM saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında TNF-α mRNA seviyesine olan etkisi.

### 3.3.1.11 SH-SY5Y Hücrelerinde Ursolik Asit Saf Bileşiği Çalışmaları

#### 3.3.1.11.1 Ursolik Asit Saf Bileşiği Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda Ursolik asit (UA) saf bileşiği %20 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya ( $1 \times 10^3$ /kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda UA'in hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 222).



Şekil 222. UA saf bileşiğinin hücre canlılığına etkisi.

Sitotoksosite testi sonunda  $y=ax+b$  denkleminde yola çıkarak yaklaşık EC05 ve EC10 değerleri hesaplandı. Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 11  $\mu$ M ve 14  $\mu$ M UA saf bileşiği konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi.

### **3.3.1.11.2 Ursolik Asit Saf Bileşiğinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi**

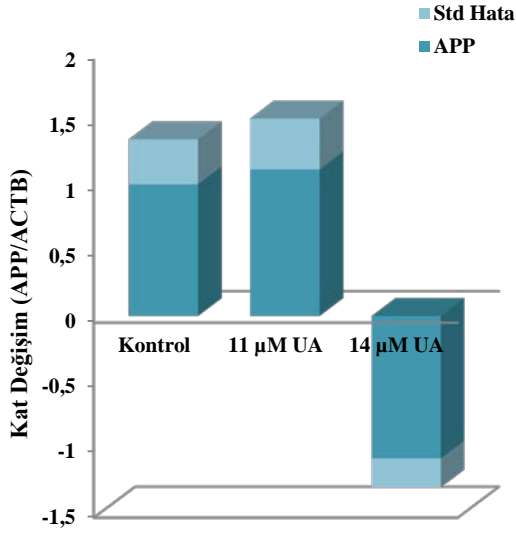
Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücrelere bu belirlenen dozlarda UA uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı.

Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar ACTB ile normalize edilip; kontrol değerleri 1 alındı. (\*) ile işaretlenen gruplar  $P < .05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

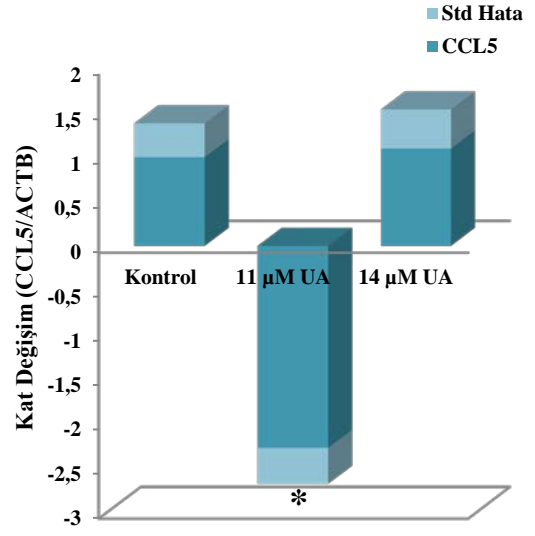
Seçilen 20 adet genden SH-SY5Y hücrelerinde UA saf bileşiği uygulanması sonucunda EC05 ve EC10 dozunda CXCL9 5.9 ve 2.6 kat, MMP9 4.9 ve 2.8 kat ve TNF- $\alpha$  3.3 ve 2.3 kat anlamlı olarak baskılanırken; EC05 dozunda C1S 3.9, CCL5 2.3 ve CXCL10 3.4 kat baskılanmaktadır. EC10 dozunda ise CD4 geni 2.6 kat baskılanmıştır.

GFAP 2.7 kat, PLP 2 kat ve PTPN 4 kat EC10 dozunda anlamlı olarak ekspresyonu artan genlerdir.

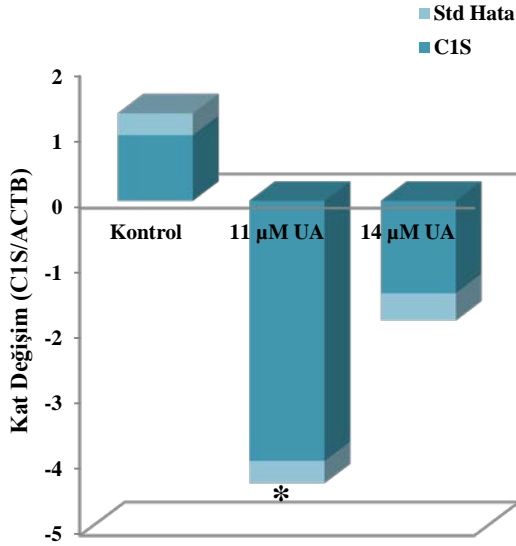
SH-SY5Y hücrelerinde UA saf bileşiğinin seçilen 20 tane gen üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 223-242'de verilmiştir.



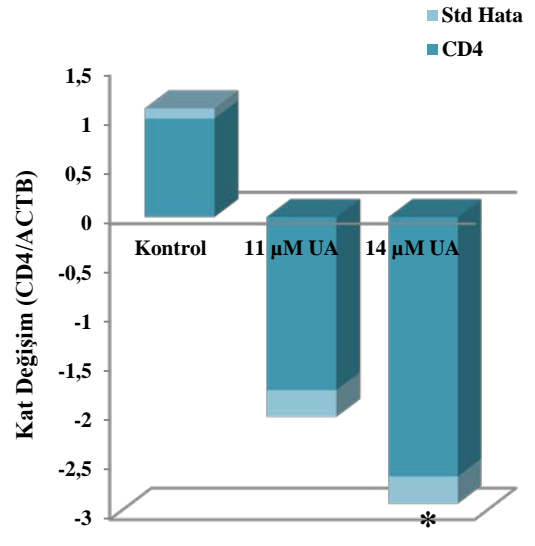
**Şekil 223.** UA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.



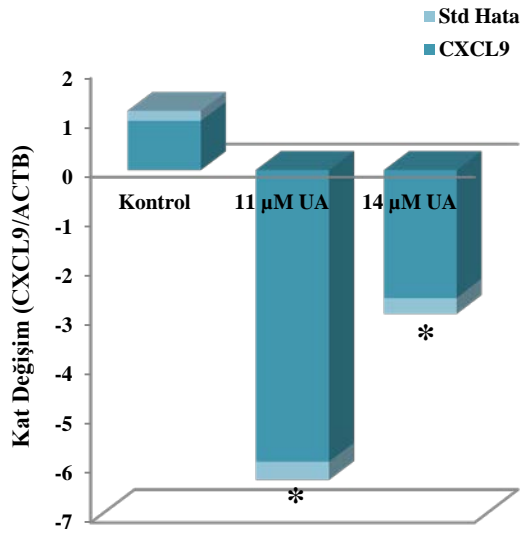
**Şekil 225.** UA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.



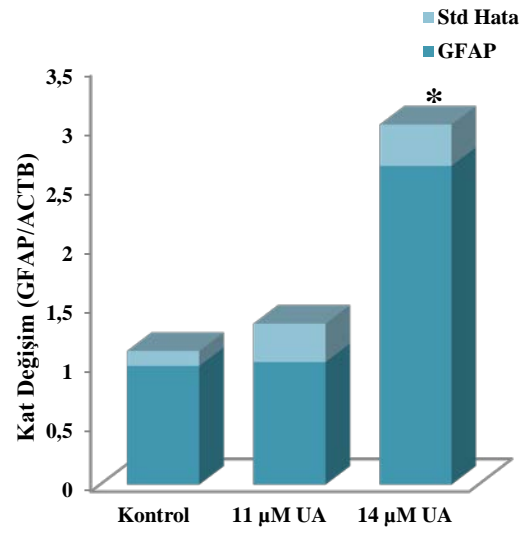
**Şekil 224.** UA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.



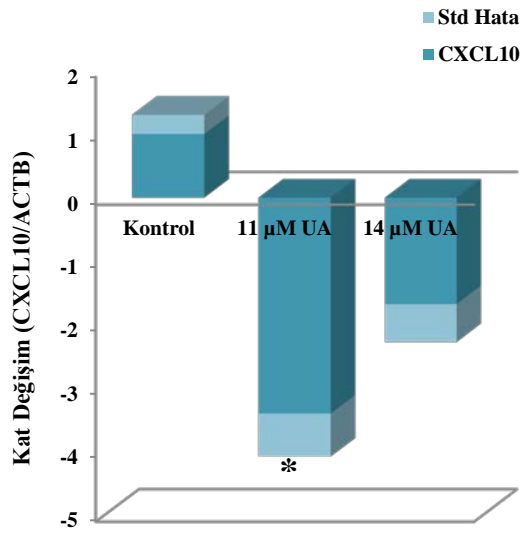
**Şekil 226.** UA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.



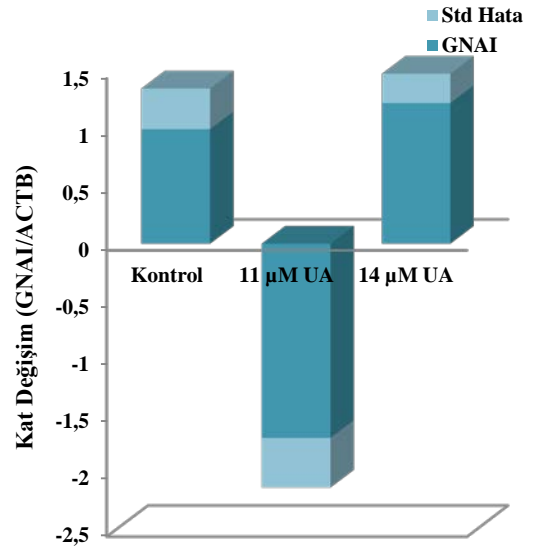
**Şekil 227.** UA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 229.** UA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.

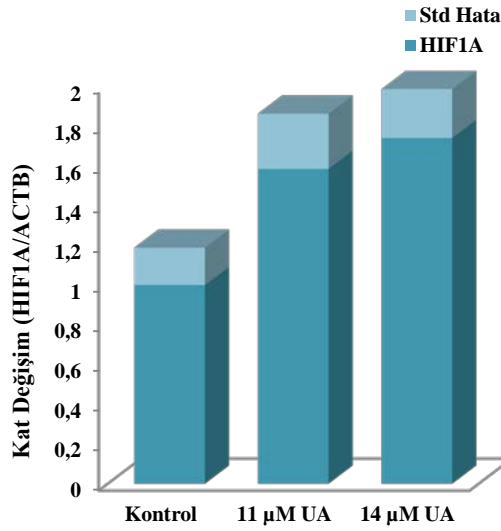


**Şekil 228.** UA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.

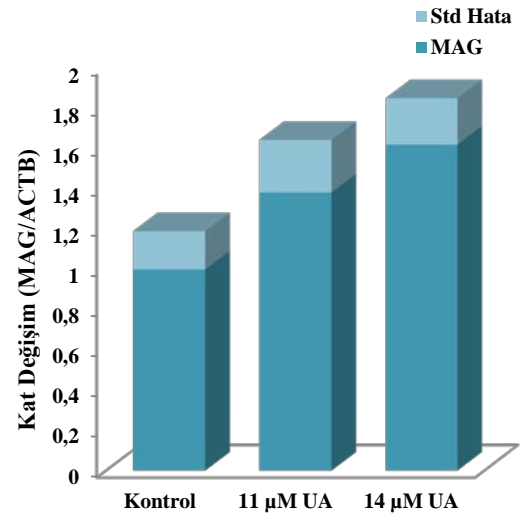


**Şekil 230.** UA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.

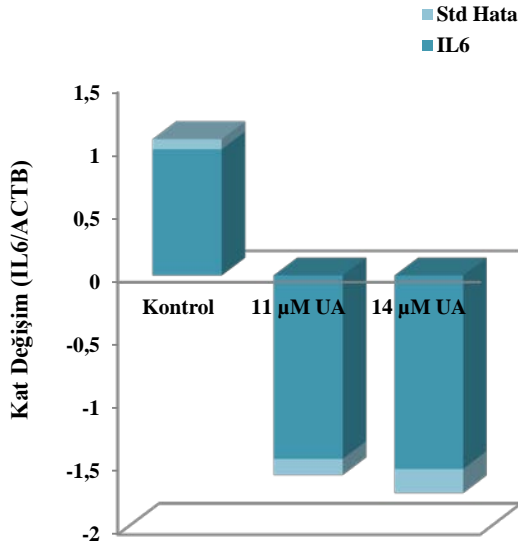




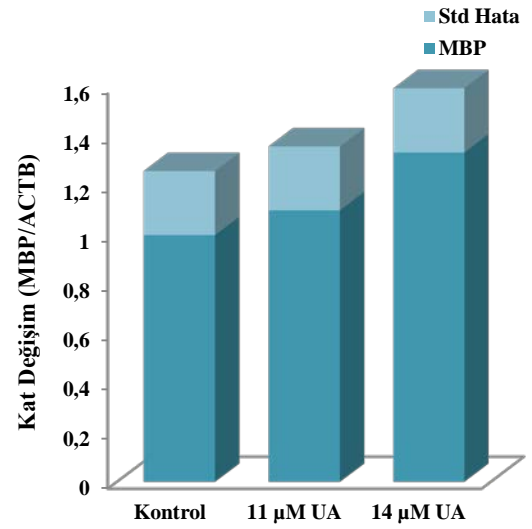
**Şekil 231.** UA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.



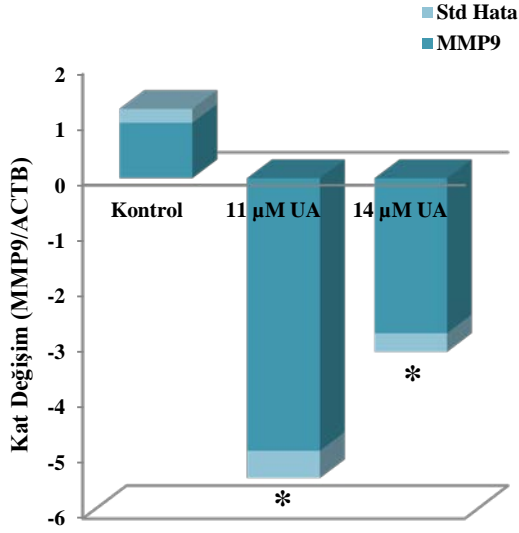
**Şekil 233.** UA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.



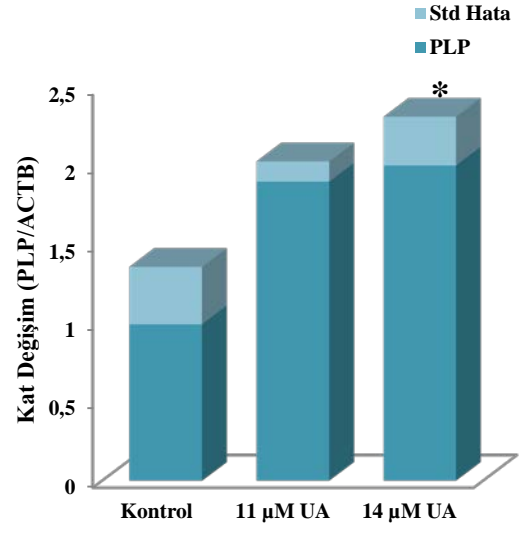
**Şekil 232.** UA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.



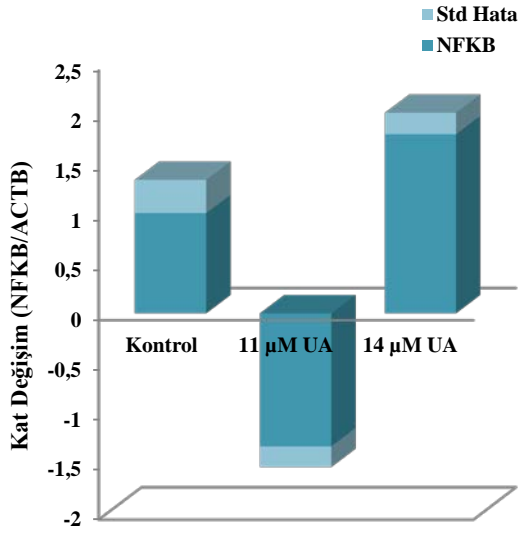
**Şekil 234.** UA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.



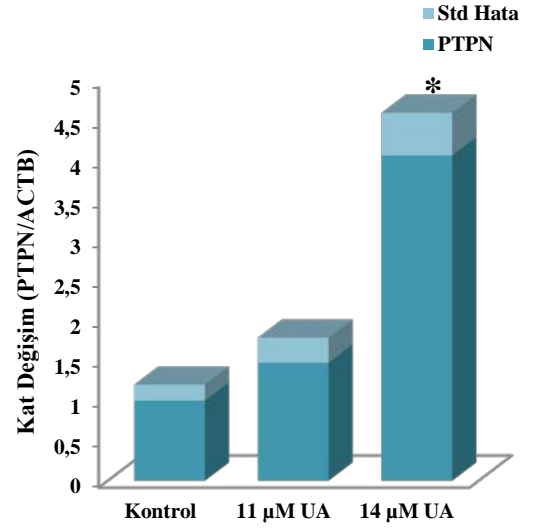
**Şekil 235.** UA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.



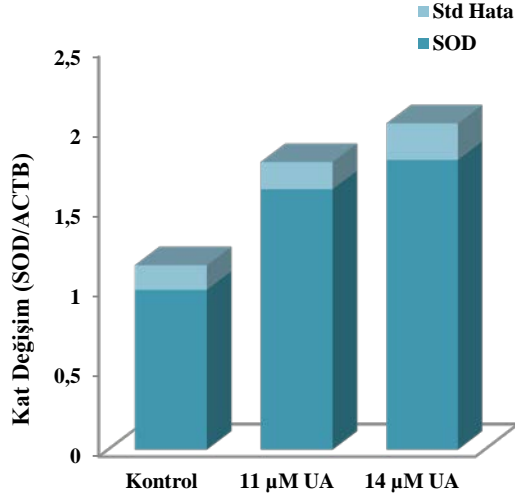
**Şekil 237.** UA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.



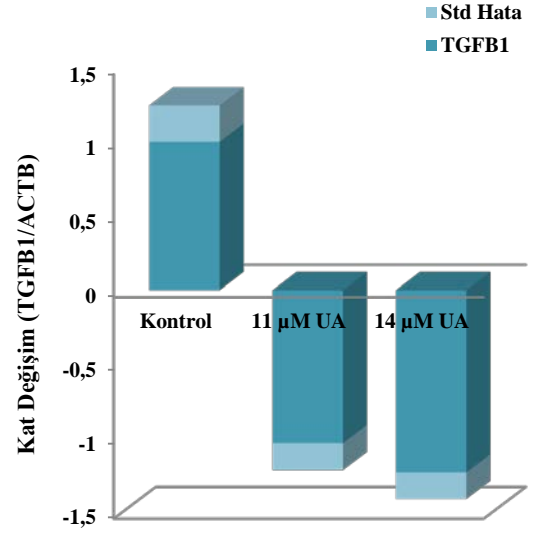
**Şekil 236.** UA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.



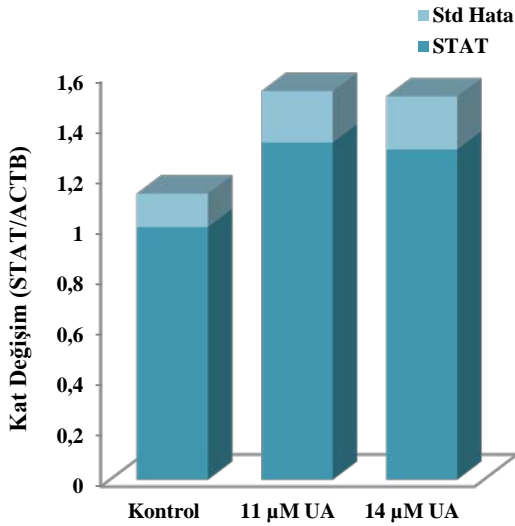
**Şekil 238.** UA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.



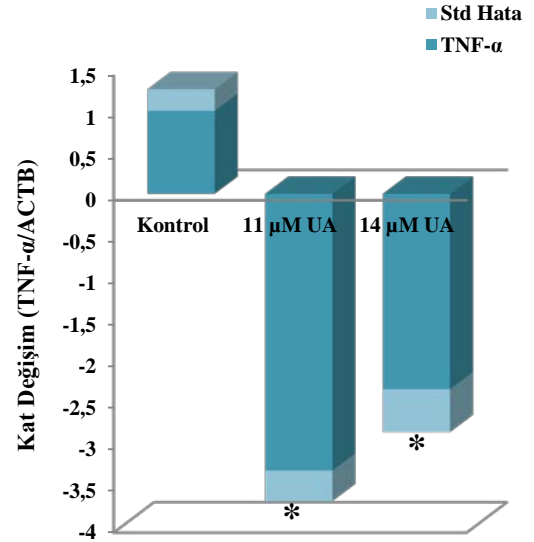
**Şekil 239.** UA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 241.** UA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 240.** UA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.

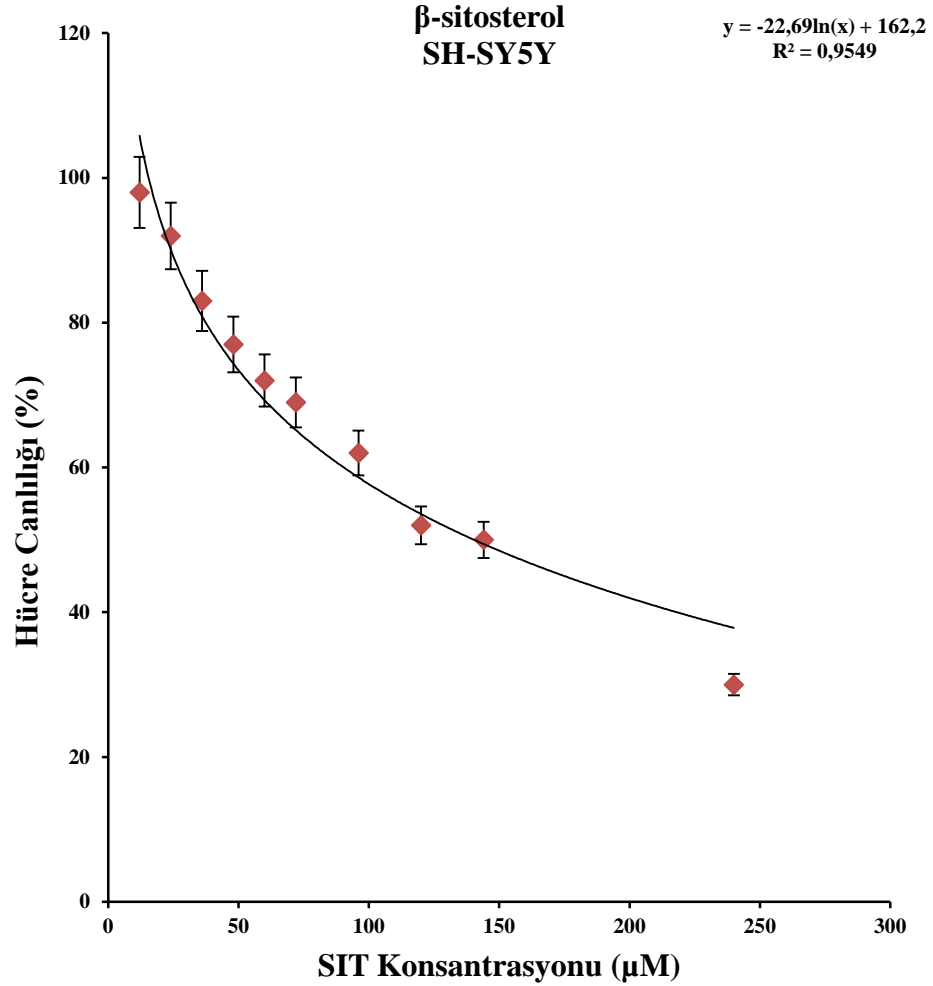


**Şekil 242.** UA saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında TNF-α mRNA seviyesine olan etkisi.

### 3.3.1.12 SH-SY5Y Hücrelerinde $\beta$ -Sitosterol Saf Bileşigi Çalışmaları

#### 3.3.1.12.1 $\beta$ -Sitosterol Saf Bileşigi Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda  $\beta$ -Sitosterol (SIT) saf bileşigi %20 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya ( $1 \times 10^3$ /kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda SIT'ün hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 243).



Şekil 243. SIT saf bileşiginin hücre canlılığına etkisi.

Sitotoksosite testi sonunda  $y=ax+b$  denkleminde yola çıkarak yaklaşık EC05 ve EC10 değerleri hesaplandı. Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 20  $\mu$ M ve 25  $\mu$ M SIT saf bileşiği konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi.

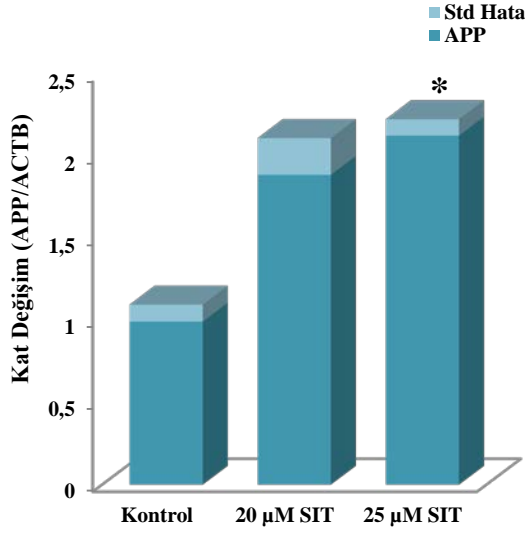
### **3.3.1.12.2 $\beta$ -Sitosterol Saf bileşiğinin SH-SY5Y Hücresinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi**

Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücelere bu belirlenen dozlarda SIT uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı.

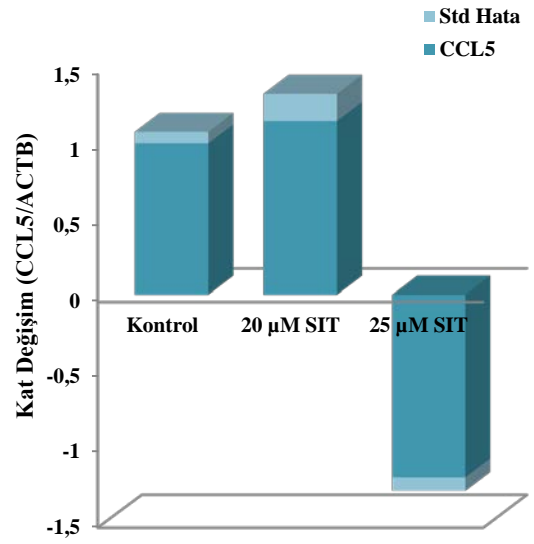
Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar ACTB ile normalize edilip; kontrol değerleri 1 alındı. (\*) ile işaretlenen gruplar  $P < .05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

Seçilen 20 adet genden SH-SY5Y hücelerinde SIT saf bileşiği uygulanması sonucunda GNAI EC05 ve EC10 dozunda 8 ve 6.1 kat anlamlı olarak artarken; TNF- $\alpha$  her iki dozda 2.2 ve 2 kat anlamlı olarak baskılanmaktadır. MMP9 sadece EC05 dozunda 2.5 kat anlamlı olarak baskılanmakta iken; APP EC10 dozunda 2.1 kat anlamlı olarak artmıştır.

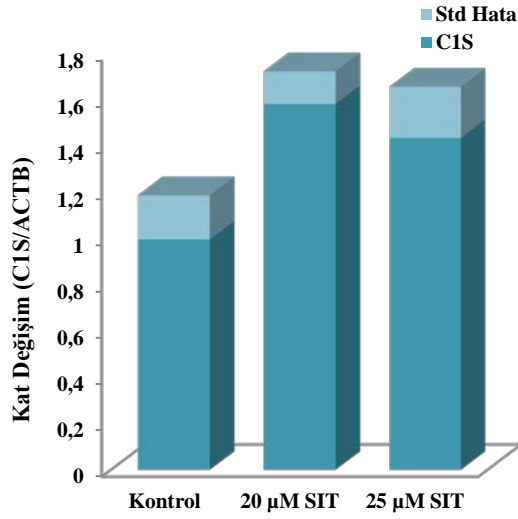
SH-SY5Y hücelerinde SIT saf bileşiğinin seçilen 20 tane gen üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 244-263'de verilmiştir.



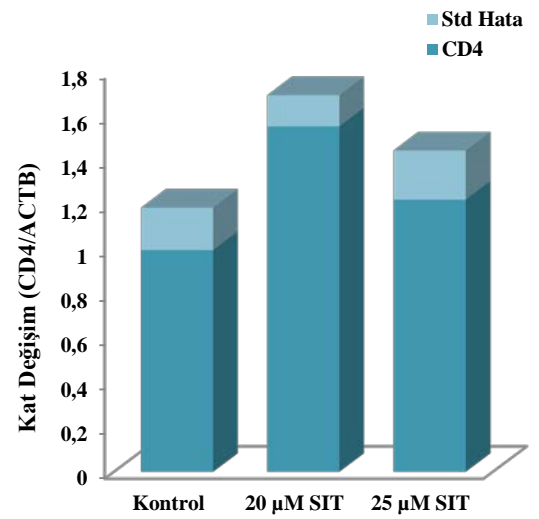
**Şekil 244.** SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında APP mRNA seviyesine olan etkisi.



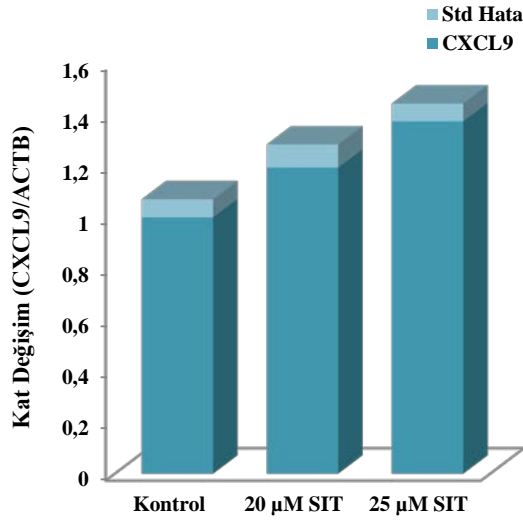
**Şekil 246.** SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.



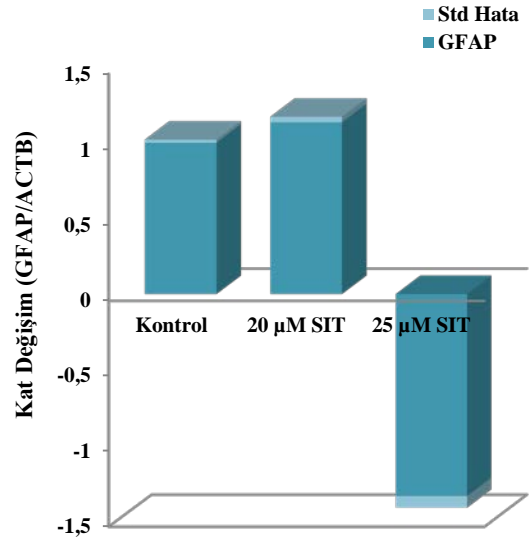
**Şekil 245.** SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.



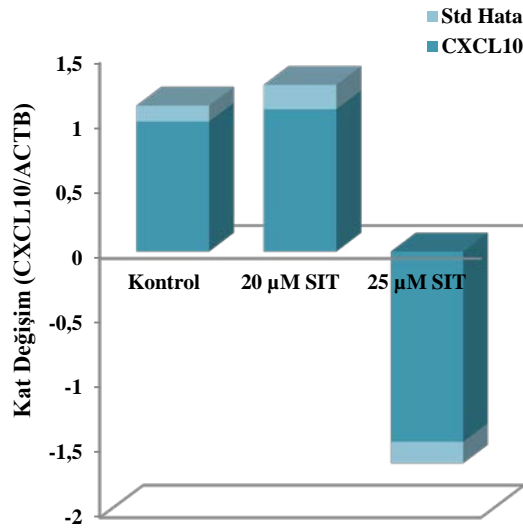
**Şekil 247.** SIT saf bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.



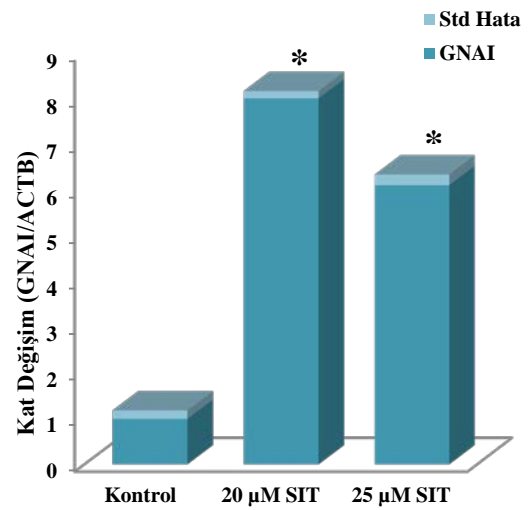
**Şekil 248.** SIT saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.



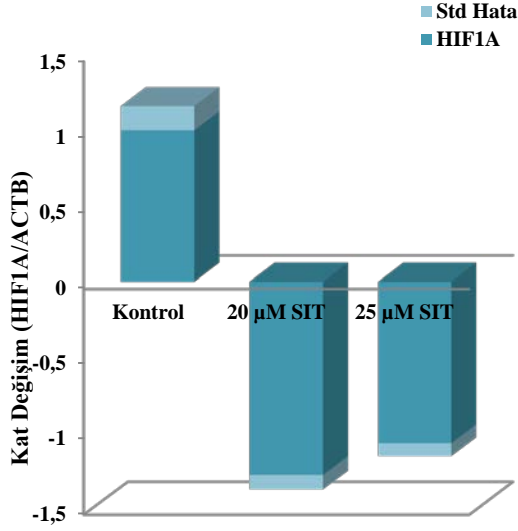
**Şekil 250.** SIT saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.



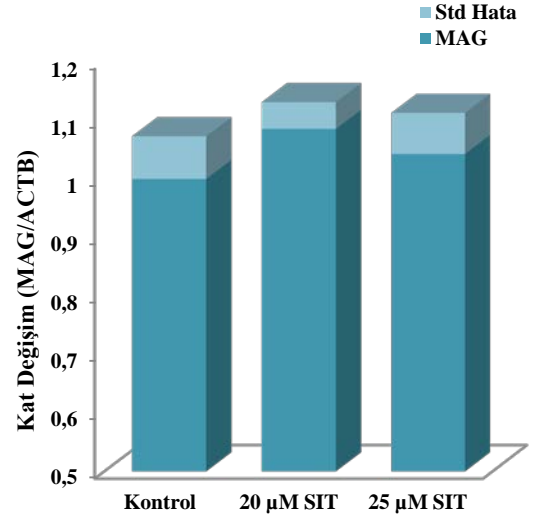
**Şekil 249.** SIT saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.



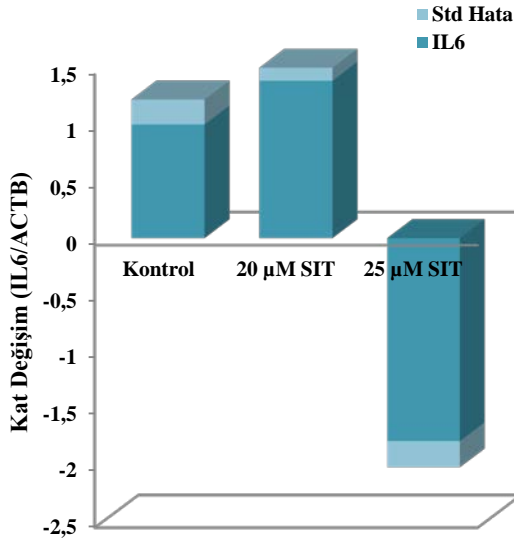
**Şekil 251.** SIT saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.



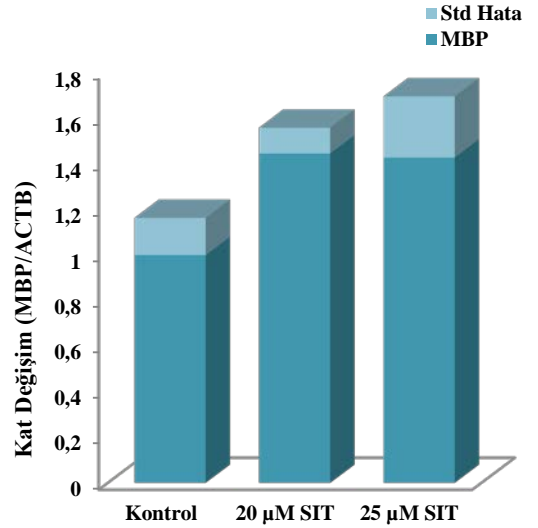
**Şekil 252.** SIT saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 254.** SIT saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.

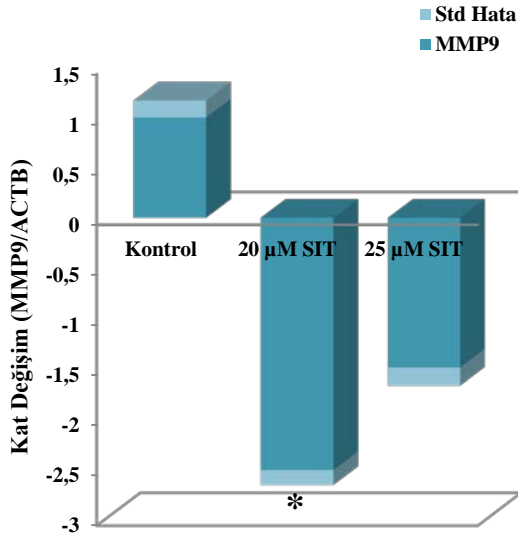


**Şekil 253.** SIT saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.

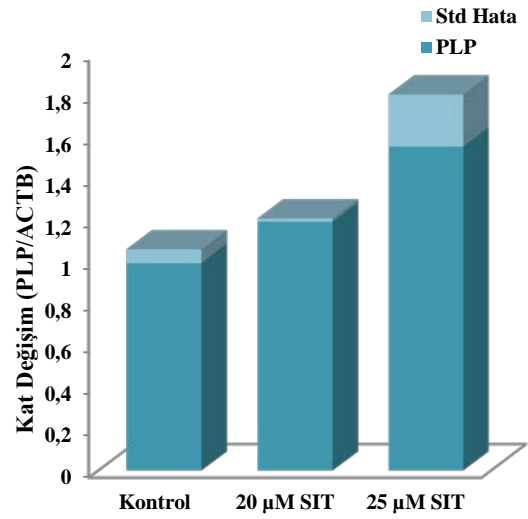


**Şekil 255.** SIT saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.

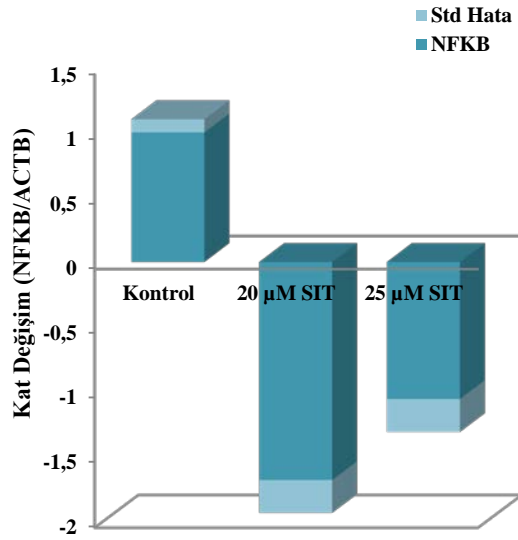




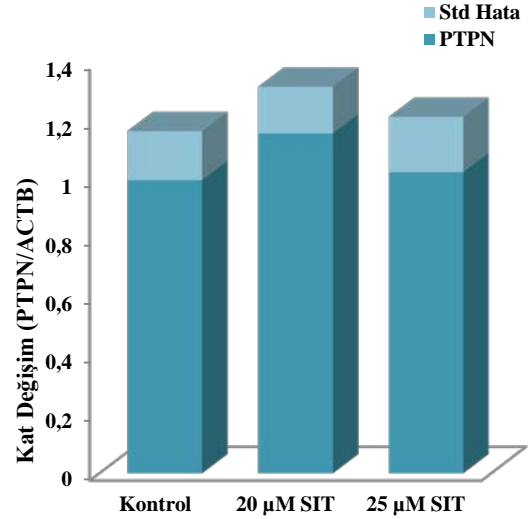
**Şekil 256.** SIT saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.



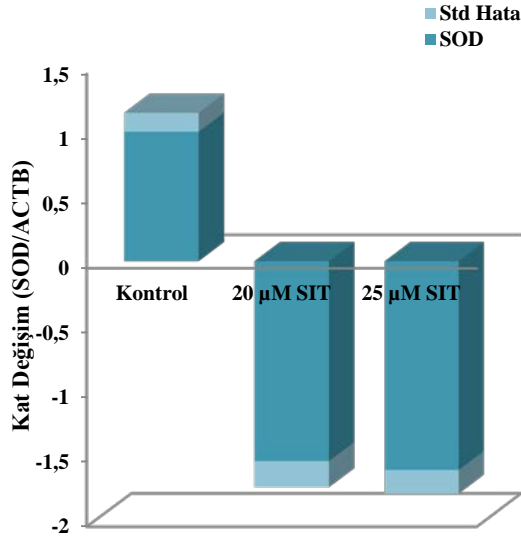
**Şekil 258.** SIT saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.



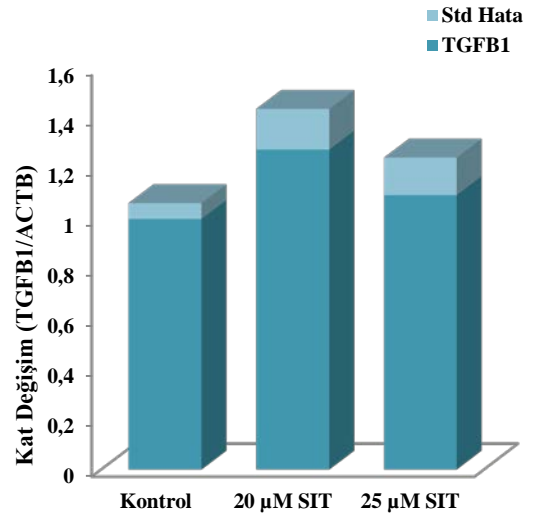
**Şekil 257.** SIT saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.



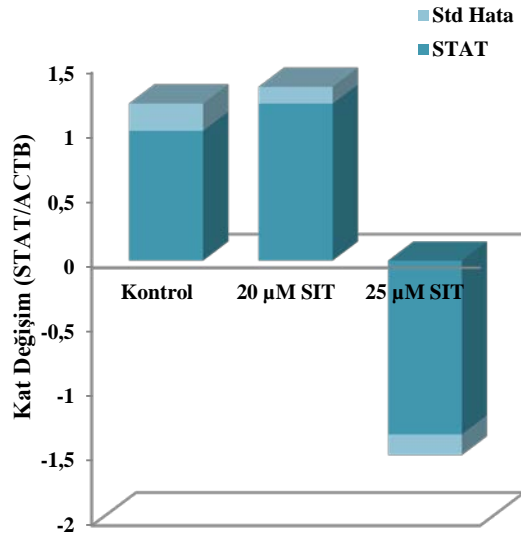
**Şekil 259.** SIT saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.



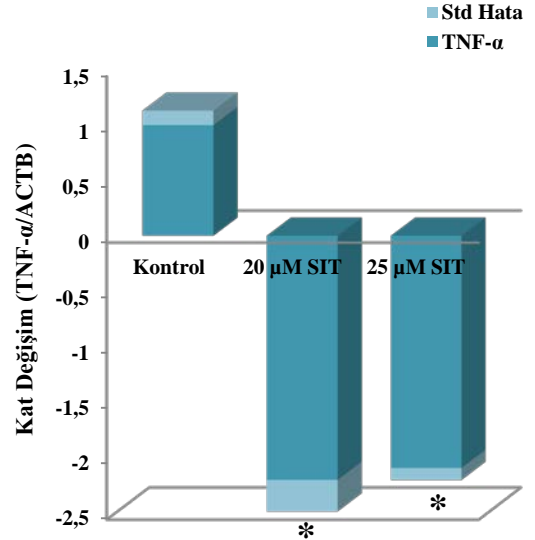
**Şekil 260.** SIT saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 262.** SIT saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 261.** SIT saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.



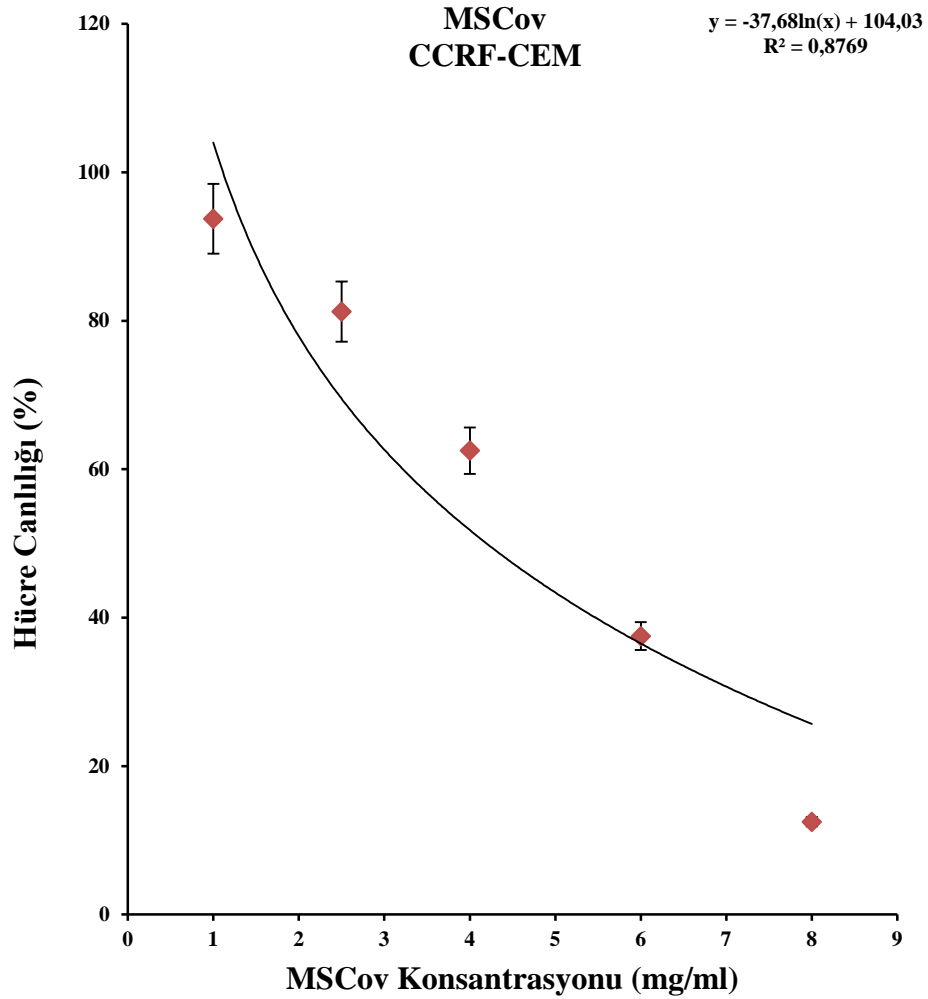
**Şekil 263.** SIT saf bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında TNF-α mRNA seviyesine olan etkisi.

