

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

***CAPPARIS OVATA*'DAN İZOLE EDİLEN BAZI BİLEŞİKLERİN
İN-VİTRO ANTI-ENFLAMATUAR ETKİLERİNİN ARAŞTIRMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAJARAT ABILO ALFA

DENİZLİ, MART - 2019

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



CAPPARIS OVATA DANI İZOLE EDİLEN BAZI BİLEŞİKLERİN *İN-VİTRO*
ANTI-ENFLAMATUAR ETKİLERİNİN ARAŞTIRMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAJARAT ABILO ALFA

DENİZLİ, MART - 2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

HAJARAT ABILO ALFA tarafından hazırlanan “*CAPPARIS OVATA*’DAN İZOLE EDİLEN BAZI BİLEŞİKLERİN *İN-VITRO* ANTİ-ENFLAMATUAR ETKİLERİNİN ARAŞTIRMASI” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 01.08.2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı[Varsa bilim dalınızı seçiniz]Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Alaattin ŞEN

Üye
Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN

Üye
Öğr. Gör. Dr. Işıl GAZİOĞLU

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 08/04/2019 tarih ve .. 15/12... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Uğur YÜCEL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez alışması PAÜ-BAP tarafından 2017FEBE060 nolu proje 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.

HAJARAT ABILO ALFA



ÖZET

**CAPPARIS OVATA'DAN İZOLE EDİLEN BAZI BİLEŞİKLERİN *İN-VİTRO*
ANTI-ENFLAMATUAR ETKİLERİNİN ARAŞTIRMASI**
YÜKSEK LİSANS TEZİ
HAJARAT ABILO ALFA
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF.DR. ALAATTİN ŞEN))

DENİZLİ, MART - 2019

Enflamasyon, enfeksiyon ve doku hasarına karşı hücrel ve humoral düzeyde oluşan güçlü bir fizyolojik cevaptır ve kanser dahil çok çeşitli hastalıkların başlama ve ilerleme süreçlerinde kritik rol oynar. Enflamasyon sürecinde hasarlı dokularda üretilen aşırı nitrik oksit üretiminden makrofaj kökenli iNOS enzimi sorumludur. RAW 264.7 hücrelerine lipopolisakkarit (LPS) uygulanması, iNOS ekspresyonunda ve nitrik oksit sentezinde artışa neden olur. Nitrik oksit, iNOS tarafından aşırı miktarda üretilir ve karsinogenez, ateroskleroz, otoimmün hastalıklar, astım, artirit, multiple skleroz, kolit, nörodejeneratif hastalıklar, tümör gelişimi ve septik şok gibi pek çok patolojik süreçte merkezi rol oynar. iNOS inhibitörlerinin, osteoartrit, deneysel otoimmün miyokardit, multipl skleroz ve septik şok gibi pek çok hastalığın patolojisinde olumlu rol oynamaktadır. iNOS enzim aktivitesinin inhibisyonu pek çok hastalığın tedavisinde önemli yer tutar. Bu çalışmada, *Capparis ovata*'dan izole edilen ursolik asit, beta- sitosterol, olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat ve rutin bileşiklerinin nitrik oksit sentezi üzerindeki etki mekanizmasının, indüklenebilir nitrik oksit sentaz enzimi (iNOS) ve NFκB yolağı üzerinden araştırılması amaçlandı. Bu amaçla, RAW 264.7 ve HEK293T hücre serileri seçildi. Hücrelerin, lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılması iNOS sentezinde artış ve NFκB yolağında aktivasyon sağladı. Bu uyarılmış hücre sisteminde, ursolik asit, beta-sitosterol, olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat ve rutin bileşiklerinin, NF-κB yolağı aracılığıyla iNOS sentezi üzerindeki etkileri ortaya kondu. Griess metoduna göre uyarılmış hücrelerin hücre dışı süpernantlarında nitrit miktar ölçümü yapıldı ve ursolik asit, olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat ve rutin bileşiklerinin uygulanması sonucunda hücrelerde ölçülen nitrit miktarının, sadece LPS ile uyarılmış olan hücrelerde ölçülen nitrit miktarına göre önemli ölçüde azaldığı görüldü. Aynı zamanda NFκB plazmidi transfekte edilmiş ve LPS ile uyarılmış olan hücrelerde NF-κB yolağında gözlenen artışın seçilen bileşikler ile inhibe edilebiliyor olması da bu bileşiklerin iyi bir anti-enflamatuvar etkiye sahip bileşikler olduğunu destekledi. Sonuç olarak, özellikle OPC bileşiğinin doğal bir anti-enflamatuvar ajan olarak kullanılabileceği gösterildi.

ANAHTAR KELİMELER: *