### 3.3.2 CCRF-CEM Hücrelerinde Yapılan Çalışmalar

#### 3.3.2.1 CCRF-CEM Hücrelerinde MSCov Ekstresi Çalışmaları

##### 3.3.2.1.1 MSCov Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda MSCov ekstresi suda çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 6 kuyulu plakaya ( $1 \times 10^4$ /kuyucuk) ekilen CCRF-CEM hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda MSCov ekstresinin bu hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 264).



Şekil 264. MSCov ekstresinin CCRF-CEM hücre canlılığına etkisi

Sitotoksosite testi sonunda  $y=ax+b$  denkleminde yola çıkarak yaklaşık EC05 ve EC10 değerleri hesaplandı. Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 1,25 mg/ml ve 1,5 mg/ml MSCov konsantrasyonunun kullanılmasına karar verildi.

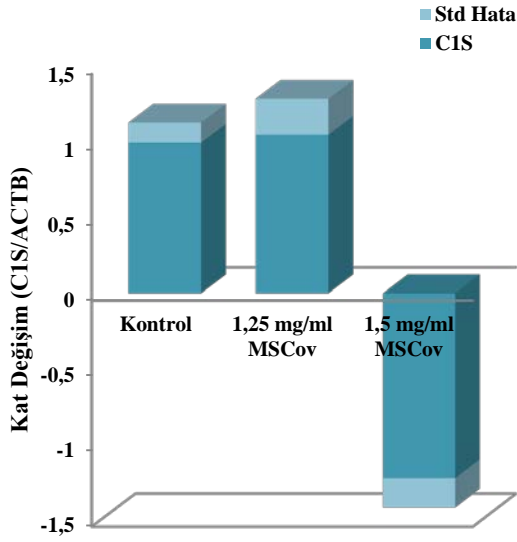
### **3.3.2.1.2 MSCov Ekstresinin CCRF-CEM Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi**

Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücrelere bu belirlenen dozlarda MSCov ekstresi uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı.

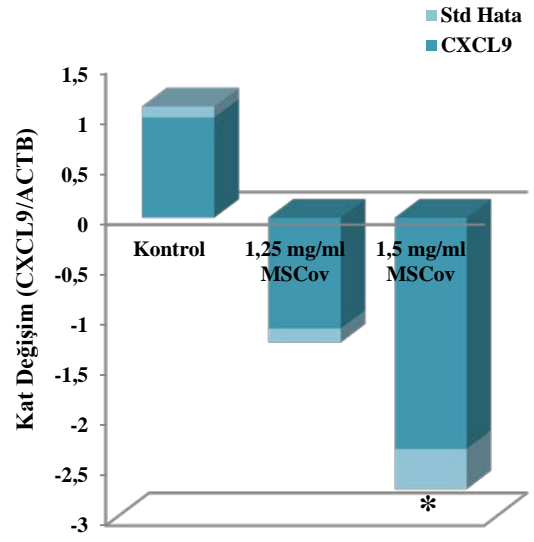
Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar ACTB ile normalize edilip; kontrol değerleri 1 alındı. (\*) ile işaretlenen gruplar  $P < .05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

Seçilen 20 adet genden CCRF-CEM hücrelerinde ekspres edilen 8 tanesi belirlenip bu hücrelerle yapılan çalışmalarda sadece bu genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine bakıldı. CCRF-CEM hücrelerinde MSCov ekstresi uygulanması sonucunda EC10 dozunda CXCL9 2.3 kat ve IL10 2.1 kat; her iki dozda sırasıyla CXCL10 2 kat ve 2.1 kat ve NFkB ise 2.2 ve 2.6 kat anlamlı olarak baskılandı. MSCov CCRF-CEM hücrelerinde de SH-SY5Y hücrelerine benzer şekilde anti-enflamatuvar etki göstermiştir.

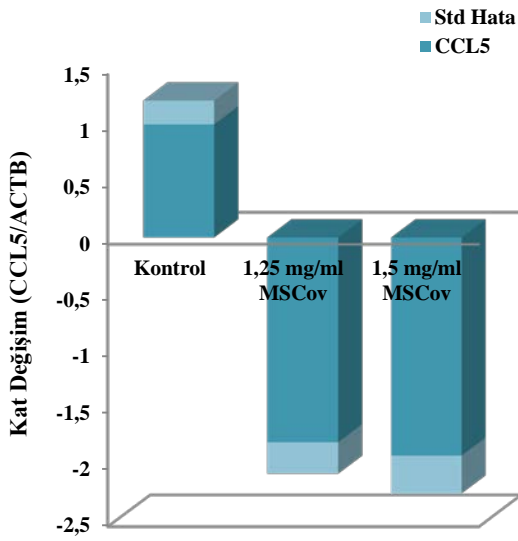
CCRF-CEM hücrelerinde MSCov ekstresinin seçilen 8 tane gen üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 265-272'de verilmiştir.



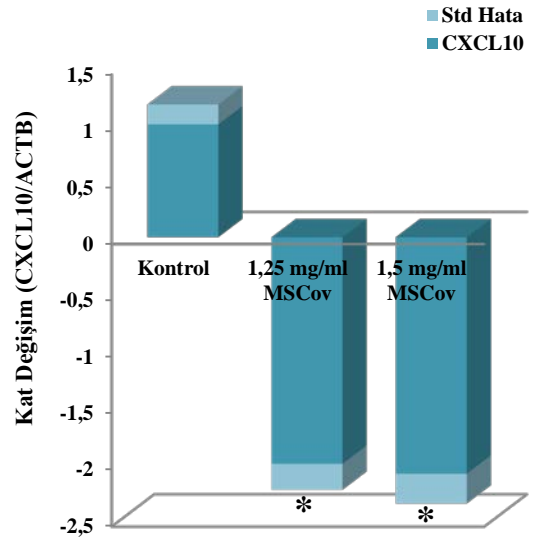
**Şekil 265.** MSCov ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.



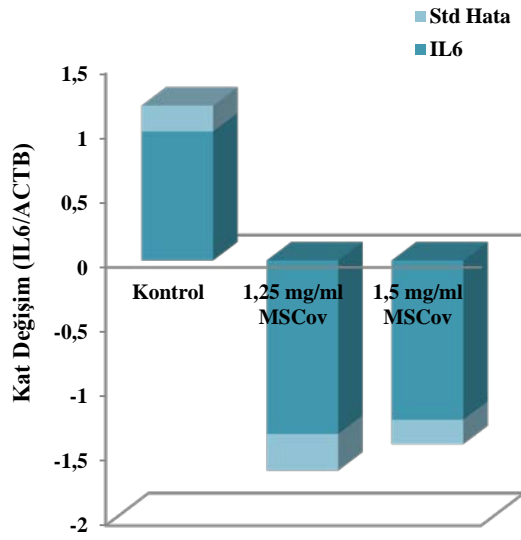
**Şekil 267.** MSCov ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.



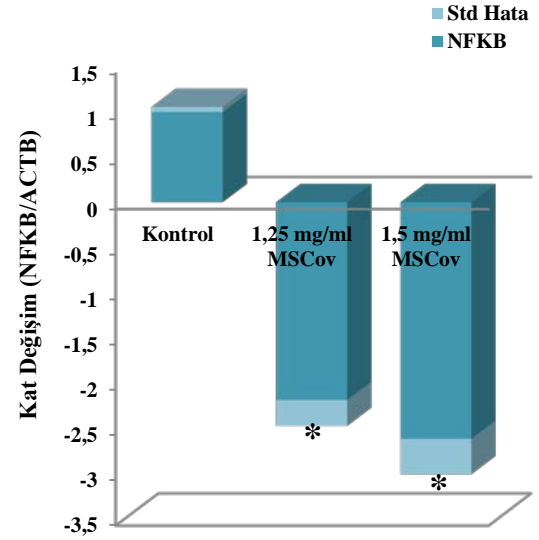
**Şekil 266.** MSCov ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.



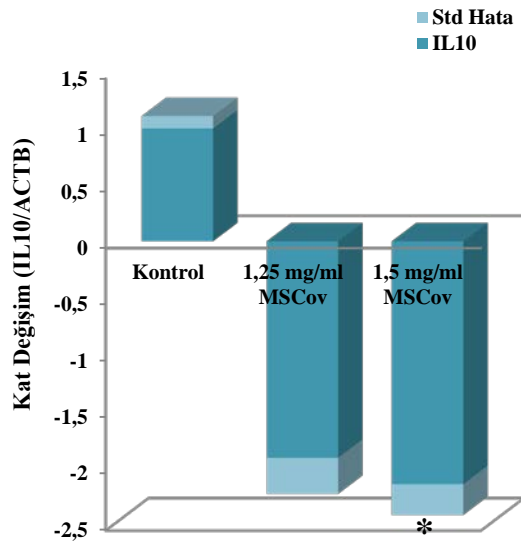
**Şekil 268.** MSCov ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.



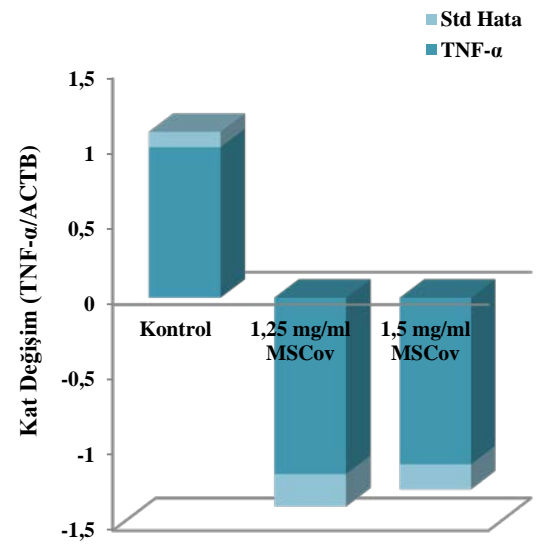
**Şekil 269.** MSCov ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 271.** MSCov ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında NFkB mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 270.** MSCov ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında IL10 mRNA seviyesine olan etkisi.

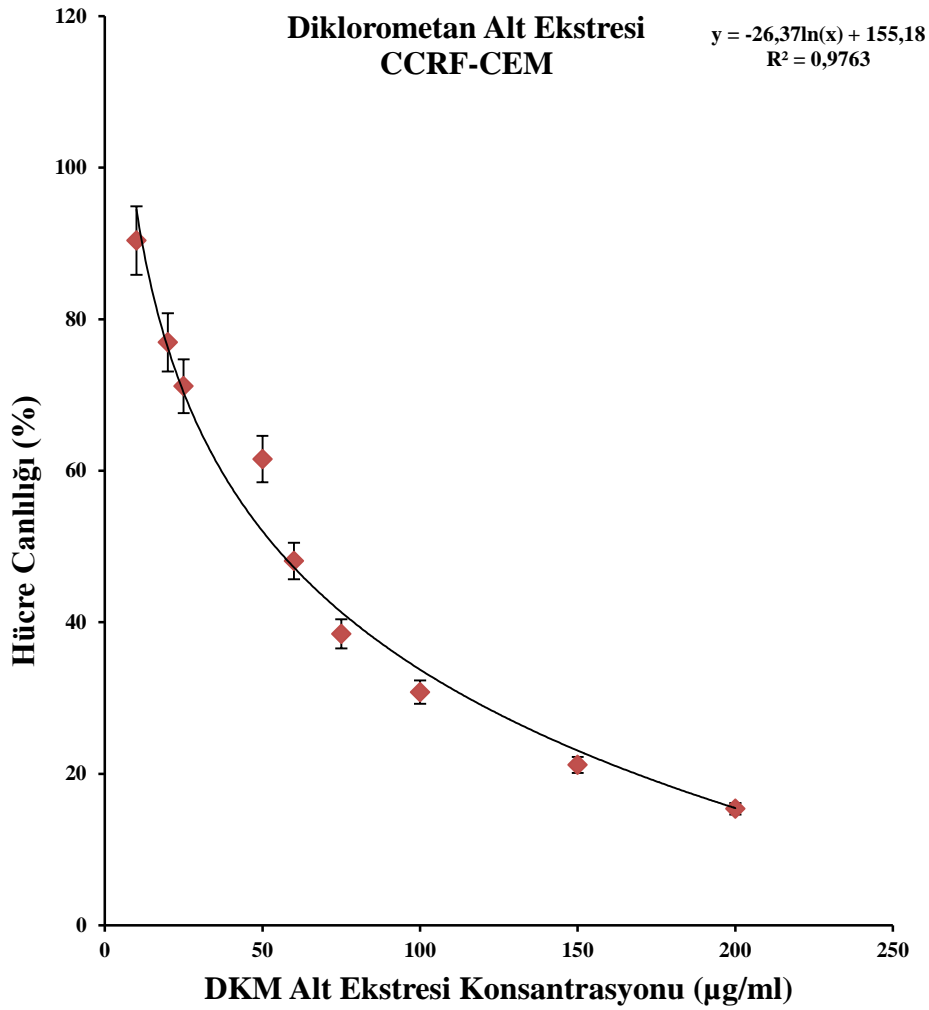


**Şekil 272.** MSCov ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında TNF-α mRNA seviyesine olan etkisi.

### 3.3.2.2 CCRF-CEM Hücrelerinde Diklorometan Alt Ekstresi Çalışmaları

#### 3.3.2.2.1 Diklorometan Alt Ekstresi Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda DKM alt ekstresi %20 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 6 kuyulu plakaya ( $1 \times 10^4$ /kuyucuk) ekilen CCRF-CEM hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda DKM alt ekstresinin bu hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 273).



Şekil 273. DKM alt ekstresinin CCRF-CEM hücre canlılığına etkisi.

Sitotoksisite testi sonunda  $y=ax+b$  denkleminde yola çıkarak yaklaşık EC05 ve EC10 değerleri hesaplandı. Bu sitotoksisite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 10 µg/ml ve 12 µg/ml DKM alt ekstresi konsantrasyonunun kullanılmasına karar verildi.

### **3.3.2.2.2 Diklorometan Alt Ekstresinin CCRF-CEM Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi**

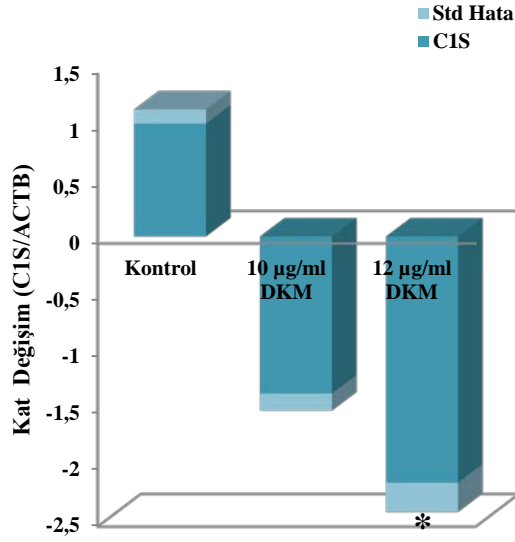
Sitotoksisite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücrelere bu belirlenen dozlarda DKM alt ekstresi uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı.

Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar ACTB ile normalize edilip; kontrol değerleri 1 alındı. (\*) ile işaretlenen gruplar  $P < .05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

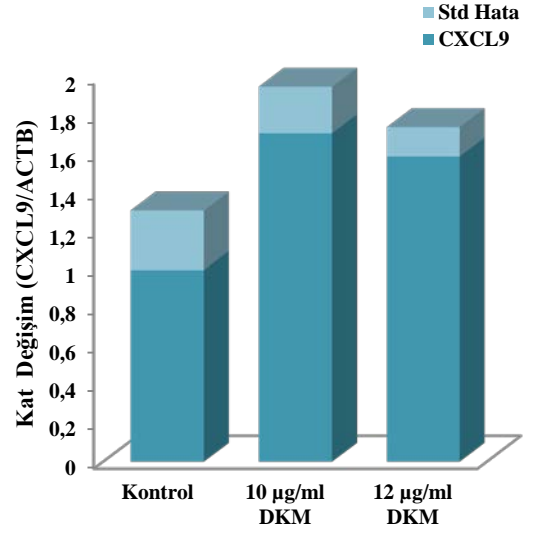
CCRF-CEM hücrelerinde DKM alt ekstresi uygulanması sonucunda C1S 2.1 kat, CCL5 2.6 kat, CXCL10 2.4 kat, TNF- $\alpha$  2.7 kat EC10 dozunda anlamlı olarak baskılanmaktadır.

CCRF-CEM hücrelerinde DKM alt ekstresinin seçilen 8 tane gen üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 274-281'de verilmiştir.

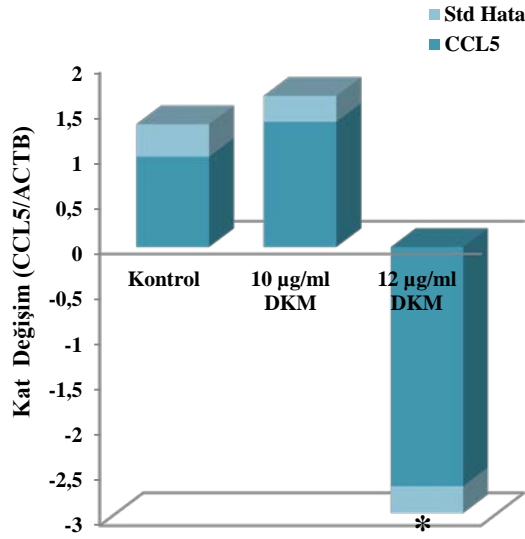




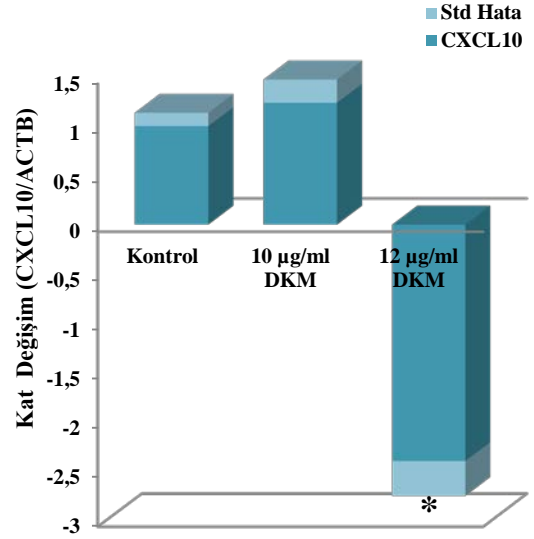
**Şekil 274.** DKM alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CIS mRNA seviyesine olan etkisi.



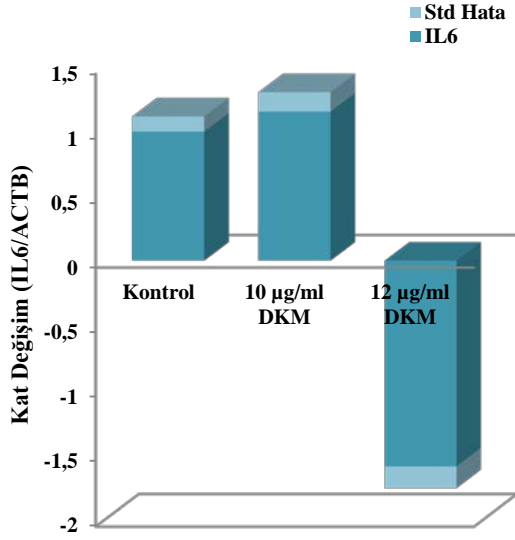
**Şekil 276.** DKM alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.



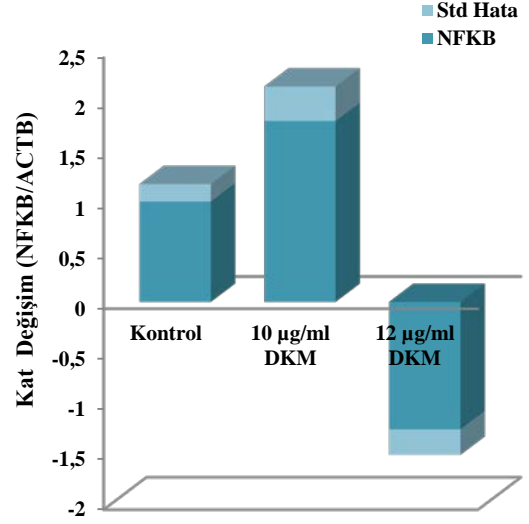
**Şekil 275.** DKM alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.



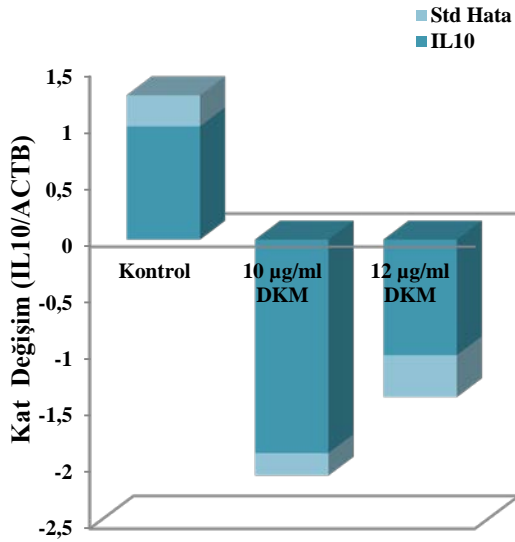
**Şekil 277.** DKM alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.



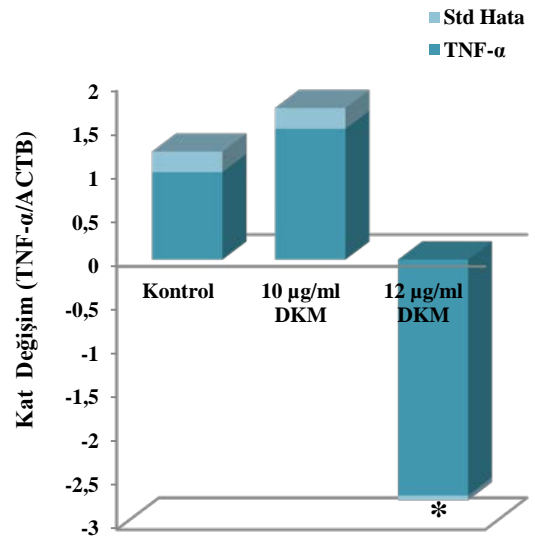
**Şekil 278.** DKM alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 280.** DKM alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında NFkB mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 279.** DKM alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında IL10 mRNA seviyesine olan etkisi.

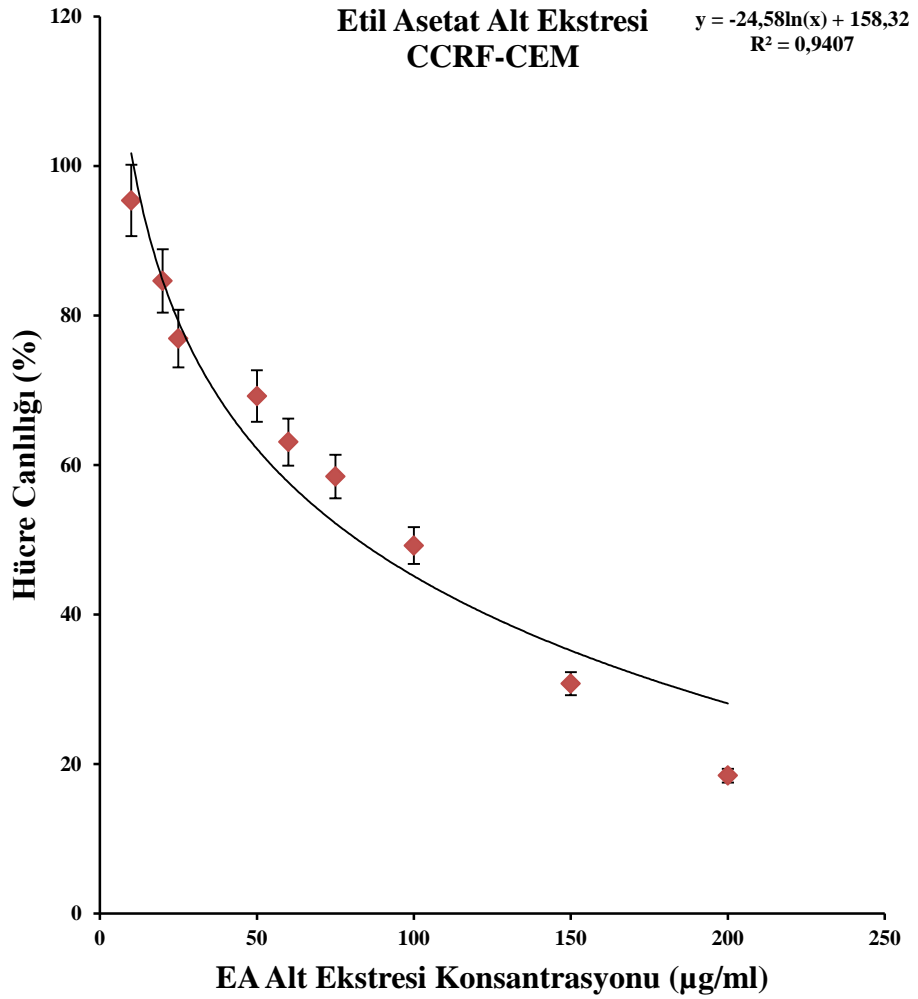


**Şekil 281.** DKM alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında TNF-α mRNA seviyesine olan etkisi.

### 3.3.2.3 CCRF-CEM Hücrelerinde Etil Asetat Alt Ekstresi Çalışmaları

#### 3.3.2.3.1 Etil Asetat Alt Ekstresi Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda EA alt ekstresi %20 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 6 kuyulu plakaya ( $1 \times 10^4$ /kuyucuk) ekilen CCRF-CEM hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda EA alt ekstresinin bu hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 282).



Şekil 282. EA alt ekstresinin CCRF-CEM hücre canlılığına etkisi

Sitotoksosite testi sonunda  $y=ax+b$  denkleminde yola çıkarak yaklaşık EC05 ve EC10 değerleri hesaplandı. Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 13 µg/ml ve 17 µg/ml EA alt ekstresi konsantrasyonunun kullanılmasına karar verildi.

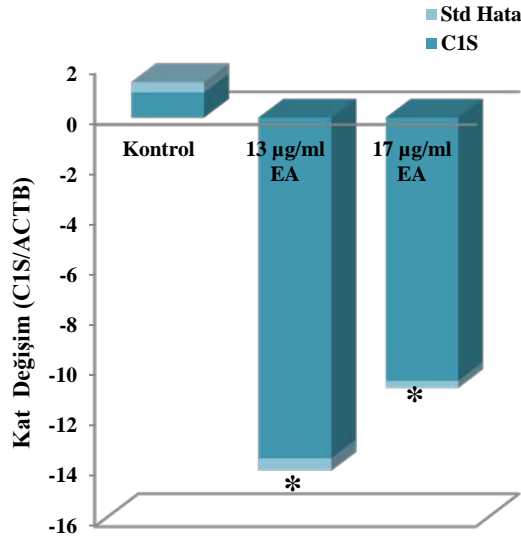
### **3.3.2.3.2 Etil Asetat Alt Ekstresinin CCRF-CEM Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi**

Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücrelere bu belirlenen dozlarda EA alt ekstresi uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı.

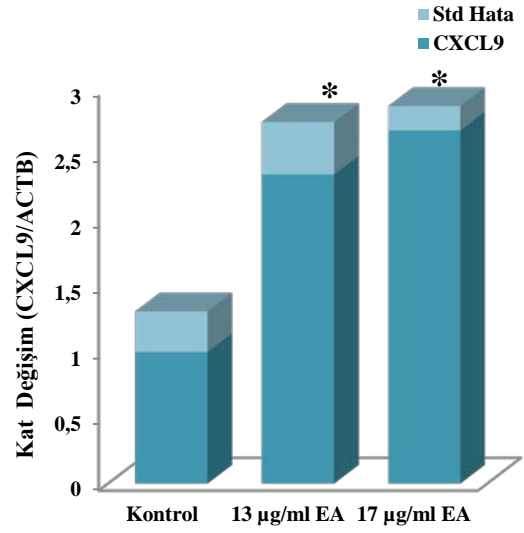
Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar ACTB ile normalize edilip; kontrol değerleri 1 alındı. (\*) ile işaretlenen gruplar  $P < .05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

CCRF-CEM hücrelerinde EA alt ekstresi uygulanması sonucunda her iki dozda sırayla C1S 13.5 ve 10.4 kat, CCL5 3.1 ve 2 kat; CXCL10 4.8 ve 7.8 kat, IL10 3.8 ve 16.5 kat ve NFKB 2 ve 3.2 kat anlamlı olarak baskılanmakta iken; CXCL9 EC05 ve EC10 dozunda 2.3 ve 2.7 kat anlamlı olarak artmaktadır.

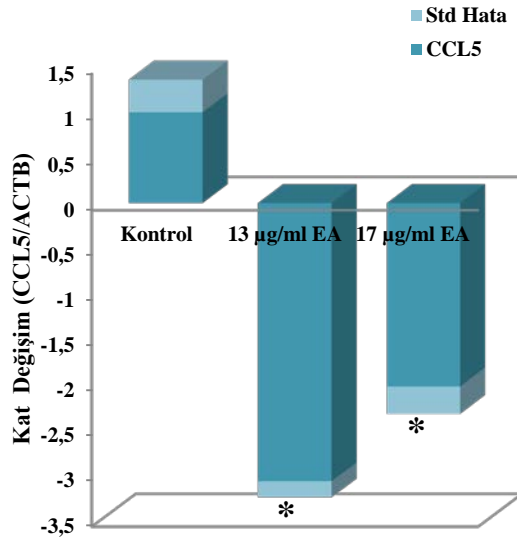
CCRF-CEM hücrelerinde EA alt ekstresinin seçilen 8 tane gen üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 283-290'de verilmiştir.



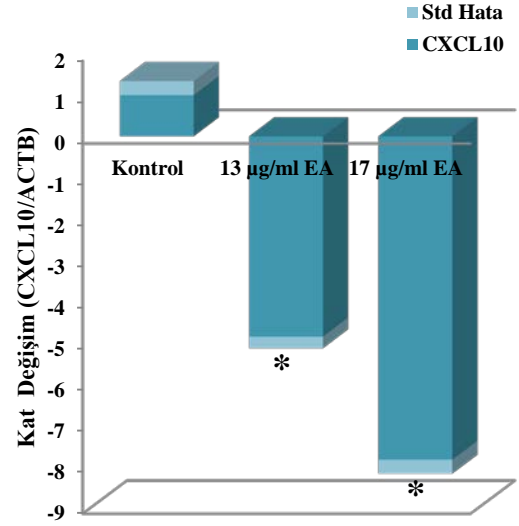
**Şekil 283.** EA alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.



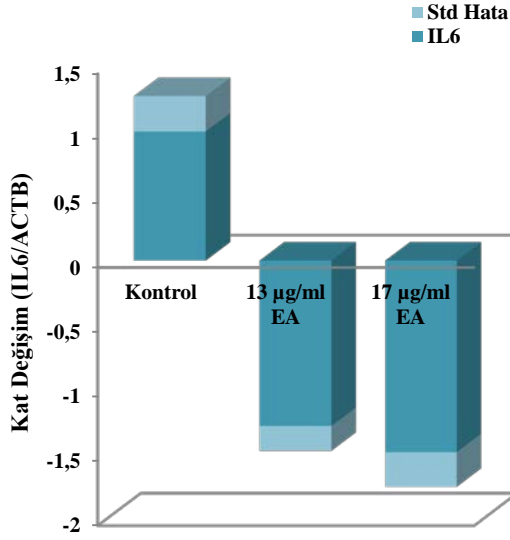
**Şekil 285.** EA alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.



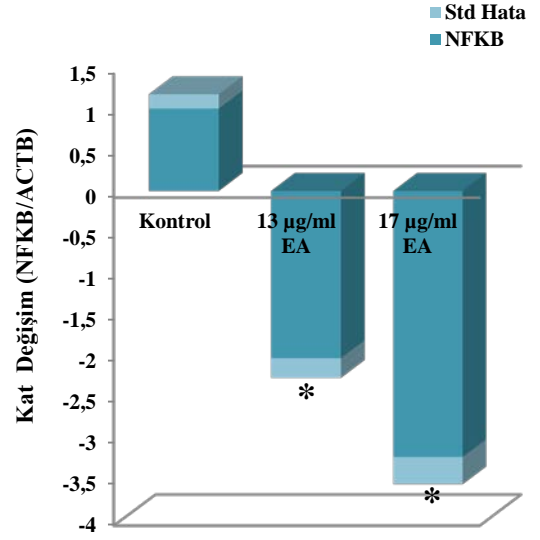
**Şekil 284.** EA alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.



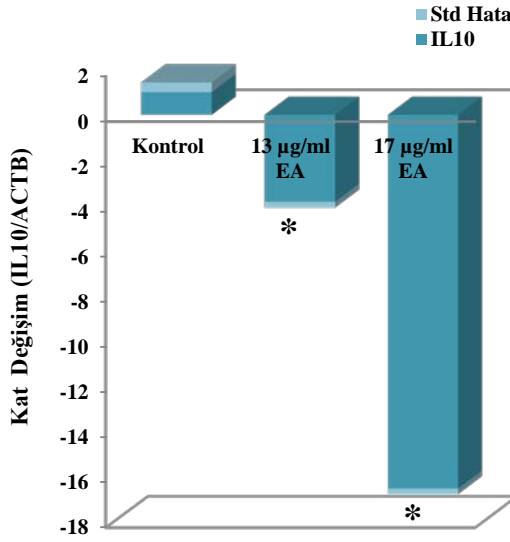
**Şekil 286.** EA alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.



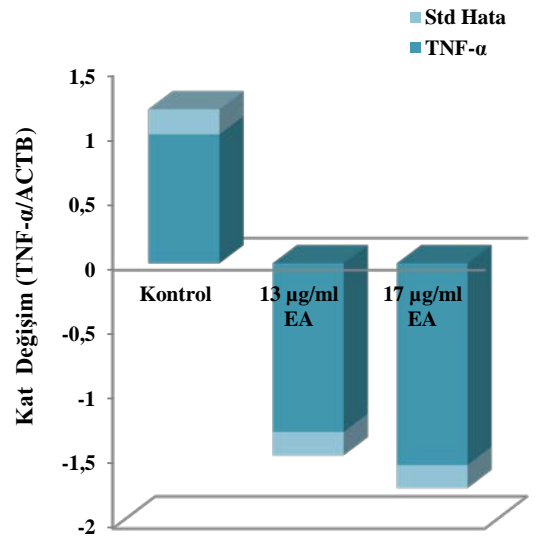
**Şekil 287.** EA alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 289.** EA alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında NFkB mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 288.** EA alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında IL10 mRNA seviyesine olan etkisi.

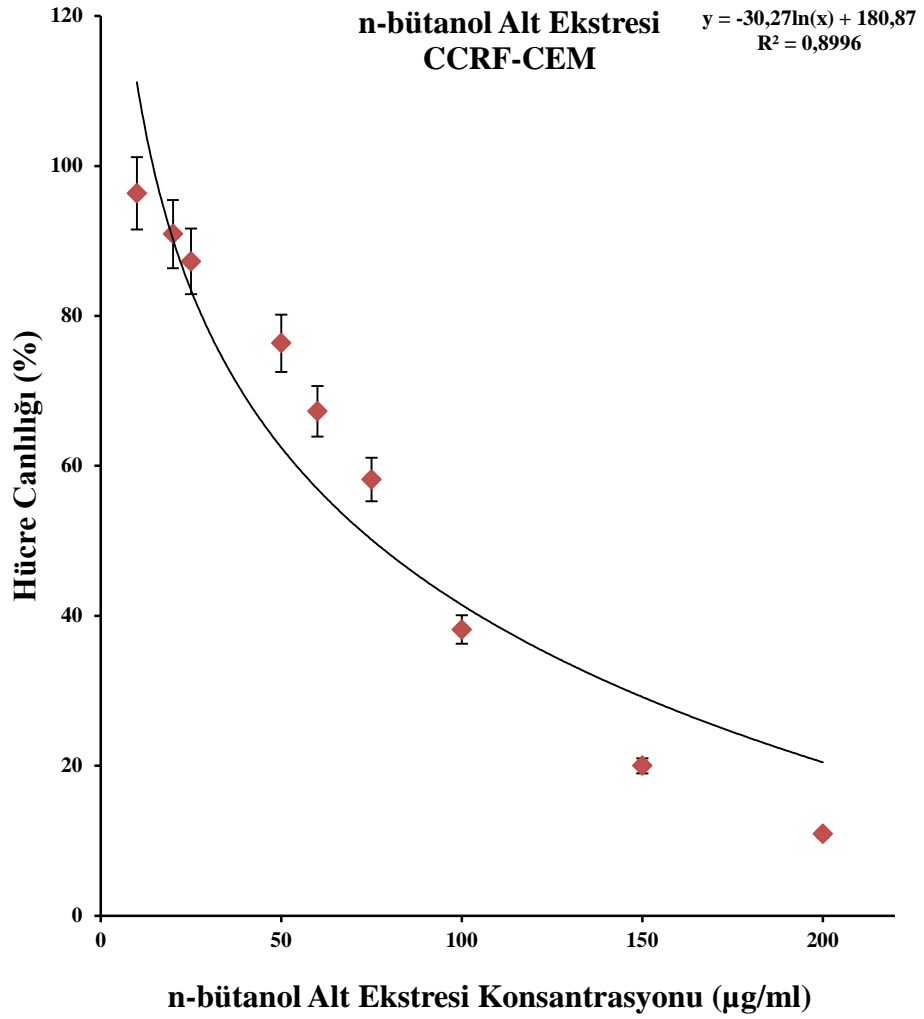


**Şekil 290.** EA alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında TNF-α mRNA seviyesine olan etkisi.

### 3.3.2.4 CCRF-CEM Hücrelerinde n-bütanol Alt Ekstresi Çalışmaları

#### 3.3.2.4.1 n-bütanol Alt Ekstresi Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda n-bütanol alt ekstresi %20 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 6 kuyulu plakaya ( $1 \times 10^4$ /kuyucuk) ekilen CCRF-CEM hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda n-bütanol alt ekstresinin bu hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 291).



Şekil 291. n-bütanol alt ekstresinin CCRF-CEM hücre canlılığına etkisi

Sitotoksisite testi sonunda  $y=ax+b$  denkleminde yola çıkarak yaklaşık EC05 ve EC10 değerleri hesaplandı. Bu sitotoksisite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 17 µg/ml ve 20 µg/ml n-bütanol alt ekstresi konsantrasyonunun kullanılmasına karar verildi.

#### **3.3.2.4.2 n-bütanol Alt Ekstresinin CCRF-CEM Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi**

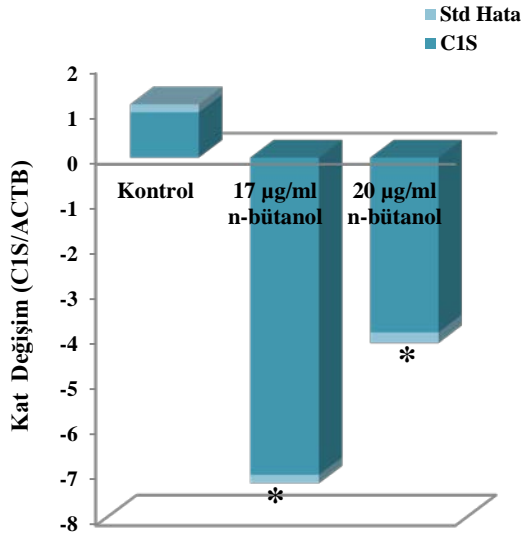
Sitotoksisite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücrelere bu belirlenen dozlarda n-bütanol alt ekstresi uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı.

Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar ACTB ile normalize edilip; kontrol değerleri 1 alındı. (\*) ile işaretlenen gruplar  $P < .05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

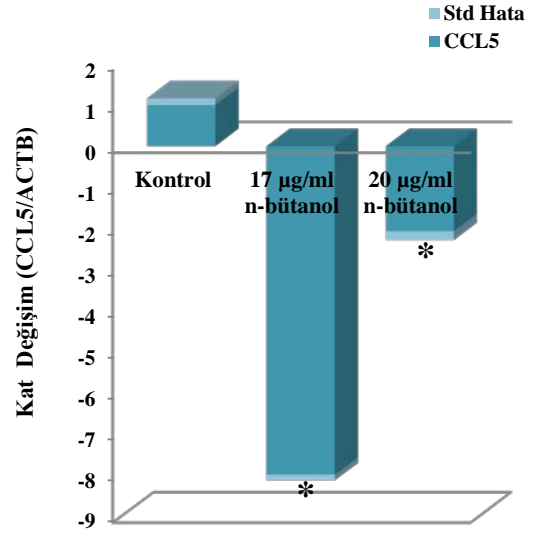
CCRF-CEM hücrelerinde n-bütanol alt ekstresi uygulanması sonucunda EC05 ve EC10 dozunda sırayla, C1S 7 ve 3.8 kat, CCL5 7.9 ve 2 kat, CXCL10 3.7 ve 3.1 kat ve IL10 2.3 ve 8.2 kat anlamlı olarak baskılanmaktadır. Diğer çalışılan genlerde ise anlamlı bir fark yoktur.

CCRF-CEM hücrelerinde n-bütanol alt ekstresinin seçilen 8 tane gen üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 292-299'da verilmiştir.

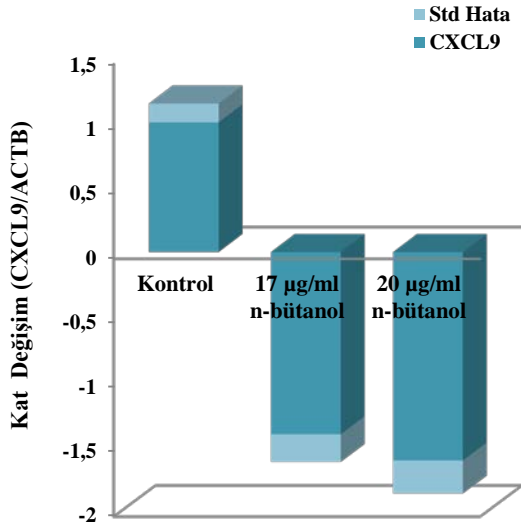




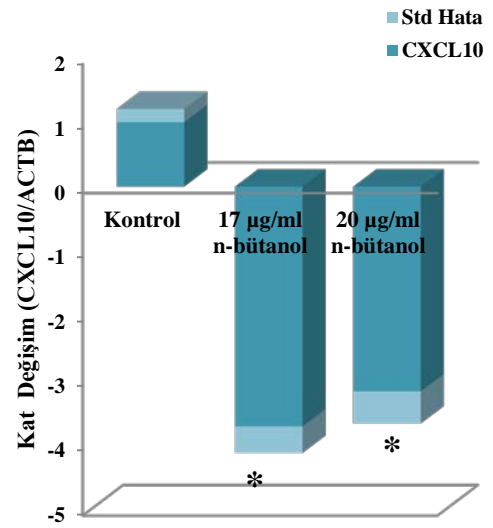
**Şekil 292.** n-bütanol alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.



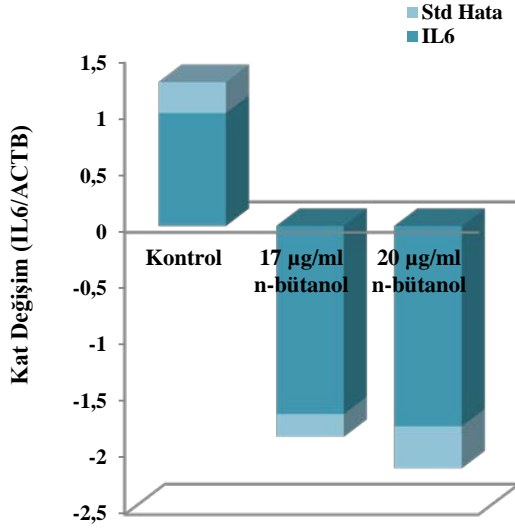
**Şekil 294.** n-bütanol alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.



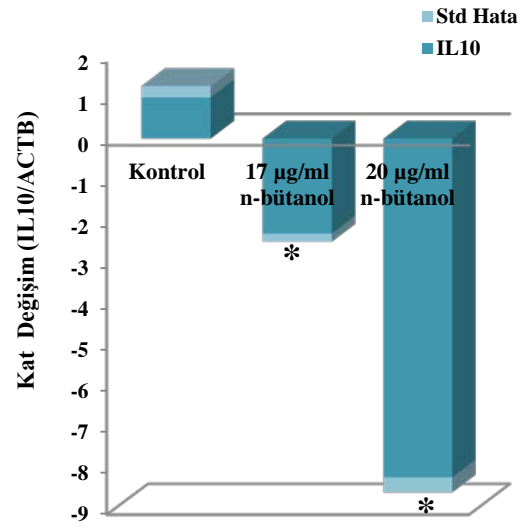
**Şekil 293.** n-bütanol alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.



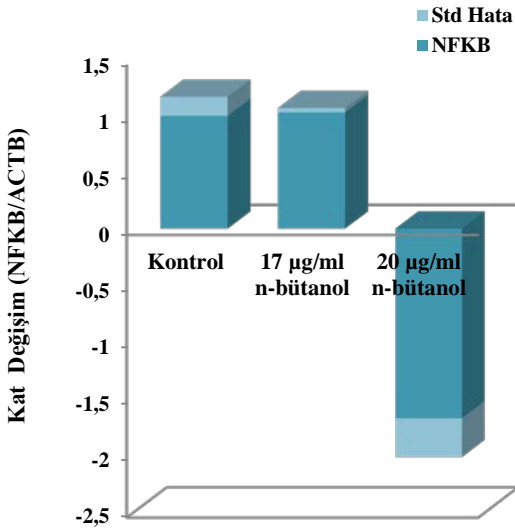
**Şekil 295.** n-bütanol alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.



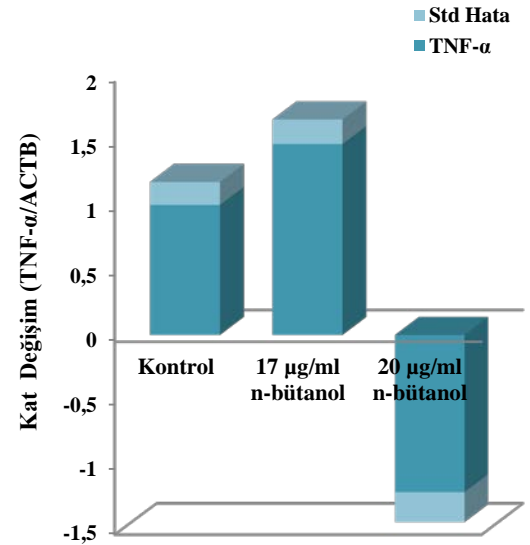
**Şekil 296.** n-bütanol alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 298.** n-bütanol alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında IL10 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 297.** n-bütanol alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında NFkB mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 299.** n-bütanol alt ekstresinin CCRF-CEM hücre hattında TNF-α mRNA seviyesine olan etkisi.

### **3.3.3 Fare Primer Oligodendrosit Hücrelerinde Yapılan Çalışmalar**

#### **3.3.3.1 Fare Primer Oligodendrosit Hücrelerinde MSCov Ekstresi Çalışmaları**

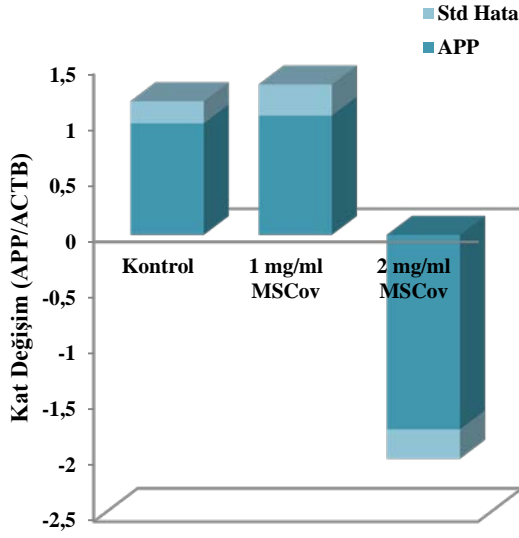
##### **3.3.3.1.1 MSCov Ekstresinin Fare Primer Oligodendrosit Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi**

Diğer iki hücre hattının EC05 ve EC10 dozundan yola çıkarak 1 mg/ml ve 2 mg/ml MSCov konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi. Bu dozlar belirlendikten sonra hücrelere MSCov ekstresi uygulandı. Yirmi dört saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı.

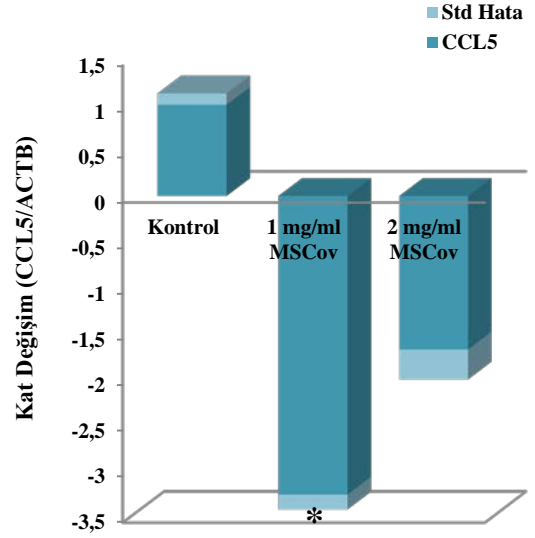
Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar ACTB ile normalize edilip; kontrol değerleri 1 alındı. (\*) ile işaretlenen gruplar  $P < .05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

Seçilen 20 adet genden fare primer oligodendrosit hücrelerinde MSCov ekstresi uygulanması sonucunda EC05 ve EC10 dozlarında GFAP 5.4 ve 4.9 kat, NFkB 7.2 ve 4.1 kat, TNF- $\alpha$  4.5 ve 2.9 kat; EC05 dozunda CCL5 3.3 kat, CXCL10 2.8 kat ve IL6 3.1 kat; EC10 dozunda C1S 2.2 kat, HIF1A 2.8 kat ve TGFB1 2.3 kat anlamlı olarak baskılanmıştır. EC05 ve EC10 dozunda MAG mRNA ekspresyon düzeyi 2.1 ve 7.4 kat anlamlı olarak artarken; MBP ise EC10 dozunda 5.2 kat anlamlı olarak artmıştır. Bu sonuçlar MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde de anti-enflamatuvar etki, T hücre aktivasyonunu baskılayıcı etki ve miyelin koruyucu etki ortaya koyduğunu göstermektedir.

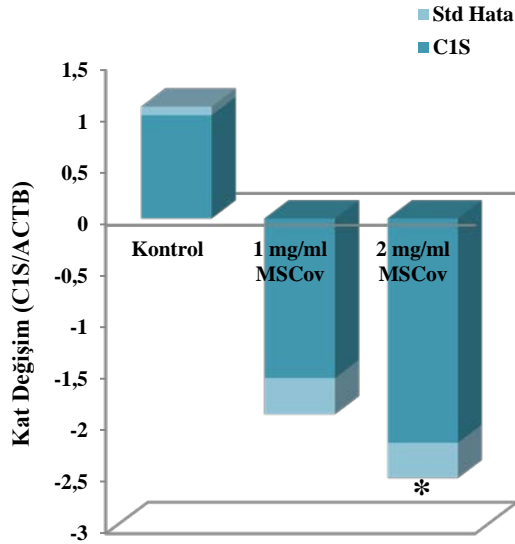
Fare primer oligodendrosit hücrelerinde MSCov ekstresinin belirlenen genler üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 300-319'da verilmiştir.



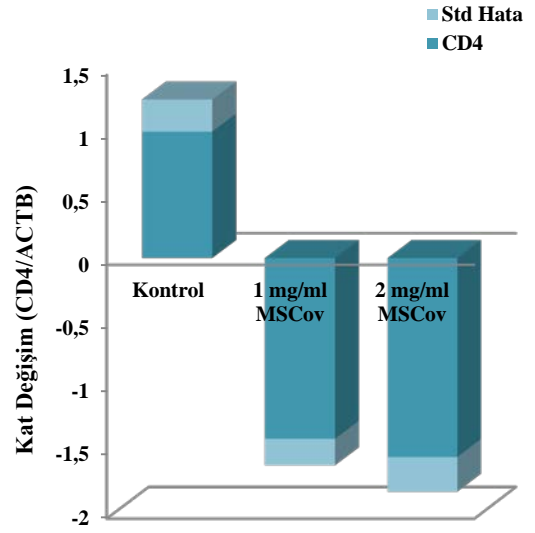
**Şekil 300.** MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde APP mRNA seviyesine olan etkisi.



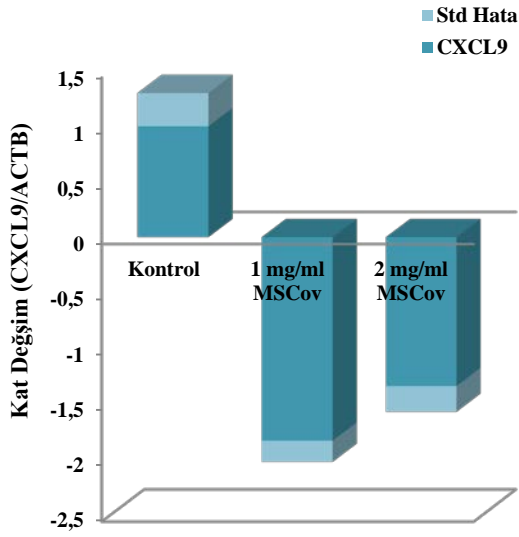
**Şekil 302.** MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.



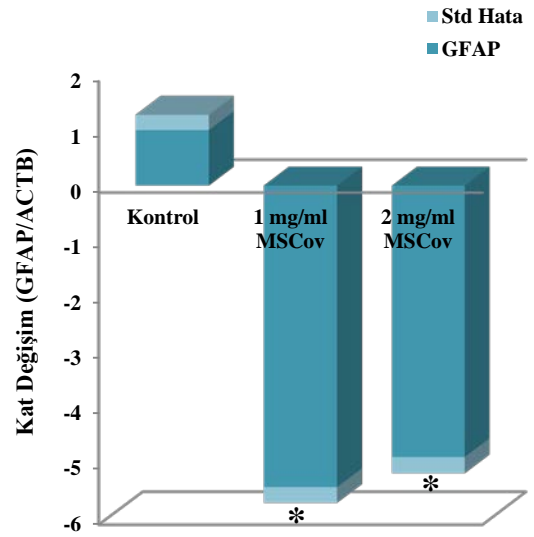
**Şekil 301.** MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde C1S mRNA seviyesine olan etkisi.



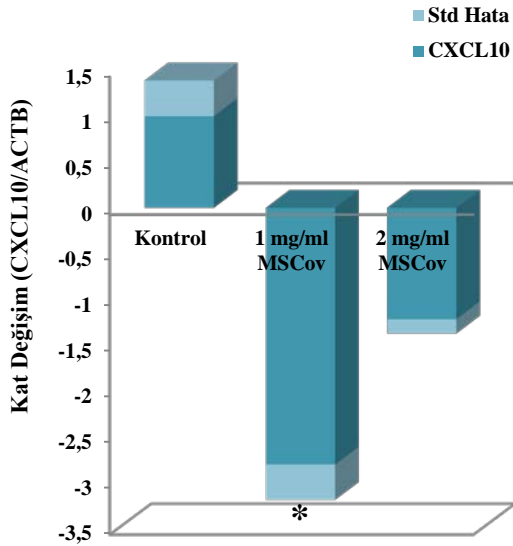
**Şekil 303.** MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.



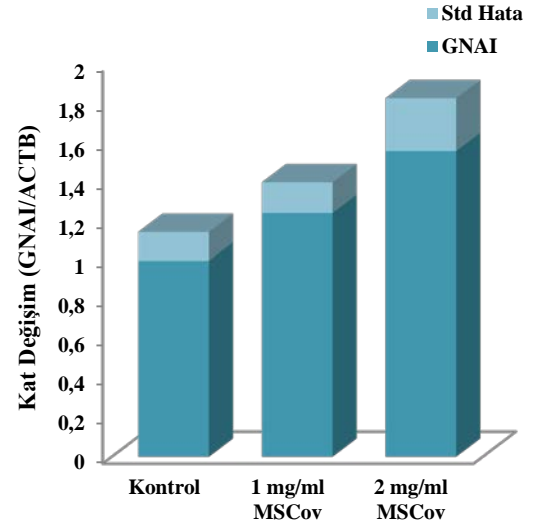
**Şekil 304.** MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.



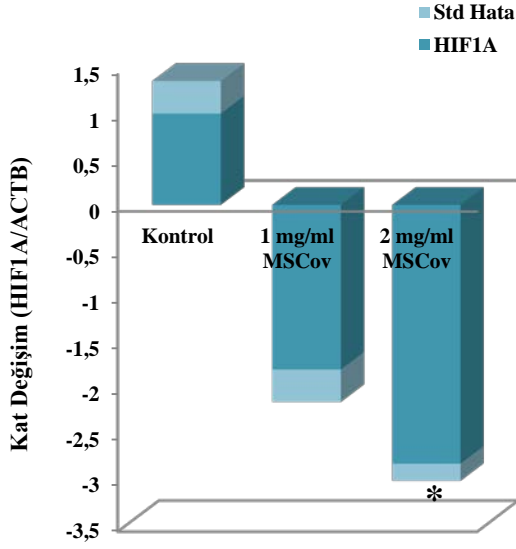
**Şekil 306.** MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.



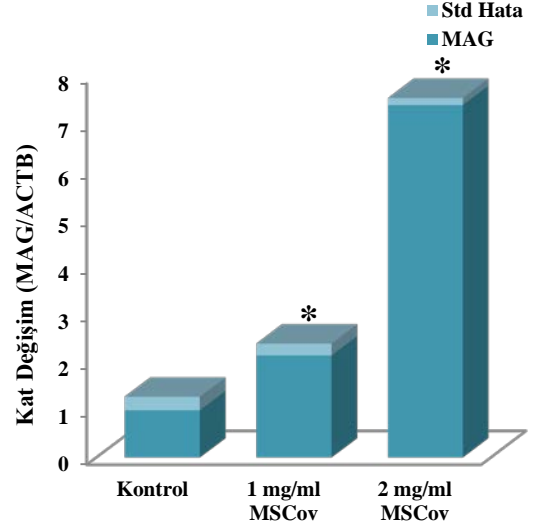
**Şekil 305.** MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.



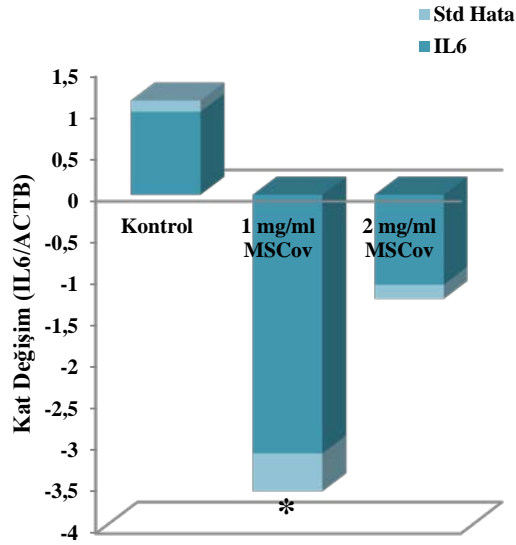
**Şekil 307.** MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.



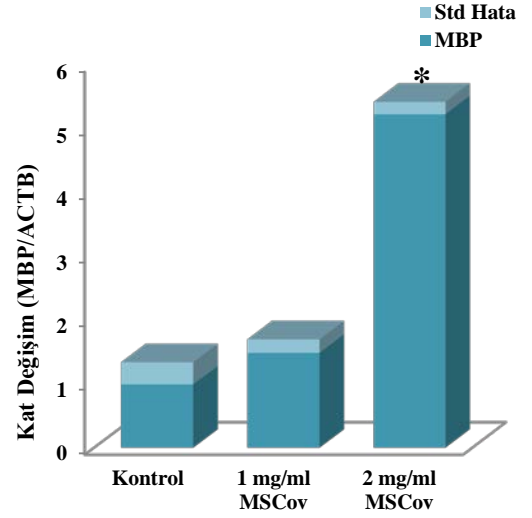
**Şekil 308.** MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.



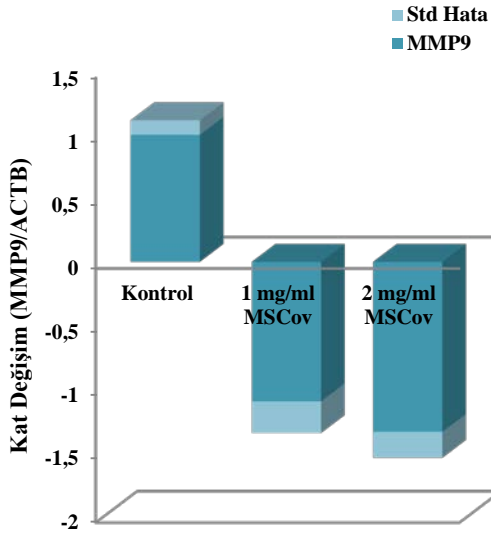
**Şekil 310.** MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit MAG mRNA seviyesine olan etkisi.



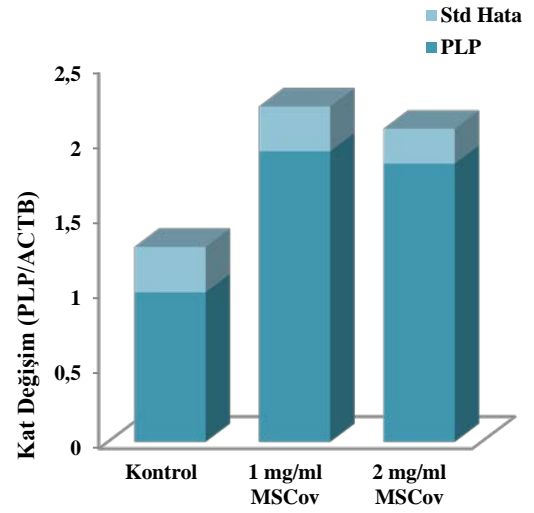
**Şekil 309.** MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.



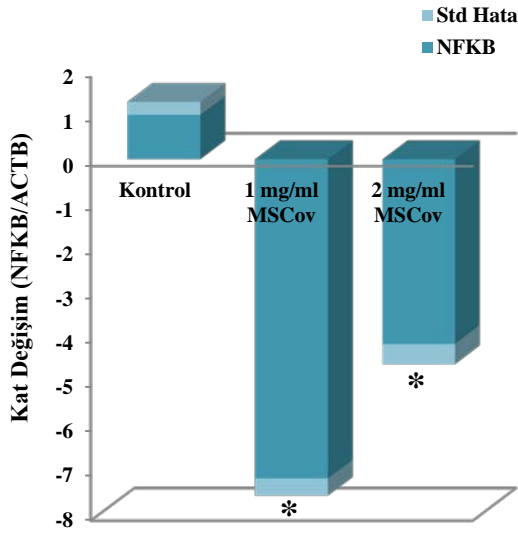
**Şekil 311.** MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit MBP mRNA seviyesine olan etkisi.



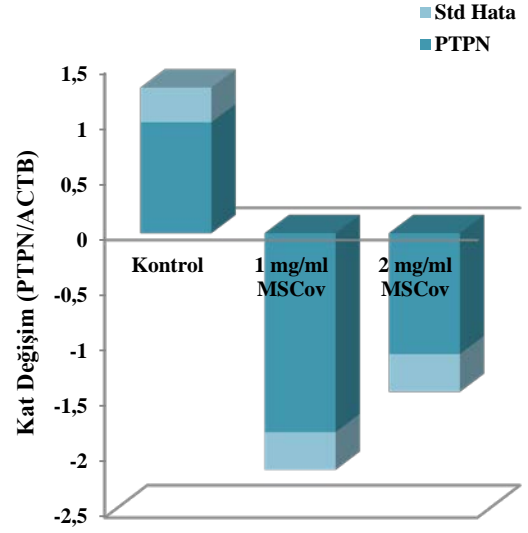
**Şekil 312.** MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.



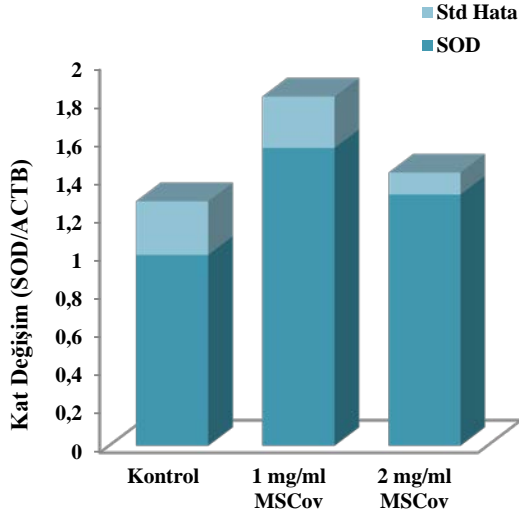
**Şekil 314.** MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit PLP mRNA seviyesine olan etkisi.



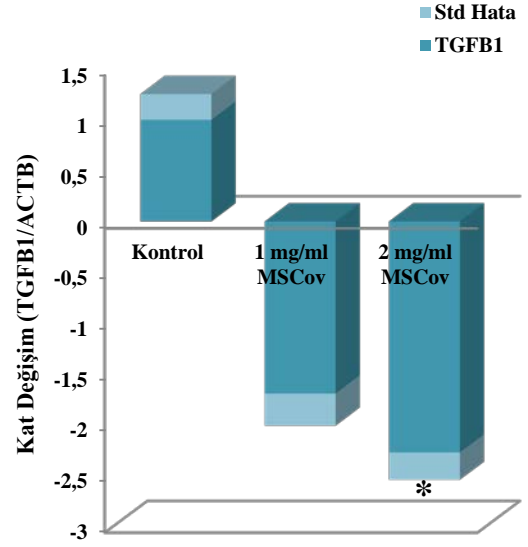
**Şekil 313.** MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit NFkB mRNA seviyesine olan etkisi.



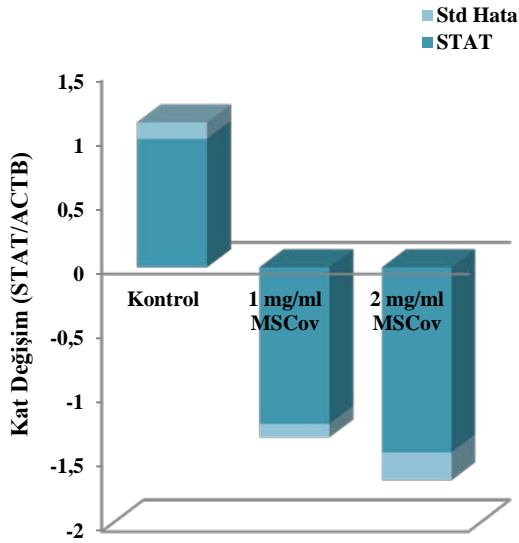
**Şekil 315.** MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.



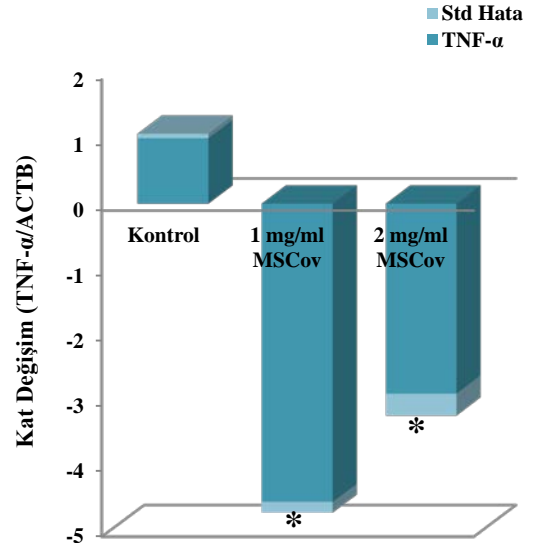
**Şekil 316.** MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit SOD mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 318.** MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit TGFβ1 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 317.** MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit STAT mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 319.** MSCov ekstresinin fare primer oligodendrosit TNF-α mRNA seviyesine olan etkisi.



### **3.3.3.2 Fare Primer Oligodendrosit Hücrelerinde Diklorometan Alt Ekstresi Çalışmaları**

#### **3.3.3.2.1 Diklorometan Alt Ekstresinin Fare Primer Oligodendrosit Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi**

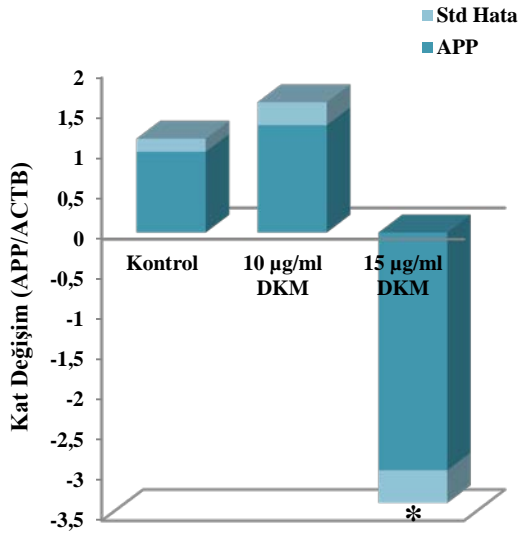
Diğer iki hücre hattının EC05 ve EC10 dozundan yola çıkarak 10 µg/ml ve 15 µg/ml DKM alt ekstresi konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi. Bu dozlar belirlendikten sonra hücelere DKM alt ekstresi uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı.

Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar ACTB ile normalize edilip; kontrol değerleri 1 alındı. (\*) ile işaretlenen gruplar  $P < .05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

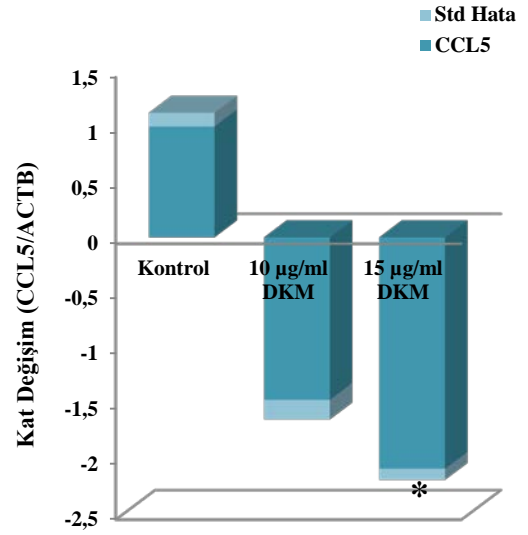
Seçilen 20 adet genden fare primer oligodendrosit hücrelerinde DKM alt ekstresi uygulanması sonucunda EC05 ve EC10 dozlarında C1S 4.7 ve 6.5 kat, GFAP 2.1 ve 4.6 kat, MMP9 2.7 ve 3.6 kat, NFkB 2.2 ve 3.2 kat; EC10 dozunda APP 3 kat, CCL5 2.1 kat, CXCL9 2.3 kat, CXCL10 2.8 kat, STAT 3.1 kat ve TNF- $\alpha$  2 kat baskılanmıştır.

EC05 ve EC10 dozunda MAG 4 ve 4.9 kat, MBP 3.4 ve 2.7 kat ve PLP 5 ve 2.5 kat; EC05 dozunda ise CD4 mRNA ekspresyon düzeyi 2.3 kat anlamlı olarak artmıştır.

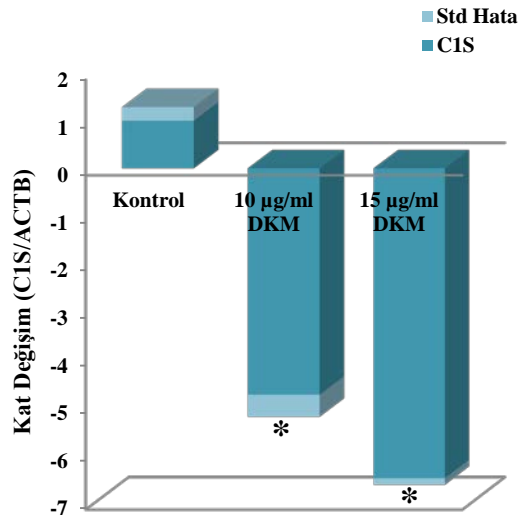
Fare primer oligodendrosit hücrelerinde DKM alt ekstresinin belirlenen genler üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 320-339'da verilmiştir.



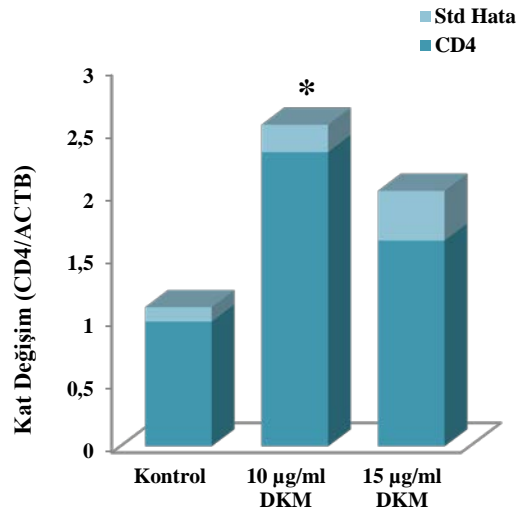
**Şekil 320.** DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde APP mRNA seviyesine olan etkisi.



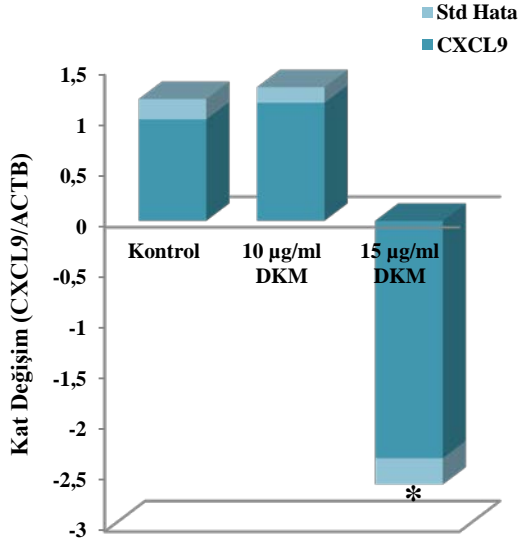
**Şekil 322.** DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.



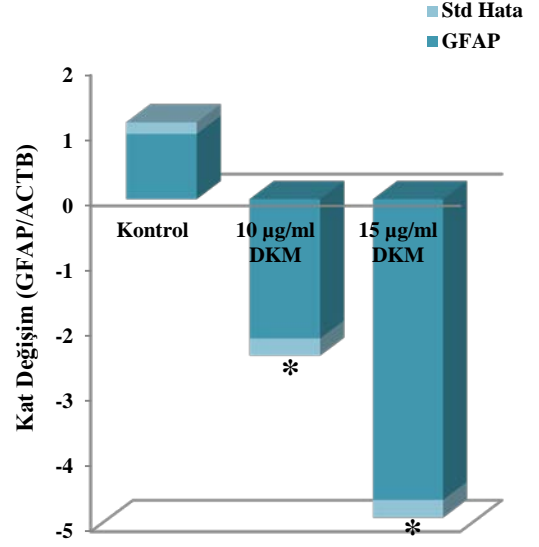
**Şekil 321.** DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde C1S mRNA seviyesine olan etkisi.



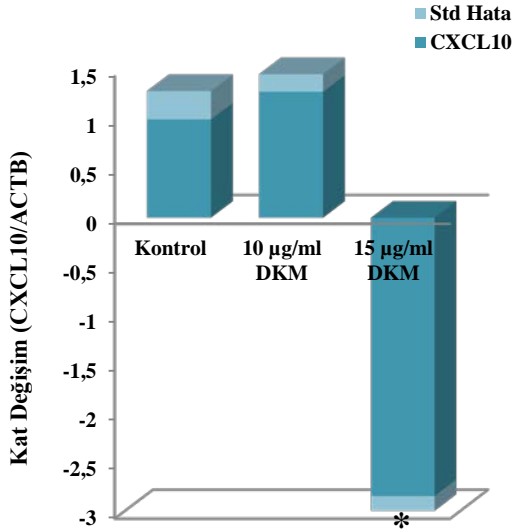
**Şekil 323.** DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.



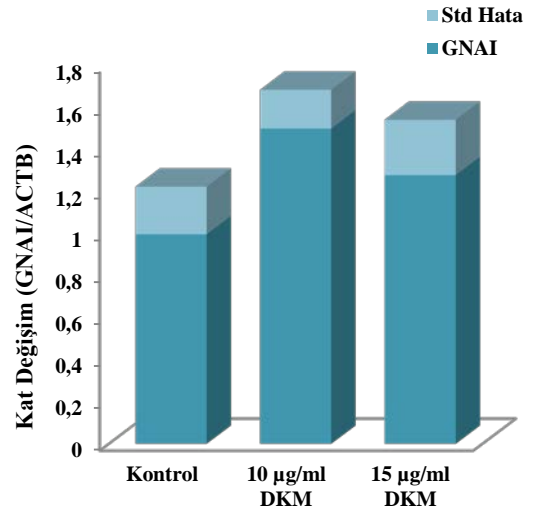
**Şekil 324.** DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.



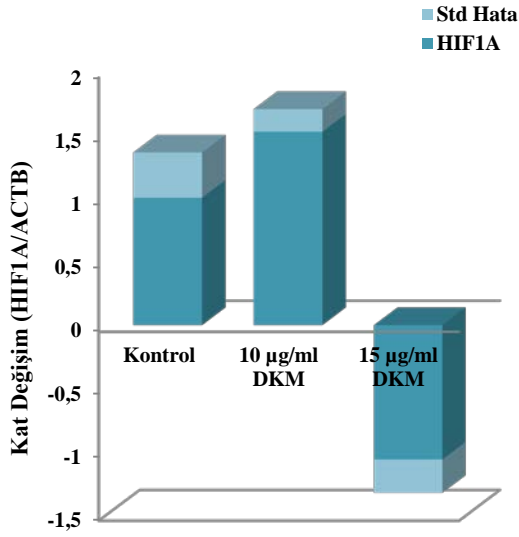
**Şekil 326.** DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.



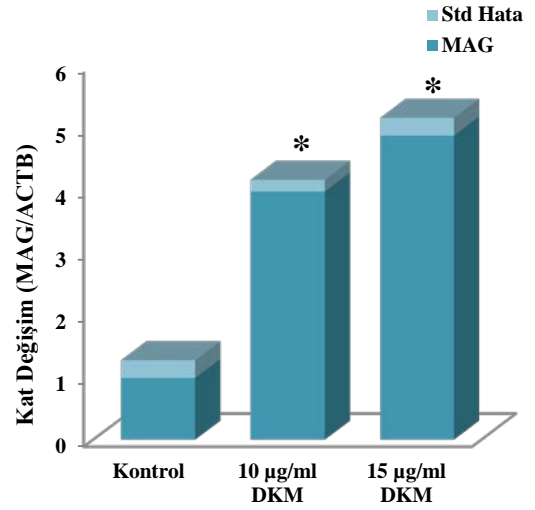
**Şekil 325.** DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.



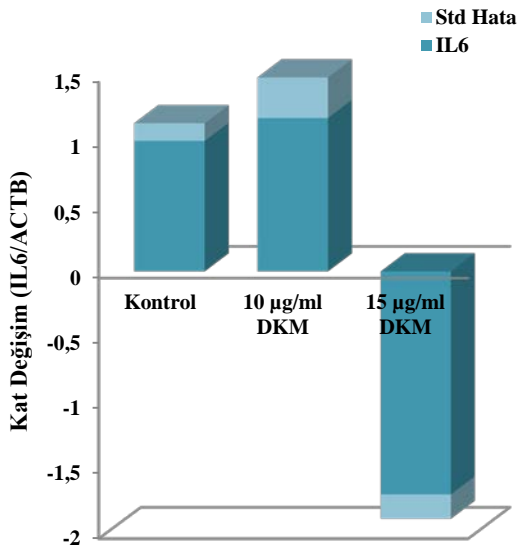
**Şekil 327.** DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.



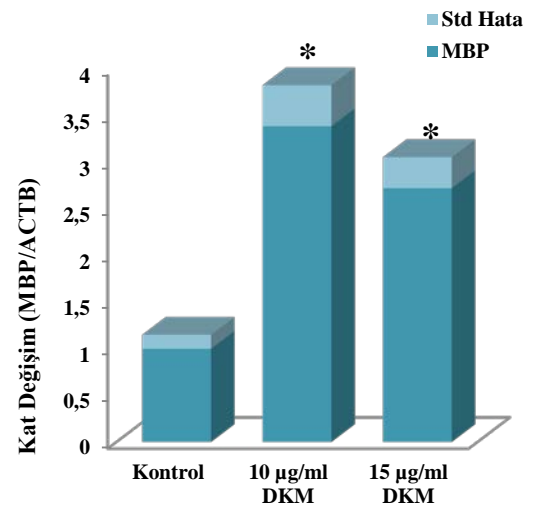
**Şekil 328.** DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.



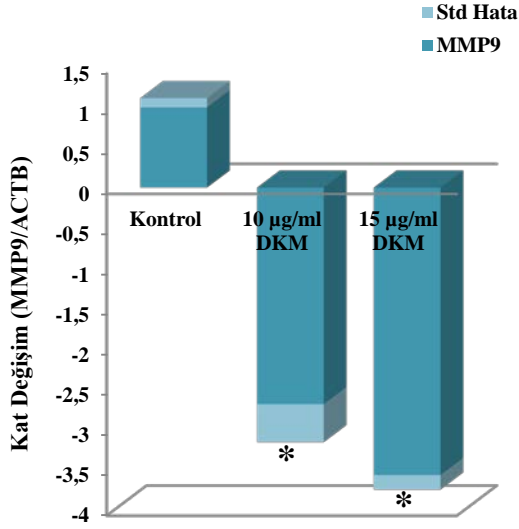
**Şekil 330.** DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde MAG mRNA seviyesine olan etkisi.



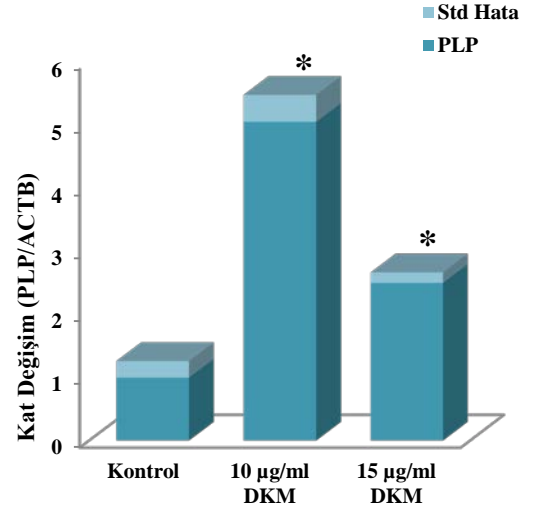
**Şekil 329.** DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.



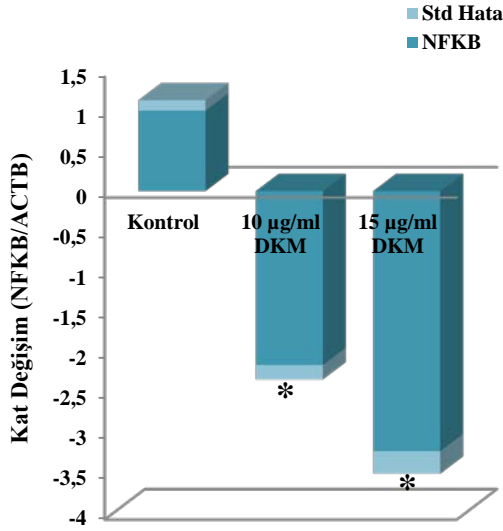
**Şekil 331.** DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde MBP mRNA seviyesine olan etkisi.



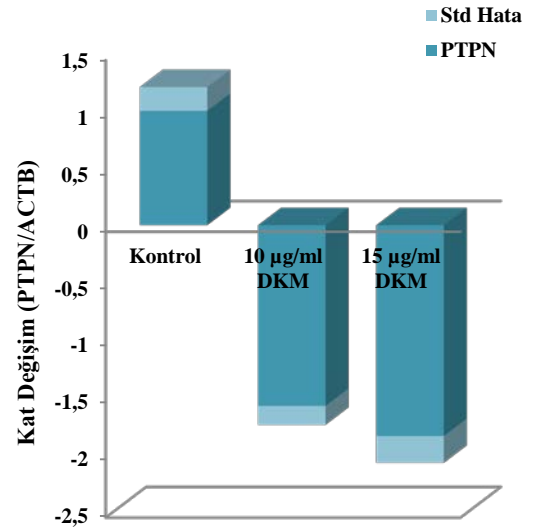
**Şekil 332.** DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.



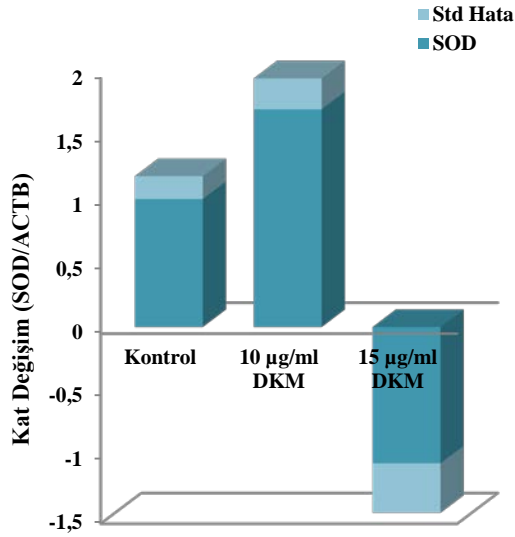
**Şekil 334.** DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde PLP mRNA seviyesine olan etkisi.



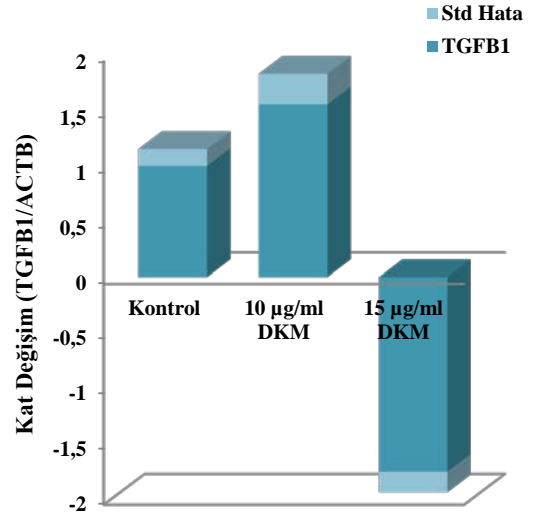
**Şekil 333.** DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde NFκB mRNA seviyesine olan etkisi.



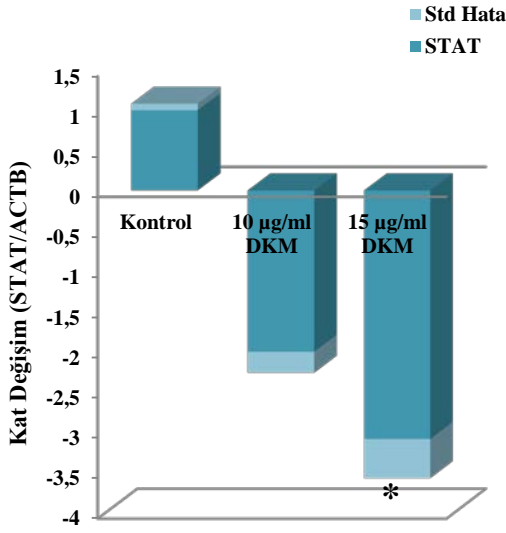
**Şekil 335.** DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.



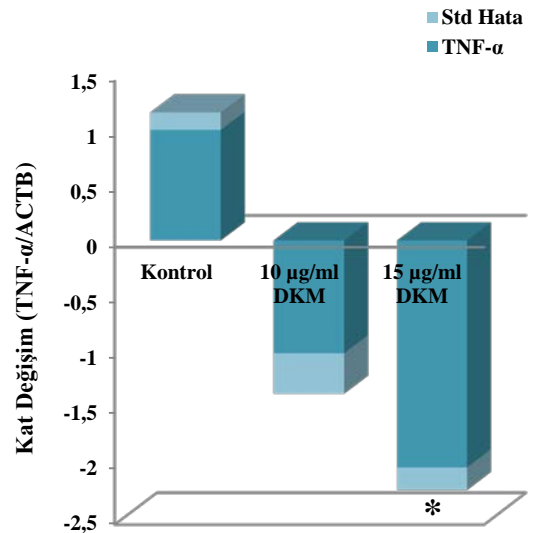
**Şekil 336.** DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde SOD mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 338.** DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 337.** DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde STAT mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 339.** DKM alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde TNF-α mRNA seviyesine olan etkisi.

### **3.3.3.3 Fare Primer Oligodendrosit Hücrelerinde Etil Asetat Alt Ekstresi Çalışmaları**

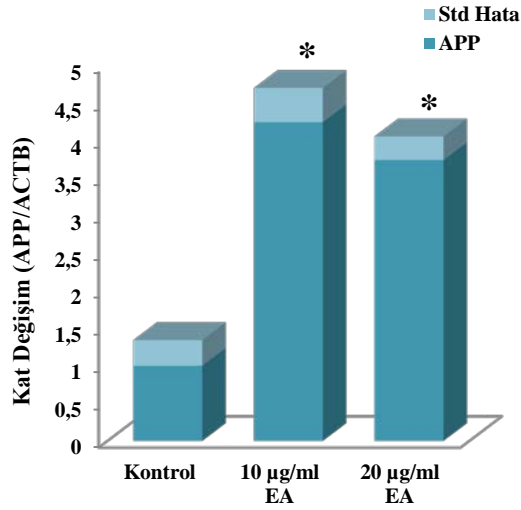
#### **3.3.3.3.1 Etil Asetat Alt Ekstresinin Fare Primer Oligodendrosit Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi**

Diğer iki hücre hattının EC05 ve EC10 dozundan yola çıkarak 10µg/ml ve 20µg/ml EA alt ekstresi konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi. Bu dozlar belirlendikten sonra hücrelere EA alt ekstresi uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı.

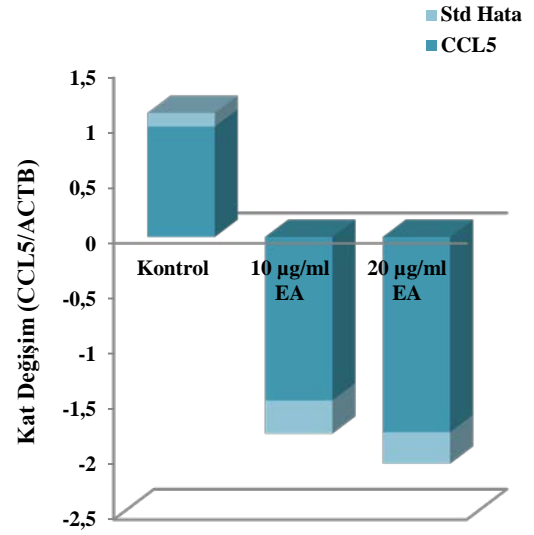
Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar ACTB ile normalize edilip; kontrol değerleri 1 alındı. (\*) ile işaretlenen gruplar  $P < .05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

Seçilen 20 adet genden fare primer oligodendrosit hücrelerinde EA alt ekstresi uygulanması sonucunda EC05 ve EC10 dozlarında IL6 2.9 ve 2 kat; sadece EC05 dozunda CXCL10 2.3 kat, PTPN 2.7 kat ve TNF- $\alpha$  5.9 kat anlamlı olarak baskılanmıştır. Bunun yanında her iki dozda GFAP 3.4 ve 9.2 kat, MBP 2 ve 6.2 kat ve STAT her iki dozda da 2.4 kat; EC10 dozunda ise CD4 2.5 kat, MAG 4.3 kat, SOD 2.5 kat ve TGFB1 2 kat anlamlı olarak artmıştır.

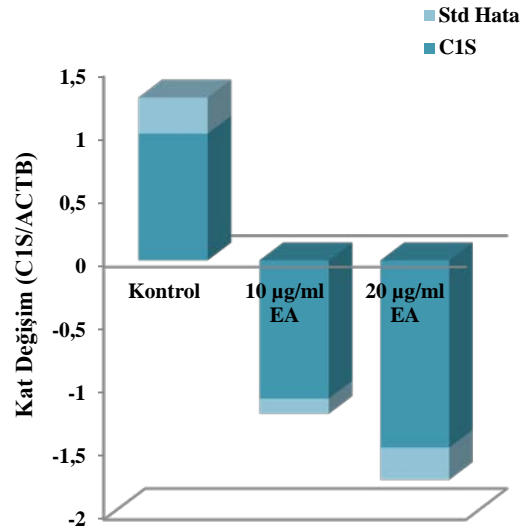
Fare primer oligodendrosit hücrelerinde EA alt ekstresinin belirlenen genler üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 340-359'da verilmiştir.



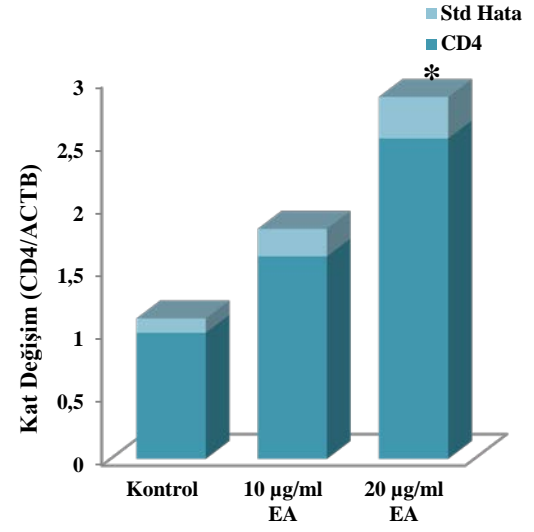
**Şekil 340.** EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde APP mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 342.** EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.

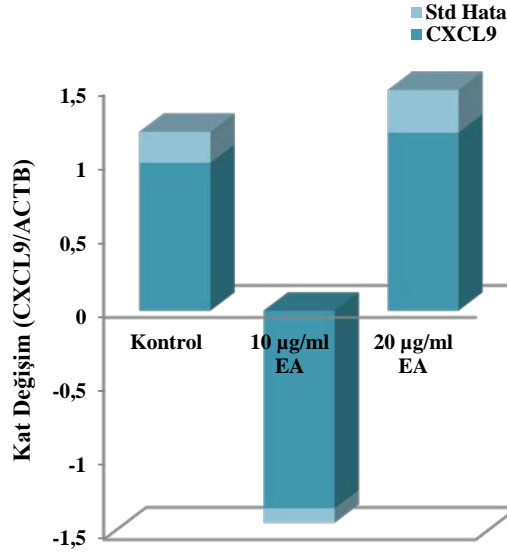


**Şekil 341.** EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde C1S mRNA seviyesine olan etkisi.

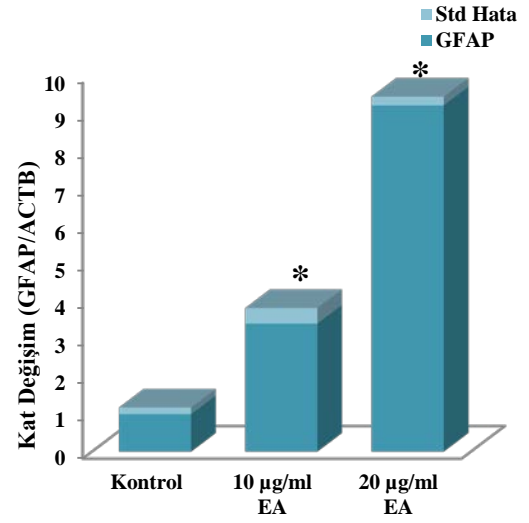


**Şekil 343.** EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.

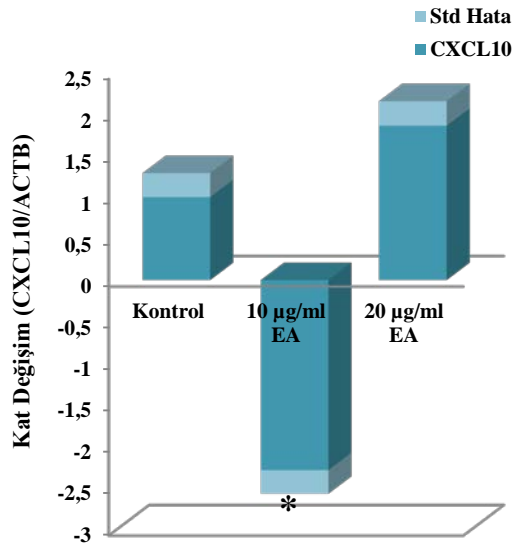




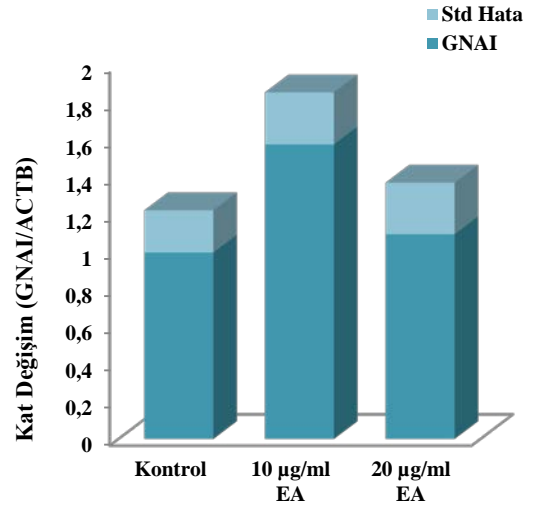
**Şekil 344.** EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.



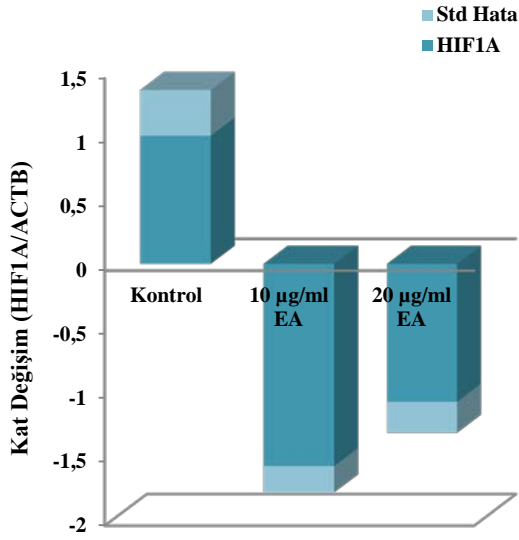
**Şekil 346.** EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.



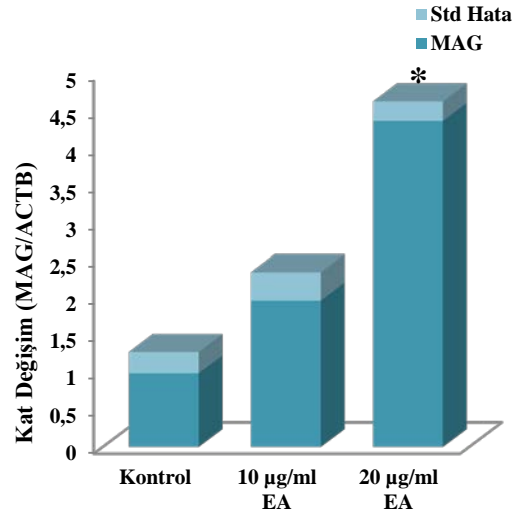
**Şekil 345.** EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.



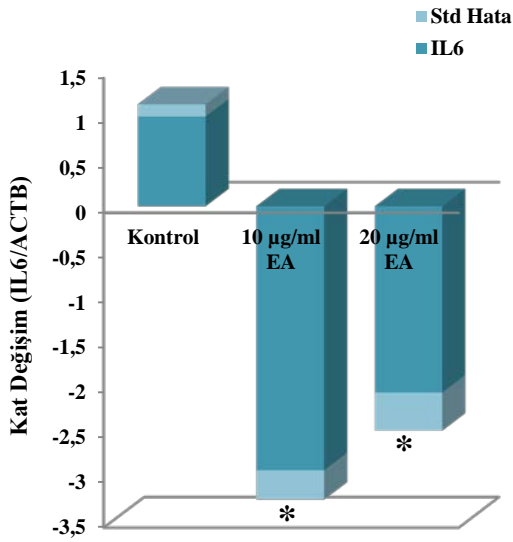
**Şekil 347.** EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.



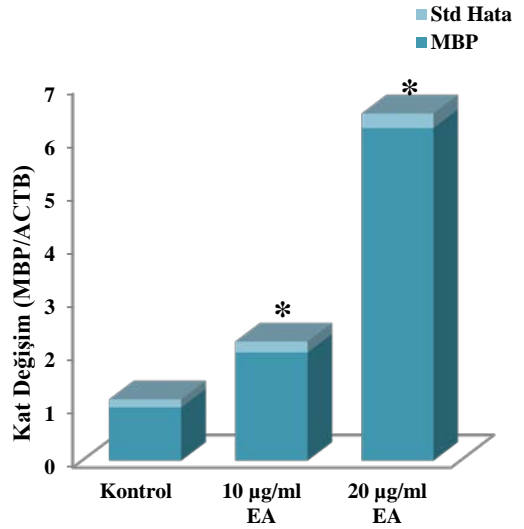
**Şekil 348.** EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.



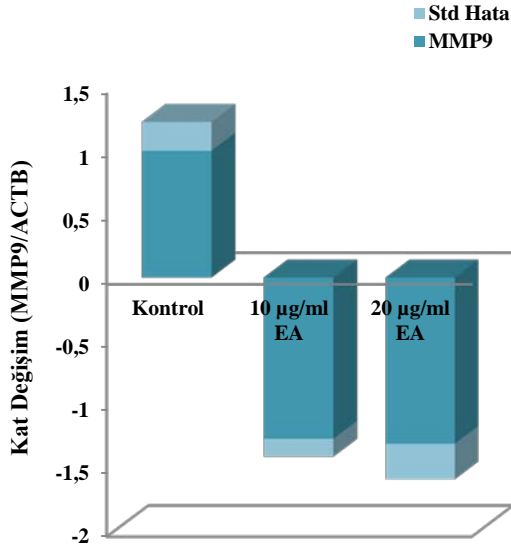
**Şekil 350.** EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde MAG mRNA seviyesine olan etkisi.



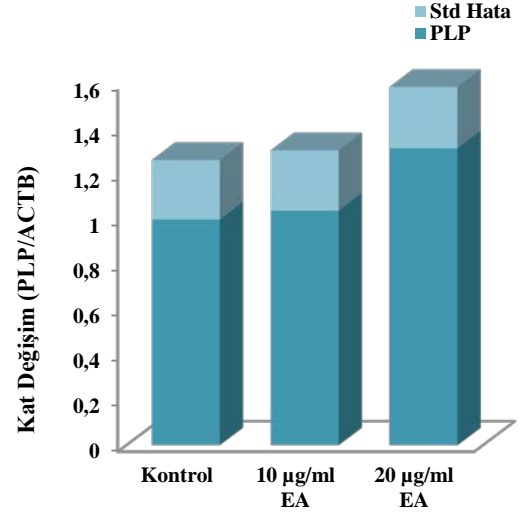
**Şekil 349.** EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.



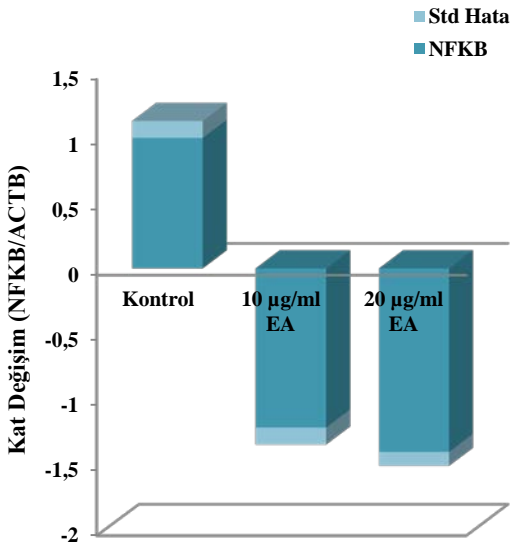
**Şekil 351.** EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde MBP mRNA seviyesine olan etkisi.



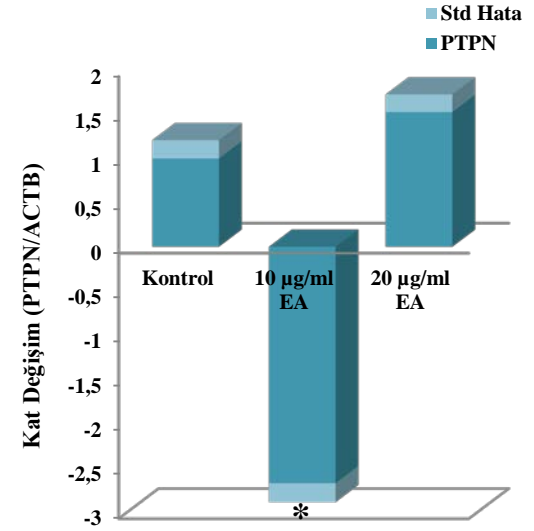
**Şekil 352.** EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.



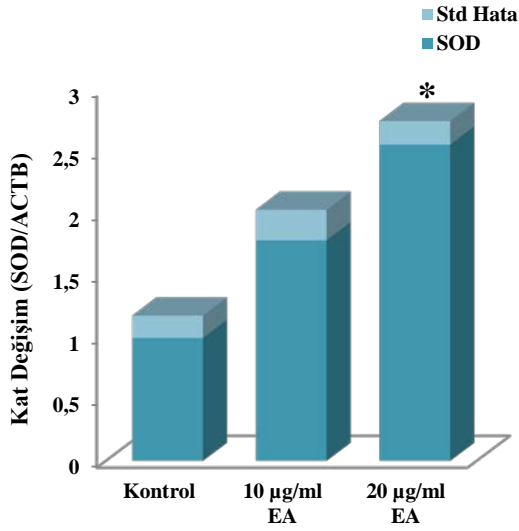
**Şekil 354.** EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde PLP mRNA seviyesine olan etkisi.



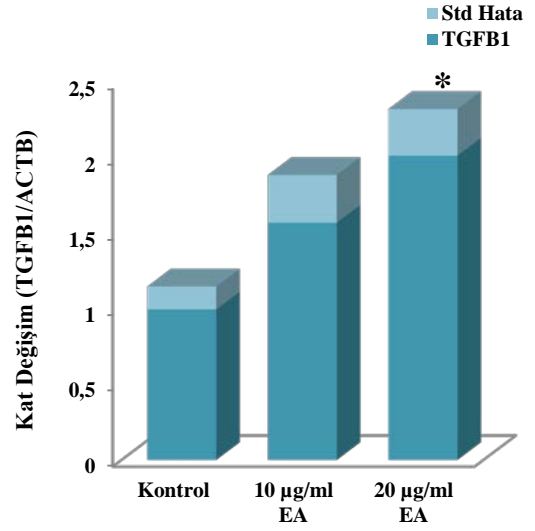
**Şekil 353.** EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde NFκB mRNA seviyesine olan etkisi.



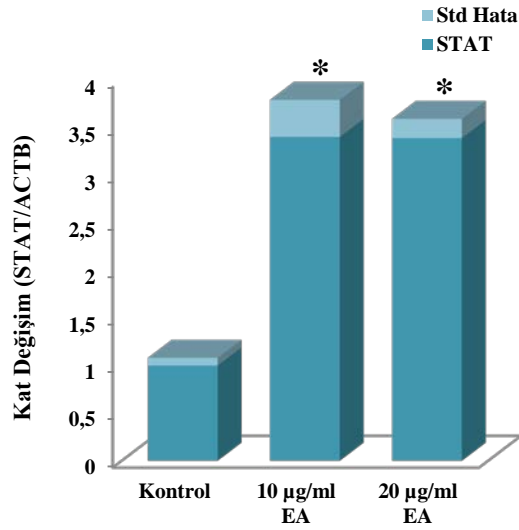
**Şekil 355.** EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.



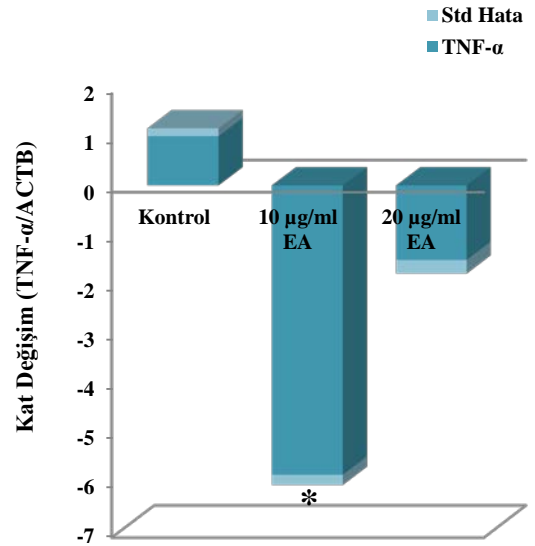
**Şekil 356.** EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde SOD mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 358.** EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 357.** EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde STAT mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 359.** EA alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde TNF-α mRNA seviyesine olan etkisi.

### **3.3.3.4 Fare Primer Oligodendrosit Hücrelerinde n-bütanol Alt Ekstresi Çalışmaları**

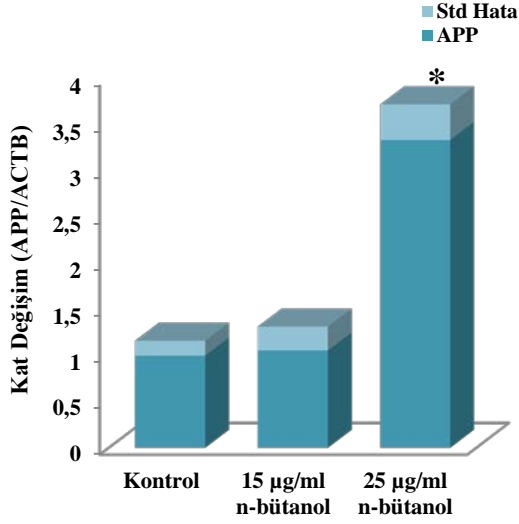
#### **3.3.3.4.1 n-bütanol Alt Ekstresinin Fare Primer Oligodendrosit Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi**

Diğer iki hücre hattının EC05 ve EC10 dozundan yola çıkarak 15 µg/ml ve 25 µg/ml n-bütanol alt ekstresi konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi. Bu dozlar belirlendikten sonra hücelere n-bütanol alt ekstresi uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı.

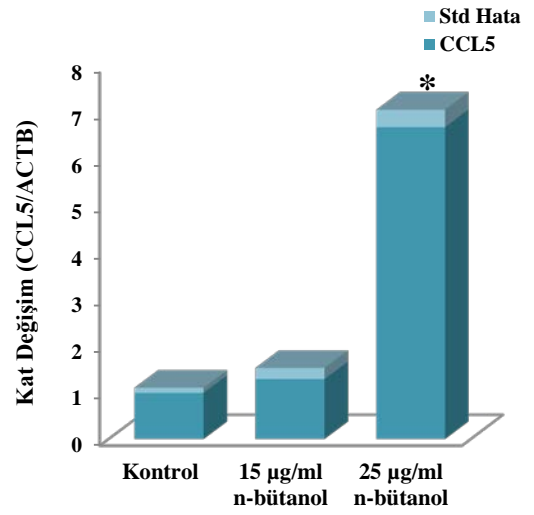
Yapılan tüm çalışmalarda sonuçlar ACTB ile normalize edilip; kontrol değerleri 1 alındı. (\*) ile işaretlenen gruplar  $P < .05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

Seçilen 20 adet genden fare primer oligodendrosit hücrelerinde n-bütanol alt ekstresi uygulanması sonucunda EC05 ve EC10 dozlarında IL6 7.1 ve 3.5 kat ve TGFB1 3.8 ve 3 kat; EC05 dozunda HIF1A 5.3 kat, MMP9 5.1 kat ve PTPN 2.1 kat anlamlı olarak baskılandı. Ek olarak EC10 dozunda APP 3.3 kat, CCL5 6.7 kat, CD4 2.6 kat, CXCL9 3.9 kat, MBP 2 kat, NFKB 3.1 kat ve PLP 2 kat anlamlı olarak artış gösterdi.

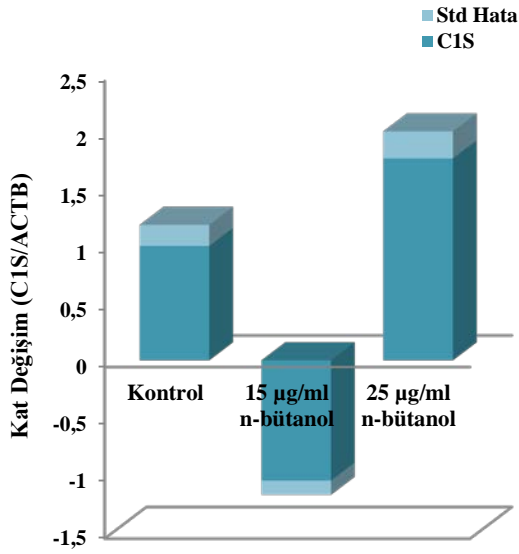
Fare primer oligodendrosit hücrelerinde n-bütanol alt ekstresinin belirlenen genler üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 360-379'da verilmiştir.



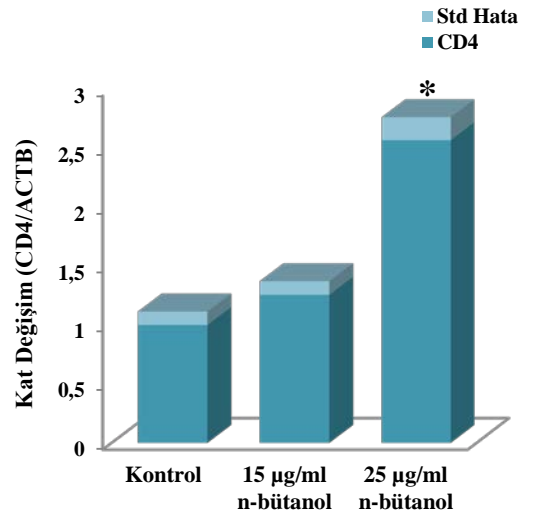
**Şekil 360.** n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde APP mRNA seviyesine olan etkisi.



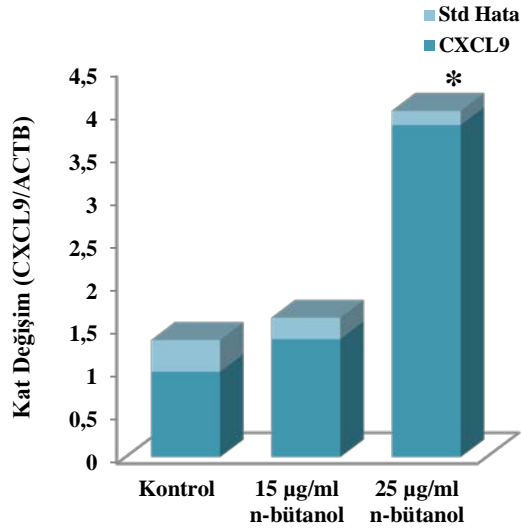
**Şekil 362.** n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.



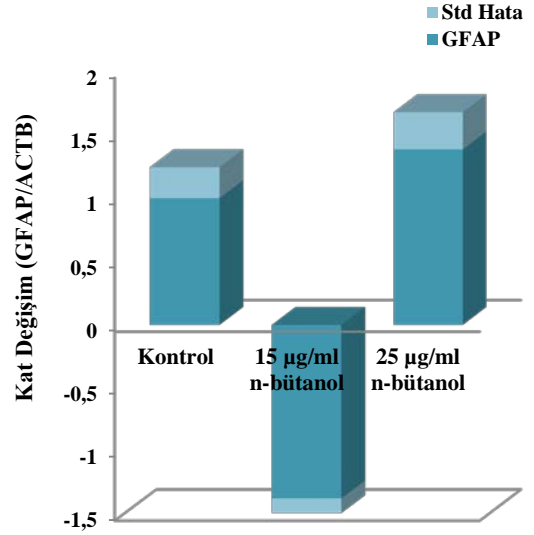
**Şekil 361.** n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde C1S mRNA seviyesine olan etkisi.



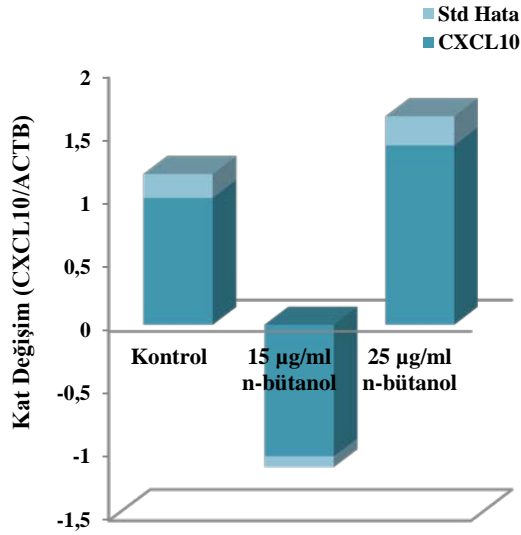
**Şekil 363.** n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CD4 mRNA seviyesine olan etkisi.



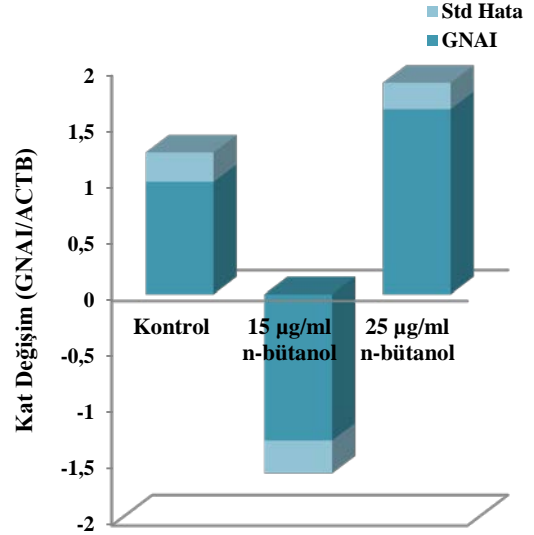
**Şekil 364.** n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.



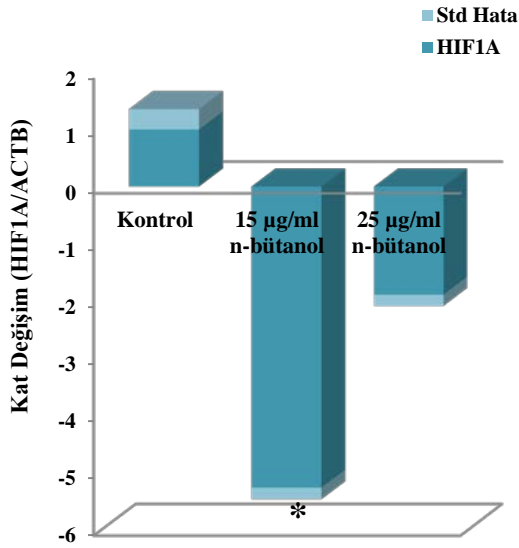
**Şekil 366.** n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.



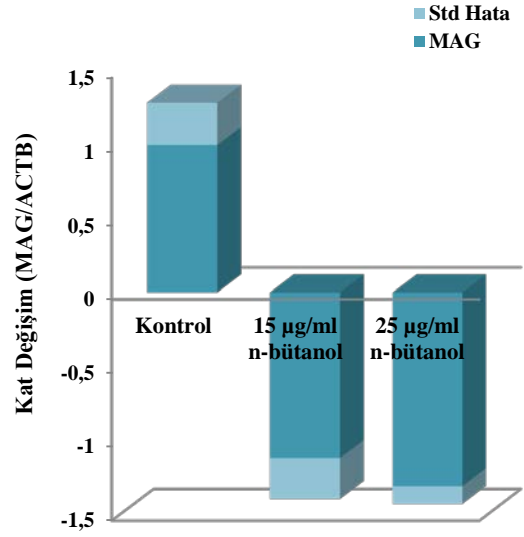
**Şekil 365.** n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.



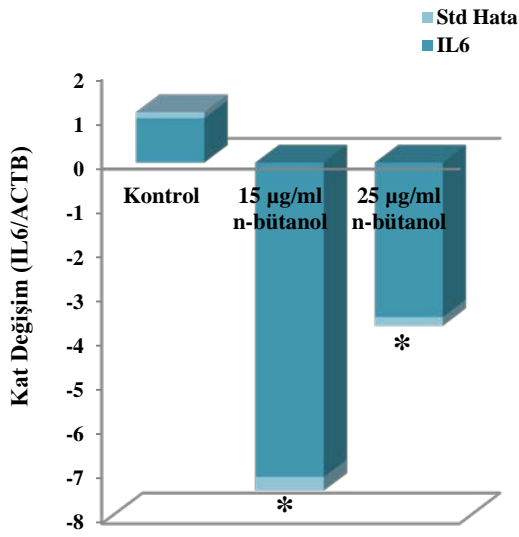
**Şekil 367.** n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.



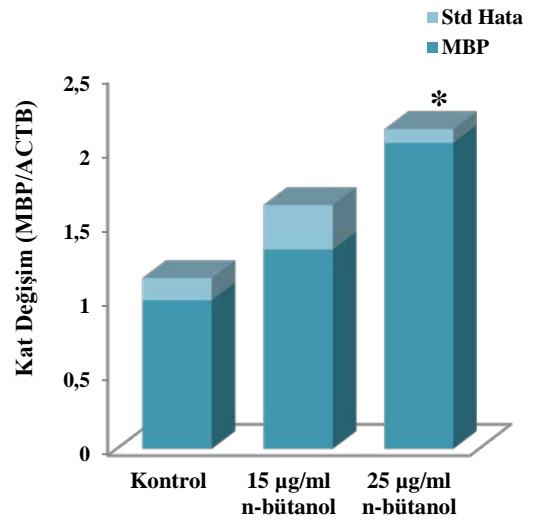
**Şekil 368.** n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 370.** n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde MAG mRNA seviyesine olan etkisi.

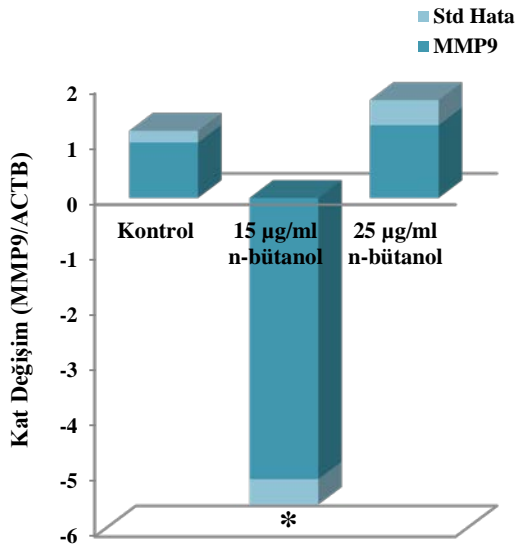


**Şekil 369.** n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.

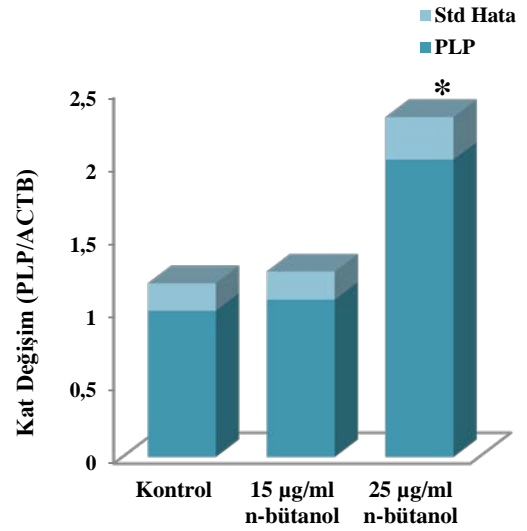


**Şekil 371.** n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde MBP mRNA seviyesine olan etkisi.

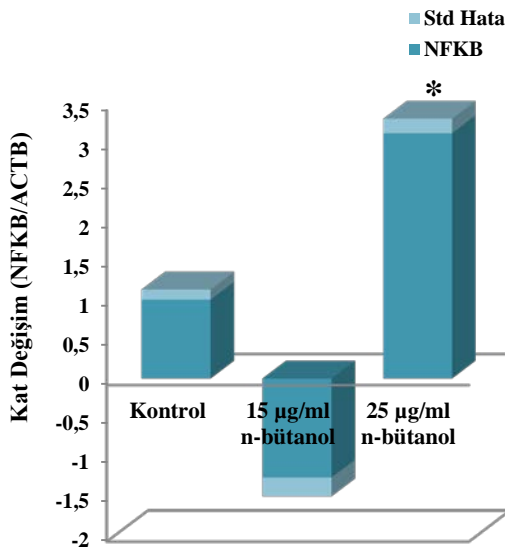




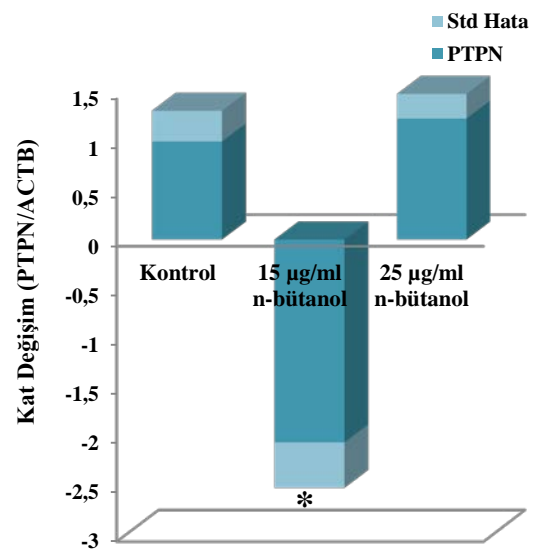
**Şekil 372.** n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.



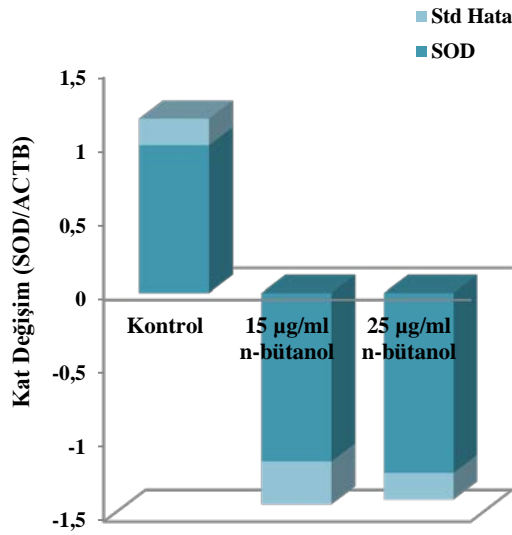
**Şekil 374.** n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde PLP mRNA seviyesine olan etkisi.



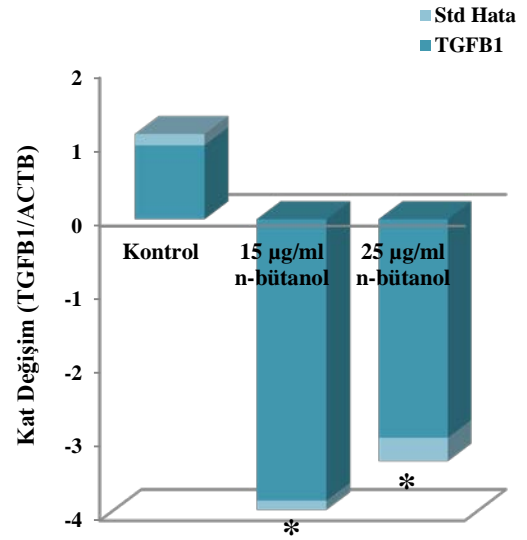
**Şekil 373.** n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde NFκB mRNA seviyesine olan etkisi.



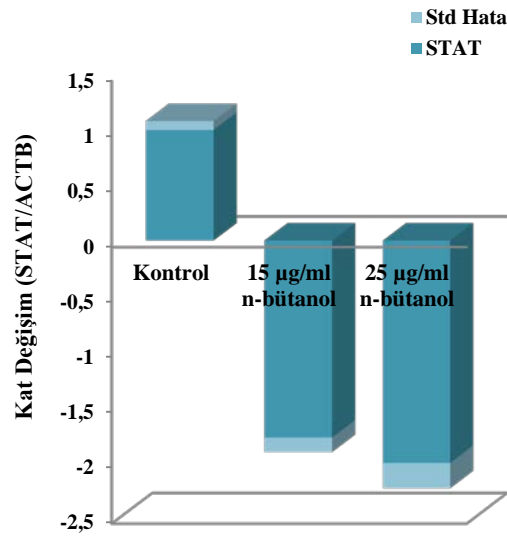
**Şekil 375.** n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.



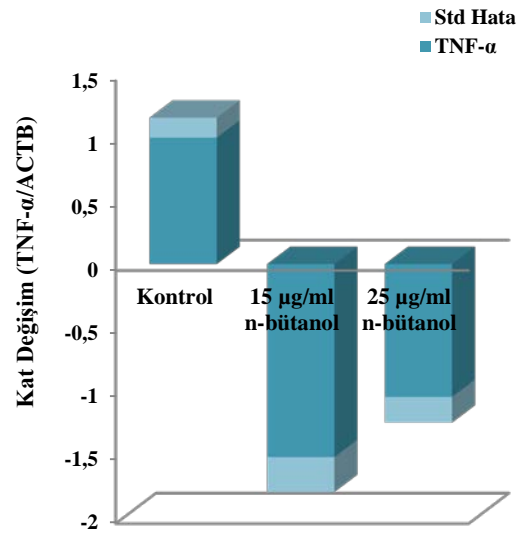
**Şekil 376.** n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde SOD mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 378.** n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde TGFβ1 mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 377.** n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde STAT mRNA seviyesine olan etkisi.



**Şekil 379.** n-bütanol alt ekstresinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde TNF-α mRNA seviyesine olan etkisi.

#### 4. TARTIŞMA

Multipl skleroz (MS) giriş bölümünde de detaylı olarak anlatıldığı gibi özellikle son yıllarda prevalansı giderek artan, dünyanın en yaygın nörolojik bozukluklardan biridir. Bununla birlikte hastalığın etiolojisinden ve patofizyolojisinden kaynaklanan bilinmeyenler ve hastalık karakterlerinin heterojen yapıda olmasından dolayı MS için hala tamamen etkin bir tedavi yöntemi yoktur. Günümüzde MS'in semptomatik tedavisinde kullanılan yedi adet FDA tarafından onaylanmış, hastalığı modifiye edici ilaç bulunmaktadır ancak bu ilaçlardan hiç birisi kesin tedavi sağlamamaktadır.

İlaç kullanımlarında görülen yan etkiler ve ekonomik nedenlerin yanında mevcut ilaçlardan tedavi anlamında tam verim alınamaması hastaların alternatif ve tamamlayıcı tıp arayışlarına yönelmesine neden olmaktadır. Kullanılan tıbbi ilaçların yanında Almanya'da yapılan bir araştırmada hastaların yaklaşık %62 oranında tamamlayıcı ve alternatif ürünlere yöneldiği gösterilmiştir (Apel ve diğ. 2005). Bu ürünlerden özellikle berberin (Ma ve diğ. 2010), kannabinoid (Zajicek 2011) ve üfolün (Dutra ve diğ. 2012) MS semptomlarını azaltıcı etkileri gösterilmiştir. Bunlardan da özellikle kannabinoid üzerine detaylı çalışmalar gerçekleştirilmiş ve ümit verici olduğu bildirilmiştir (Lakhan ve Rowland 2009). Ancak kannabinoidlerle ilgili en büyük soru işareti tedaviye ara verildiğinde ya da tedavi tamamen bırakıldığında ortaya çıkan nöropsikiyatrik bozukluklardır. Ayrıca kannabinoidlerin, çeşitli ksenobiyotik ve endojen maddeleri hücrelerden uzaklaştırmaya yarayan; kan-beyin bariyerleri oluşumunda önemli rol oynadığı için doku koruyucusu olarak kabul edilen P-glikoprotein inhibisyonuna bağlı ilaç-ilaç ya da ilaç-diyet etkileşim potansiyeli oldukça yüksektir (Zhu ve diğ. 2006).

Bu çalışmada özellikle Türkiye'de MS hastalarının tedavi için sıklıkla kullandığı *Capparis ovata*'dan elde edilen MSCov adını verdiğimiz, tamamen doğal maddeler kullanılarak, hiçbir kimyasal madde ya da çözücü kullanılmadan *Capparis ovata* bitkisi tomurcuk, meyve ve çiçek karışımından elde ettiğimiz (Türkiye Patent Enstitüsü, 2012/04 093) ekstrenin iyileştirici etkisi fraksiyonlanarak alt ekstrelerde ve izole edilen saf bileşikler düzeyinde tanımlanmaya çalışıldı. Tez kapsamında

MSCov ekstresinin fraksiyonlanması ve aktif bileşiklerin izolasyonu Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU'nun laboratuvarında gerçekleştirildi. Alt ekstreler ve özellikle aktif bileşikler miligram ve mikrogram düzeyinde elde edildiği ve hiçbir şekilde hayvan deneyleri için yeterli olmaması nedeniyle bu bileşikler *in vitro* ortamda çalışıldı. Bu aşamada hücre kültürü için hayvan modeli ile uyum sağlayabilecek hücre hatları [insan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y) ve insan lenfoblastoma hücre hattı (CCRF-CEM)] ve kontrol hücreler olarak seçilen fare primer oligodendrosit hücreleri kullanıldı.

Hücre kültüründe çalışılacak genlerin belirlenmesi ve sonuçların *in vivo* ve *in vitro* olarak karşılaştırılabilmesi amacıyla fare MS modeli olan deneysel alerjik ensefalomyelit (DAE) oluşturuldu. DAE merkezi sinir sistemi (MSS)'nde görülen ve insanları etkileyen en yaygın nörodejeneratif hastalık olan MS için geliştirilmiş hayvan modelidir (Constantinescu ve diğ. 2011). DAE Freund Complete Adjuvant içerisinde emülsifiye edilmiş miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG), proteolipit protein (PLP), miyelin temel protein (MBP) gibi merkezi sinir sistemi (MSS) kaynaklı yani hayvanın kendi miyelin yapısında var olan kendi antijeniyle indüklenir ve deneysel MS modeli için en genel kabul edilen ve yaygın çalışılan modeldir (Rangachari ve Kuchroo 2013). Bağışıklık yanıtını arttırmak için antijenle birlikte hayvana enjekte edilen *Pertussis toxin* (Boğmaca toksini) kan beyin bariyeri (KBB) geçirgenliğini ve dolayısıyla MSS'ne lökosit göçünü artırır (Kerfoot ve diğ. 2004). DAE modeli özellikle hastalık patojenezinin aydınlatılmasında ve MS için yeni terapötik ajanların test edilmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Çünkü DAE histopatolojik ve immünolojik olarak MS'e en çok benzeyen modeldir. Ayrıca, diğer modellerin aksine tamamen otoimmün karakterli bir modeldir ve virüs ya da diğer toksin etkinliğini içermez (Tsunoda ve diğ. 2010; Bataulis ve diğ. 2011). MS tedavisinde günümüzde kullanılmaya devam edilen immünmodülatör terapi ajanları olan glatiramer asetat ve natalizumab DAE çalışmaları sayesinde geliştirilmiştir (Sela ve diğ. 1990; Yednok ve diğ. 1992).

Moleküler toksikoloji, çeşitli ksenobiyotik ajanların canlı organizmalar üzerinde etkilerini moleküler gen ekspresyon düzeyinde inceleme çalışmalarıdır. İlaç-vücut etkileşimlerinin anlaşılması ilaç geliştirme için çok önemlidir. Bu çalışmalar olası yan etkiler için anahtar anlayışlar sunarak ilaç geliştirme

programlarının her aşamasında önem arz etmektedir. Laboratuvarımızda 112S187 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında MSCov ekstresi 500 mg/kg/gün olacak şekilde C57BL/6 farelere 21 gün boyunca gavaj kullanarak içirildi ve süre sonunda farelerin karaciğerleri alınarak moleküler toksikolojik çalışmalar gerçekleştirildi. Bu çalışmada toksik etkiye aktif şekilde yanıt olan 13 farklı biyolojik yolakta yer alan 380 anahtar gen ve 4 adet normalizasyon (housekeeping) geninin ekspresyonları çalışıldı. Seçilen biyolojik yollar (apoptoz, nekroz, DNA hasarı ve tamiri, mitokondriyal enerji metabolizması, yağ asidi metabolizması, oksidatif stres, ısı şok tepkisi, katlanmamış protein stresi, sitokrom P450 ve ilaç metabolizması, steatoz, kolestaz, fosfolipidoz ve immün tepki) çok geniş bir yelpazede veri üretecek şekilde ve temel genler olarak seçildi. Bu sayede MSCov ekstresinin yan etki potansiyeli hakkında bilgi sahibi olunmuştur. Bu bağlamda 380 adet genden sadece 11 tanesi kontrole göre farklılık (anlamlılık derecesi  $\pm 2$  kat olarak belirlenmiştir) göstermiştir (Celik ve diğ. 2014). Bu genler apoptotik yoldan 1 gen (CD40Ig), DNA hasarı ve tamiri ilişkili 2 gen (Mgmt ve Ogg1), ısı şok tepkisi ilişkili 1 gen (HspB7), kolestaz ilişkili 3 gen (Abcc2, Abcc3 ve Apoe), fosfolipidoz ilişkili 1 gen (Sc4mol) ve immün yanıt ilişkili 3 gen (Ahr, Apof ve Hrg)'dir. Bu genlerin tamamı kontrol değerlere göre artış göstermekle birlikte artış değerleri aslında hiçbir gen için 2,5 kat değerinin üzerine çıkmamıştır. Anlamlılık düzeyinin  $\pm 2$  olduğu göz önünde bulundurulduğunda aslında bu genlerdeki değişimlerin dramatik değişimler olmadığını, sıfır değerlerde olduğunu söylemek mümkündür. Elde edilen bu sonuçlar MSCov'un yan etki potansiyelinin oldukça düşük olduğunu ve MS tedavisinde alternatif ve tamamlayıcı tedavi ajanı olarak güvenle kullanılabileceğini gösteren oldukça önemli verilerdir.

Çalışmamızda hücre kültüründe çalışacak olduğumuz genleri belirlemek ve aynı zamanda hücre kültürü sonuçlarıyla karşılaştırma yapabilmek adına DAE modeli oluşturduk. Öncelikle, hastalığın klinik skor olarak pik değerlere ( $3,5 \pm 0,5$ ) ulaştığı durumlarda hasta farelerden "MSCov tedavi grubu" oluşturuldu ve bu gruba 21 gün boyunca 500 mg/kg/gün MSCov ekstresi verildi. Diğer bir grubumuz ise deney protokolü süresince önce hastalık oluşturulup, tedavi hayvanlar ile aynı koşullarda tutulan ve herhangi bir uygulama yapmadan deney sürecinin sonunda tedavi uygulamaları ile birlikte ötenazi edilerek dokuları alınan hayvanlardır. Bu grup, paralel hastalar anlamına gelen PDAE ile kodlandı. Bu grubun deney

protokolüne dahil edilme nedeni; hasta edilmiş hayvanların bekleme süreçlerinde kendiliklerinden gösterdikleri iyileşme ve etkileri, tedavi etme amaçlı uygulanan deney protokolü ile oluşturulan iyileştirme etkileriyle karşılaştırarak daha doğru sonuçlar üretilmesidir. Şekil 11’de verilen skorlama grafiğinden de anlaşıldığı üzere, hasta farelere MSCov tedavisi uygulandığı günden itibaren hastalık skorlarında ciddi gerilemeler söz konusudur. Bunun yanında PDAE grubunda hala yüksek seyreden hastalık skorları bu iyileşmenin zamanla alakalı olmadığını bir göstergesidir.

Deney aşaması hayvanların ötenazi edilerek beyin dokularının alınması ile sonlandırıldı. Beyin dokularından izole edilen RNA’lar kullanılarak kontrollere göre anlamlı olarak değişen gen ifadeleri fare MS dizin (array) kullanılarak saptandı. Bu çalışmalar neticesinde 20 adet gen saptadık. Bu genler enflamasyon/sitokin/kemokin ilişkili genler (CCL5, CXCL9, CXCL10, HIF1A, NFKB, PTPN11, STAT3, TNF  $\alpha$ ); miyelin ilişkili genler (MAG, MBP, PLP, SOD); T-hücre aktivasyonu ilişkili genler (CD4, IL6, TGFB1); kalıtsal bağışıklık (adaptif immünite) ilişkili genler (C1s); apoptoz ilişkili genler (MMP9); hücre adezyonu ilişkili genler (APP) ve diğerleri (GFAP, GNAI) şeklinde gruplandı.

İncelendiğinde MS array yapılarak DAE ve kontrol grubu arasında farklılık gösteren bu genlerin MS patofizyolojisi ile bir şekilde ilgili olduğu görülmektedir. Öncelikle hayvan deneylerinden elde edilen sonuçlar ve bu genlerin tez ile ilgi ve önemini açmak ve yorumlamalar getirebilmek için kısa kısa teorik bilgiler ele alınarak yapılan değerlendirmeler aşağıda verilmektedir.

İlk değişkenlik gösteren gen beyinde yüksek oranda ekspres olan büyük bir transmembran glikoprotein ve nöronal büyüme gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde yer alan (Wang ve diğ. 2016) amiloid prekürsör protein (APP)’dir. Bizim çalışmamızda APP DAE grubu hayvanlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmıştır. MSCov tedavi grubunda ise APP mRNA ekspresyon düzeyinde kontrole göre bir miktar azalma söz konusudur. Sağlıklı koşullarda APP immunohistokimyasal boyama ile tespit edilemezken; aksonal hasar ve aksonal transportta bozulma ve nörodejenerasyon gibi süreçlerde APP birikimi söz konusudur (Kuhlmann ve diğ. 2002). Alzheimer hastalığından, APP'nin  $\beta$ -sekretaz yoluyla bölünmesinin nörotoksik A $\beta$  ve APP-hücre içi domain oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Nöronlarda biriken A $\beta$ 'nin nörodejeneratif bir hastalık olduğu

bilinen Alzheimer'ın gelişiminde çok önemli bir adım olduğu bilinmektedir (O'Brien ve Wong 2011). MS lezyonlarında önemli bir belirteçtir. MS lezyonlarında APP-pozitif akson sayısı hastalığın süresi ile ilişkilendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda çoğu APP pozitif akson, hastalık başlangıcından sonraki ilk yıl içerisinde tespit edilmiş, ancak akut aksonal hasar da hastalık süresi 10 yıl ve daha uzun olan hastaların lezyonlarında ise daha az saptanmıştır (Kuhlmann ve diğ. 2002). Bizim çalışmamızda da DAE grubu farelerde ekspresyon düzeyinin artması literatürle örtüşen sonuçlar olarak karşımıza çıktı.

C1S geni kalıtsal bağışıklıkta rol oynayan, klasik kompleman sistemi yolunun ilk bileşenini oluşturmak için C1q ve C1r ile kompleks oluşturan ve C2 ve C4'ü aktive eden bir serin proteazdır. Kompleman sistemi, enfeksiyon ve öz bağışıklık sistemi hastalıklarına karşı önemli bir savunma sağlar (Gal ve diğ. 2002). Kompleman sistemin aktive olması, Alzheimer ve MS gibi infeksiyöz olmayan nörodejeneratif hastalık varlığında ortaya çıkar (Yashojima ve diğ. 1998; Ingram ve diğ. 2009). Çalışmamızda DAE oluşturulan hayvanlarda C1S ekspresyon düzeyi yaklaşık 7 kat artmıştır. MSCov ile tedavi sonucunda ise ekspresyonu kontrol değerlerine dönmüştür. MS'de ortaya çıkan kompleman sistem aktivasyonundan özellikle oligodendrositlerin hasar gördüğü bilinmektedir (Prineas ve diğ. 2001). Hatta bazı çalışmalar C1S artan serum düzeylerinin biyomarkör (belirteç) olarak kullanılabilirliğini ileri sürmektedir (Ingram ve diğ. 2012). Yukarıda belirtildiği gibi C1S ile yapılan literatür taraması kanıtları bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Çalışmamızda DAE grubu farelerde ekspresyonu ikinci en çok artan gen (78 kat) RANTES adıyla da bilinen CCL5, monositler, bellek T-yardımcı hücreler, makrofajlar ve eozinofiller için kemo-çekicidir (kemokindir) yani bunların hareketlerini kontrol etme kabiliyetine sahiptir. Bu özelliği nedeniyle inflamatuvar hastalıklarda ve kanserde kritik rol oynar (Rot ve von Andrian 2004; Ransohoff 2006; Bajetto ve diğ. 2002; Viola ve Luster 2008). Yapılan çalışmalarda hastalığın aktif formunda olan MS hastalarının beyin-omurilik sıvılarındaki CCL5 konsantrasyonunun sağlıklı bireylerle ve hastalığın inaktif aşamasındaki hastalarla karşılaştırıldığında büyük oranda arttığı ve CCL5'in MS hastalığı için biyobelirteç olduğunu göstermektedir (Tomioka ve Matsui 2014; Mori ve diğ. 2016). Yapılan çalışmalarda şu an MS tedavisinde kullanılan tedavilerin çoğunun CCL5'in ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Örneğin interferon  $\beta$ -1b

ilacının kullanımı CCL5'in periferik kanda ve mononükleer hücrelerde aşırı üretimini engeller (Iarlori ve diğ. 2000), benzer şekilde MS tedavisinde onaylanmış bir ilaç olan glatiramer asetatın, insan U-251 MG astrositlerinde TNF- $\alpha$  kaynaklı CCL5 mRNA aşırı ekspresyonunu azalttığı rapor edilmiştir (Li ve diğ. 2000). Fingolimod ile tedavi sonrasında DAE farelerin merkezi sinir sisteminde CCL5'in endojen içeriğinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Bonfiglio ve diğ. 2017). Benzer şekilde DAE oluşturulan farelerde 78 kat arttığı gösterilen CCL5 mRNA ekspresyon düzeyi MSCov tedavisi sonrasında yaklaşık olarak 5 kat değerine düşmüştür (Ozgun-Acar ve diğ. 2016). Bu sonuçlar MSCov'un özellikle ciddi anti-nöroenflamatuvar ve immün supresif etkinliğini ortaya koymaktadır.

“Disease” veri bankasında MS'in yanısıra birçok başka hastalık ile de ilişkilendirilen CD4 antijeni ya da T-hücre yüzey glikoproteini olan CD4, ana histouyumluluk kompleksi (MHC) sınıf II antijen/T hücre reseptörü etkileşimleri için yardımcı protein/reseptördür ve bizim çalışmamızda DAE grubu farelerde ekspresyonu anlamlı olarak artan bir diğer genidir. Bu gen, T lenfosit hücrelerinde MHC sınıf II antijenler ile etkileşime giren bir membran proteini kodlar ve aynı zamanda insan immün yetmezlik virüsü için de bir reseptördür (Brady ve diğ. 1993). Bu gen, sadece T lenfositlerde değil aynı zamanda B hücreleri, makrofajlar ve granülositlerde de ifade edilir. Aynı zamanda, beyin belirli bölgelerinde de ifade edilir. Bu protein T-hücre aktivasyonunun erken döneminde aktivasyon başlatıcı ve artırıcı olarak işlev yapmasından dolayı merkezi sinir sisteminde enfeksiyon veya bağışıklık aracılı nöronal hasar oluşunda önemli bir rol oynar (Chitnis 2007). T lenfositleri, MS patojenezinde merkezi bir rol oynamaktadır. Akut lezyonlarda baskın olan CD4<sup>+</sup> T hücreleri iken kronik lezyonlarda daha sık gözlenen CD8<sup>+</sup> T hücreleridir (Raine 1994). Aktive edilmiş miyelin reaktif CD4<sup>+</sup> T hücreleri, MS hastalarının kanında ve beyin omurilik sıvısında (BOS) bulunur.

Kemokinler farklı hücre tiplerini aktive eden ve selektif olarak onlarla ilişki içerisinde olan bir sitokin ailesidir. Kemokinler çeşitli lökosit türlerini enfeksiyon ve enflamasyon bölgelerine çeken ve bunların trafiğini düzenleyen küçük polipeptid araçlar (8-14 kDa) grubudur (Charo ve Ransohoff 2006; Szczucinski ve diğ 2011). CXCL9 ve CXCL10 (sırasıyla interferon- $\gamma$  tarafından indüklenen monokin, interferon-indüklenebilir protein-10) ile birlikte bunların reseptörü olan CXCR3 MS patojenezinde oldukça önem arz eder. Bizim çalışmamızda DAE grubunda



ekspresyonu 79 kat ile en fazla artan gen CXCL10'dur. Yine CXCL9 ekspresyonu ise DAE grubunda 13 kat artarak çalışmalarımıza dahil edilmiştir. CXCR3 reseptörü, MS'li hastaların BOS'ndaki T hücrelerinin çoğunluğunda ekspres edilir ve bu da CXCR3 reseptörünün T hücrelerinin merkezi sinir sistemine yönlendirilmesine aracı olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda nöks sonrasında MS'li hastaların BOS'larında yüksek CXCL9 ve CXCL10 miktarları saptanmıştır (Mazzi 2015). Bunun yanında CXCL10'un MS'de lökosit göç faktörü olarak ve pro-enflamatuvar reaksiyonlara aracılık ederek demiyelinizasyon sürecini teşvik edici etki gösterdiği gösterilmiştir (Muller ve diğ. 2010). CXCL9 geni mRNA ekspresyon düzeyi MSCov tedavisi ile 2 kat ve CXCL10 mRNA ekspresyon düzeyi ise 6 kat değerlerine baskılanmıştır.

Beyin spesifik bir ara filament ve sitoiskelet protein ailesi üyesi olan Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP), aksonal dejenerasyon ve astrogliozisten sonra oldukça hızlı salınması nedeniyle potansiyel bir BOS biyobelirtecidir (Madeddu ve diğ. 2013; Storoni ve diğ. 2012; Petzold 2015). Astrogliozis ile ilişkili aksonal hasar, MS patojenezinde oldukça önemli olduğu için, astrositik hasar için yüksek spesifitesi olan GFAP, MS için tanısal bir biyolojik belirteç görevi görmektedir (Abdelhak ve diğ. 2015). Progresif MS alt tipleri ve sürekli beyin dokusu hasarı olan hastalarda ayrıca deneysel MS modelinde, yükselmiş GFAP seviyeleri daha önce birçok çalışmada rapor edilmiştir (Malmeström ve diğ. 2003; Norgren ve diğ. 2004). Bizim çalışmamızda GFAP; DAE modelinde yaklaşık 5.5 kat artış gösterdiği için ilerleyen çalışmalara dahil edilmiştir. MSCov tedavi sonucunda GFAP ekspresyon düzeyi kontrol değerlerine geri dönmüştür.

GNAI guanin nükleotid bağlama proteinleri (G proteinleri) alfa alt birimi proteini kodlar. Kodlanmış protein guanin nükleotid bağlama domaini içerir ve adenilat siklazın hormonal düzenlenmesinde yer almaktadır. Ayrıca GNAI2 hücre canlılığı ve göçünü düzenleyen etkilere sahiptir (Raymond ve diğ. 2014). Bu genin MS hastalığı ile ilişkisini gösteren çalışma yoktur. MS array'de DAE grubunda ekspresyonu anlamlı olarak arttığı için deneylerimize dahil edilmiştir.

Hipoksi indüklenebilir faktörü 1-alfa, HIF1A geni tarafından kodlanır, heterodimerik transkripsiyon faktörünün hipoksi ile tetiklenebilen bir alt-birimidir (Semenza ve diğ. 1996). Gen ifadesinin hipoksi-bağımlı regülasyonu, HIF1A gibi

hipoksiye duyarlı transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesine aracılık eder. HIF1A birikimi ile karakterize edilen hipoksi-benzeri doku değişiklikleri, MS patojenezinde çok erken bir evrede ortaya çıkar ve bu durumun KBB bozulmasıyla da doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir (Le Moan ve diğ. 2015). HIF1A'nın MS hastalarının demiyelinizan lezyonlarında upregülasyonu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Graumann ve diğ. 2003; Zeis ve diğ. 2008). Pre-demiyelinizan plaklarda oluşan erken hipoksik değişikliklerin, mikrogliya aktivasyonu, periferik lenfosit birikimi, KBB bozulması ve hafif aksonal yaralanma ile ilişkisi yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (Marik ve diğ. 2007). Bizim çalışmamızda bu genin ekspresyon düzeyi DAE grubunda 5 kat artarak literatürle örtüşen veriler olarak karşımıza çıktı. Bu genin ekspresyon düzeyi MSCov tedavi grubunda kontrol değerlerine geri dönmüştür. HIF1A geninin MS hastalığının yanı sıra Sepsis (Peyssonnaud ve diğ. 2007; Thiel ve diğ. 2007), romatizmal artrit ve inme dahil olmak üzere iltihaplanma ve nörodejenerasyonla seyreden hastalıklarda hastalığın ilerlemesi üzerinde kuvvetli bir etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Cramer ve diğ. 2003).

İnterlökin 6 (IL-6) ve sitokin ailesinin diğer üyeleri, T hücreleri, B hücreleri ve dendritik hücreler üzerindeki çeşitli etkilerle bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinde önemli roller oynamaktadır ve MS gibi otoimmün hastalıkların patojenezinde rol alır. MS'de IL-6, bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinde merkezi bir role sahiptir (Janssens ve diğ. 2015); DAE'de, IL-6 geni susturulmuş fareler hastalık indüksiyonuna direnç göstermektedir (Eugster ve diğ. 1998). IL-6, DAE modelinde CD4<sup>+</sup> T hücrelerinden Th17 hücre farklılaşmasında önemli bir role sahiptir. IL6 baskılanmış farelerde DAE patojenezinde görülen MSS'ne geçen Th17 hücrelerinde azalma görülmüştür; bu sonuçlar da IL6'nın hastalık patojenezindeki rolünü açıkça ortaya koymaktadır (Bettelli ve diğ. 2006; Serada ve diğ. 2008; Kimura ve Kishimoto 2010; Murphy ve Lalor 2010). MS dizin analiz çalışmalarında IL6 düzeyi DAE grubunda kontrole göre yaklaşık 6 kat artış göstermiştir ve çalışmalarımıza dahil edilmiştir.

MS dizin çalışmalarımız ile farklılık tespit ettiğimiz genler arasında miyelin proteinlerini kodlayan genlerde mevcuttur. Yukarıdaki grup genlerde artış gözlenirken, miyelin ilişkili genlerin tamamında DAE grubunda baskılanma gözlenmiştir.

MS oluşumunda miyelin proteinleri özellikle, miyelin temel protein (MBP), proteolipit protein (PLP), miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG) ve miyelin ilişkili glikoprotein (MAG) otreaktif T hücrelerinin hedefleridir (Sun ve diğ. 1991; Link ve diğ. 1992; Chou ve diğ. 1992; Zhang ve diğ. 1994). Özellikle MBP ve PLP insan MSS miyelin yapısındaki toplam proteinlerin yaklaşık olarak %80'ine tekabül eder (Leadbetter ve diğ. 1998). MBP geni tarafından kodlanan MBP, sinir sisteminde oligodendrosit ve schwann hücrelerinin miyelin kılıfının önemli bir yapı taşıdır (Harauz ve Boggs 2013). MBP sadece kompakt miyelin oluşumunda klasik yapıştırıcı rolü oynamasının yanı sıra oligodendrosit çoğalmasında ve miyelin stabilizasyonunda ve miyelin üreten hücrelerin stabilizasyonunda rol oynayan önemli bir proteindir (Vassall ve diğ. 2015). MBP azalması miyelin membran bağlanmada zayıflamalara neden olabilmektedir. Bu mekanizma MS gibi demiyelinizan hastalıklarında bir neden olarak ortaya çıkmaktadır.

DAE grubunda ekspresyonu baskılanan bir diğer gen miyelin kılıfının yapısında bulunan bir diğer gen ürünü miyelin-ilişkili glikoproteini kodlayan MAG genidir. İmmünoglobülin üst ailesinin bir üyesi olan MAG, 100 kD büyüklüğündedir ve miyelin-oluşturucu hücreler (oligodendrositler ve schwann hücreleri, her ikisi de) arasındaki etkileşimleri düzenleyen tip I transmembran bir glikoproteindir (Quarles 1989). Diğer miyelin proteinlere kıyasla MS plaklarının gelişiminde erken kaybı bu hastalığın patojenezinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Nakahara ve diğ. 2003, Quarles 2007). Çalışmamızda DAE oluşumunda ekspresyonunun baskılanması hastalık patojenezindeki rolünü destekler niteliktedir. Ayrıca MSCov tedavi grubunda kontrol değerlerine tamamen geri dönen sonuçlar MSCov ekstresinin miyelin oluşumunu uyarıcı etkisinin varlığını göstermektedir.

PLP1 geni, MSS'nde ana miyelin proteini olan bir transmembran proteolipid proteini kodlar. Bu protein, miyelin tabakasının sıkılaştırılması, stabilizasyonu ve korunmasında rol oynar. Bunların yanı sıra oligodendrosit gelişmesi ve aksonal sağlık bakımından da oldukça önemlidir. Bu proteinin MS hastalığının seyir süreçleri ile doğrusal ilişki gösteren dört proteinden biri olduğu bildirilmiştir (Raphael ve diğ. 2012). Nitekim bizim çalışmamızda DAE grubunda yaklaşık 2.5 kat baskılanmış ve diğer miyelin proteinlerinde olduğu gibi MSCov tedavi grubunda kontrol değerlerine geri dönmüştür. Disease veri bankasında bu protein ile ilişkili olarak bildirilen hastalıklar arasında Pelizaeus-Merzbacher hastalığı, Parapleji ve MS vardır.

Matris metalloproteinazlar (MMP'lar) çinko içeren endopeptidazlardır, çeşitli doku hasarlarında ekstrasellüler matriks proeinlerinin bozulmasına aracılık ederler. Normal koşullar altında, MMP'lar hem gelişmekte olan organizmada hem de erişkinlerde çeşitli fizyolojik süreçlere katılırlar. MMP'lar MS'de KBB bozulması ve MSS enflamasyonuna ve böylece hastalık patojenezine katkıda bulunurlar (Boziki ve Grigoriadis, 2017). MS'li hastaların KBB'nde yüksek MMP9 seviyeleri MMP9'un KBB bütünlüğünün bozulmasına katkısını ortaya koymaktadır; bu etki MMP9'un sitokin ve kemokinlerle işbirliği ile gerçekleşir (Ram ve diğ. 2006; Larochelle ve diğ. 2011). Bu veriler MMP9'un MS patojenezinde bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir. DAE ile yapılan çalışmalarda MMP inhibitörü olan GM-6001 ile hayvanların tedavisi farelerde klinik deneysel alerjik ensefalomyelit gelişimini baskılamıştır (Gijbels ve diğ. 1994). Bizim çalışmamızda da DAE grubunda MMP9 seviyesi anlamlı olarak kontrole göre artış göstermiş; MSCov tedavisi sonucunda ise kontrole göre bir miktar baskılanmıştır. Bu sonuçlar MSCov'un potansiyel MMP9 inhibitörü gibi davrandığının bir göstergesi olabilir.

NFKB (aktifleşmiş B hücreleri Nükleer Faktör kappa hafif zincir-arttırıcı), hücrede DNA transkripsiyonu, hücre döngüsü, bağışıklık tepkileri, apoptoz ve enfeksiyonlarda rol oynayan bir protein kompleksidir. NFKB hücrede hızlı yanıt oluşturan birincil transkripsiyon faktörlerindedir. Hücrede normal zamanda etkin olmayan halde bulunur ve aktifleşmek için protein sentezine gerek duymaz ve sadece inaktif halden aktif hale döner. NFKB bağışıklık ve enflamatuvar yanıt düzenlenmesinde kritik bir rol oynar ve MS ve MS'in hayvan modeli olan DAE gibi otoimmün demiyelinizan hastalıkların patojenezinde rol alır (Leibowitz ve Yan 2016). Bizim çalışmamızda NFKB MS modelinde yaklaşık 5 kat artış gösterdi; MSCov tedavi grubunda ise bu artış ortadan kalkmış NFKB baskılanmıştır. MS gibi enflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda, NFKB yapısal aktivasyonu ile bu yolakta var olan efektör moleküllerin (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-18) aşırı ekspresyonuna neden olur ve NFKB'nin aşırı ekspresyonu, MS'te pro-enflamatuvar bir ortam oluşumuna teşvik eder (Li ve Verma 2002; Yamamoto ve Gaynor 2004). Belirtildiği gibi NFKB aktivasyonundan etkilendiği bilinen TNF- $\alpha$ 'nın da DAE grubunda ekspresyonunun ciddi olarak artması sonuçlardaki korelasyonu ortaya koyan bir başka veri olarak karşımıza çıkmaktadır. İlginç bir şekilde, hali hazırda FDA tarafından onaylanmış ve MS hastalığının tedavisinde kullanılan fingolimod, teriflunomid, dimetil fumarat

NFKB sinyalini bir şekilde modüle ederek etki göstermektedir (Leibowitz ve Yan 2016). Ancak bu ilaçlarla ilgili ciddi yan etkiler rapor edilmiştir. MSCov toksikoloji testlerinde ise yan etki potansiyeli oldukça az hatta yok denebilecek sonuçlar elde edilmiştir. Buda MSCov'un var olan ilaçlara alternatif olabileceğinin bir diğer göstergesidir.

Protein-tirozin fosfataz 1B (PTP-1B) veya protein-tirozin fosfataz 2C (PTP-2C) olarak bilinen protein tirozin fosfataz reseptör olmayan tip 11 (PTPN11) insanlarda PTPN11 geni tarafından kodlanan bir enzimdir. Hücre farklılaşması, hücre proliferasyonu, apoptoz, immünolojik sinyal ve hücre iskeleti fonksiyonları gibi hücrel süreçlerde çok çeşitli ve önemli rol oynar (Ostman ve diğ. 1994). Son yıllarda yapılan çalışmalar ile TNF- $\alpha$  gibi pro-enflamatuvar sikokinlerin üretimini düzenleyici olarak rol aldığı da bildirilmiştir (Seo ve diğ. 2013). Bu gen DAE grubunda baskılanma gözlenmesi ve MS ile ilişkisi bildirilmemiş yeni bir gen olması nedeniyle deneylerimize kontrol amaçlı dahil edilmiştir.

DAE grubunda ekspresyonu baskılanan bir diğer gen; SOD1 geni insanlarda kromozom 21 üzerinde yer alır ve süperoksit dismutaz 1 ya da süperoksit dismutaz [Cu-Zn] olarak bilinen enzimi kodlar. SOD reaktif oksijen türlerini süpürücü bir enzimdir ve daha çok apoptoz ve amiyotrofik lateral skleroz ile ilişkilendirilmiştir. MS'in sadece bağışıklık aracılı enflamatuvar reaksiyonlarla değil aynı zamanda nörodejeneratif süreçlerle de karakterize edildiğine dair güçlü kanıtlar vardır. Yapılan çalışmalar oksidatif stresin bu süreçte önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Fazla üretilen reaktif oksijen türleri oksidatif strese neden olur ve MS'de demiyelinizasyon ve bunların aksonal hasar ile ilişkisi vardır (Inoue ve diğ. 2012). Yapılan çalışmalar MS hastalarında bozulmuş antioksidan savunma sisteminin kısmen SOD'nin düşük aktivitesine bağlı olabileceğini göstermektedir (Miller ve diğ. 2010). Çalışmamızda DAE grubunda ekspresyonunun anlamlı olarak baskılanması hastalıkla ilişkisini destekler bir veri olarak değerlendirilebilir.

Janus Kinaz/Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü (JAK/STAT) sinyal yolu çok sayıda sitokin tarafından kullanılır ve bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesi için önemli bir role sahiptir (O'Shea ve Plenge 2012; Hamid ve diğ. 2017). Sitokinler özellikle T hücrelerinin gelişimi, farklılaşması ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde büyük öneme sahiptir (Weaver ve diğ. 2007; Geissmann ve diğ.

2010). Bu nedenle, JAK/STAT yolağının sınırsız aktivasyonu, otoimmün hastalıklar için patolojik etkilere sahiptir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda MS ve DAE'de, JAK/STAT yolunun anormal işlevselliği için kanıtlar ortaya konulmuştur. MS hastalarının nüks dönemlerinde T hücreleri ve monositlerinde, aktif STAT3 düzeylerini yükseldiği rapor edilmiştir (Frisullo ve diğ. 2006). DAE'de STAT3 aktivasyonu ile STAT3'ün hedef geni olan IL6 artışı patolojik Th17 hücrelerinin aktivasyonunu ve dolayısıyla otoreaktiviteyi sağlar (Seavey ve Dobrzanski 2012; Harris ve diğ. 2007; Liu ve diğ. 2008). Bizimde çalışmamızda DAE grubunda hem STAT3 (yaklaşık 3 kat) hem de IL6 gen seviyesinde anlamlı olarak artış gözlenmesi literatür ile benzer sonuçları ortaya koymuştur. Bununla birlikte DAE oluşturulmuş farelerin beyin ve omuriliklerinde STAT3 aktivasyonunun anlamlı olarak arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Nishikomori ve diğ. 2002).

Transforme edici büyüme faktörü-beta 1 (TGFB1) hemopoietik hücrelerde çeşitli etkileri olan güçlü bir düzenleyici sitokindir (Goris ve diğ. 2007). TGFB1 ekspresyonu veya onun T-hücreleri üzerindeki sinyal hasarları çeşitli otoimmün hastalıkların başlangıcı ile bağlantılıdır. Deneysel MS modeli ile yapılan çeşitli araştırmalar, endojen TGFB1'in hastalığın patojenezinde önemli bir savunma rolü oynayabileceğini göstermiştir (Swanborg 1995). Bununla birlikte, TGFB1'in MS veya deneysel modeli üzerinde etkilerini gösteren ana mekanizma hala açıklanmaya ihtiyaç duymaktadır ve incelenmesi gereken konu olarak durmaktadır. Bizim çalışmamızda da TGFB1 hasta modelinde anlamlı artışlar göstermiştir.

Çalışmamızda DAE grubunda yüksek artış (26 kat) gözlemediğimiz bir diğer gen olarak ortaya çıkan TNF- $\alpha$  geni, tümör nekrozis faktörü (TNF) süper ailesine ait olan çok fonksiyonlu bir pro-enflamatuar sitokini kodlar, bu sitokin özellikle makrofajlar tarafından salgılanır ve TNFRSF1A/TNFR1 ve TNFRSF1B/TNFR reseptörlerine bağlanarak işlevlerini gerçekleştirir (Vasalli 1992). TNF- $\alpha$ 'nın patojenik fonksiyonları enflamasyonun tetiklenmesi, vasküler endotelin uyarılması, immün hücrelerin proliferasyonu ve doku hasarını içerir (Robinson ve diğ. 2001). Fizyolojik koşullarda çevresel sinir sisteminde (ÇSS) makrofajlar, T ve B lenfositler, doğal öldürücü hücreler ve dendritik hücreler; MSS'nde ise nöronlar, mikroglia ve astrositler TNF- $\alpha$  üretiminden sorumludur (Lim ve diğ. 2010; Caminero ve diğ. 2011). TNF- $\alpha$  ve reseptörleri patolojik koşullar altında genellikle nöroenflamasyon ve sekonder nöronal hasarı teşvik edici etki gösterir; bunun yanında MS

patojenezinde demiyelinizasyon sürecinde, KBB geçirgenliğinin artmasında ve MSS enflamasyonunda da rol oynadığı rapor edilmiştir (Murphy ve diğ. 2010; Probert 2015).

Sonuç olarak, yapılan MS dizin çalışmaları ile birlikte farklılık tespit ettiğimiz 20 adet gen, ileriki çalışmalarımızda takip edilen genler olarak seçildi. Tespit edilen genlerin literatür ve veri bankalarında sunulan bilgi ve veriler ile uygunluk ve paralellik gösterdiği görülmektedir. Böylelikle sürekli 84 geni takip etmek yerine sadece değişen genleri kapsayan bir küme ile deneylerimize devam ettik ve bu genleri analiz ettik.

Şekil 11’de verilen skorlama grafiğinden de anlaşıldığı gibi MSCov klinik skorlar göz önüne alındığında ciddi iyileşme sağlamıştır. Hastalık skorları hastalık indüksiyonu ile pik değerlerine ( $3.5 \pm 0.5$ ) ulaşan hayvanlarda MSCov ile tedavi protokolüne başlanılan günden itibaren 4 gün gibi kısa bir süre içinde geri dönmeye başlamıştır ve 21 günlük MSCov tedavisi sonunda hastalık bulguları neredeyse tamamen ortadan kalkmıştır. Bu klinik skorlarla elde ettiğimiz iyileşme belirtileri MS dizin analizleri ile moleküler düzeyde de teyit edilmiştir. Anlamlılık gösteren 16 gende (APP, C1S, CD4, GFAP, GNAI, HIF1A, IL6, MAG, MBP, MMP9, NFKB, PLP, PTPN, SOD, STAT3, TGFB1) MSCov tedavisi ile kontrol değerlerine geri dönüş söz konusudur. İncelenen 20 genden 4 tanesinin ekspresyonu ise (CCL5, CXCL9, CXCL10, TNF- $\alpha$ ) sırasıyla 78, 14, 79 ve 26 kat artış değerlerinden tedavi ile yaklaşık 5 kat değerlerine düşmüştür. Hasta grubunda özellikle ekspresyonu artan genler enflamasyon/sitokin/kemokin ilişkili; T hücre aktivasyonu ilişkili; kalıtsal bağışıklık ilişkili genler iken ekspresyonu azalanlar ise miyelin ilişkili genlerdir. Bu durumun MSCov tedavisi ile neredeyse tüm genlerde kontrol değerlerine geri dönmesi MSCov’un miyelin kılıf rejenerasyonunu sağlayabildiği, nöroenflamasyonu baskılama potansiyeline sahip olduğunun göstergesidir.

Bu sonuçlardan yola çıkarak, MSCov’un etkisi ile ilgili daha detaylı bir çıkarım yapacak olursak bu etkiler şu şekilde sıralanabilir:

- a) Anti-enflamatuvar etki: oldukça güçlü bir etki gözlendi
- b) Miyelin rejenerasyonu: miyelin oluşumunda yer alan proteinlerin artması
- c) T- ve B-hücre aktivasyonunu baskılaması: immüno-supresif etki
- d) Kompleman aktivasyonunu baskılaması

- e) Miyelin ilişkili antijen sunumunu engellemek: özgün immünosupresif etki
- f) Bağışıklık düzenleyici: immünomodülatör
- g) Th17 baskılayıcı – dolaylı tespit edilen etki (daha fazla çalışma yapılmalıdır)

Tıpta bir hastalığın tedavisi ve önlenmesi için en önemli adım hastalığın nedenini araştırmaktır. Ancak özellikle MS gibi karmaşık karakterli hastalıklarda tek bir sebep aramak mümkün değildir. İmmün sistem ve MSS arasındaki önemli homeostazi glia ve nöronların aralarındaki iletişimle sağlanabilmektedir. Oligodendrositler MSS'nde miyelin yapımından sorumlu hücrelerdir. Bunun yanında nöronların büyüme ve sağkalım potansiyelini arttıran bazı nörotropik faktörleri üretirler. Oligodendrositler MS gibi nörodejeneratif hastalıklarda önem arz eden hücrelerdir çünkü bu hücreler doğuştan gelen güçlü bağışıklık işlevlerine sahiptirler, kemokin ve sitokinleri üreterek bağışıklık tepkilerini modüle ederler; bu sayede ilerleyen nörodejenerasyona neden olan yanıtı ortaya çıkarırlar (Ortiz ve diğ. 2016). Bunun gibi patolojik durumlarda CD4<sup>+</sup> T hücreleri, antijen sunan glia hücreleri (astrositler ve mikroglialar) makrofajlar ve B hücreleri KBB'ni geçer ve enflamatuvar yanıtı başlatır (Ortiz ve diğ. 2013; Ortiz ve diğ. 2016).

MS bu kadar karmaşık karakterli bir hastalık olduğu için ve sonuçlara geniş bir yelpazeden bakabilmek adına 3 farklı hücre tipinin çalışmalarımıza dahil edilmesi uygun görüldü. Bu hücreler; insan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y), insan T lenfoblastoma hücre hattı (CCRF-CEM) ve kontrol hücreler olarak seçilen fare primer oligodendrosit hücreleridir.

Bundan sonraki aşamalarda hayvan deneylerinde yaptığımız MS dizin analizleri ile gruplar arasında farklılık saptadığımız genler ile çalışmalarımız gerçekleştirildi. Bu genlerin literatür taraması yapılarak da MS ile ilişkili olduğu doğrulandı. Hücre kültürü çalışmalarında öncelikle doz saptamaları için sitotoksosite deneyleri gerçekleştirildi. Bu deneylerden NOEL ve LOEL benzeri değerler saptanmaya çalışıldı. Çünkü bu denemeler için kanser çalışmalarının aksine, kullanılacak dozların hücre üzerine toksik etki göstermemesi gerekmektedir. Hücre kültürlerinden de LOEL ve NOEL doz tayinleri yapılması mümkün olmadığı için bu değerlere yakın olabilecek 2 farklı doz (EC05 ve EC10) saptanarak bundan sonraki çalışmalarda bu dozlar kullanıldı.



Hücre kültürü çalışmalarına ilk SH-SY5Y hücreleri ile başlandı. SH-SY5Y hücrelerinde MSCov ekstresi ile birlikte MSCov'dan geri tüketilerek elde edilen 3 alt fraksiyon ve MSCov ekstresinden izole edilen 7 aktif bileşik (Glukokapparin, 1H-indol-, 2-hidroksi, 3-karboksilik asit, Oleanolik asit, Olean-12-en-28-ol, 3 $\beta$ -pentakosanoat, Stigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -miristat,  $\beta$ -Sitosterol ve Ursolik asit) ve 1 tane kombine etki (Olean-12-en-28-ol, 3 $\beta$ -pentakosanoat +Rutin) çalışıldı.

Burada öncelikle MSCov ile tedavi edilen hayvanların ve MSCov uygulanan SH-SY5Y hücrelerinin sonuçlarını karşılaştıracak olursak sonuçlar birbiriyle örtüşen veriler ortaya koymuştur. Bu karşılaştırma Tablo 10'da özetlenmiştir.

**Tablo 10.** MSCov tedavi grubu hayvanların beyin dokularıyla yapılan çalışmalar ve MSCov ekstresinin SH-SY5Y hücrelerinde seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine etkilerinin kat değişim sonuçları. Sonuçlar karşılaştırma açısından deneysel MS oluşturan DAE grubu sonuçları ile birlikte verilmiştir.

| Gen    | (C57BL6 Fare) |                             | MSCov (SH-SY5Y) |        |
|--------|---------------|-----------------------------|-----------------|--------|
|        | DAE           | MSCov Tedavi (500mg/kg/gün) | 4mg/ml          | 6mg/ml |
| APP    | 2,45          | 1.43                        | -2,73           | -3,20  |
| C1S    | 6,99          | -1.27                       | -1,62           | -1,93  |
| CCL5   | 78,28         | 4,94                        | -3,21           | -2,98  |
| CD4    | 3,06          | 1.87                        | -1,48           | -1,60  |
| CXCL9  | 13,43         | 2,44                        | -3,32           | -2,89  |
| CXCL10 | 79,13         | 6,26                        | -2,32           | -2,82  |
| GFAP   | 5,42          | 1.59                        | -2,50           | -1,98  |
| GNAI   | 2,85          | -1.83                       | -1,41           | -1,29  |
| HIF1A  | 4,95          | 1.28                        | -3,24           | -1,89  |
| IL6    | 5,56          | 1.68                        | 1,34            | -2,51  |
| MAG    | -2,20         | 1.15                        | 1,43            | 2,34   |
| MBP    | -2,80         | 1.21                        | 1,33            | 1,75   |
| MMP9   | 2,83          | -1.47                       | -1,68           | -2,43  |
| NFKB   | 4,48          | -1.41                       | -2,16           | -1,02  |
| PLP    | -2,63         | 1.53                        | 1,10            | 3,79   |
| PTPN11 | -2,20         | -1.31                       | -2,61           | -1,56  |
| SOD    | -2,36         | 1.56                        | -1,10           | -1,22  |
| STAT3  | 2,78          | -1.38                       | 1,21            | 1,04   |
| TGFB1  | 2,10          | -1.43                       | -1,22           | -1,51  |
| TNF    | 26,33         | 5,42                        | -2,33           | -2,81  |

Kırmızı renkli olanlar kontrole göre ekspresyon düzeyi artanlar; mavi olanlar ise azalanlardır.

Yukarıdaki tabloda görüldüğü üzere MSCov tedavi grubu fareler ve SH-SY5Y hücrelerine MSCov uygulaması sonucunda elde edilen veriler birbiriyle korelasyon göstermektedir. CCL5, CXCL9, CXCL10 ve TNF- $\alpha$  genlerinde MSCov tedavi grubunda görülen sonuçlar DAE grubunda bu genlerdeki ciddi artıştan kaynaklanmaktadır. Örneğin CXCL10 (DAE grubunda en çok ekspresyonu artan genidir) ekspresyon düzeyi 79 kat gibi oldukça yüksek bir artıştan MSCov tedavisi ile 6 kat değerine düşmüştür. Buradaki fark 73 kat gibi ciddi bir farktır ve MSCov ekstresinin anti-enflamatuvar etkinliğini göz önüne çıkarmaktadır.

Bu sonuçlar, SH-SY5Y hücrelerinin *in vitro* etkinliklerin tespiti için kullanılabilirliğini de gösterdi. Her ne kadar DAE gibi hayvan modelinde elde edilen veriler kadar olmasa da MSCov ekstresi gen ifade düzeyinde paralellik tespiti bu değerlendirmenin yapılmasına veri oluşturmaktadır. MSCov ekstresi ve bu ekstreden geri tüketimle elde edilen alt ekstrelerin SH-SY5Y hücrelerinde DAE ile karşılaştırmalı sonuçları Tablo 11’de verilmektedir.

**Tablo 11.** MSCov ekstresinin ve alt ekstrelerinin SH-SY5Y hücrelerinde seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine etkilerinin kat değişim sonuçları. Sonuçlar karşılaştırma açısından deneysel MS oluşturan DAE grubu sonuçları ile birlikte verilmiştir.

| Gen           | DAE   | MSCov  |        | Diklorometan  |               | Etil Asetat   |               | n-Bütanol     |               |
|---------------|-------|--------|--------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|               |       | 4mg/ml | 6mg/ml | 22 $\mu$ g/ml | 27 $\mu$ g/ml | 24 $\mu$ g/ml | 32 $\mu$ g/ml | 37 $\mu$ g/ml | 50 $\mu$ g/ml |
| APP           | 2,45  | -2,73* | -3,20* | 1,54          | 1,88          | 3,67*         | 4,62*         | 1,30          | 1,41          |
| C1S           | 6,99  | -1,62  | -1,93  | -1,76         | -1,43         | -1,52         | -1,61         | -2,09*        | -2,73*        |
| CCL5          | 78,28 | -3,21* | -2,98* | -1,12         | -2,23*        | -1,34         | -2,09*        | -1,67         | -1,84         |
| CD4           | 3,06  | -1,48  | -1,60  | -1,19         | -1,41         | 1,35          | 1,76          | -1,34         | -1,64         |
| CXCL9         | 13,43 | -3,32* | -2,89* | -1,76         | -2,21*        | -1,32         | -2,03*        | -1,50         | -1,71         |
| CXCL10        | 79,13 | -2,32* | -2,82* | -1,31         | -1,27         | -1,87         | 1,02          | -6,42*        | -3,50*        |
| GFAP          | 5,42  | -2,50* | -1,98  | 1,14          | -1,21         | 2,44*         | 1,34          | -1,01         | 1,20          |
| GNAI          | 2,85  | -1,41  | -1,29  | -1,60         | -1,12         | 1,01          | 1,67          | 1,41          | 1,31          |
| HIF1A         | 4,95  | -3,24* | -1,89  | -3,14*        | -3,81*        | 1,03          | 1,56          | -1,20         | 1,13          |
| IL6           | 5,56  | 1,34   | -2,51* | -1,41         | -1,67         | -1,72         | -1,91         | -2,58*        | -2,04*        |
| MAG           | -2,20 | 1,43   | 2,34*  | 1,34          | 1,21          | -1,25         | 1,74          | -3,63*        | -6,39*        |
| MBP           | -2,80 | 1,33   | 1,75   | 1,34          | 1,27          | 1,10          | 1,33          | 1,34          | 1,47          |
| MMP9          | 2,83  | -1,68  | -2,43* | -1,34         | -1,97         | -1,55         | -1,65         | -4,74*        | -3,32*        |
| NFKB          | 4,48  | -2,16* | -1,02  | -1,70         | 1,57          | -1,99         | -2,39*        | -2,83*        | -1,76         |
| PLP           | -2,63 | 1,10   | 3,79*  | 1,55          | 1,06          | 2,07*         | 2,33*         | 1,71          | 2,49*         |
| PTPN11        | -2,20 | -2,61* | -1,56  | 1,32          | 1,07          | 2,16*         | 2,25*         | -3,23*        | -2,29*        |
| SOD           | -2,36 | -1,10  | -1,22  | 1,24          | 1,36          | 1,84          | 1,32          | 1,21          | 1,09          |
| STAT3         | 2,78  | 1,21   | 1,04   | -1,82         | -1,34         | -1,18         | 1,25          | -1,04         | 1,56          |
| TGFB1         | 2,10  | -1,22  | -1,51  | 1,17          | 1,23          | 1,88          | -1,93         | 1,48          | 1,51          |
| TNF- $\alpha$ | 26,33 | -2,33* | -2,81* | -2,12*        | -2,39*        | 1,12          | 1,35          | -1,69         | -2,74*        |

DAE grubunda Kırmızı renkli olanlar kontrole göre ekspresyon düzeyi artanlar; mavi olanlar ise azalanlardır. Diğer gruplardaki \*'lar ise anlamlı farkı göstermektedir.

Alt ekstreleri kendi içerisinde değerlendirdikten sonra en sitotoksik olanın DKM alt ekstresi olduğu görüldü. Sonuçlardan da anlaşılacağı gibi hiçbir alt ekstreten ana ekstre MSCov ile benzer ya da daha iyi veriler üretilmedi. Tek tek ele alındıklarında, bazı genlerin ifade düzeylerinde pozitif etkiler gözlemlenmesine rağmen tüm genler birlikte değerlendirildiğinde ekstrelerin etkilerinin zaman zaman kendi içinde zıt veriler ürettiği saptandı. Örneğin; n-bütanol alt ekstresi enflamasyon ilişkili bazı genleri inhibe ederken, miyelin ilişkili gen olan MAG genini de inhibe etmiştir ve çelişkili sonuçlar ortaya koymuştur. EA alt ekstresi de CCL5, CXCL9 gibi genleri baskımlarken; APP, GFAP gibi genlerin mRNA ekspresyon düzeyini arttırarak tezat etkiler ortaya koymuştur. MSCov'dan geri tüketilerek elde edilen 3 alt ekstre kendi aralarında değerlendirildiğinde en fazla pozitif etki gösteren ekstreten MSCov DKM alt ekstresi olduğu görülmektedir. Çünkü bu alt ekstre MSCov uygulmasına benzer şekilde CCL5, CXCL9, HIF1A, TNF- $\alpha$  genlerini anlamlı olarak baskımlamaktadır. Bu ekstretenin hem anti-enflamatuvar hem de miyelin rejenere edici etkiler sergilediği söylenebilir.

Literatürde çeşitli flavonoid bileşiklerin anti-enflamatuvar etkiler sergiledikleri yani enflamasyonu baskıladığına kanıtlar mevcuttur (García-Lafuente ve diğ. 2009; Serefani ve diğ. 2010; Parhiz ve diğ. 2015). Buradan yola çıkarak MSCov'un etkinliğinin flavanoid kaynaklı olup olmadığı sorusuna cevap arandı. Ozgun-Acar ve diğ. tarafından 2016'da yapılan çalışmada MSCov'dan elde edilen ekstrelerin özellikle flavanoid içerikleri analiz edilmiştir. Hem ana ekstretenin ve hem de alt ekstrelerin izokersetin, izoramnetin, kampferol-3-O-rutinozit, kampferol, luteolin-7-O-glukozit, p-kumarik asit, pirogallol, kersetin-3-O-arabinosit, kersetin, rutin, t-ferulik asit ve ursolik asit içerdiği rapor edilmiştir. En fazla bulunan 2 flavanoid kaemferol ve rutindir. Bu çalışmadan yola çıkarak flavonoid bileşik içerikleri ve uygulamalar ile moleküler düzeyde gen ifadelerinde gözlemlenen değişiklikler karşılaştırmalı olarak analiz edildiğinde bu bileşikler ile bir pozitif korelasyon ve uyum olmadığı sonucuna ulaşıldı. Yani, özellikle MSCov başta olmak üzere, alt ekstreler ile gözlemlenen etkiler bu ekstrelerin etkilerinin flavonoid ilişkili olmadığını göstermektedir. Buradan yola çıkarak MSCov'un yukarıda sayılan etkilerinin, özellikle MS için gözlemlenen iyileştirici etkilerinin flavonoid bileşikler kaynaklı olmadığını söylemek çok da zor değildir.

MSCov ekstresi ve alt ekstreleri ile çalışmalar yapıldıktan sonra MSCov'dan elde edilen ve yapısı aydınlatılan aktif bileşik çalışmalarına geçildi. Her birisi için öncelikle ayrı ayrı EC05 ve EC10 değerleri saptandı. Bu bileşiklerle yapılan çalışmaların sonuçları Tablo 12 ve 13'de verilmiştir.

**Tablo 12.** MSCov ekstresinden elde edilen IHK, GC, OPC saf bileşiklerinin ve OPC+Rutin kombine uygulamasının SH-SY5Y hücrelerinde seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine etkilerinin kat değişim sonuçları. Sonuçlar karşılaştırma açısından deneysel MS oluşturulan DAE grubu sonuçları ile birlikte verilmiştir.

| Gen    | DAE   | IHK    |        | GC     |         | OPC    |        | OPC+Rutin   |             |
|--------|-------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|-------------|-------------|
|        |       | 36 µM  | 45 µM  | 24 µM  | 31 µM   | 17 µM  | 20 µM  | 17 µM+Rutin | 20 µM+Rutin |
| APP    | 2,45  | -1,36  | -1,20  | 7,02*  | 5,83*   | -1,41  | -1,06  | -2,73*      | 1,17        |
| C1S    | 6,99  | -1,17  | -1,50  | 2,21*  | 2,70*   | -1,02  | -1,21  | 1,34        | 1,48        |
| CCL5   | 78,28 | 1,19   | -1,45  | 2,33*  | 4,65*   | -1,53  | -1,84  | -1,88       | -1,42       |
| CD4    | 3,06  | -1,75  | -1,32  | -1,31  | -1,56   | -1,24  | -1,56  | -1,57       | -1,39       |
| CXCL9  | 13,43 | -1,12  | -1,04  | 1,09   | 1,25    | 1,46   | -1,60  | 1,84        | 1,87        |
| CXCL10 | 79,13 | 1,81   | 1,97   | 2,20*  | 2,62*   | -2,22* | -2,11* | -5,29*      | -8,37*      |
| GFAP   | 5,42  | 2,83*  | 2,22*  | 3,26*  | 3,98*   | 1,88   | -1,48  | -1,28       | 1,60        |
| GNAI   | 2,85  | -2,15* | -2,16* | -1,32  | -21,10* | -2,86* | -3,03* | -1,15       | -1,24       |
| HIF1A  | 4,95  | 1,23   | -1,64  | 3,16*  | -1,46   | -4,48* | -2,59* | -1,34       | 1,30        |
| IL6    | 5,56  | 1,12   | -1,01  | 1,19   | 1,22    | -1,78  | -1,98  | 1,58        | 1,80        |
| MAG    | -2,20 | -1,57  | -1,34  | 1,76   | 2,23*   | 1,76   | 1,55   | 3,92*       | 4,24*       |
| MBP    | -2,80 | 1,21   | 1,57   | 1,67   | 2,71*   | 1,65   | 1,79   | 1,22        | 1,12        |
| MMP9   | 2,83  | -2,09* | -1,21  | 3,15*  | 3,46*   | -1,20  | -3,49* | -1,02       | -1,16       |
| NFKB   | 4,48  | -1,86  | -1,88  | -1,79  | -12,45* | -1,12  | -2,54* | -1,47       | -1,12       |
| PLP    | -2,63 | 1,06   | -1,53  | 1,90   | 3,11    | 1,64   | 1,24   | 2,68*       | 2,57*       |
| PTPN11 | -2,20 | 1,28   | -1,68  | -1,56  | -1,28   | -1,28  | -1,16  | -1,12       | 1,53        |
| SOD    | -2,36 | -1,73  | -1,77  | 27,71* | 24,29*  | 1,43   | 1,56   | -1,08       | 1,81        |
| STAT3  | 2,78  | 1,01   | -1,56  | -1,53  | -1,71   | -1,31  | 1,13   | 1,31        | 1,14        |
| TGFB1  | 2,10  | 1,47   | 1,63   | 1,41   | 1,77    | 1,38   | 1,28   | 1,58        | 1,61        |
| TNF-α  | 26,33 | -1,02  | -1,52  | 1,23   | 1,32    | -1,18  | -4,49* | -1,92       | -2,69*      |

DAE grubunda Kırmızı renkli olanlar kontrole göre ekspresyon düzeyi artanlar; mavi olanlar ise azalanlardır. Diğer gruplardaki \*'lar ise anlamlı farkı göstermektedir.

**Tablo 13.** MSCov ekstresinden elde edilen OA, SDM, UA ve SIT saf bileşiklerinin SH-SY5Y hücrelerinde seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine etkilerinin kat değişim sonuçları. Sonuçlar karşılaştırma açısından deneysel MS oluşturan DAE grubu sonuçları ile birlikte verilmiştir.

| Gen    | DAE   | OA      |         | SDM    |        | UA     |        | SIT    |        |
|--------|-------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|        |       | 20 µM   | 26 µM   | 8 µM   | 12 µM  | 11 µM  | 14 µM  | 20 µM  | 25 µM  |
| APP    | 2,45  | -2,20*  | -4,35*  | 1,54   | 1,69   | 1,11   | -1,09  | 1,88   | 2,12*  |
| C1S    | 6,99  | -3,20*  | -2,68*  | -1,11  | -1,61  | -3,95* | -1,40  | 1,58   | 1,43   |
| CCL5   | 78,28 | -4,41*  | -3,77*  | -1,14  | -1,68  | -2,27* | 1,11   | 1,14   | -1,21  |
| CD4    | 3,06  | -1,73   | -1,74   | 1,56   | 1,65   | -1,75  | -2,63* | 1,55   | 1,22   |
| CXCL9  | 13,43 | -13,41* | -19,36* | 1,18   | -1,91  | -5,90* | -2,58* | 1,19   | 1,37   |
| CXCL10 | 79,13 | -6,13*  | -8,11*  | -1,45  | -2,51* | -3,39* | -1,67  | 1,09   | -1,49  |
| GFAP   | 5,42  | -6,39*  | -5,02*  | -1,72  | -2,25* | 1,03   | 2,68   | 1,13   | -1,34  |
| GNAI   | 2,85  | -1,82   | -2,56*  | -1,51  | -1,27  | -1,69  | 1,22   | 8,02*  | 6,11*  |
| HIF1A  | 4,95  | -2,77*  | -6,26*  | -1,86  | -2,05  | 1,58   | 1,74   | -1,28  | -1,06  |
| IL6    | 5,56  | -1,71   | -2,22*  | -1,71  | -1,81  | -1,45  | -1,53  | 1,38   | -1,77  |
| MAG    | -2,20 | 1,66    | 1,12    | 3,08*  | 2,89*  | 1,38   | 1,62   | 1,08   | 1,04   |
| MBP    | -2,80 | 1,32    | 1,57    | 2,08*  | 2,76*  | 1,10   | 1,33   | 1,44   | 1,42   |
| MMP9   | 2,83  | -24,04* | -48,59* | -1,74  | -2,77* | -4,90* | -2,78* | -2,51* | -1,49  |
| NFKB   | 4,48  | -2,65*  | -4,52*  | 1,37   | -1,02  | -1,33  | 1,79   | -1,68  | -1,05  |
| PLP    | -2,63 | -1,86   | -1,27   | 2,04*  | 2,18*  | 1,90   | 2,01*  | 1,19   | 1,55   |
| PTPN11 | -2,20 | -3,41*  | -4,18*  | -2,62* | -2,38* | 1,47   | 2,06*  | 1,15   | 1,02   |
| SOD    | -2,36 | 1,87    | 2,61    | 1,26   | 2,08*  | 1,62   | 1,81   | -1,54  | -1,61  |
| STAT3  | 2,78  | 1,54    | 1,61    | -1,62  | -1,22  | 1,33   | 1,30   | 1,21   | -1,34  |
| TGFB1  | 2,10  | 1,76    | 1,43    | -1,58  | -1,76  | -1,03  | -1,24  | 1,27   | 1,09   |
| TNF-α  | 26,33 | -15,44* | -18,69* | 1,76   | 1,54   | -3,32* | -2,34* | -2,20* | -2,09* |

DAE grubunda Kırmızı renkli olanlar kontrole göre ekspresyon düzeyi artanlar; mavi olanlar ise azalanlardır. Diğer gruplardaki \*'lar ise anlamlı farkı göstermektedir.

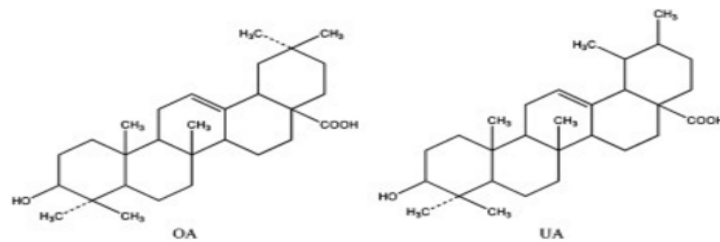
Glukozinatlar bitkilerin özellikle keskin koku ve tatlarından sorumlu olan sekonder metabolitlerdir. *GC Capparis ovata* yaprak ve tohum ekstraktlarında var olan ana glukozinattır ve diğer kapari türlerinde de bu bileşiğe rastlanır (Bor ve diğ. 2009). Kullanılan dozlarda GC özellikle enflamasyon/kemokin sitokin ilişkili ve kalıtsal bağışıklık ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerini arttırdı, dolayısıyla enflamatuvar etki ortaya çıkardı. Bu sonuçlar MS tedavisi için GC saf bileşiğinin umut vaat etmediğini gösteren kuvvetli deliller ortaya çıkardı.

IHK ile yapılan çalışmalarda bu bileşiğin çalışılan genlere bakıldığında kombine pozitif bir etkisine rastlanmadı.

İzole edilen ve incelenen diğer bileşiklere baktığımızda OA ilginç sonuçlar ortaya koymuştur. Elde edilen verilere göre OA, T hücre aktivasyonunu ve

enflamasyonu baskılamaktadır. OA'in gen ifade düzeylerine etkileri daha oldukça umut vaat eder gibi görünse de, hayvan deneyleri ile karşılaştırma yaptığımızda bu değerler kontrol hayvanlarda saptanan değerlerin oldukça altındadır. Bu durumda oleanolik asitin yan etki oluşturma potansiyelinden bahsetmek yanlış olmayacaktır. Bunun yanında miyelin ilişkili genlerden en önemlilerinden biri olan PLP'nin baskılanma eğiliminde olması OA'in MS tedavisi için kullanılabilirliğini sorgulatan bir başka etkidir. Litretatür gözden geçirildiğinde OA ile ilgili iki adet çalışmaya rastlandı. Bu çalışmalardan bir tanesinde OA'in enflamatuvar hücrelerin KBB'nden sızmasını azalttığı ve MSS'ne infiltrasyonu baskıladığı bildirilmektedir. Ancak çalışmada detaylı gen ifadeleri incelenmediği için bizim elde ettiğimiz diğer veriler ile karşılaştırılması mümkün değildir. Diğer çalışmada ise OA'in DAE oluşumunu sitokin üretimini engelleyerek baskıladığı rapor edilmiştir (Martin ve diğ. 2010; Pareek 2011). Bu çalışmalarda detaylı gen ifadesi incelenmediği için bizim çalışmamızla karşılaştırma yapmak çok doğru yönde bir çıkarım olmayacaktır. Ancak MS'de KBB bozulmasının ana nedenlerinden biri olarak MMP'lar gösterilmektedir. Bizim çalışmamızda OA, MMP9 mRNA ekspresyon düzeyini EC05 ve EC10 dozlarında sırasıyla 24 ve 48 kat baskılamıştır; buradan yola çıkarak OA'in KBB üzerindeki etkisini MMP9'a bağlayabiliriz.

Çalışılan bir diğer aktif bileşik UA'in herhangi bir tedavi edici etki göstermediğini ve MS tedavisi için umut vaat etmediğini söylemek mümkündür. Ancak ilginç olan durum OA ve UA bileşikleri yapısındaki tek fark sadece bir metil grubuyken etkilerinin bu kadar farklı olmasıdır (Şekil 380). Tek bir metil grubunun yer değiştirmesi bile bileşiğin etkisini %100 farklılaştırabilmektedir. Buradan yola çıkarak etki belirleme ve ilaç geliştirme çalışmalarının ne kadar zor süreçler olduğunu söylemek yanlış bir çıkarım olmayacaktır.



**Şekil 380.** Oleanolik asit (OA) ve ursolik asit (UA) karşılaştırmalı kimyasal yapıları.

SIT bir fitosteroldür ve çalışmalarımıza dahil edilmiştir. Bu bileşiminde, herhangi bir tedavi edici etki göstermediğini söylemek mümkündür. Çünkü sonuçlara baktığımızda bu bileşimin gösterdiği tek pozitif etki TNF- $\alpha$  ve MMP9 ekspresyonunu baskılıyor olmasıdır ancak sadece bu iki gene bakarak pozitif bir değerlendirme yapmak doğru değildir.

Çalışılan diğer bir bileşik bir steroid olan SDM'tır. SDM CXCL10, HIF1A ve PTPN11 gibi enflamasyon/sitokin/kemokin grubu genlerin ekspresyonunu baskılayarak anti-enflamatuvar etki ortaya koymuştur. Bunun yanında miyelin ilişkili genler olan MAG, MBP ve PLP'nin ekspresyonunu arttırarak nöron rejenere edici etki gösterme potansiyeli gösterdi. IL6 ve TGFB1, MS'in başlangıcı için kritik bir parametre olan T-hücresi aktivasyonunda yer alan sitokinlerdir (Dendrou ve diğ. 2015). Hem IL6 hem de TGFB1'in ekspresyonu üzerine SDM'nin aşağı-düzenleyici etkisi, doku infiltrasyonu ile ilgili olan MMP9'un da ifadesinin baskılanması ile hem anti-enflamatuvar hem de bağışıklık baskılayıcı etkiler olarak görülebilir. Bu sonuçlar ayrıca SDM'nin anti-enflamatuvar aktivitesini de desteklemektedir (Ozgun-Acar ve diğ. 2017).

İzole edilen saf bileşiklerin seçili genlerin ifade düzeylerine etkileri DAE ile karşılaştırıldığında ve kontrol veriler ele alındığında, bir triterpenoid olan OPC bileşiği kontrol ile en uyumlu sonuçları üreten bileşik olarak ortaya çıkmaktadır. Bu veriler OPC'nin yan etki ihtimali düşük ancak tedavi etmenliği güçlü bir bileşik olarak önerilmesini kuvvetle desteklemektedir. Ayrıca, OPC'nin etki ettiği genler irdelendiğinde hem anti-enflamatuvar (CXCL10, HIF1A, NFKB, TNF- $\alpha$ ) etki gösterdiği hem de miyelin rejenerasyonunu tetiklediği (MAG, MBP, PLP) söylenebilir. Bu nedenle, hastalığın, hem semptomatik etkilerinin giderilmesinde hem de sistematik tedavisinde ümit verici bir bileşik olduğu ve hastalık belirtilerini ortadan kaldırmada ve tedavide potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini söyleyebiliriz. Bu bileşimin kök yapısının OA yapısından türediğini düşünersek ve burada bir çıkarım yapacak olursak OPC yapısındaki pentakosonoat grubunun bu bileşimin biyolojik etkinliğine pozitif etki kattığı, hücre zarlarına ve çeşitli lipofilik ajanlar ile etkileşimine olumlu etki ettiğini düşündürmektedir. OA'e göre daha az toksisite göstermesinin nedeni olarak da yine pentakosonoat grubu gösterilebilir.

Triterpenoidler; immünmodulator etkiye sahip UA ve OA gibi bitkilerden izole edilen sekonder metabolitlerdir (Lee ve diğ. 2013; Venkatesha ve Moudgil 2016). Doğal triterpenoidlerin sentetik türevleri özellikle kanser çalışmalarına oldukça fazla konu olmuştur (Probst ve diğ. 2015). Triterpenoidlerin karsinogenezin bastırılmasını NFKB ve STAT3 gibi pro-enflamatuvar mediyatörlerin inhibisyonuyla ilişkilendirilmesi bu bileşiklerin otoimmün ve enflamatuvar hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde potansiyel rolünü sorgulamaya itmiştir (Liby ve diğ. 2006; Choi ve diğ. 2014). Literatürde MS ve triterpenoidlerle ilgili yapılan 2 tane çalışmaya rastlanmıştır (Pareek ve diğ. 2011; Wei ve diğ. 2017). Her iki çalışmada kullanılan triterpenoid de sentetiktir. Bunlardan bir tanesinde kullanılan triterpenoid OPC gibi bir OA türevidir ve MS patolojisinde çok önemli olan IL-17 ekspresyonunu baskılayarak DAE modeli üzerinde iyileştirici etkiler yaptığı bildirilmiştir. Diğer çalışmada ise triterpenoid T hücre farklılaşmasını baskılayarak DAE indüksiyonunu baskılamıştır. Bu veriler ışığında, doğal olarak ilk defa bu çalışmada izole edilen ve bir triterpenoid olan OPC bileşiğinin de MS için ümit verici bir terapötik ajan olma ihtimali çok yüksektir.

OPC ile birlikte kombine olarak rutin uygulaması yaptığımız deneyler de enteresan sonuçlar elde edildi. Rutin MSCov ekstresinde en fazla olan ikinci flavonoid olması nedeniyle tercih edildi. Ayrıca rutin ile ilgili bağışıklık sistemini artırdığı ve düzenleyici etkisi olduğunu bildirir *in vitro* veriler de bulunmaktadır (Ganeshpurkar ve Saluja 2017). Ancak bizim yaptığımız veriler literatürdeki bu verilere ters düşmektedir. Tam tersine, kombine uygulama ile OPC ile elde edilen pozitif etkileri de bozucu sonuçlar elde edildi. Çünkü sadece OPC uygulaması ile ekspresyonu anlamlı olarak baskılanan HIF1A, MMP9, NFKB ve TNF- $\alpha$  gibi genlerin OPC+Rutin uygulamasında bu anlamlı farkın ortadan kalktığı görüldü. Bu genlerden örneğin HIF1A OPC uygulaması ile EC05 ve EC10 dozunda 4.5 kat ve 2.6 kat baskılanırken; rutin ile kombine OPC uygulamasında EC05 dozunda 1.3 kat baskılanmış EC10 dozunda ise baskılanma tamamen ortadan kalkmıştır. Bu noktada, MSCov ekstresi ve alt ekstrelerde flavonoid bileşiklerle yapılan yorumlarımızı destekler veriler elde edildi. Ekstre ve alt ekstrelerin etkileri de içerdikleri flavonoid bileşikler ile bir paralellik ve uyum göstermemekteydi. Bu hücre hattında rutin ile elde ettiğimiz sonuçlar flavonoidlerin MS tedavisi için bir etkilerinin olmadığı hipotezimizi çok kuvvetle desteklemektedir.



SH-SY5Y hücreleriyle yapılan saf bileşik sonuçlarına bakılarak özellikle 2 bileşik MS tedavisi için terapötik ajan olma potansiyeline sahiptir çıkarımı yapabiliriz. Bu 2 bileşik SDM ve OPC'dir. Aktif bileşik miktarları elimizde çok az olduğu için bu bileşikler sadece SH-SY5Y hücrelerinde test edilebildi. Diğer 2 hücrede ise MSCov ve alt ekstreleri ile çalışmalar yapıldı.

Bu 2 bileşik uygulaması sonucunda elde ettiğimiz sonuçları MSCov ekstresi uygulamasından elde ettiğimiz sonuçlarla karşılaştıracak olursak OPC uygulamasında MSCov'da olduğu gibi CXCL10, HIF1A, MMP9, NFKB ve TNF- $\alpha$  mRNA ekspresyon düzeylerinde kontrole göre anlamlı baskılanma olmuştur. Bu sonuçlar OPC'nin anti-enflamatuvar etkisini gösteren ciddi delillerdir. SDM uygulamasında ise yine MSCov'da olduğu gibi CXCL10, GFAP, HIF1A, MMP9 ve PTPN genlerinin ekspresyon düzeylerinde MSCov uygulamasındaki sonuçlarla benzer olarak baskılanma gözlemlendi. Bu verilerden yola çıkarak bu iki bileşiğin MSCov'un etkilerinden sorumlu olabileceklerine dair bir çıkarım yapabiliriz. Ancak bu çıkarımın tam anlamıyla kanıtlanabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

MS, MSS'nin kronik enflamatuvar ve demiyelinizan bir hastalığıdır ve MSS'ne T hücrelerinin ve makrofajların sızması ile seyreder. MS'de oluşan enflamasyon bu hücreler kaynaklıdır (Severson ve Hafler 2010). MSCov ve alt ekstrelerinin T hücreleri üzerinde özellikle enflamasyon etkinliğini test etmek için seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine etkisine bakıldı. Sonuçlar Tablo 14'de verilmiştir.

**Tablo 14.** MSCov ekstresinin ve alt ekstrelerinin CCRF-CEM hücrelerinde seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine etkilerinin kat değişim sonuçları. Sonuçlar karşılaştırma açısından deneysel MS oluşturan DAE grubu sonuçları ile birlikte verilmiştir.

| Gen           | DAE   | MSCov     |          | Diklorometan |         | Etil Asetat |         | n-Bütanol |         |
|---------------|-------|-----------|----------|--------------|---------|-------------|---------|-----------|---------|
|               |       | 1,25mg/ml | 1,5mg/ml | 10µg/ml      | 12µg/ml | 13µg/ml     | 17µg/ml | 17µg/ml   | 20µg/ml |
| C1S           | 6,99  | 1,05      | -1,22    | -1,38        | -2,17*  | -13,5*      | -10,4*  | -7,0*     | -3,84*  |
| CCL5          | 78,28 | -1,80     | -1,92    | 1,38         | -2,64*  | -3,07*      | -2,01*  | -7,91*    | -2,09*  |
| CXCL9         | 13,43 | -1,10     | -2,36*   | 2,71*        | 1,58    | -2,35*      | -2,68*  | -1,42     | -1,61   |
| CXCL10        | 79,13 | -2,01*    | -2,09*   | 1,23         | -2,40*  | -4,84*      | -7,85*  | -3,71*    | -3,17*  |
| IL6           | 5,56  | -1,34     | -1,23    | 1,15         | -1,58   | -1,28       | -1,49   | -1,66     | -1,78   |
| IL10          |       | -1,91     | -2,15*   | -1,88        | -1,01   | -3,84*      | -16,54* | -2,30*    | -8,24*  |
| NFKB          | 4,48  | -2,18*    | -2,61*   | -1,80        | -1,26   | -2,02*      | -3,23*  | 1,02      | -1,67   |
| TNF- $\alpha$ | 26,33 | -1,17     | -1,10    | 1,49         | -2,68*  | -1,3        | -1,56   | 1,47      | -1,21   |

DAE grubunda Kırmızı renkli olanlar kontrole göre ekspresyon düzeyi artanlar; mavi olanlar ise azalanlardır. Diğer gruplardaki \*'lar ise anlamlı farkı göstermektedir.

MSCov ekstresi T hücre aktivasyonunun, enflamasyonun ve sitokin, kemokinlerin baskılanmasını sağlamıştır. Yani bu hücre hattında da SH-SY5Y hücre hattından elde edilen sonuçlarla uyum içinde olan sonuçlar elde edildi.

Sitotoksosite sonuçlarını değerlendirecek olursak SH-SY5Y hücrelerinde olduğu gibi bu hücre hattında da en sitotoksik olan alt ekstre DKM'dır. Alt ekstreler kendi içinde değerlendirildiğinde her üç alt ekstre enflamasyonu ve T hücre aktivasyonunu baskılamıştır. C1S, CCL5 ve CXCL10 yine üç ekstrede de baskılanan genlerdir. CXCL9 ve NFKB sadece EA, TNF- $\alpha$  ise sadece DKM alt ekstresinde anlamlı olarak baskılanmıştır. IL6 geninde hiçbir uygulamada anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Bu sonuçlardan yola çıkarak en kuvvetli anti-enflamatuvar etkiyi gösteren ekstre EA ekstresi olmuştur. Özellikle NFKB pro-enflamatuvar gen ekspresyonunun en önemli düzenleyicisi olarak bilinir. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerin sentezi NFKB aracılıdır (Aupperle ve diğ. 1999). Bu da EA alt ekstresinin anti-enflamatuvar etkinliğini ortaya koyan başka bir çıkarımdır.

Hücre hatları, biyolojik araştırmalar için birincil olarak tercih edilirler. Çünkü bu hücreleri büyütme ve temin etmek oldukça kolaydır. Bununla birlikte, sonuçların yorumlanmasında dikkat edilmelidir; çünkü hücre hatları birincil hücreleri her zaman doğru bir şekilde çoğaltmamaktadır. Sonuç olarak, hücre hatları güçlü bir araçtır ve primer hücrelere kıyasla birçok avantaj sunar. Bununla birlikte, hücre hatlarının

primer hücrelerle birebir aynı olmadığı, örneğin bunların kontakt inhibisyonlarının ortadan kaldırıldığı bilinmektedir. Bu nedenle, hücre hatları çalışmalarından çıkan sonuçların doğruluğundan emin olmak için deneyler tasarlanırken çok dikkatli olunmalıdır (Kaur ve Dufour 2012). Buradan yola çıkarak biz de bulgularımızı kuvvetlendirmek için deneylerimize primer fare oligodendrosit hücreleri ekledik. Sonuçlar Tablo 15’de verilmiştir.

**Tablo 15.** MSCov ekstresinin ve alt ekstrelerinin fare primer oligodendrosit hücrelerinde seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine etkilerinin kat değişim sonuçları. Sonuçlar karşılaştırma açısından deneysel MS oluşturan DAE grubu sonuçları ile birlikte verilmiştir.

| Gen           | DAE   | MSCov  |        | Diklorometan |         | Etil Asetat |         | n-Bütanol |         |
|---------------|-------|--------|--------|--------------|---------|-------------|---------|-----------|---------|
|               |       | 1mg/ml | 2mg/ml | 10µg/ml      | 15µg/ml | 10µg/ml     | 20µg/ml | 15µg/ml   | 25µg/ml |
| APP           | 2,45  | 1,06   | -1,73  | 1,33         | -2,95*  | 4,25*       | 3,74*   | 1,05      | 3,34*   |
| C1S           | 6,99  | -1,54  | -2,17* | -4,74*       | -6,48*  | -1,09       | -1,47   | -1,05     | 1,76    |
| CCL5          | 78,28 | -3,26* | -1,67  | 2,34*        | 1,63    | 1,60        | 2,54*   | 1,30      | 6,69*   |
| CD4           | 3,06  | -1,42  | -1,56  | -1,46        | -2,09*  | -1,48       | -1,76   | 1,25      | 2,56*   |
| CXCL9         | 13,43 | -1,83  | -1,34  | 1,16         | -2,34*  | -1,33       | 1,20    | 1,38      | 3,86*   |
| CXCL10        | 79,13 | -2,79* | -1,20  | 1,28         | -2,83*  | -2,28*      | 1,85    | -1,04     | 1,41    |
| GFAP          | 5,42  | -5,44* | -4,89* | -2,12*       | -4,61*  | 3,41*       | 9,22*   | -1,37     | 1,38    |
| GNAI          | 2,85  | 1,24   | 1,55   | 1,50         | 1,28    | 1,58        | 1,09    | -1,29     | 1,64    |
| HIF1A         | 4,95  | -1,79  | -2,82* | 1,52         | -1,06   | -1,58       | -1,07   | -5,27*    | -1,89   |
| IL6           | 5,56  | -3,11* | -1,08  | 1,17         | -1,70   | -2,93*      | -2,06*  | -7,08*    | -3,47*  |
| MAG           | -2,20 | 2,15*  | 7,39*  | 3,98*        | 4,88*   | 1,97        | 4,37*   | -1,12     | -1,31   |
| MBP           | -2,80 | 1,49   | 5,23*  | 3,38*        | 2,72*   | 2,03*       | 6,23*   | 1,33      | 2,05*   |
| MMP9          | 2,83  | -1,09  | -1,33  | -2,68*       | -3,57*  | -1,27       | -1,31   | -5,07*    | 1,31    |
| NFKB          | 4,48  | -7,19* | -4,14* | -2,16*       | -3,23*  | -1,21       | -1,40   | -1,26     | 3,12*   |
| PLP           | -2,63 | 1,93   | 2,85*  | 5,05*        | 2,50*   | 1,03        | 1,31    | 1,07      | 2,03*   |
| PTPN11        | -2,20 | -1,79  | -1,09  | -1,58        | -1,84   | -2,67*      | 1,52    | -2,05*    | 1,23    |
| SOD           | -2,36 | -121   | -1,43  | 1,70         | -1,07   | 1,78        | 2,55*   | -1,13     | -1,21   |
| STAT3         | 2,78  | 1,55   | 1,31   | -2,00*       | -3,08*  | 3,40*       | 3,39*   | -1,78     | -2,01*  |
| TGFB1         | 2,10  | -1,68  | -2,26* | 1,55         | -1,75   | 1,57        | 2,01*   | -3,81*    | -2,95*  |
| TNF- $\alpha$ | 26,33 | -4,56* | -2,89* | -1,01        | -2,04*  | -5,86*      | -1,51   | -1,52     | -1,05   |

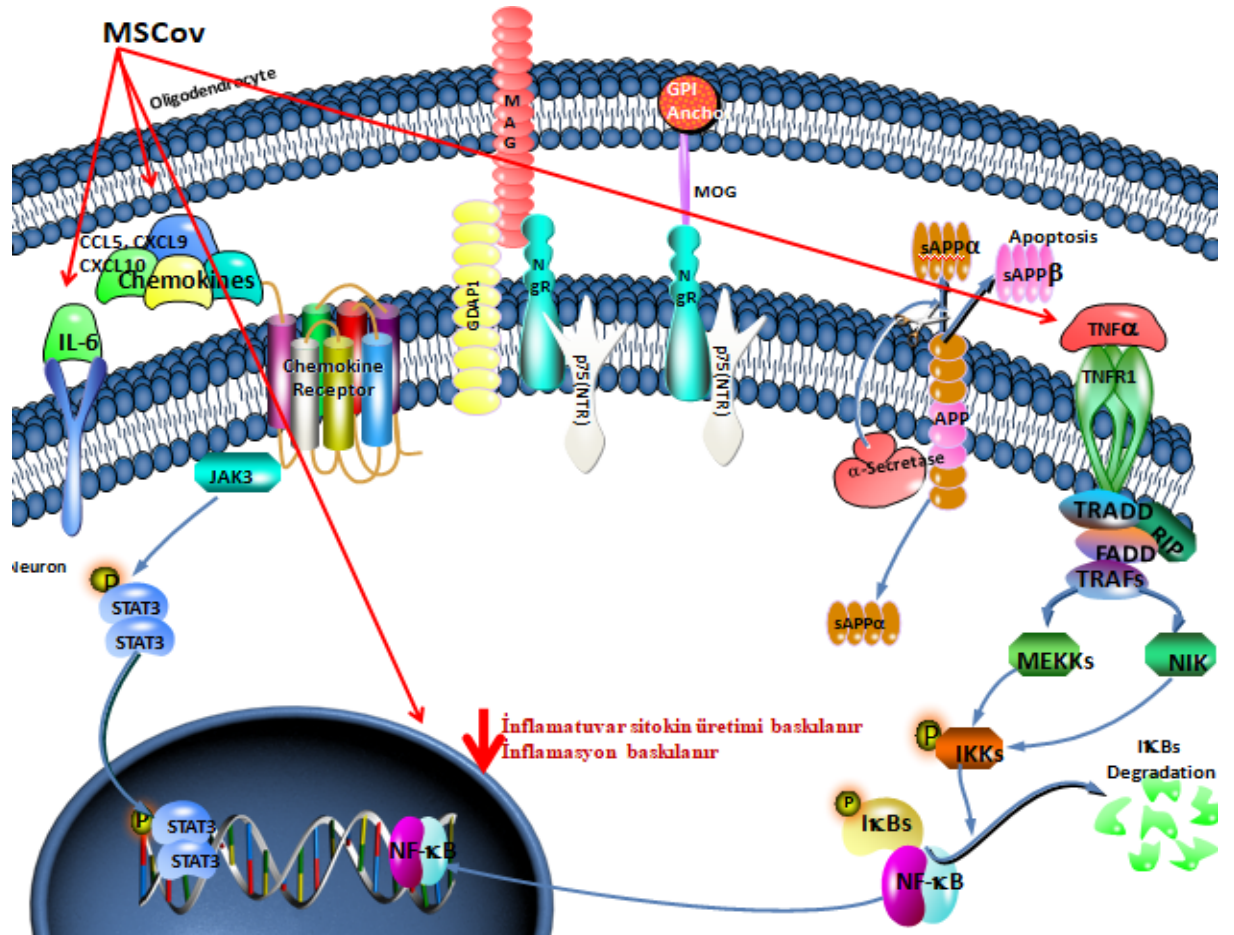
DAE grubunda Kırmızı renkli olanlar kontrole göre ekspresyon düzeyi artanlar; mavi olanlar ise azalanlardır. Diğer gruplardaki \*’lar ise anlamlı farkı göstermektedir.

Fare primer oligodendrosit hücrelerinde yapılan çalışmalarda diğer hücrelerde olduğu gibi hiçbir alt ekstre ana ekstre MSCov kadar iyi sonuçlar ortaya koyamadı. MSCov’dan geri tüketilerek elde edilen diğer 3 alt ekstre kendi aralarında değerlendirildiğinde en fazla etki gösteren ekstre SH-SY5Y hücrelerinde olduğu gibi DKM alt ekstresi olmuştur.

MSCov ekstresi C1S, CCL5, CXCL10, HIF1A, NFKB ve TNF- $\alpha$  ekspresyonunu baskılayarak kemokin/sitokin cevabını baskıladı. Ayrıca IL6 ve TGFB1 genlerini baskılayarak da T-hücre aktivasyonunu baskılamıştır. Bunun yanında miyelin ilişkili 3 gen olan MAG, MBP ve PLP ekspresyonunu ciddi anlamda arttırarak miyelin rejenere edici etki göstermiştir.

Aksonların miyelinizasyonu nöronal sağkalım için çok önemlidir ve MSS'nde bu görev oligodendrosit hücrelerindedir. Miyelin yokluğunda sinir impulsunun iletimi oldukça yavaştır (Wolswijk ve Noble 1989; Noble ve diğ. 1992) ve sağlıklı iletim için mutlaka sağlam miyelin tabakaya ihtiyaç vardır. Bu bilgilerden de yola çıkarak MSCov'dan elde edilen sonuçların önemi ortaya çıkmaktadır.

Yukarıdaki bilgileri desteklemek ve MSCov ile ilgili verileri daha iyi değerlendirebilmek adına çalışılan genlerin yolağı Şekil 381'de verilmektedir.



Şekil 381. Çalışılan genlerin MSCov uygulaması ile ilişkili yolağ (kırmızı oklar MSCov tarafından baskılanan yolları göstermektedir).

Sonuç olarak, yaptığımız hayvan deneyleri ve hücre kültürü deneyleri MSCov ekstresinin MS terapisi için ümit vadeden, güvenli bir alternatif ve tamamlayıcı tedavi ajanı olabileceğini çok kuvvetle desteklemektedir. Ana ekstre kadar iyi sonuçları hiçbir alt ekstre hiçbir hücre hattında sağlamadı. Ancak ana ekstre ile en yakın sonuçlar ise DKM alt ekstresinden elde edildi. İzole edilen saf bileşiklere bakacak olursak OPC ve SDM bileşiklerinin de moleküler veriler ışığında MS için çok önemli alternatif bir terapötik olma özelliği taşıdığını söyleyebiliriz. Umut vaad eden her iki bileşimde DKM alt ekstresinden geri tüketilerek elde edilmesi sonuçlar arasındaki korelasyonu gösteren bir başka veridir. Ancak her iki bileşik için de *in vivo* deneyler yapılması kesin sonuçlar elde etmek için gereklidir.

## 5. SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında *Capparis ovata* bitkisinden elde edilen ve MSCov ismi verilen sulu ekstrenin, halen kesin tedavisi bulunmayan MS hastalığı için hem düşük maliyeti hem de yan etkilerinin olmaması (güvenilirliği) ve aynı zamanda kolay kullanılabilir olması göz önüne alındığında, yüksek potansiyelli ve önemli bir alternatif tedavi etmeni olduğunu kuvvetle destekleyen veriler elde edildi.

Hem hayvan deneyleri hem de hücrelerle yapılan deneyler MSCov'un anti-enflamatuvar, miyelin rejenere edici, T ve B hücre aktivasyonunu baskılayıcı, kompleman aktivitesini baskılayıcı, miyelin ilişkili antijen sunumunu engelleyen etkiler ortaya koyduğunu gösterdi. Bunun yanında MSCov ekstresi ile yapılan çalışmalar bu ekstrenin ilaç-diyet etkileşiminin neredeyse olmadığını ve güvenle kullanılabileceğini göstermektedir. Tüm bu etkilerin hepsini bünyesinde barındırdığı için en iyi etki MSCov ekstresinde görüldü.

Hücrelerle yapılan çalışmalardan SH-SY5Y ve primer fare oligodendrosit hücrelerinin MS çalışmalarında kullanılabilmesini ancak CCRF-CEM hücrelerinin sadece anti-enflamatuvar etki tespiti için kullanılabilmesini gösterdi. Bunun yanında yapılacak olan bir co-culture (nöron-oligodendrosit veya nöron-T hücresi gibi) çok daha anlamlı sonuçlar elde edilmesini sağlayabilir.

Çalışma kapsamında *Capparis ovata* bitkisinden izole edilen (bazıları doğadan ilk kez izole edildi) ve yapısı tayin edilen ve *in vitro* moleküler etkileri tespit edilen toplam 7 tane saf bileşik çalışıldı. Bu bileşiklerden stigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -miristat ve özellikle olean-12-en-28-ol, 3 $\beta$  pentakosanoat bileşiklerinin MS için çok önemli alternatif terapötik olma özellikleri taşıdıkları gösterildi.

Bundan sonraki aşamada pozitif veriler elde ettiğimiz aktif bileşiklerle özellikle hayvan denemeleri yapılarak, yurt dışından çok yüksek maliyetlerle alınan ve kesin tedavi sağlamayan MS ilaçlarına bir alternatif olarak ticari bir ürüne dönüştürülmesi ülke ekonomisine katkı sağlayacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

Abdelhak, A., Junker, A., Brettschneider, J., Kassubek, J., Ludolph, A.C., Otto, M., Tumani, H. “Brain-Specific cytoskeletal damage markers in cerebrospinal fluid: is there a common pattern between amyotrophic lateral sclerosis and primary progressive multiple sclerosis?”, *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 17565–17588, (2015).

Akdemir, N., Terzi, M., Arslan, N., Onar, M., “Prevalence of Multiple Sclerosis in the Middle Black Sea Region of Turkey and demographic characteristics of patients”, *Arch Neuropsychiatry*, 54, 11-14, (2017).

Akgul, A., “Yeniden keşfedilen lezzet: Kapari (*Capparis* spp.)”, *Gıda*, 21, 119-128, (1996).

Al Said, M. S., Abdelsattar, E. A., Khalifa, S. I., El Feraly, F. S., “Isolation and Identification of an anti-inflammatory principle from *Capparis spinosa*”, *Pharmazie*, 43, 640-641, (1988).

Albrecht, P., Bouchachia, I., Goebels, N., Henke, N., Hofstetter, H.H., Issberner, A., Kovacs, Z., Lewerenz, J., Lisak, D., Maher, P., Mausberg, A. K., Quasthoff, K., Zimmermann, C., Hartung, H. P., Methner, A., “Effects of dimethyl fumarate on neuroprotection and immunomodulation”, *Journal of Neuroinflammation*, 9, 163, (2012).

Angelini, G., Vena, G. A., Filotico, R., Foti, C., Grandolfo, M., “Allergic contact dermatitis from *Capparis spinosa* L. applied as wet compresses”, *Contact dermatitis*, 24, 382-383, (1991).

Anonim, “*Capparis* spp. hakkında genel bilgiler ve ormancılık açısından önemi”, *Ege Ormancılık Araştırma Enstitüsü-Teknik Rapor*, İzmir, (1995).

Anonim, “Gebere (Kapari, *Capparis*) bitkisinin özellikleri, ekonomik değeri ve ormancılık çalışmalarındaki önemi”, *Orman Bakanlığı, Kozalak Gazetesi*, 1, 2, (1998).

Apel A., Greim B., Zetl U.K., “How frequently do patients with multiple sclerosis use complementary and alternative medicine?”, *Complement Therapy Medicine*, 13(4), 258-263, (2005).

Apel, A., Greim, B., Zetl, U. K., “How frequently do patients with multiple sclerosis use complementary and alternative medicine?”, *Complement Therapy Medicine*, 13, 258-263, (2005).

Aupperle, K. R., Bennett, B. L., Boyle, D. L., Tak, P. P., Manning, A. M., Firestein, G. S., “NF-kappa B regulation by I kappa B kinase in primary fibroblast-like synoviocytes”, *Journal of Immunology*, 163(1), 427-33, (1999).

Awwad, A. M., Hanafi, N. F., Achmawi, G. A., Naguib, A. M., “Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis patients”, *Egypt Journal of Immunology*, 24(1), 49-55, 2017.

Aydın, D., Weyer, S. W., Müller, U. C., “Functions of the APP gene family in the nervous system: insights from mouse models”, *Experimental Brain Research*, 217, 423-434, (2012).

Bagcı, C., Şimşek, S., “*Capparis ovata* desf. farelerde karaciğer enzimleri ile bazı kan parametreleri üzerine etkisi”, *Genel Tıp Dergisi*, 9, 123-125, (1999).

Baggiolini, M., “Chemokines and leukocyte traffic”, *Nature*, 392 (6676), 565-568, (1998).

Bagur, M. J., Murcia, M. A., Jiménez-Monreal, A. M., Tur, J. A., Bibiloni, M. M., Alonso, G. L., Martínez-Tomé, M., “Influence of diet in multiple sclerosis: A Systematic Review”, *Advances in Nutrition*, 8(3), 463-472, (2017).

Bajetto, A., Bonavia, R., Barbero, S., Schettini, G., “Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications”, *Journal of Neurochemistry*, 82, 1311–1329, (2002).

Baker, D., Pryce, G., Croxford, J.L., Brown, P., Pertwee, R.G., Makriyannis, A., Khanolkar, A., Layward, L., Fezza, F., Bisogno, T., Di Marzo, V., “Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model”, *FASEB Journal*, 15, 300–302, (2001).

Balashov, K. E., Rottman, J. B., Weiner, H. L., Hancock, W. W., “CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(12), 6873–6878, (1999).

Balkwill, F. R., “Tumor necrosis factor”, *British Medical Bulletin*, 45, 389-400, (1989).

Batoulis H., Recks, M. S., Addicks, K., Kuerten, S., “Experimental autoimmune encephalomyelitis-achievements and prospective advances”, *Acta Pathologica, Microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 119, 819-830, (2011).

Begg, M., Dale, N., Llaudet, E., “Modulation of the release of endogenous adenosine by cannabinoids in the myenteric plexus-longitudinal muscle preparation of the guinea pig ileum”, *British Journal of Pharmacology*, 137(8), 1298-1304, (2002).



- Benveniste, E. N., Liu, Y., McFarland, B. C., Qin, H., “Involvement of the janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in multiple sclerosis and the animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis”, *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 34, 577-588, (2014).
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., Kuchroo, V. K., “Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells”, *Nature*, 441, 235–238, (2006).
- Beutler, B., “TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade”, *Journal of Investigative Medicine*, 43, 227-235, (1995).
- Bhargava, P., Mowry, E. M. “Gut microbiome and multiple sclerosis”, *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 14(10), 492, (2014).
- Bielekova, B., Goodwin, B., Richert, N., Cortese, I., Kondo, T., Afshar, G., Grand, B., Eaton, J., Antel, J., Frank, J. A., McFarland, H. F., Martin, R., “Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83–99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand”, *Nature Medicine*, 6, 1167–1175, (2000).
- Blazevski, J., Petković, F., Momčilović, M., Paschke, R., Kaluđerović, G. N., Mostarica, S. M., Miljković, D., “Betulinic acid regulates generation of neuroinflammatory mediators responsible for tissue destruction in multiple sclerosis in vitro”, *Acta Pharmacologica Sinica*, 34, 424-431, (2013).
- Bloomgren, G., Richman, S., Hotermans, C., Subramanyam, M., Goelz, S., Natarajan, A., Lee, S., Plavina, T., Scanlon, J. V., Pharm, D., Sandrock, A., Bozic, C., “Risk of natalizumab-associated progressive multi focal leuko encephalopathy”, *The New England Journal of Medicine*, 366, 1870-1880, (2012).
- Bonfiglio, T., Olivero, G., Merega, E., Di Prisco, S., Padolecchia, C., Grilli, M., Milanese, M., Mannelli, L. C., Ghelardini, C., Bonanno, G., Marchi, M., Pittaluga, A. “Prophylactic versus therapeutic fingolimod: restoration of presynaptic defects in mice suffering from experimental autoimmune encephalomyelitis”, *PLoS One*, 12:e0170825.doi:10.1371, (2017).
- Booth, V., Keizer, D.W., Kamphuis, M.B., Clark-Lewis, I., Sykes, B.D., “The CXCR3 binding chemokine IP-10/CXCL10: structure and receptor interactions”, *Biochemistry*, 41, 10418-25, (2002).
- Bor, M., Ozkur O., Ozdemir, F., Turkan I., “Identification and characterization of the glucosinolate-myrosinase system in Caper (*Capparis ovata* Desf.)”, *United States Department of Agriculture National Agricultural Library*, (2009).

Bosch-Marce, M., Okuyama, H., Wesley, J. B., Sarkar, K., Kimura, H., Liu, Y. V., Zhang, H., Strazza, M., Rey, S., Savino, L., Zhou, Y. F., McDonald, K. R., Na, Y., Vandiver, S., Rabi, A., Shaked, Y., Kerbel, R., Lavalley, T., Semenza, G. L., “Effects of aging and hypoxia-inducible factor-1 activity on angiogenic cell mobilization and recovery of perfusion after limb ischemia”, *Circulation Research*, 101(12), 1310-8, (2007).

Bowling, A. C., “Complementary and alternative medicine and multiple sclerosis”, *Neurologic Clinics*, 29, 465-480, (2011).

Boziki, M., Grigoriadis, N., “An Update on the role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of multiple sclerosis”, *Medicinal Chemistry*, 13, (2017).

Brady, R. L., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Lange, G., Davis, S. J., Williams, A. F., Barclay, A. N., “Crystal structure of domains 3 and 4 of rat CD4: relation to the NH2-terminal domains”, *Science*, 260, 979–983, (1993).

Brasier, A. R., “The NF-kappaB regulatory network”, *Cardiovascular Toxicology*, 6, 111- 130, (2006).

Bronisz, E., Kurkowska-Jastrzębska I., “Matrix Metalloproteinase 9 in epilepsy: The role of neuroinflammation in seizure development”, *Mediators Inflammation*, 2016, 7369020, (2016).

Browne, P., Chandraratna, D., Angood, C., Tremlett, H., Baker, C., Taylor, B. V., Thompson, A. J., “Atlas of Multiple Sclerosis A growing global problem with widespread inequity”, *Neurology*, 83, 1022-1024, (2013).

Buscarinu, M. C., Romano, S., Mechelli, R., Pizzolato Umeton, R., Ferraldeschi, M., Fornasiero, A., Reniè, R., Cerasoli, B., Morena, E., Romano, C., Loizzo, N. D., Umeton, R., Salvetti, M., Ristori, G., “Intestinal permeability in relapsing-remitting multiple sclerosis”, *Neurotherapeutics*, doi.org/10.1007/s13311-017-0582-3, (2017).

Buttmann, M., Merzyn, C., Rieckmann, P., “Interferon- $\beta$  induces transient systemic IP-10/CXCL10 chemokine release in patients with multiple sclerosis”, *Journal of Neuroimmunology*, 156, 195-203, (2004).

Caminero, A., Comabella, M., Montalban, X., “Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), anti-TNF- $\alpha$  and demyelination revisited: an ongoing story”, *Journal of Neuroimmunology*, 234, 1-6, (2011).

Carter, S. L., Müller, M., Manders, P. M., Campbell, I. L., “Induction of the genes for Cxcl9 and Cxcl10 is dependent on IFN-gamma but shows differential cellular expression in experimental autoimmune encephalomyelitis and by astrocytes and microglia in vitro”, *Glia*, 55, 1728–1739, (2007).

Celik, G., Ozgun, O., Arslan, S., Sen, A., “Toxicogenomic analysis of *Capparis ovata* water extract (MSCov)”, *FEBS Journal*, 281(1), 184, (2014).

Charo, I. F., Ransohoff, R. M., “The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation”, *New England Journal of Medicine*, 354, 610–621, (2006)

Chen, F. E., Huang, D. B., Chen, Y. Q., Ghosh, G., “Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA”, *Nature*, 391, 410-413, (1998).

Chitnis, T., “The Role of CD4 T Cells in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis”, *International Review of Neurobiology*, 79, 43-72, (2007).

Choi, S. H., Kim, B. G., Robinson, J., Fink, S., Yan, M., Sporn, M. B., Markowitz, S. D., Letterio, J. J., “Synthetic triterpenoid induces 15-PGDH expression and suppresses inflammation-driven colon carcinogenesis”, *The Journal of Clinical Investigation*, 124(6), 2472-2482, (2014).

Chou, Y. K., Bourdette, D. N., Offner, H., Whitham, R., Wang, R., Hashim, G. A., Vandenberg, A. A., “Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis”, *Journal of Neuroimmunology*, 38, 105-113, (1992).

Cohen, L. H., Remley, M. J., Raunig, D., Vaz, A. N., “In vitro drug interactions of cytochrome P450: An evaluation of fluorogenic to conventional substrates”, *Drug Metabolism Disposition*, 31, 1005-1015, (2003).

Coles, A., “Newer therapies for multiple sclerosis”, *Annals of Indian Academy of Neurology*, 18, 30–34, (2015).

Comabella, M., Khouryb, S. J., “Immuno pathogenesis of multiple sclerosis”, *Clinical Immunology*, 142, 2–8, (2012).

Compston, A., Coles, A., “Multiple sclerosis”, *The Lancet*, 372, 1502-1517, (2008).

Compston, A., Coles, A., “Multiple Sclerosis”, *The Lancet*, 359, 1221-1231, (2002).

Compston, A., Confavreux, C., Lassmann, H., “The genetics of multiple sclerosis”, *McAlpine’s multiple sclerosis*, 113-181, (2005).

Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K., Gran, B., “Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)”, *British Journal of Pharmacology*, 164, 1079-1106, (2011).

Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B. E., Förster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., Haase, V. H., Jaenisch, R., Corr, M., Nizet, V., Firestein, G. S., Gerber, H. P., Ferrara, N., Johnson, R. S., “HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation”, *Cell*, 112, 645–657, (2003)

- Dalgleish, A. G., Beverley, P. C. L., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., Weiss, R. A., “The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus”, *Nature*, 312, 763-766, (1984).
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., Turnbaugh, P. J., “Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome”, *Nature*, 505(7484), 559-563 (2014).
- Davies, A. L., Desai, R. A., Bloomfield, P. S., McIntosh, P. R., Chapple, K. J., Lington, C., Fairless, R., Diem, R., Kasti, M., Murphy, M. P. and Smith, K. J., “Neurological deficits caused by tissue hypoxia in neuroinflammatory disease”, *Annals Neurology*, 74, 815–825, (2013).
- Dawson, V. L., Dawson, T. M., Bartley, D. A., Uhl G. R., Snyder, S. H., “Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures”, *Journal of Neuroscience*, 13, 2651-2661, (1993).
- De Jager, P. L., Jia, X., Wang, J., de Bakker, P. I., Ottoboni, L., Aggarwal, N. T., Piccio, L., Raychaudhuri, S., Tran, D., Aubin, C., Briskin, R., Romano, S., Baranzini, S.E., McCauley, J.L., Pericak-Vance, M.A., Haines, J.L., Gibson, R.A., Naeglin, Y., Uitdehaag, B., Matthews, P.M., Kappos, L., Polman, C., McArdle, W.L., Strachan, D.P., Evans, D., Cross, A.H., Daly, M.J., Compston, A., Sawcer S.J., Weiner, H.L., Hauser, S.L., Hafler, D.A., Oksenberg, J.R., “Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci”, *Nature Genetics*, 41, 776–782, (2009).
- Dendrou, C. A., Fugger, L., Friese, M. A., “Immunopathology of multiple sclerosis”, *Nature Review Immunology*, 15(9), 545-558 (2015).
- Dinesh, P., Rasool, M., “Berberine, an isoquinoline alkaloid suppresses TXNIP mediated NLRP3 inflammasome activation in MSU crystal stimulated RAW 264.7 macrophages through the upregulation of Nrf2 transcription factor and alleviates MSU crystal induced inflammation in rats”, *International Immunopharmacology*, 44, 26-37, (2017).
- Duddy, M., Niino, M., Adatia, F., Hebert, S., Freedman, M., Atkins, H., Kim, H. J., Bar-Or, A., “Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis”, *Journal of Immunology*, 178, 6092-6099, (2007).
- Dutra, R.C., de Souza, P.R.D., Bento, A.F., Marcon, R., Bicca, M.A., Pianowski, L.F., Calixto, J.B., “Euphol prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: Evidence for the underlying mechanisms”, *Biochemical Pharmacology*, 83, 531-542, (2012).

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Feather-Stone, R. M., “A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity”, *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95, (1961).

Eugster, H., Frei, K., Kopf, M., Frei, K., Kopf, M., Lassmann, H., Fontana, A., “IL-6- deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis”, *European Journal of Immunology*, 28, 2178–2187, (1998).

Farber, J. M., “Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes”, *Journal of Leukocyte Biology*, 61(3), 246–257, (1997).

Fernández-Ruiz, J., Moro, M. A., Martínez-Orgado, J., “Cannabinoids in neurodegenerative disorders and stroke/brain trauma: from preclinical models to clinical applications”, *Neurotherapeutics*, 12, 793–806, (2015a).

Fernández-Ruiz, J., Pazos, M. R., García-Arencibia, M., Sagredo, O., Ramos, J. A., “Role of CB 2 receptors in neuroprotective effects of cannabinoids”, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 286, 91–96, (2008).

Finco, T. S., Baldwin, A. S., “Mechanistic aspects of NF-kappa B regulation: the emerging role of phosphorylation and proteolysis”, *Immunity*, 3, 263-272, (1995).

Finnie, J. W., Blumbergs, P. C., Manavis, J., “Neuronal damage produced in rat brains by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin”, *Journal of Comparative Pathology*, 120(4), 415-420,(1999).

Friese, M. A., Montalban, X., Willcox, N., Bell, J. I., Martin, R., Fugger, L., “The value of animal models for drug development in multiple sclerosis”, *Brain*, 129, 1940-1952, (2006).

Frisullo, G., Angelucci, F., Caggiula, M., Nociti, V., Iorio, R., Patanella, A. K., Sancricca, C., Mirabella, M., Tonali, P. A., Batocchi, A. P., “pSTAT1, pSTAT3, and T-bet expression in peripheral blood mononuclear cells from relapsing-remitting multiple sclerosis patients correlates with disease activity”, *Journal of Neuroscience Research*, 84, 1027-1036, (2006).

Gaber, T., Strehl, C., Sawitzki, B., Hoff, P., Buttgereit, F., “Cellular energy metabolism in T-lymphocytes”, *International Review Immunology*, 34, 34-49, (2015).

Gál, P., Ambrus, G., Závodszy, P., “C1s, the protease messenger of C1. Structure, function and physiological significance”, *Immunobiology*, 205, 383-394, (2002).

Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., Casellas, P., “Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations”, *European Journal of Biochemistry*, 232(1), 54-61, (1995).

Gandhi, R., Laroni, A., Weiner, H. L., “Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis”, *Journal of Neuroimmunology*, 221, 7-14, (2009).

Ganeshpurkar, A., Saluja, A. K., “Protective effect of rutin on humoral and cell mediated immunity in rat model”, *Chemico-Biologica Interactions*, 273, 154-159, (2017).

García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M. A., Martínez, J. A., “Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease”, *Inflammation Research*, 58(9), 537-552, (2009).

Gasper, N. A., Petty, C. C., Schrum, L. W., Marriott, I., Bost, K. L., “Bacterium-induced CXCL10 secretion by osteoblasts can be mediated in part through toll-like receptor 4”, *Infection and Immunity*, 70(8), 4075–4082, (2002).

Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., Ley, K., “Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells”, *Science*, 327, 656–661, (2010).

Ghasemi, N., Razavi, S., Nikzad, E., “Multiple sclerosis: pathogenesis, symptoms, diagnoses and cell-based therapy”, *Cell Journal*, 19, 1-10, (2017).

Ghule, B. V., Murugananthan, G., Nakhat, P. D., Yeole, P. G., “Immunostimulant effects of *Capparis zeylanica* Linn. Leaves”, *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 311-315, (2006).

Gijbels, K., Galardy, R. E. and Steinman, L., “Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis with a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteases”, *Journal of Clinical Investigation*, 94, 2177–2182, (1994).

Gilmore, T. D., “Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives”, *Oncogene*, 25, 6680–6684, (2006).

Givogri, M. I., Bongarzone, E. R., Schonmann, V. and Campagnoni, A. T., “Expression and regulation of golli products of myelin basic protein gene during in vitro development of oligodendrocytes”, *Journal of Neuroscience Research*, 66, 679–690, (2001).

Gold, R., Kappos, L., Arnold, D. L., Bar-Or, A., Giovannoni, G., Selmaj, K., Tornatore, C., Sweetser, M.T., Yang, M., Sheikh, S.I., Dawson K. T., “Placebo-controlled phase 3 study of oral bg-12 for relapsing multiple sclerosis”, *New England Journal of Medicine*, 367, 1098–1107, (2012).

González-García, C., Torres, I. M., García-Hernández, R., Campos-Ruíza, L., Esparragoza, L. R., Coronado, M. J., Grandec, A. G., García-Merino, A., Sánchez López, A. J., “Mechanisms of action of cannabidiol in adoptively transferred experimental autoimmune encephalomyelitis”, *Experimental Neurology*, 298, 57–67, (2017)

Goris, A., Williams-Gray, C. H., Foltynie, T., Brown, J., Maranian, M., Walton, A., Compston, D. A., Barker, R. A., Sawcer, S. J., “Investigation of TGFB2 as a candidate gene in multiple sclerosis and Parkinson's disease”, *Journal of Neurology*, 254, 846–848, (2007).

Goverman, J., “Autoimmune T cell responses in the central nervous system”, *Nature Reviews Immunology*, 9, 393–407, (2009).

Graumann, U., Reynolds, R., Steck, A. J., Schaeren-Wiemers, N., “Molecular changes in normal appearing white matter in multiple sclerosis are characteristic of neuroprotective mechanisms against hypoxic insult”, *Brain Pathology*, 13, 554–573, (2003).

Greer, J. M., Lees, M. B., “Molecules in focus Myelin proteolipid protein—the first 50 years”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34, 211–215, (2002).

Hafler, D. A., “Multiple sclerosis”, *The Journal of Clinical Investigation*, 113, 788–794, (2004).

Hafler, D. A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E. S., Daly, M. J., De Jager, P. L., De Bakker, P. I., Gabriel, S. B., Mirel, D. B., Ivinson, A. J., Pericak-Vance, M. A., Gregory, S. G., Rioux, J. D., McCauley, J. L., Haines, J. L., Barcellos, L. F., Cree, B., Oksenberg, J. R., Hauser, S. L., “Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genome wide study”, *The New England Journal of Medicine*, 357, 851–862, (2007).

Hamada, N., Negishi, Y., Mizuno, M., Miya, F., Hattori, A., Okamoto, N., Kato, M., Tsunoda, T., Yamasaki, M., Kanemura, Y., Kosaki, K., Tabata, H., Saitoh, S., Nagata, K., “Role of a heterotrimeric G-protein, Gi2, in the corticogenesis: possible involvement in periventricular nodular heterotopia and intellectual disability”, *Journal of Neurochemistry*, 140(1), 82–95, (2017).

Hamid, K. M., Isiyaku, A., Kalgo, M. U., Yahaya, I. S., Mirshafiey, A., “JAK-STAT lodges in multiple sclerosis”, *Pathophysiology and Therapeutic Approach Overview Open Access Library Journal*, 4, 1–15, e3492, (2017).

Handel, A. E., Williamson, A. J., Disanto, G., Dobson, R., Giovannoni, G., Ramagopalan, S. V., “Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis”, *Plos One*, 6, e16149, (2011).

- Harauz, G., Boggs, J. M., “Myelin management by the 18.5-kDa and 21.5-kDa classic myelin basic protein isoforms”, *Journal of Neurochemistry*, 125, 334-361, (2013).
- Harris, T. J., Grosso, J. F., Yen, H. R., Xin, H., Kortylewski, M., Albesiano, E., Hipkiss, E. L., Getnet, D., Goldberg, M. V., Maris, C. H., Hausseu, F., Yu, H., Pardoll, D. M., Drake C. G., “Cutting edge: an in vivo requirement for STAT3 signaling in Th17 development and Th17- dependent autoimmunity”, *Journal of Immunology*, 179, 4313–4317, (2007).
- Hartmann, D., Tournoy, J., Saftig, P., Annaert, W., De Strooper, B., “Implication of APP secretases in notch signaling”, *Journal of Molecular Neurosciences*, 17, 171-81, (2001).
- Hartung, H. P., Gonsette, R., Konig, N., Kwiecinski, H., Guseo, A., Morrissey, S.P., Krapf, H., Zwingers, T., “Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: A placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial”, *Lancet*, 360, 2018–2025, (2002).
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., Latz, E., “Innate immune activation in neurodegenerative disease”, *Nature Review Immunology*, 14, 463–477, (2014).
- Hogenesch, J. B., Chan, W. K., Jackiw, V. H., Brown, R. C., Gu, Y. Z., Pray-Grant, M., Perdew, G. H., Bradfield, C. A., “Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway”, *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 8581–8593, (1997).
- Holman, D. W., Klein, R. S., Ransohoff, R. M., “The blood–brain barrier, chemokines and multiple sclerosis”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812, 220–230, (2011).
- Hu, Y., Liu, J., Huang, H., “Recent agents targeting HIF-1 $\alpha$  for cancer therapy”, *Journal of Cell Biochemistry*, 114, 498-509, (2013).
- Huang, B., Wang, Q. T., Song, S. S., Wu, Y. J., Ma, Y. K., Zhang, L. L., Chen, J. Y., Wu, H. X., Jiang, L., Wei, W., “Combined use of etanercept and mtx restores CD4+/CD8+ ratio and tregs in spleen and thymus in collagen-induced arthritis”, *Inflammation Research*, 61, 1229–1239, (2012),
- Iarlori, C., Reale, M., Lugaresi, A., De Luca, G., Bonanni, L., Di Iorio, A., Feliciani, C., Conti, P., Gambi, D., “RANTES production and expression is reduced in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon-beta-1b”, *Journal of Neuroimmunology*, 107, 100–107, (2000).
- Ibeas B. C., Chen, T., Nunn, A. V. W., Bazelot, M., Dallas, M., Whalley, B. J., “Molecular targets of cannabidiol in neurological disorders”, *Neurotherapeutics*, 12, 699–730, (2015).



Inglese, M., Petracca, M., “Therapeutic strategies in multiple sclerosis: A focus on neuroprotection and repair and relevance to schizophrenia”, *Schizophrenia Research*, 161, 94–101, (2015).

Ingram, G., Hakobyan, S., Hirst, S. L., Harris, C. L., Loveless, S., Mitchell, J. P., Pickersgill, T. P., Robertson, N. P., Morgan, B. P., “Systemic complement profiling in multiple sclerosis as a biomarker of disease state”, *Multiple Sclerosis*, 18, 1401–1411, (2012).

Ingram, G., Hakobyan, S., Robertson, N. P. Morgan, B. P., “Complement in multiple sclerosis: its role in disease and potential as a biomarker”, *Clinical Experimental Immunology*, 155,128-139, (2009).

Inocencio, C., Rivera, D., Obon, M. C., Alcaraz, F., Barrena, J. A., “A systematic revision of *Capparis* section *Capparis* (Capparaceae)”, *Annals Of The Missouri Botanical Garden*, 92, 122-149, (2006).

Inoue, T., Majid, T., Quick, A., Robia, G. P., Christine, B., “The role of SOD-2 in a mouse model of multiple sclerosis”, *The FASEB Journal*, 26, (2012).

Jakkula, E., Leppä, V., Sulonen, A. M.,Varilo, T., Kallio, S. Purcell, S., Koivisto K., Pentti Tienari, P., Sumelahti, M. L., Elovaara, I., Pirttilä, T., Reunanen, M., Aromaa, A., Oturai, A. B., Søndergaard, H. B., Harbo, H., Mero, I. L., Gabriel, S. B., Mirel, D.B., Hauser, S. L., Kappos, L., Polman, C., Jager, L. D., Hafler, D. A., Daly, M. J., Palotie, A., Saarela, A., Peltonen L., “Genome-wide association study in a high-risk isolate for multiple sclerosis reveals associated variants in STAT3 gene”, *American Journal of Human Genetics*, 86, 285–291, (2010).

Janssens, K., Slaets, H., Hellings, N., “Immunomodulatory properties of the IL-6 cytokine family in multiple sclerosis”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1351, 52–60 (2015).

Jeong, Y. H., Hyun, J. W., Kim Van Le, T., Kim, D. H., Kim, H. S., “Kalopanaxsaponin exerts anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-stimulated microglia via inhibition of JNK and NF-κB/AP-1 pathways”, *Biomolecules and Therapeutics*, 21, 332-337, (2013).

Johnson, K. P., Brooks, B. R., Cohen, J. A., Ford, C. C., Goldstein, J., Lisak, R. P., Myers, L. W., Panitch, H. S., Rose, J. W., Schiffer, R. B., “Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: Results of a phase iii multicenter, double-blind placebo-controlled trial”, *Neurology*, 45, 1268–1276, (1995).

Kappos, L., Radue, E. W., O’Connor, P., Polman, C., Hohlfeld, R., Calabresi, P., Selmaj, K., Agoropoulou, C., Leyk, M., Zhang-Auberson, L., Burtin, P., “A placebo-controlledtrial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis”, *The New England Journal of Medicine*, 362, 387-410, (2010).

Kasper, L. H., Shoemaker, J., “Multiple sclerosis immunology: the healthy immune system vs the MS immune system”, *Neurology*, 74, 2-8, (2010).

Katsuno, M., Adachi, H., Banno, H., Suzuki, K., Tanaka, F., Sobue, G., “Transforming growth factor- $\beta$  signaling in motor neuron diseases”, *Current Molecular Medicine*, 11(1), 48-56, (2011).

Kaur, G., Dufour, J.M., “Cell lines”, *Spermatogenesis*, 2, 1–5, (2012).

Kerfoot, S.M., Long, E.M., Hickey, M.J., Andonegui, G., Lapointe, B.M., Zanardo, R.C., Bonder, C., James, W.G., Robbins, S.M., Kubes, P., “Tlr4 contributes to disease-inducing mechanisms resulting in central nervous system autoimmune disease”, *The Journal of Immunology*, 173, 7070–7077, (2004).

Kimura, A., Kishimoto, T., “IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance”, *European Journal of Immunology*, 40, 1830–1835, (2010).

Kingwell, E., Marriott, J. J., Jetté, N., Pringsheim, T., Makhani, T., Morrow, S. A., Fisk, J. D., Evans, C., Béland, S. G., Kulaga, S., Dykeman, J., Wolfson, C., Koch, M. W., Marrie, R. A., “Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review”, *BMC Neurology*, 13, 128-14, (2013).

Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S., Ito, H., “Novel precursor of Alzheimer’s disease amyloid protein shows protease inhibitory activity”, *Nature*, 331, 530–532, (1988).

Kivrak, I., Duru, M. E., Ozturk, M., Mercan, N., Harmandar, M., Topcu, G., “Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*”, *Food Chemistry*, 116, 470-479, (2009).

Klein, T. W., Newton, C. A., “Therapeutic potential of cannabinoid-based drugs”, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 601, 395–413, (2007).

Kouchaki, E., Salehi, M., Sharif, M., Nikouejad, H., Akbari, H., “Numerical status of CD4(+), CD25(+), FoxP3(+) and CD8(+), CD28(-) regulatory T cells in multiple sclerosis”, *Iran Journal of Basic Medicinal Sciences*, 17, 250-255, (2014).

Kozela, E., Lev, N., Kaushansky, N., Eilam, R., Rimmerman, N., Levy, R., Ben-Nun, A., Juknat, A., Vogel, Z., “Cannabidiol inhibits pathogenic T cells, decreases spinal microglial activation and ameliorates multiple sclerosis-like disease in C57BL/6 mice”, *British Journal of Pharmacology*, 163, 1507–1519, (2011).

Kreutzberg, G. W., “Microglia: a sensor for pathological events in the CNS”, *Trends Neurosciences*, 19, 312–318, (1996).

Krumbholz, M., Meinl, E., “B cells in MS and NMO: pathogenesis and therapy”, *Seminars in Immunopathology*, 36, 339-350, (2014).

Kuhlmann, T., Lingfeld, G., Bitsch, A., Schuchardt, J., Bruck, W., “Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time”, *Brain*, 125, 2202–2212, (2002).

Kumar, A., Ekavali, K., Chopra, M., Mukherjee, R., Pottabathini, D., Dhull, K., “Current knowledge and pharmacological profile of berberine: an update”, *European Journal of Pharmacology*, 761, 288-297, (2015).

Lakhan S. E., Rowland M., “Whole plant cannabis extracts in the treatment of spasticity in multiple sclerosis: a systematic review”, *BMC Neurology*, doi:10.1186/1471-2377-9-59, (2009).

Larochelle, C., Alvarez, J. I., Prat, A., “How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis?”, *FEBS Letters*, 585(23), 3770–3780, (2011).

Laursen, J. H., Sondergaard, H. B., Sorensen, P. S., Sellebjerg, F., Oturai, A. B., “Association between age at onset of multiple sclerosis and vitamin D level-related factors”, *Neurology*, 86, 88–93, (2016).

Le Moan, N., Baeten, K. M., Rafalski, V. A., Ryu, J. K., Coronado, P. E. R., Catriona B., Syme, C., Davalos, D., Akassoglou, K., “Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  in Astrocytes and/or Myeloid Cells Is Not Required for the Development of Autoimmune Demyelinating Disease”, *eNeuro*, doi:10.1523/ENEURO.0050-14.2015 (2015).

Leadbetter, E. A., Bourque, C. R., Devaux, B., Olson, C. D., Sunshine, G. H., Hirani, S., Wallner, B. P., Smilek, D. E., Happ, M. P., “Experimental autoimmune encephalomyelitis induced with a combination of myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein is ameliorated by administration of a single myelin basic protein peptide”, *Journal of Immunology*, 161(1), 504-512, (1998).

Lee, W., Yang, E. J., Ku, S. K., Song, K. S., Bae, J. S., “Anti-inflammatory effects of oleanolic acid on LPS-induced inflammation in vitro and in vivo”, *Inflammation*, 36(1), 94-102, (2013).

Leibowitz, S. M., Yan, J., “NF- $\kappa$ B Pathways in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis and the Therapeutic Implications”, *Frontiers in Molecular Neurosciences*, 84, (2016).

Lenk, H., Muller, U., Tanneberger, S., “Mitoxantrone: Mechanism of action, antitumor activity, pharmacokinetics, efficacy in the treatment of solid tumors and lymphomas, and toxicity”, *Anticancer Research*, 7, 1257–1264, (1987).

Leong, E. M., Semple, S. J., Angley, M., Siebert, W., Petkov, J., McKinnon R. A., “Complementary and alternative medicines and dietary interventions in multiple sclerosis: what is being used in South Australia and why?”, *Complementary Therapies in Medicine*, 17, 4, 216-223, (2009).

Li, Q. Q., Burt, D. R., Bever, C. T., “Glatiramer acetate inhibition of tumor necrosis factor-alpha-induced RANTES expression and release from U-251 MG human astrocytic cells”, *Journal of Neurochemistry*, 77, 1208–1217, (2001).

Li, Q., Verma, I. M., “NF-kappaB regulation in the immune system”, *Nature Reviews Immunology*, 2(10), 725-734, 2002.

Liby, K., Voong, N., Williams, C. R., Risingsong, R., Royce, D. B., Honda, T., Gribble, G. W., Sporn, M. B., Letterio, J. J., “The synthetic triterpenoid CDDO-Imidazolide suppresses STAT phosphorylation and induces apoptosis in myeloma and lung cancer cells”, *Clinical Cancer Research*, 12, 4288-4293, (2006).

Lill, C. M., Schjeide, B. M., Akkad, D. A., Blaschke, P., Winkelmann, A., Gerdes, L. A., Hoffjan, S., Luessi, F., Dörner, T., Li, S. C., Steinhagen-Thiessen, E., Lindenberger, U., Chan, A., Hartung, H.P., Aktas, O., Lohse, P., Kümpfel, T., Kubisch, C., Epplen, J. T., Zettl, U. K., Bertram, L., Zipp, F., “Independent replication of STAT3 association with multiple sclerosis risk in a large German case-control sample”, *Neurogenetics*, 13, 83-86, (2012).

Lim, S., Constantinescu, C., Lim, S. Y., Constantinescu, C. S., “TNF- $\alpha$ : a paradigm of paradox and complexity in multiple sclerosis and its animal models”, *Open Autoimmunity Journal*, 2, 160–70, (2010).

Link, H. J., Sun, Z., Wang, Z., Xu, A., Löve, S., Olsson, F. T., “Virus-reactive and autoreactive T-cells are accumulated in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis”, *Journal of Neuroimmunology*, 38, 63, (1992).

Liu, W., Liu, Y., Fu, Q., Zhou, L., Chang, Y., Xu, L., Zhang, W., Xu, J., “Elevated expression of IFN-inducible CXCR3 ligands predicts poor prognosis in patients with non-metastatic clear-cell renal cell carcinoma”, *Oncotarget*, 7(12), 13976-13983, (2016).

Liu, X., Lee, Y. S., Yu, C. R., Egwuagu, C. E., “Loss of STAT3 in CD4+ T cells prevents development of experimental autoimmune diseases”, *Journal of Immunology*, 180, 6070–6076, (2008).

Liu, Y. F., Wen, C. Y. Chen, Z. Wang, Y. Huang, Y. Tu, S. H., “Effects of berberine on NLRP3 and IL-1beta expressions in monocytic THP-1 cells with monosodium urate crystals-induced inflammation”, *Biomed Research International*, Doi: 10.1155/2016/2503703, (2016)

Luo, J., Chen, R., Zeng S., Yu, J., Jiang G., Wang L., Qin, X., “The effects of berberine on a murine model of multiple sclerosis and the SPHK1/S1P signaling pathway”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 490(3), 927-932, (2017).

- Ma X., Jiang Y., Wu A., Chen X., Pi R., Liu M., Liu Y., “Berberine attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice”, *Plos One*, 5(10), e13489, (2010).
- Madeddu, R., Farace, C., Tolu, P., Solinas, G., Asara, Y., Sotgiu, M.A. Delogu, L. G., Prados, J. C., Sotgiu, S., Montella, A., “Cytoskeletal proteins in the cerebrospinal fluid as biomarker of multiple sclerosis”, *Neurological Sciences*, 34, 181–186, (2013).
- Malmeström, C., Haghghi, S., Rosengren, L., Andersen, O., Lycke, J., “Neurofilament light protein and glial fibrillary acidic protein as biological markers in MS”, *Neurology*, 61, 1720–1725, (2003).
- Marik, C., Felts, P. A., Bauer, J., Lassmann, H., Smith, K. J., “Lesion genesis in a subset of patients with multiple sclerosis: a role for innate immunity?”, *Brain*, 130, 2800–2815, (2007).
- Martín, R., Carvalho-Tavares, J., Hernández, M., Arnés, M., Ruiz-Gutiérrez, V., Nieto, M. L., “Beneficial actions of oleanolic acid in an experimental model of multiple sclerosis: A potential therapeutic role”, *Biochemical Pharmacology*, 79, 198-208, (2010).
- Martinelli, V., Radaelli, M., Straffi, L., Rodegher, M., Comi, G., “Mitoxantrone: Benefits and risks in multiple sclerosis patients”, *Neurological Sciences*, 30, 167-170, (2009).
- Martini, R., Mohajeri, M. H., Kasper, S., Giese, K. P. and Schachner, M., “Mice doubly deficient in the genes for P0 and myelin basic protein show that both proteins contribute to the formation of the major dense line in peripheral nerve myelin”, *Journal of Neuroscience*, 15, 4488-4495, (1995).
- Massberg, S., von Andrian, U. H., “Fingolimod and sphingosine-1-phosphate modifiers of lymphocyte migration”, *The New England Journal of Medicine*, 355, 1088-1091, (2006).
- Mathew, A., Pakan, J. M., Collin, E. C., “An ex-vivo multiple sclerosis model of inflammatory demyelination using hyperbranched polymer”, *Biomaterials*, 34, 5872–5882, (2013).
- Mazzi, V., “Cytokines and chemokines in multiple sclerosis”, *Clinical Theraphy*, 166(1), 62-66, (2015).
- McKimmie, C. S., Graham, G. J., “Astrocytes modulate the chemokine network in a pathogen-specific manner”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394(4), 1006–1011, (2010).

- Mehling, M., Johnson, T. A., Antel, J., Kappos, L., Bar-Or, A., “Clinical immunology of the sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis”, *Neurology*, 76, 20-27, (2011).
- Merrill, J. E., Ignarro, L. J., Sherman, M. P., Melinek, J., Lane, T. E., “Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide”, *Journal of Immunology*, 151, 2132-2141, (1993).
- Mete, A., Garcia, J., Ortega, J., Lane, M., Scholes, S., Uzal, F. A., “Brain lesions associated with clostridium perfringens type D epsilon toxin in a Holstein heifer calf”, *Veterinary Pathology*, 50(5), 765-768, (2013).
- Miller, A. E., O’Connor, P., Wolinsky, J. S., Confavreux, C., Kappos, L., Olsson, T. P., Truffinet, P., Wang, L., D’Castro, L., Comi, G., Freedman, M. S., “Pre-specified subgroup analyses of a placebo-controlled phase III trial (TEMPO) of oral teriflunomide in relapsing multiple sclerosis”, *Multiple Sclerosis Journal*, 18, 1625-1632, (2012).
- Miller, E., Mrowicka, M., Malinowska, K., Mrowicki, K., Saluk-Juszczak, J., Kedziora, J., “The effects of whole-body cryotherapy on oxidative stress in multiple sclerosis patients”, *Journal of Thermal Biology*, 35, 406–410, (2010).
- Milo, R., Kahana, E., “Multiple sclerosis: geoeconomics, genetics and the environment”, *Autoimmunity Reviews*, 9, 387-394, (2010).
- Minty, A., Chalon, P., Derocq, J. M., Dumont, X., Guillemot, J. C., Kaghad, M., Labit, C., Leplatois, p., Liauzun, P., Miloux, B., “Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses”, *Nature*, 362, 248-250. (1993).
- Mitrovic, B., Ignarro, L. J., Vinters, H. V., Akers, M. A., Schmid, I., Uittenbogaart, C., Merrill, J. E., “Nitric oxide induces necrotic but not apoptotic cell death in oligodendrocytes”, *Neuroscience*, 65, 531-539, (1995).
- Mitsdoerffer, M., Kuchroo, V., “New pieces in the puzzle: How does interferon-beta really work in multiple sclerosis?”, *Annals of Neurology*, 65, 487–488, (2009).
- Moreno Torres, I., Sanchez, A. J., Garcia-Merino, A., “Evaluation of the tolerability and efficacy of Sativex in multiple sclerosis”, *Expert Review Neurotherapeutics*, 14 (11), 1243–1250, (2014).
- Mori, F., Nisticò, R., Nicoletti, C. G., Zagaglia, S., Mandolesi, G., Piccinin, S., Martino, G., Finardi, A., Rossini, P. M., Marfia, G. A., Furlan, R., Centonze, D., “RANTES correlates with inflammatory activity and synaptic excitability in multiple sclerosis”, *Multiple Sclerosis*, 22, 1405–1412, (2016).
- Moser, B., Loetscher, P., “Lymphocyte traffic control by chemokines”, *Nature Immunology*, 2, 123–128, (2001).

- Muller, D. M., Pender, M. P., Greer, J. M., “Chemokines and chemokine receptors: potential therapeutic targets in multiple sclerosis”, *Current Drug Targets Inflammation Allergy*, 3, 279-290, (2004).
- Muller, M., Carter, S., Hofer M. J., Campbell, I. L., “The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity a tale of conflict and conundrum”, *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 36, 368-387, (2010).
- Muller, S. K., Bender, A., Laub, C., Högen, T., Schlaudraff, F., Liss, B., Klopstock, T., Elstner, M., “Lewy body pathology is associated with mitochondrial DNA damage in Parkinson's disease”, *Neurobiology Aging*, 34, 2231-2233, (2013).
- Multhaup, G., Huber, O., Buée, L., Galas, M. C., “Amyloid Precursor Protein (APP) Metabolites APP Intracellular Fragment (AICD), A $\beta$ 42, and Tau in Nuclear Roles”, *The Journal of Biological Chemistry*, 290, 23515-23522, (2015).
- Munger, K. L., Levin, L. I., Hollis, B. W., Howard, N. S., Ascherio, A., “Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis”, *The Journal of the American Medical Association*, 296, 2832–2838, (2006).
- Munoz-Torredo, D., “Acetylcholinesterase inhibitors as disease-modifying therapies for Alzheimer's disease”, *Current Medicinal Chemistry*, 15, 2433-2455, (2008).
- Munz, C., Lunemann, J. D., Getts, M. T., Miller, S. D., “Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity?”, *Nature Reviews Immunology*, 9, 246–258, (2009).
- Murphy, Á. C., Lalor, S. J., Lynch, M. A., Mills, K. H. G., “Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis”, *Brain Behavior Immunology*, 24, 641–651, (2010).
- Murray, T. J., “The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries”, *Journal of the Neurological Sciences*, 277, 3-8, (2009).
- Müller, M., Carter, S., Hofer M. J., Campbell, I. L., “The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity a tale of conflict and conundrum”, *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 36, 368–387, (2010).
- Nakahara, J., Takemura, M., Gomi, H., Tsunematsu, K., Itohara, S., Asou, H., Ogawa, M., Aiso, S., Tan-Takeuchi, K., “Role of radial fibers in controlling the onset of myelination”, *Journal of Neuroscience Research*, 72, 279–289, (2003).
- Nemazannikova, N., Mikkelsen, K., Stojanovska, L., Blatch, G. L., Apostolopoulos, V., “Is there a link between vitamin B and multiple sclerosis?”, *Medicinal Chemistry*, doi: 10.2174/1573406413666170906123857, (2017).

- Neuhaus, O., Farina, C., Wekerle, H., Hohlfeld, R., “Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis”, *Neurology*, 56, 702–708, (2001).
- Nishikomori, R., Usui, T., Wu, C. Y., Morinobu, A., O’Shea, J. J., and., Strober, W., “Activated STAT4 has an essential role in Th1 differentiation and proliferation that is independent of its role in the maintenance of IL-12R Beta 2 chain expression and signaling”, *Journal of Immunology*, 169, 4388-4398, (2002).
- Noble, M., Wren, D., Wolswijk, G., “The O-2A(adult) progenitor cell: a glial stem cell of the adult central nervous system”, *Seminars in Cell Biology*, 3, 413–422, (1992).
- Norgren, N., Sundström, P., Svenningsson, A., Rosengren, L., Stigbrand, T., Gunnarsson, M., “Neurofilament and glial fibrillary acidic protein in multiple sclerosis”, *Neurology*, 63, 1586–1590, (2004).
- Noseworthy, J. H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Weinshenker, B. G., “Multiple sclerosis”, *The New England Journal of Medicine*, 343, 938–952, (2000).
- Nouri, M., Bredberg, A., Weström, B., Lavasani, S., “Intestinal barrier dysfunction develops at the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis, and can be induced by adoptive transfer of autoreactive T cells”, *PLoS One*, e106335, (2014).
- O’Brien R. J., and Wong P. C., “Amyloid precursor protein processing and alzheimer’s disease”, *Annual Review Neurosciences*, 34, 185–204, (2011).
- O’Shea, J. J., Plenge, R., “JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease”, *Immunity*, 36, 542–550, (2012).
- O’connor, P., Filippi, M., Arnason, B., Comi, G., Cook, S., Goodin, D., Hartung, H. P., Jeffery, D., Kappos, L., Boateng, F., Filippov, V., Groth, M., Knappertz, V., Kraus, C., Sandbrink, R., Pohl, C., Bogumil, T., Beyond Study Group, O’connor, P., Filippi, M., Arnason, B., Cook, S., Goodin, D., Hartung, H. P., Kappos, L., Jeffery, D., Comi, G., “250 microgor 500 microgor interferon beta-1b versus 20 mg glatiramercetate in relapsing-remitting multiple sclerosis: a prospective, randomised, multi centre study”, *The Lancet Neurology*, 8, 889-897, ( 2009).
- Omary, M. B., Coulombe, P. A., McLean, W. H., “Intermediate filament proteins and their associated diseases”, *New England Journal of Medicine*, 11, 351(20), 2087-2100, (2004).
- Ortiz, G. G., Flores-Alvarado, L. J., Pacheco-Moisés, F. P., Mireles-Ramírez, M. A., González Renovato, E. D., Sánchez-López, E. L., Sánchez-Romero, L., Santoscoy, J. F., Brizuela, V., Sánchez-González, V. J., “Cross-talk between glial cells and neurons: Relationship in Multiple Sclerosis”, *Clinical Case Reports and Reviews*, 2, 565-571, (2016).



Ortiz, G. G., Pacheco-Moisés, F. P., Bitzer-Quintero, O. K., Ramírez-Anguiano, A. C., FloresAlvarado, L. J., “Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach”, *Clinical and Developmental Immunology*, doi: 10.1155/2013/708659, (2013).

O'shea, J. J., Plenge, R., “JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease”, *Immunity*, 36, 542-550, (2012).

Ostman, A., Yang, Q., Tonks, N. K., “Expression of DEP-1, a receptor-like protein-tyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density”, *Proceedings of the National Academy of Science*, 91, 9680–9684, (1994).

Ozgun- Acar, O., Celik-Turgut, G., Gazioglu, I., Kolak, U., Ozbal, S., Ergur, B. U., Arslan, S., Sen, A., Topcu, G., “*Capparis ovata* treatment suppresses inflammatory cytokine expression and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis in C57BL/6 mice”, *Journal of Neuroimmunology*, 298, 106-116, (2016).

Ozgun-Acar O., Gazioglu, I., Kolak, U., Sen, A., Topcu, G., “A potential therapeutic role in multiple sclerosis for stigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -ol myristate isolated from *Capparis ovata*”, *The Eurobiotech Journal*, doi:10.24190/ISSN2564-615X, (2017).

Ozturk, M., Kolak, U., Topçu, G., Oksuz, S., Choudhary, M. I., “Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical scavenging activity guided fractionation”, *Food Chemistry*, 126, 31-38, (2011).

Ölmez, Z., Akın, E., Göktürk, A., “Farklı yetiştirme ortamı ve polietilen tüp boyutunun Kapari (*Capparis ovata* Desf.) fidanlarının bazı morfolojik özellikleri üzerine etkisi”, *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 12,101-108, (2011).

Palmer, A. M., “Teriflunomide, an inhibitor of dihydroorotate dehydrogenase for the potential oral treatment of multiple sclerosis”, *Current Opinion in Investigation Drugs*, 11, 1313–1323, (2010).

Pareek, T. K., Belkadi, A., Kesavapany, S., Zaremba, A., Loh, S.L., Bai, L., Cohen, M. L., Meyer, C., Liby, K. T., Miller, R. H., Sporn, M. B., Letterio, J. J., “Triterpenoid modulation of IL-17 and Nrf-2 expression ameliorates neuroinflammation and promotes remyelination in autoimmune encephalomyelitis”, *Scientific Reports*, 1, 201-212, (2011).

Parhiz, H., Roohbakhsh, A., Soltani, F., Rezaee, R., Iranshahi, M., “Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models”, *Phytotherapy Research*, 29, 323-331, (2015).

Petzold, A., “Glial fibrillary acidic protein is a body fluid biomarker for glial pathology in human disease”, *Brain Research*, 1600, 17–31, (2015).

- Peyssonnaud, C., Cejudo-Martin, P., Doedens, A., Zinkernagel, A. S., Johnson, R. S., Nizet, V., “Cutting edge: essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis”, *Journal of Immunology*, 178, 7516–7519, (2007)
- Pike, C. J., Burdick, D., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G., Cotman, C. W., “Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state”, *Journal of Neurology*, 13, 1676-1687, (1993).
- Polachini, C. R., Spanevello, R. M., Zanini, D., Baldissarelli, J., Pereira, L. B., Schetinger, M. R., da Cruz I. B., Assmann, C. E., Bagatini, M. D., Morsch, V. M., “Evaluation of Delta-Aminolevulinic Dehydratase Activity, Oxidative Stress Biomarkers, and Vitamin D Levels in Patients with Multiple Sclerosis”, *Neurotoxicity Research*, 29, 230-242, (2016).
- Prineas, J. W., Kwon, E. E., Cho, E. S., Sharer, L. R., Barnett, M. H., Oleszak, E. L., Hoffman, B., Morgan, B. P., “Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis”, *Annals of Neurology*, 50, 646–657, (2001).
- Probert, L., “TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects”, *Neuroscience*, 302, 2-22, (2015).
- Probst, B. L., Trevino, I., McCauley, L., Bumeister, R., Dulubova, I., Wigley, W. C., Ferguson, D. A., “A novel synthetic triterpenoid with broad anticancer and anti-inflammatory activity”, *PLoS One*, 10(4), e0122942, (2015).
- Pucci, E., Giuliani, G., Solari, A., Simi, S., Minozzi, S., Di Pietrantonj, C., Galea, I., “Natalizumab for relapsing remitting multiple sclerosis”, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 10, DOI: 10.1002/14651858.CD007621, (2011).
- Quarles, R. H., “Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond”, *Journal of Neurochemistry*, 100, 1431-1448, (2007).
- Quarles, R. H., “Myelin-associated glycoprotein in demyelinating disorders”, *Critical Reviews in Neurobiology*, 5, 1-28, (1989).
- Qureshi, M., Al-Suhaimi, E. A., Wahid, F., Shehzad, O., Shehzad, A., “Therapeutic potential of curcumin for multiple sclerosis”, *Neurological Sciences*, doi: 10.1007/s10072-017-3149-5, (2017).
- Quyang, W., Kolls, J. K., Zheng, Y., “The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation”, *Immunity*, 28, 454-467, (2008).
- Ragheb, S., Abramczyk, S., Lisak, D., Lisak, R., “Long-term therapy with glatiramer acetate in multiple sclerosis: Effect on t-cells”, *Multiple Sclerosis Journal*, 7, 43-47, (2001).

Raine, C. S., “The Dale E. McFarlin Memorial Lecture: the immunology of the multiple sclerosis lesion”, *Annals Neurology*, 36, 61-72, (1994).

Raivich, G., Banati, R., “Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease”, *Brain Research Reviews*, 46, 261–281, (2004).

Ram, M., Sherer, Y., Shoenfeld, Y., “Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases”, *Journal of Clinical Immunology*, 26, 299–307, (2006).

Rangachari, M., Kuchroo, V. K., “Using eae to better understand principles of immune function and autoimmune pathology”, *Journal of Autoimmunity*, 45, 31–39, (2013).

Ransohoff, R. M., “Turning over the Chance card on MS susceptibility”, *Nature Immunology*, 11, 570–572, (2010).

Raphael, I., Mahesula, S., Kalsaria, K., Kotagiri, V., Purkar, A. B., Anjanappa, M., Shah, D., Pericherla, V., Jadhav, Y. L., Raghunathan, R., Vaynberg, M., Noriega, D., Grimaldo, N. H., Wenk, C., Gelfond, J. A., Forsthuber, T. G., Haskins, W. E., “Microwave and magnetic (M(2)) proteomics of the experimental autoimmune encephalomyelitis animal model of multiple sclerosis”, *Electrophoresis*, 33, 3810-3819, (2012).

Raymond, J. R., Appleton, K. M., Pierce, J.Y., Peterson, Y. K., “Suppression of GNAI2 message in ovarian cancer”, *Journal of Ovarian Research*, doi: 10.1186/1757-2215-7-6, (2014).

Rice, G. A., Hartung, H. P., Calabresi, P. A., “Anti- $\alpha$ 4 integrin therapy for multiple sclerosis: Mechanisms and rationale”, *Neurology*, 64, 1336-1342, (2005).

Robinson, W. H., Genovese, M. C., Moreland, L. W., “Demyelinating and neurologic events reported in association with tumor necrosis factor alpha antagonism: by what mechanisms could tumor necrosis factor alpha antagonists improve rheumatoid arthritis but exacerbate multiple sclerosis?”, *Arthritis and Rheumatology*, 44, 1977-83, (2001).

Rog, D. J., Nurmikko, T. J., Friede, T., Young, C. A., “Randomized, controlled trial of cannabis-based medicine in central pain in multiple sclerosis”, *Neurology*, 65 (6), 812-819, (2005).

Romi, F., Helgeland, G., Gilhus, N. E., “Serum levels of matrix metalloproteinases: implications in clinical neurology”, *European Neurology*, 67, 121–128, (2012).

Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X., “Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis”, *Nature*, **362**, 59–62, (1993).

- Rot, A., von Andrian, U. H., “Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells”, *Annual Review of Immunology*, 22, 891-928, (2004).
- Rumah, K. R., Linden, J., Fischetti, V. A., Vartanian, T., “Isolation of *Clostridium perfringens* type B in an individual at first clinical presentation of multiple sclerosis provides clues for environmental triggers of the disease”, *PLoS One*, 8(10), e76359, (2013).
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjogren, S., Hjorth, S., Hermansson, N. O., Leonova, J., Elegring, T., Nilsson, K., Drmota, T., Greasley, P. J., “The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor”, *British Journal of Pharmacology*, 152, 984-986, (2007).
- Saresella, M., Mendozzi, L., Rossi, V., Mazzali, F., Piancone, F., LaRosa, F., Marventano, V., Caputo, D., Felis, G. E., and Clerici, E., “Immunological and clinical effect of diet modulation of the gut microbiome in multiple sclerosis patients: A pilot study”, *Front Immunology*, 8, 1391, (2017).
- Sattentau, Q. J., Weiss, R. A., “The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor”, *Cell*, 52, 631-633, (1988).
- Schoenborn, J. R., Wilson, C. B., “Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses”, *Advances in Immunology*, 96, 41-101, (2007).
- Seavey, M. M., Dobrzanski, P., “The many faces of Janus kinase”, *Biochem Pharmacol*, 83, 1136–1145, (2012).
- Sela, M., Arnon, R., Teitelbaum, D., “Suppressive activity of Cop-1 in EAE and its relevance to multiple sclerosis”, *Bull Institut Pasteur*, 88, 303-314, (1990).
- Semenza, G. L., Rue, E. A., Iyer, N. V., Pang, M. G., Kearns, W. G., “Assignment of the hypoxia-inducible factor 1alpha gene to a region of conserved synteny on mouse chromosome 12 and human chromosome 14q”, *Genomics*, 34, 437–439, (1996).
- Seo, H., Lee, I. S., Park, J. E., “Role of protein tyrosine phosphatase non-receptor type 7 in the regulation of TNF- $\alpha$  production in RAW 264.7 macrophages”, *PLoS One*, 8, 11-18, (2013).
- Serada, S., Fujimoto, M., Mihara, M., Koike, N., Ohsugi, Y., Nomura, S., Yoshida, H., Nishikawa, T., Terabe, F., Ohkawara, T., Takahashi, T., Ripley, B., Kimura, A., Kishimoto, T., Naka, T., “IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 9041–9046, (2008).
- Serafini, M., Peluso, I., Raguzzini, A., “Flavonoids as anti-inflammatory agents”, *Proceedings of the Nutrition Society*, 69, 273-278, (2010).

Severson, C., Hafler, D. A., “T-cells in multiple sclerosis”, *Results and Problems in Cell Differentiation*, 51, 75-98, (2010).

Shinto, L., Ya dav, V., Morris, C., Lapidus J. A., Senders, A., Bourdette, D., “The perceived benefit and satisfaction from conventional and complementary and alternativemedicine (CAM) in people with multiple sclerosis”, *Complementary Therapies in Medicine*, 13, 264-272, (2005).

Simpson, S., Blizzard, L., Otahal, P., Van der Mei, I., Taylor, B., “Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis”, *Journal of Neurology Neurosurgery Psychiatry*, 82, 1132–1141, (2011).

Sloka, S., Silva, C., Pryse-Phillips, W., Patten, S., Metz, L., Yong, V.W., “A quantitative analysis of suspected environmental causes of MS”, *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 38, 98–105, (2011).

Smolders, J., Damoiseaux, J., Menheere, P., Hupperts, R., “Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review”, *Journal of Neuroimmunology*, 194, 7-17, (2008).

Sorensen, T. L., Tani, M., Jensen, J., Pierce, V., Lucchinetti, C., Folcik, V. A., Qin, S., Rottman, J., Sellebjerg, F., Strieter, R. M., Frederiksen, J. L., Ransohoff R. M., “Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients, *Journal of Clinical Investigation*”, 103, 807-815, (1999).

Stauffer, M., “Understanding multiple sclerosis, The University Press of Mississippi is a member of the Association of American University Presses, (2006).

Steinman, L., “Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system”, *Cell*, 85, 299–302, (1996).

Steinman, L., “Multiple sclerosis: a two-stage disease”, *Nature Immunology*, 2, 762-764, (2001).

Stevens, D. B., Gould, K. E., Swanborg, R. H., “Transforming growth factor-beta 1 inhibits tumor necrosis factor-alpha/lymphotoxin production and adoptive transfer of disease by effector cells of autoimmune encephalomyelitis”, *Journal of Neuroimmunology*, 51, 77–83, (1994).

Storoni, M., Verbeek, M.M., Illes, Z., Marignier, R., Teunissen, C.E., Grabowska, M., Confavreux, C., Plant, G. T., Petzold, A. F. S., “Serum GFAP levels in optic neuropathies”, *Journal of Neurological Sciences*, 317, 117–122, (2012).

Sun, J., Link, H., Olsson, T. Xiao, B.-G., Andersson, G., Ekre, H.-P., Linington, C., Diener, P., “T and B cell responses to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis”, *Journal of Immunology*, 146 (5), 1490-1495, (1991).

- Sundstrom, P., Juto, P., Wadell, G., Hallmans, G., Svenningsson, A., Nyström, L., Dillner, J., Forsgren L., “An altered immune response to Epstein–Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study”, *Neurology*, 62, 2277–2282, (2004).
- Swanborg, R. H., “Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease”, *Clinical Immunology Immunopathology*, 77, 4-13, (1995).
- Szczucinski, A., Losy, J., “CCL5, CXCL10 and CXCL11 chemokines in patients with active and stable relapsing-remitting multiple sclerosis”, *Neuroimmunomodulation*, 18 (1), 67–72, (2011).
- Tanaka, T., Narazaki, M., Kishimoto, T., “IL-6 in inflammation, immunity, and disease”, *Cold Spring Harb Perspectives in Biology*, 6(10): a016295, (2014).
- Tasaki, A., Shimizu, F., Sano, Y., Fujisawa, M., Takahashi, T., Haruki, H., Abe, M., Koga, M., Kanda, T., “Autocrine MMP-2/9 secretion increases the BBB permeability in neuromyelitis optica”, *Journal of Neurology Neurosurgery Psychiatry*, 85, 419-430, (2014).
- Tesoriere, L., Butera, D., Gentile, C. and Livrae, M. A., “Bioactive components of Caper (*Capparis spinosa* L.) from Sicily and antioxidant effects in a red meat simulated gastric digestion”, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55, 8465-8471, (2007).
- Thiel, M, Caldwell, C. C., Kreth, S., Kuboki, S., Chen, P., Smith, P., Ohta, A., Lentsch, A. B., Lukashev, D., Sitkovsky, M. V., “Targeted deletion of HIF-1alpha gene in T cells prevents their inhibition in hypoxic inflamed tissues and improves septic mice survival”, *PLoS One*, 2(9), e853, (2007)
- Tomoka, R., Matsui, M., “Biomarkers for multiple sclerosis”, *Internal Medicine*, 53, 361-365, (2014).
- Tsunoda, I., Fujinami, R. S., “Neuropathogenesis of Theiler’s murine encephalomyelitis virus infection, an animal model for multiple sclerosis”, *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 5, 355–369, (2010).
- Turk, B. U., Alp, R., Sur, H., Gül, L., “Prevalence of multiple sclerosis door-to-door survey in Maltepe, Istanbul, Turkey”, *Neuroepidemiology*, 27, 17-21, (2006).
- Van Der Mei, I. A. F., Ponsonby, A. L., Dwyer, T., Blizzard, L., Simmons, R., Taylor, B.V., Butzkueven, H., Kilpatrick, T., “Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case control study”, *British Medical Journal*, 327, 1–6, (2003).
- Vassall, K. A., Bamm, V. V., Harauz, G., “MyelStones: the executive roles of myelin basic protein in myelin assembly and destabilization in multiple sclerosis”, *Biochemical Journal*, 472 (1), 17-32, 2015.

Vassalli, P., “The pathophysiology of tumor necrosis factors”, *Annuals Review Immunology*, 10, 411–452, (1992).

Vaziiinejad, R.A., Ahmadi, Z.B., Kazemi A.M., Hassanshahi, G., Kennedy, D., “The biological functions, structure and sources of CXCL10 and its outstanding part in the pathophysiology of multiple sclerosis”, *Euroimmunomodulation*, 21, 322-330, (2014).

Venkatesha, S. H., Moudgi, K. D., “Celastrol and Its Role in Controlling Chronic Diseases”, *Advanced in Experimental Medicine and Biology*, 928, 267-289, (2016).

Viola, A., Luster, A. D. “Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation”, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48, 171–197, (2008).

Wang, Y. Q., Qu, D. H., and Wang, K., “Therapeutic approaches to Alzheimer’s disease through stimulating of non-amyloidogenic processing of amyloid precursor protein”, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 20, 2389–2403, (2016).

Wang, Z., Jackson, R. J., Hong, W., Taylor, W. M., Corbett, G. T., Moreno, A., Liu, W., Li, S., Frosch, M. P., Slutsky, I., Young-Pearse, T. L., Spires-Jones, T. L., Walsh, D. M., “Human Brain-Derived A $\beta$  Oligomers Bind to Synapses and Disrupt Synaptic Activity in a Manner That Requires APP”, *Journal of Neurosciences*, ;37(49), 11947-11966, (2017).

Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Harrington, L. E., “IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages”, *Annuals Review Immunology*, 25, 821–852, (2007).

Wei, H., Pareek, T. K., Liu, Q. and Letterio, J. J., “A unique tolerizing dendritic cell phenotype induced by the synthetic triterpenoid CDDO-DFPA (RTA-408) is protective against EAE”, *Scientific Reports*, 7, 9886, (2017).

Wiener, C. M., Booth, G., Semenza, G. L., “In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1”, *Biochemical Biophysical Research Communications*, 225(2), 485-488, (1996).

Wippold, F. J., Perry, A., Lennerz, J., “Neuropathology for the neuroradiologist: Rosenthal fibers”, *American Journal of Neuroradiology*, 27(5), 958-61, (2006).

Wolinsky, J. S., Narayana, P. A., O’Connor, P., Coyle, P.K., Ford, C., Johnson, K., Miller, A., Pardo, L., Kadosh, S., Ladkani, D., “Glatiramer acetate in primary progressive multiple sclerosis: Results of a multinational, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial”, *Annals of Neurology*, 61, 14–24, (2007).

Wolinsky, J. S., “Copolymer 1: A most reasonable alternative therapy for early relapsing–remitting multiple sclerosis with mild disability”, *Neurology*, 45, 1245–1247, (1995).

Wolswijk, G., Noble, M., “Identification of an adult-specific glial progenitor cell”, *Development*, 105, 387–400, (1989).

Wu, Z., Huang, X., Han, X., Li, Z., Zhu, Q., Yan, J., Yu, S., Jin, Z., Wang, Z., Zheng, Q., Wang, Y., “The chemokine CXCL9 expression is associated with better prognosis for colorectal carcinoma patients”, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 78, 8-13, (2016).

Wucherpfennig, K. W., Strominger, J. L., “Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein”, *Cell*, 80, 695-705, (1995).

Wynn, T. A., “IL-13 effector functions”, *Annual Review of Immunology*, 21, 425-456, (2003).

Yadav, V., Shinto, L., Bourdette, D., “Complementary and alternative medicine for the treatment of multiple sclerosis”, *Expert Reviews of Clinical Immunology*, 6, 381-395, (2010).

Yamamoto, Y., Gaynor, R. B., “IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway”, *Trends in Biochemical Sciences*, 29(2), 72-79, (2004).

Yashojima, K., Schwab, C., McGeer, E. G., McGeer, P. L., “Human heart generates complement proteins that are upregulated and activated after myocardial infarction”, *Circulation Research*, 83, 860–869, (1998).

Yednock, T.A., Canon, C., Fritz, L. C., Sanchez-Madrid, F., Steinman, L., Karin, N., “Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin”, *Nature*, 356, 63-66, (1992).

Yong, V. W., Giuliani, F., Xue, M., Bar-Or, A., Metz, L. M., “Experimental models of neuroprotection relevant to multiple sclerosis”, *Neurology*, 68, 32-37, (2007).

Zajicek, J. P., Apostu V. I., “Role of cannabinoids in multiple sclerosis”, *CNS Drugs*, 25(3), 187-201, (2011).

Zeis, T., Graumann, U., Reynolds, R., Schaeren-Wiemers, N., “Normal-appearing white matter in multiple sclerosis is in a subtle balance between inflammation and neuroprotection”, *Brain*, 131, 288–303, (2008).

Zhang, H., Podojil, J. R. , Luo, X., Miller, S. D., “Intrinsic and induced regulation of the age-associated onset of spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis”, *Journal of Immunology*, 181, 4638-4647, (2008).



Zhang, J., Markovic-Plese, S. Lacet, B., Raus, J., Weiner, H. L., Hafler, D. A., “Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis”, *The Journal of Experimental Medicine*, 179(3), 973-984 (1994).

Zheleznyakova, G. Y., Piket, E., Marabita, F., Kakhki, M. P., Ewing, E., Ruhrmann, S., Needhamsen, M., Jagodic, M., Kular, L., “Epigenetic research in multiple sclerosis: progress, challenges, and opportunities”, *Physiological Genomics Published*, 49, 447-461, (2017).

Zhu, H. J., Wang, H. J., Markowitz, J. S., Donovan, J. L., Gibson, B. B., Gefroh, H. A., Lindsay, C., “Characterization of P-glycoprotein inhibition by major Cannabinoids from Marijuana”, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317, 850-857, (2006).

Zhu, J., Paul W. E., “CD4 T cells: fates, functions, and faults”, *Blood*, 112, 1557-1569, (2008).

Zlotnik, A., Yoshie, O., “Chemokines: a new classification review system and their role in immunity”, *Immunity*, 12, 121–127, (2000).

## 7. EKLER

### **Amiloyid Beta Prekürsör Protein (APP)**

Bu gen insanlarda 21 nolu kromozomun uzun (q) kolu üzerinde 21q21.3 pozisyonunda bulunur. APP geni, 18 ekson içerir ve ekzon 7, 8 ve 15'in alternatif eklenip çıkarılması ile (splicing) en az sekiz APP protein izoformu oluşur (Kitaguchi ve diğ. 1988) . APP amiloyid beta prekürsör proteini kodlayan gendir. Amiloid prekürsör protein, daha küçük peptitler oluşturmak için enzimler tarafından kesilir. Bu peptitlerden ikisine çözünebilir ve amiloid prekürsör protein (APP) ve amiloid beta ( $\beta$ ) peptidi adını alırlar. APP proteini bir hücre yüzey reseptörü olarak işlev görür ve nörit büyümesi, nöron yapışması ve aksonojenez ile ilgili nöronların yüzeyinde fizyolojik işlevleri yerine getirir. Son kanıtlar, APP'nin büyüme destekleyici özelliklere sahip olduğunu ve doğum öncesi ve doğum sonrası nöronların oluşumunda rol oynayabileceğini göstermektedir. APP peptidi, bazı diğer proteinlerin işlevlerini de kapatarak (inhibe ederek) kontrol edebilir. Bunun yanında protein-protein etkileşimleri yoluyla hücre hareketliliğine ve transkripsiyon regülasyonuna katılır. APBB1-KAT5'e bağlanma yoluyla transkripsiyon aktivasyonunu teşvik edebilir ve Numb ile etkileşim yoluyla Notch sinyalini inhibe eder (Hartmann ve diğ. 2001; Wang ve diğ. 2017). Alzheimer hastalığından, APP'nin  $\beta$ -sekretaz yoluyla bölünmesinin nörotoksik A $\beta$  ve APP-hücre içi domain oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Nöronlarda biriken A $\beta$ 'nın nörodejeneratif bir hastalık olduğu bilinen Alzheimer gelişiminde çok önemli bir adım olduğu bilinmektedir (O'Brien ve Wong 2011).

### **Kompleman Bileşen 1 (C1s)**

C1S geni kalıtsal bağışıklıkta rol oynayan, klasik kompleman sistemi yolunun ilk bileşenini oluşturmak için C1q ve C1r ile kompleks oluşturan ve C2 ve C4'ü aktive eden bir serin proteazdır. Bu gen 12. kromozomun kısa kolu (p) üzerinde 12p13.31 pozisyonunda bulunur. Kompleman sistemi, enfeksiyon ve öz bağışıklık sistemi hastalıklarına karşı önemli bir savunma sağlar (Gal ve diğ. 2002). Kompleman sistemin aktive olması, Alzheimer ve MS gibi enfeksiyöz olmayan

nörodejeneratif hastalık varlığında ortaya çıkar (Yashojima ve diğ. 1998; Ingram ve diğ. 2009).

### **Kemokin (C - C motifi) Ligandı 5 (CCL5)**

Bu gen, kromozom 17'nin q-kolunda bulunan birkaç kemokin geninden biridir. Kemokinler, bağışıklık düzenleyici ve inflamatuvar süreçlerde rol oynayan protein süper ailesidir. CC alt ailesi üyesi olan bu kemokin, monositler, bellek T yardımcı hücreleri ve eozinofiller için bir kemoçekici görevi yapar. Histaminin bazofillerden salınmasına ve eozinofillerin aktivasyonuna neden olur. CCR1, CCR3, CCR4 ve CCR5 reseptörlerine bağlanır (Rot ve von Andrian 2004; Ransohoff 2006; Bajetto ve diğ. 2002; Viola ve Luster 2008). Yapılan çalışmalarda hastalığın aktif formunda olan multipl skleroz (MS) hastalarının beyin-omurilik sıvılarındaki CCL5 konsantrasyonunun sağlıklı bireylerle ve hastalığın inaktif aşamasındaki hastalarla karşılaştırıldığında büyük oranda arttığı ve CCL5'in MS hastalığı için biyobelirteç olduğunu göstermektedir (Tomioka ve Matsui 2014; Mori ve diğ. 2016).

### **CD4 Molekülü (CD4)**

Bu gen, majör histouyumluluk kompleksi sınıf II antijenleri ile etkileşime giren ve aynı zamanda insan bağışıklık yetmezliği virüsü için bir reseptör olan, T lenfositlerinin bir zar glikoproteini kodlar. Bu gen sadece T lenfositlerde değil aynı zamanda B hücrelerinde, makrofajlarda ve granülositlerde de ifade edilir. Ayrıca beynin bazı belirli bölgelerinde de bu gen ifade edilir. T-hücre aktivasyonunun erken safhasını başlatmak veya arttırmak üzere için görür ve merkezi sinir sisteminin bulaşıcı ve immün aracılı hastalıklarında dolaylı olarak nöronal hasarın önemli bir ara bulucusu olarak işlev görür (Brady ve diğ. 1993). T hücrelerinin insan immün yetmezlik virüsü tip 1 (HIV-1) ile enfekte olması CD4 ekspresyonunun baskılanmasına neden olur ve hücrelerin enfekte olma süreci başlar. HIV-1 enfeksiyonunu takiben, konakçı bağışıklık sistemini ciddi şekilde tehlikeye atan ve kazanılmış bağışıklık yetersizliği sendromunun gelişmesine yol açan ilerleyici bir CD4-pozitif lenfosit kaybı vardır (AIDS) (Dalglais ve diğ. 1984; Sattentau ve Weiss 1988). Bunun yanında bu protein T-hücre aktivasyonunun erken döneminde aktivasyon başlatıcı ve artırıcı olarak işlev yapmasından dolayı merkezi sinir sisteminde enfeksiyon veya bağışıklık aracılı nöronal hasar oluşunda önemli bir rol oynar (Chitnis 2007).

### **Kemokin (C-X-C Motifi) Ligandı 9 (CXCL9)**

CXC kemokinler, farklı lökosit alt gruplarını lokal enflamatuvar bölgelere yönlendiren temel moleküllerdir. Bu kemokinler, kemokinlerin ikinci en büyük alt ailesidir. CXCL9 geni 4. kromozomun q kolu üzerinde 4q21.1 pozisyonunda yer alır. İnterferon- $\gamma$  tarafından indüklenir. İnterferon-indüklenebilir CXCR3 ligandları, yani CXCL9, CXCL10 ve CXCL11, bağışıklık ve anjiyojenezin düzenlenmesinde pleiotropik roller sergilemektedir (Zlotnik ve Yoshie 2000; Moser ve Loetscher 2001; Li ve diğ. 2016). CXCL9'un insanlarda görülen tümör gelişiminde önemli roller oynadığı gösterilmiştir (Wu ve diğ. 2016).

### **Kemokin (C-X-C Motifi) Ligandı 10 (CXCL10)**

Bu gende CXCL9 gibi, CXC alt familya üyesi bir kemokin kodlar ve CXCR3 reseptörünün bir ligandıdır. CXCL10 hem İnterferon- $\gamma$  hemde tip 1 interferonlar olan interferon- $\alpha$  ve  $\beta$  tarafından indüklenebilir (Farber 1997). Merkezi sinir sistemi dışında CXCL10, monositler, makrofajlar, fibroblastlar, osteoblastlar ve endotel hücreleri gibi çeşitli hücreler tarafından eksprese edilir. Merkezi sinir sisteminde ise tüm glial hücreler ve nöronlar tarafından ekspres edilir (Gasper ve diğ. 2002; McKimmie ve Graham 2010). CXCL10 ekspresyonunun MS'in erken dönemlerinde arttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir ve CXCL10 özellikle aktive olan astrositler tarafından salınır. Beyin omurilik sıvısındaki CXCL10 protein seviyeleri, MS hastalarında belirgin olarak artmaktadır ve beyin omurilik sıvısı ve serumdaki CXCL10 düzeylerinin, MS akut evrelerinde oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir (Balashov ve diğ. 1999). CXCL10 sadece MS'te değil ayrıca alzheimer gibi diğer nörodejeneratif hastalıklarda da yüksek oranda ifade edilmektedir. "Disease" veri bankasında bu protein ile ilişkili olarak bildirilen hastalıklar; MS, tüberküloz, alzheimer, aşırı duyarlılık reaksiyonu tip II hastalığı, kanser, astım, grip, şiddetli akut solunum yolu sendromu, hepatit C, pnömoni, dermatit ve artrit'dir (Booth ve diğ. 2002).

### **Glial Fibrillar Asidik Protein (GFAP)**

Bu gen, olgun astrositlerin ana ara filament proteinlerinden birini kodlar. Gelişme sırasında astrositleri diğer glial hücrelerden ayırt etmek için bir belirteç olarak kullanılır. Bu genin mutasyonları, merkezi sinir sisteminde nadir bulunan bir

astrosit bozukluğu olan Alexander hastalığına neden olur. Bazı araştırmacılar, astroglial hücrelerin, sınırları çevreleyen özel hücreler (oligodendrositler) de dahil olmak üzere diğer hücrelerin işleyişinde önemli bir rol oynadığını ve miyelin üretiminde ve uzun süreli bakımında rol aldığını öne sürmüşlerdir. Ayrıca astroglial hücreler, sadece belirli maddelerin kan damarları ve beyin (kan-beyin bariyeri) arasında geçiş yapmasına izin veren koruyucu bariyerin korunmasına yardımcı olabilir. Bu gen insanlarda 17. kromozomun q kolu üzerinde lokalizedir (Omary ve diğ. 2004; Wippold ve diğ. 2006).

### **Guanin Nükleotid Bağlayan Protein (G Protein), Alfa Alt Birimi 2(GNAI2)**

Bu gen tarafından kodlanan protein guanin nükleotid bağlama proteinlerinin (G proteinleri) bir alfa altbirimi'dir. Sentezlenen protein, guanin nükleotid bağlama bölgesini içerir ve adenilat siklazın hormonal regülasyonunda yer alır. Guanin nükleotid-bağlayıcı proteinler (G proteinleri) çeşitli transmembran sinyalizasyon sistemlerinde modülatör olarak yer alırlar. Bu gen insanlarda 3. kromozomun p kolu üzerinde lokalizedir (Hamada ve diğ. 2017).

### **Hipoksi İle İndüklenebilir Faktör 1-Alfa (HIF1A)**

Hipoksi indüklenebilir faktörü 1-alfa, HIF1A geni tarafından kodlanır, heterodimerik transkripsiyon faktörünün hipoksi ile tetiklenebilen bir alt-birimidir (Semenza ve diğ. 1996). HIF-1, enerji metabolizması, anjiyogenez, apoptoz ve hipoksiye metabolik adaptasyonu kolaylaştıran diğer genler dahil olmak üzere birçok genin transkripsiyonunu aktive ederek hipoksiye hücrel ve sistemik homeostatik tepkinin ana düzenleyicisi olarak işlev görür. HIF-1, glikoz metabolizmasını ve redoks homeostazını düzenleyerek, anjiyogenezi ve oksijen kullanımını regüle ederek oksijen alımını denetler. HIF-1 aktivitesi beyinde, kalpte, böbrekte, akciğerde ve iskelet kasında HIF-1 $\alpha$  mRNA ve protein seviyelerinde meydana gelen değişiklikler yoluyla hipoksi ile indüklenir (Wiener ve diğ. 1996; Bosch-Marce ve diğ. 2007). HIF1A birikimi ile karakterize edilen hipoksi-benzeri doku değişiklikleri, MS patojenezinde çok erken bir evrede ortaya çıkar ve bu durumun kan beyin bariyeri bozulmasıyla da doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir (Le Moan ve diğ. 2015). HIF1A geninin ayrıca Sepsis (Peyssonnaud ve diğ. 2007; Thiel ve diğ. 2007), romatizmal artrit ve inme dahil olmak üzere iltihaplanma ve nörodejenerasyonla

seyreden hastalıklarda hastalığın ilerlemesi üzerinde kuvvetli bir etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Cramer ve diğ. 2003).

### **İnterlökin 6 (IL6)**

Bu gen, enflamasyon ve B hücrelerinin olgunlaşmasında işlev gören bir sitokini kodlar. Enfeksiyonlara ve doku yaralanmalarına tepki olarak derhal ve geçici olarak üretilen IL6, akut faz tepkileri, hematopoez ve bağışıklık reaksiyonlarının uyarılması yoluyla konakçı savunmasına katkıda bulunur. İfadesi transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası mekanizmalarla sıkı bir şekilde kontrol edilmesine rağmen, IL6'nın düzensiz ve devamlı sentezi, kronik iltihaplanma ve otoimmünite üzerinde patolojik bir etki yapar. İnsan IL6 sitokini 212 amino asitten oluşur ve geni 7p21 kromozomunda lokalizedir. Bu genin işleyişi çok çeşitli iltihap ile ilişkili hastalık durumlarıyla ilişkilendirilir (Tanaka ve diğ. 2014).

### **Miyelin İlişkili Glikoprotein (MAG)**

Bu gen tarafından kodlanan protein, tip I zar proteindir ve immüoglobulin süper ailesinin bir üyesidir. Miyelinizasyon sürecine dahil olur. Miyelin ile ilişkili glikoprotein (MAG), miyelin kılıflarının periaksonal Schwann hücresi ve oligodendroglial membranlarında seçici olarak lokalize olan 100 kDa'luk bir transmembran glikoproteindir ve hem çevresel sinir sistemi hem de merkezi sinir sisteminde glia-akson etkileşimlerinde işlev gördüğünü göstermektedir. Miyelinli aksonların normal oluşumu ve bakımı için önemlidir, IgM monoklonal antikorlar için bir antijen olarak bilinmektedir. Bu protein miyelinin önemli bir bileşenidir. Diğer miyelin proteinlere kıyasla MS plaklarının gelişiminde erken kaybı bu hastalığın patojenezinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Nakahara ve diğ. 2003; Quarles 2007).

### **Miyelin Temel Protein (MBP)**

Klasik MBP geni tarafından kodlanan protein, oligodendrositlerin miyelin kılıfının ve çevresel sinir sistemindeki Schwann hücrelerinin önemli bir bileşenidir. MBP merkezi sinir sisteminde toplam proteinin %30'unu miyelin kuru ağırlığının yaklaşık %10'unu oluşturur. MSS'nde miyelin oluşumu ve miyelinin çok katlı sıkı yapısının stabilizasyonu için gereklidir. MBP geni baskılanmış farelerde MSS miyelinizasyonunda belirgin azalma ve titreme, nöbetler ve erken ölüm ile

karakterize ilerleyici hastalık tablosu izlenmiştir (Martini ve diğ. 1995). Miyelin kılıf tüm omurgalılarda MBP bulundurur (Harauz ve diğ. 2004). Miyelin yapısında bulunan miyelin temel proteininin farelerde 11 ekson, insanlarda 10 eksondan oluşur (Givogri ve diğ. 2001).

### **Matriks Metalloproteinaz 9 (MMP9)**

MMP ailesinin proteinleri, embriyonik gelişme, reproduksiyon ve doku yenilemesi gibi normal fizyolojik süreçlerin yanı sıra artrit ve metastaz gibi hastalık süreçlerinde ekstrasellüler matriksin parçalanmasına katılırlar. Bunlar çinko içeren endopeptidazlardır. Çoğu MMP'lar, hücre dışı proteinazlarla parçalandığında aktive olan pasif proproteinler olarak salgılanır. Nöroenflamatuvar hastalıklarda, MMP'lar enflamatuvar hücrelerin MSS'ne akışı, miyelin tahribine katkısı, KBB bozulması ve ekstraselüler matriksin bozunmasından sorumludur (Romi ve diğ. 2012). MMP9, önemli bir biyobelirteç olan proteolitik enzimdir. İnme, kalp hastalıkları, tümörler, MS ve epilepside nöronal hasarın biyolojik belirteçleri olarak kullanımı yaygındır. MMP9 beyinde en yaygın bulunan metalloproteinazdır (Bronisz ve Kurkowska-Jastrzębska 2016).

### **Nükleer Faktör Kappa B (NFkB)**

NFkB ilk kez 1986 yılında Baltimore ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. İlk tanımlandığında B hücrelerinde immünoglobulin kappa hafif zincirinin üretimini kolaylaştıran bir faktör olarak tarif edilen NFkB, daha sonraları birçok organizmada ve hemen her hücre tipinde bulunan, organizmanın kendi kendini savunmada kullandığı ana şarhterlerden birisi olarak kabul edilmiştir (Brasier 2006). NFkB hücrede DNA transkripsiyonu, hücre döngüsü, bağışıklık tepkileri, apoptoz ve enfeksiyonlar da rol oynayan bir protein kompleksidir. NFkB tüm hücre tiplerinde bulunan dimerik bir transkripsiyon faktörüdür. Rel A (p65), Rel B, c-Rel, NFkB1 (p50), ve NFkB2 (p52) tarafından oluşturulan homo ya da hetero dimerler halinde bulunur ve bunlar sırası ile Rel A, Rel B, c-Rel, NFkB1 ve NFkB2 genleri tarafından kodlanırlar. En sık bulunan dimer p50/RelA heterodimeri olup genel olarak NFkB olarak adlandırılan bu dimerdir (Chen ve diğ. 1998). NFkB birçok hücrede bir uyarı olmadığı sürece sitoplazmada yer almaktadır. Burada inhibitör protein olan inhibitör kappa B (IKB) ile kompleks oluşturan NFkB inaktif formundadır. Organizma bir uyarıya maruz kaldığında ise NFkB ile IKB ayrılır ve

NFKB aktif hale geçer. Aktive olan IKK, IKB'yi fosforile eder ve NFKB aktive olur. Aktif hale geçen NFKB hücre sitoplazmasından nükleusa yer değiştirir. Burada sitokinler, kemokinler ve adezyon moleküllerinin de yer aldığı çeşitli enflamatuvar proteinleri kodlayan genlerin DNA sekanslarına bağlanır ve bunların transkripsiyonunu düzenler (Finco ve Baldwin 1995).

### **Proteolipit Protein (PLP)**

PLP geni insan X kromozomu üzerinde Xq22 bölgesinde lokalizedir. Bu gen, merkezi sinir sisteminde ana miyelin proteini olan bir transmembran proteolipid proteini kodlar. Bu protein özellikle beyinde ve spinal kordda (merkezi sinir sistemi) bulunan oldukça hidrofobik miyelin ana proteini. "Disease" veri bankasında bu protein ile ilişkili olarak bildirilen hastalıklar şunlardır: MS, pelizaeus-merzbacher hastalığı ve parapleji. Bu protein MS hastalığında önemli bir otoantijendir. Buda MS ile ilişkisini ortaya koyan en önemli delildir. PLP proteini 276 aminoasit içerir ve yaklaşık 30kDa büyüklüğündedir. PLP geninde meydana gelen bir mutasyon miyelin oluşumunda aksaklıklara neden olur. PLP proteininin MSS'inde PLP'den daha az bulunan DM20 izoformu mevcuttur (Raphael ve diğ. 2012).

### **Protein Tirozin Fosfataz Reseptör Olmayan Tip 11 (PTPN11)**

PTPN11 geni onkogenler olarak sınıflandırılan gen grubunda yer alır. İnsanlarda 12. kromozom üzerinde bulunur. Protein-tirozin fosfataz 1B (PTP-1B) veya protein-tirozin fosfataz 2C (PTP2C) olarak bilinen protein tirozin fosfataz reseptör olmayan tip 11 (PTPN11) insanlarda PTPN11 geni tarafından kodlanan bir enzimdir. Hücre farklılaşması, hücre proliferasyonu, apoptoz, immünolojik sinyal ve hücre iskeleti fonksiyonları gibi hücresel süreçlerde çok çeşitli ve önemli rol oynar. Embriyonik gelişim sırasında kalp, kan hücreleri, kemiklerin ve diğer dokuların gelişiminde kritik öneme sahiptir (Ostman ve diğ. 1994).

### **Süperoksit Dismutaz 1 (SOD1)**

SOD1 geni insanlarda kromozom 21 üzerinde yer alır ve süperoksit dismutaz 1 ya da süperoksit dismutaz [Cu-Zn] olarak bilinen enzimi kodlar. Bu enzim süperoksit radikaller adı verilen toksik, yüklü oksijen moleküllerini parçalamak için bakır ve çinko moleküllerine bağlar. SOD1 antioksidan bir enzim olarak işlev görür. Zararlı süperoksit radikallerini temizler ve daha az reaktif oksijen türü (ROS) ve



hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) haline dönüştürür. Hidrojen peroksit de toksik olduğundan, katalaz adı verilen başka bir enzim onu moleküler oksijene ( $O_2$ ) ve suya ( $H_2O$ ) dönüştürür. 1993 yılında yapılan bir çalışmada SOD1 genindeki genetik mutasyonların ailesel ALS ile bağlantılı olduğu bulundu (Rosen ve diğ. 1993). Bunun yanında yapılan çalışmalar MS hastalarında bozulmuş antioksidan savunma sisteminin kısmen SOD'nin düşük aktivitesine bağlı olabileceğini göstermektedir (Miller ve diğ. 2010).

### **Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü 3 (STAT3)**

Janus Kinaz/Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü (JAK / STAT) sinyal yolu, çok sayıda sitokin tarafından kullanılır ve doğuştan gelen bağışıklığın başlatılması, kazanılmış bağışıklığın düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir. JAK / STAT yolu sinyalleme için çok sayıda sitokin tarafından kullanılır ve immün yanıtların gelişimi, düzenlenmesi ve sonlandırılması için kritik önem taşır. STAT3 geni 17. kromozom üzerinde bulunur. Bağışıklık sisteminde, STAT3 proteini, bağışıklık sistemi hücrelerinin, özellikle T hücrelerinin ve B hücrelerinin olgunlaşması için gerekli sinyalleri iletir. Ek olarak, STAT3 proteini bağışıklık sisteminin enfeksiyona veya yaralanmaya tepki vermesinin bir yolu olan enflamasyonun düzenlenmesinde yer alır. STAT3 literatürde MS duyarlılık geni olarak geçmektedir ve ekspresyonunda artış MS ile ilişkilendirilmektedir. STAT3 hedef genlerinden bir tanesi IL6'dır ve bu genin de aşırı ekspresyonu da yine MS ile ilişkilendirilmektedir (Lill ve diğ. 2002).

### **Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta 1 (TGFB1)**

Bu gen insanlarda 19. kromozomun q kolu üzerinde lokalizedir. TGFB1 proteinini kodlar. Bu protein çeşitli hücre aktivitelerini düzenleyen kimyasal sinyalleri uyarır, bu aktiviteler arasında hücrelerin büyümesi ve bölünmesi, hücrelerin belirli işlevleri yerine getirmesi için olgunlaşması (farklılaşma), hücre hareketi (motilite) ve apoptoz yer almaktadır. TGFB1, bağışıklık sistemindeki çok çeşitli hücre tipleri üzerinde çeşitli etkilere sahip pleiotropik bir sitokindir. TGFB; TGFB1, B2 ve B3 izoformları nöronlar ve glial hücreler tarafından ifade edilir ve bunların reseptörleri merkezi sinir sisteminde ekspres edilir. Yapılan çalışmalar, TGFB sinyalizasyonunun çeşitli nörodejeneratif bozuklukların patogenezinde yatan

bir mekanizma olan glutamat aracılı eksitotoksisteden nöronları koruduğunu göstermektedir (Katsuno ve diğ. 2011).

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

TNF- $\alpha$  geni, tümör nekrozis faktörü (TNF) süper ailesine ait olan çok fonksiyonlu bir pro-enflamatuar sitokini kodlar. TNF- $\alpha$ , güçlü proinflamatuvar ve immün yanıtı denetleyen bir sitokindir. TNF $\alpha$  başka sitokinlerin üretimini, adhezyon moleküllerinin belirginleşmesini, hücrelerin çoğalmasını ve metalloproteinazların üretimini arttırır. TNF- $\alpha$  akut faz yanıtını, vasküler adezyonu, kemik iliğinde farklılaşmayı ve apoptozu regüle eder ve ayrıca nötrofil aktivasyonuna, T ve B lenfositlerin proliferasyonuna ve immunoglobulin sentezinde artışa da yol açar. TNF- $\alpha$  esas olarak monosit ve makrofajlar tarafından sentezlenir ve belirli koşullarda T lenfositler, nötrofiller, mast hücreleri ve endotel hücreleri senteze katkıda bulunur. TNF- $\alpha$ , 26 kilo dalton ağırlığında membrana bağlı pro-protein şeklinde sentezlenir ve TNF- $\alpha$  dönüştürücü enzim tarafından 17 kilo daltonluk bir monomere çevrilerek çözünür TNF- $\alpha$  molekülü şeklinde serbestleşir. Olgun TNF- $\alpha$ , hücrelerin çoğunda eksprese edilen TNFR1 veya TNFR2 reseptörlerine bağlanarak etkilerini gösterir (Balkwill 1989; Beutler 1995). “Disease” veri bankasında bu protein ile ilişkili olarak bildirilen hastalıklar şunlardır: Romatoid artrit, enflamatuvar bağırsak hastalığı, psoriatik artrit, aşırı duyarlılık reaksiyonu tip II hastalığı, sedef hastalığı, kanser, sıtma, multipl skleroz, bağ dokusu hastalığı, ankilozan spondilit, tüberküloz, vasküler hastalık ve peritonit astımdır.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özden ÖZGÜN ACAR  
Doğum Yeri ve Tarihi : DENİZLİ/11.03.1986  
Lisans Üniversite : Pamukkale Üniversitesi  
Y. Lisans Üniversite (varsa) : Pamukkale Üniversitesi  
Elektronik posta : ozdenozgun86@gmail.com  
İletişim Adresi : Bağbaşı/ DENİZLİ

### Yayın Listesi

- Ozgun-Acar, O., Gazioglu, I., Kolak, U., Sen, A., Topcu, G. (2017). 'A potential therapeutic role in multiple sclerosis for stigmast-5,22-dien-3 $\beta$ -ol myristate isolated from *Capparis ovata*' The Eurobiotech Journal, 1, 1-6
- Ozgun-Acar, O., Celik-Turgut, G., Gazioglu, I., Kolak, U., Ozbal, S., Ergur, B., Arslan, S., Sen, A., Topcu, G. (2016). '*Capparis ovata* treatment suppresses inflammatory cytokine expression and ameliorates experimental allergic encephalomyelitis model of multiple sclerosis in C57BL/6 mice' Journal of Neuroimmunology, 298, 106-16.
- Semiz, A., Celik-Turgut, G., Semiz, G., Ozgun, O., Sen, A. (2016). 'Association between herbivore stress and glutathione S-transferase expression in *Pinus brutia Ten.*', Cellular and Molecular Biology, 31;62(3), 89-94.
- Sen, A., Terzioğlu, G., Atmaca, P., Celik G., Ozgun, O., Arslan, S. (2015). 'Modulatory actions of o-coumaric acid on carcinogenactivating cytochrome P450 isozymes and the potential for drug interactions in human hepatocarcinoma cells', Pharmaceutical Biology, 53(9), 1391-8.
- Sen A., Ozgun O., Arinç E., Arslan S. (2012). 'Diverse action of acrylamide on cytochrome P450 and glutathione S-transferase isozyme activities,

mRNA levels and protein levels in human hepatocarcinoma cells'. *Cell Biology Toxicology*, 28(3), 175-186.

- Arslan S. and Ozgun O. (2012). *Cyclamen trochopteranthum*: Cytotoxic activity and possible adverse interactions including drugs and carcinogens. *Chinese Journal of Integrative Medicine* DOI: 1111117/s11655-112-1253-1.

- Arslan, S., Ozgun, O., Celik, G., Semiz, A., Dusen, O., Mammadov, R., ve Sen, A. (2011). 'Effects of *Cyclamen trochopteranthum* on Hepatic Drug Metabolizing Enzymes', *Archives of Biological Sciences*, 63 (3), 545-555.

### **Konferans listesi :**

- Ozgun-Acar O., Gazioglu, I., Topcu, G., Sen A. (2017). Analysis of 1H-indole-2-hydroxy, 3 carboxylic acid isolated from *Capparis ovata* for the treatment of MS: lack of evidence for the efficacy. 5th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İstanbul, Turkey (P163).

- Kale E., Ozgun-Acar O., Sen A., (2017). In vitro investigation of the role of Cytochrome P4503A4 in 5-Aminosalicylic acid metabolism. 5th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İstanbul, Turkey (P120).

- Kale E., Ozgun-Acar O., Sandal F., Sen A. (2017). Comparative evaluation of the anti-inflammatory effect of 5-Aminosalicylic acid in Caco-2 and HepG2 cell line. 5th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İstanbul, Turkey (P171).

- Ozgun-Acar O., Kilavuz E., Oruc H., Sen A. (2017). Multi-functional plant *Capparis ovate*: focusing on the antidiabetic effect. 5th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İstanbul, Turkey (P158).

- Sen A., Ozgun-Acar O., Gazioglu, I., Topcu, G. (2017). A promising Neuroprotective Agent for the Treatment of Multiple Sclerosis: 3-beta Hydroxyolean-12-en-28-oate İsolated from *Capparis ovata*. Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB), Belarus (Sözlü Bildiri) (P85).

- Ozgun-Acar O., Gazioglu, I., Topcu, G. Sen A. (2017). Comparative Study of the Anti-inflammatory Effects of Sub-extracts of the *Capparis ovata* Water Extract (COWE) Used as an Alternative and Complementary Treatment for Multiple Sclerosis Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB), Belarus (Sözlü Bildiri) (P163).

- Ozgun-Acar O., Gazioglu, I., Topcu, G.Sen A. (2017). Investigation of the Anti-inflammatory Potential of Glucocapparin Isolated from *Capparis ovata*. Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB), Belarus (P483).
- Ozgun-Acar O., Sen A., Topcu G., Gazioglu I., Kolak U., Arslan S. (2016). Beneficial actions of dichloromethane sub-fraction of the COWE extract for multiple sclerosis: A potential therapeutic role. FEBS Journal 283, Suppl. 1, (P358).
- Sen A., Ozgun-Acar O., Celik-Turgut G., Arslan S., Ozbal S., Ergür B. U. (2016). Caper (*Capparis ovata*) water extract as an efficient preparation for treatment of multiple sclerosis. International Society of Antioxidant in Nutrition and Health (ISANH), Dubai (Sözlü Bildiri).
- Ayar B., Celik Turgut G., Ozgun O., Kale E., Yilmaz A., Gazioglu I., Topcu G., Sen A. (2015). Investigation of the in vitro anticancer activities of the diterpenoid alysin B isolated from *Teucrium Alyssifolium*. 4<sup>th</sup> International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, Ankara, Turkey, (P49).
- Ozgun O., Celik Turgut G., Gazioglu I., Kolak U., Ozbal S., Ergür B.U., Arslan S., Topcu G., Sen A. (2015). Treatment of multiple sclerosis with *Capparis ovata* water extract (MSCov) implicating anti-neuroinflammatory and myelinating mechanism. 4<sup>th</sup> International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, Ankara, Turkey, (P20).
- Celik Turgut G., Ozgun O., Gazioglu I., Kolak U., Arslan S., Topcu G., Sen A. (2015). Comparative study of the anti-neuroinflammatory activities of ethyl acetate and butanolic subextracts of the water extract of *Capparis ovata* (MSCov). 4<sup>th</sup> International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, Ankara, Turkey, (P51).
- Ozgun O., Celik Turgut G., Gazioglu I., Kolak U., Arslan S., Topcu G., Sen A. (2015). Anti-neuroinflammatory effect of ursolic acid may find application in treatment for multiple sclerosis. 4<sup>th</sup> International Congress of the Molecular biology association of Turkey, Ankara, Turkey, (P57).
- Ayar B., Ozgun O., Celik Turgut G. Yilmaz A., Gazioglu I., Topcu G., Sen A. (2015). Evaluation of antidiabetic potential of Circillineol using B-TC-6, 3T3-L1, C2C12 Chang Liver and Caco-2 cell lines. 4<sup>th</sup> International Congress of the Molecular biology association of Turkey, Ankara, Turkey, (P45).

- Ozgun O., Celik Turgut G., Gazioglu I., Kolak U., Ozbal S., Ergür B.U., Arslan S., Topcu G., Sen A. (2015). Treatment of multiple sclerosis with *Capparis ovata* water extract (MSCov) implicating anti-neuroinflammatory and myelinating mechanism. 4<sup>th</sup> International Congress of the Molecular biology association of Turkey, Ankara, Turkey, (P62).
- Bozagac N., Kocaoglan D., Ozgun O., Celik Turgut G., Sen A. (2015). No obvious interaction between Cytochrome P4501A1 and Hepatitis BX. 4<sup>th</sup> International Congress of the Molecular biology association of Turkey, Ankara, Turkey, (P56)
- Ozgun O., Celik Turgut G., Gazioglu I., Semiz A., Kolak U., Topcu G., Sen A. (2015). Investigation of in vitro impact of Oleonic Acid on neuroblastoma cells (SH-SY5Y). 4<sup>th</sup> International Congress of the Molecular biology association of Turkey, Ankara, Turkey, (P44).
- Ozgun, O., Celik, G., Gazioglu, I., Kolak, U., Ozbal, S., Ergur, B. U., Arslan, S., Topcu, G. Sen, A. (2015). *Capparis ovata* ameliorates experimental allergic encephalomyelitis model of multiple sclerosis in C57BL/6 mice. Eposter, EP1286, Barcelona, Spain.
- Sen A., Celik G., Ozgun O., Arslan Ş. (2014) Alterations of gene expression at the peak level in the experimental allergic encephalomyelitis. European Society of Human Genetics – ESHG, Volume 22 Supp1, Milan, Italy, (P183).
- Celik G., Ozgun O., Arslan Ş., Sen A. (2014) Toxicogenomic analysis of *Capparis ovata* water extract (MSCov). FEBS Journal 281: Suppl. 1, (184).
- Ozgun O., Celik G., Arslan Ş., Sen A. (2014) *Capparis ovata* water extract (MSCov) for the potential treatment of multiple sclerosis without drug interaction: molecular evidences. FEBS Journal 281: Suppl. 1, (P104).
- Celik G., Ozgun O., Sen A. Effects of *Capparis ovata* on apoptotic and necrotic (2014). 2<sup>nd</sup> International Symposium Secondary Metabolites: Chemistry, Biology and Biotechnology, Russia, (P70).
- Celik G., Ozgun O., Hacıbekiroglu I., Arslan S., Topçu G., Sen A. (2014). Effect of *Capparis ovata* water extract on the lipid metabolism used as an alternative and complementary treatment for multiple sclerosis. 3<sup>th</sup> International Congress of the Molecular Biology Association Turkey, Izmir, Turkey, (P114).

- Sen A., Topcu G., Ozgun O., Kolak U., Hachbekiroglu I., Celik G., Arslan S. (2014). Anti-neuroinflammatory effect of butanolic fraction of *Capparis ovata* water extract used as an alternative and complementary treatment for multiple sclerosis. 12<sup>th</sup> International Congress of Journal of Neuroimmunology, 275(1-2): DOI: 10.1016/j.jneuroim.2014.08.464, Mainz, Germany, (P172-173).
- Özgün Ö., Arslan Ş., Şen A. Multipl skleroz tedavisi için olası etkin bir preparat-*Capparis ovata* ekstresi MSCOV: moleküler bulgular (2012). 24. Ulusal Biyokimya Kongresi, Konya, Türkiye, (121), (Sözlü Bildiri).
- Arslan, Ş., Atmaca, P., Terzioğlu, G., Özgün, Ö., Çelik, G., Şen, A., o-Kumarik Asit'in prokarsinojen/karsinojen ve ilaç metabolizması üzerine etkileri. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, İzmir, Türkiye, (S390-391), 2012.
- Ozgun O., Arslan S. and Sen A. (2012). Low potential for drug interaction of *Capparis ovata* water extract. 19<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations and 12<sup>th</sup> European Regional ISSX Meeting, (p97).
- Arslan S., Atmaca P., Terzioglu G., Ozgun O., Celik G. and Sen A. (2012). Drug interaction and carcinogen activating potential of o-Coumaric Acid. 19<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations and 12<sup>th</sup> European Regional ISSX Meeting, (P99-100).
- Arslan S, Ozgun O and Sen A. (2011). Modulatory effects of *Cyclamen Trochopteranthum* on drug and carcinogen metabolism in HELA cells. FEBS Journal 278: Suppl. 1, Italy, (194).
- Ozgun O., Arslan S. and Sen A. (2011). Differential effects of cyclamen extract on P450 gene expression in human hepatocarcinoma HepG2 cells. FEBS Journal 278: Suppl. 1, Italy, (225).
- Urhan R., Terzioglu G., Gul A. O., Atmaca P., Ozgun O., Cetin S., Arslan S. and Sen A. (2011). Anti-cancer effect of bee venom in cervical cancer cells. FEBS Journal 278: Suppl. 1, Italy, (230).
- Terzioglu G., Gul A. O., Atmaca P., Ozgun O., Cetin S., Arslan S. and Sen A. (2011). Bee venom induced apoptosis in human hepatocarcinoma HepG2 cells. FEBS Journal 278: Suppl. 1, Italy, (P234).
- Arslan S., Ozgun O., Sen A. (2010). Differential effects of cyclamen extract on P450 gene expression, ISSX Journal, (P131).

- Ozgun O., Celik G., Sen A., Arslan S. (2010). Akrlamidin insan karaciğer kanser hücre hattında (HepG2) Sitokrom P4501A1, 1A2, 2E1 ve 3A4 mRNA ekspresyon düzeylerinde olan etkisi. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli, (S214).
- Ozgun, O., Arslan, S., Semiz, A., Kapdag M., Oztas, M., and Sen, A. (2009). Cyclamen as an ethnomedicine. Is it safe? FEBS Journal 276: Suppl. 1, Czech Republic, (P333).
- Kapdag M., Arslan S., Ozgun O., Oztas M., Ural M., Dusen O., Sen A. (2009). Possible implications of *Cyclamen trochopterantum* on human therapeutics. FEBS Journal 276: Suppl. 1, Czech Republic, (P315).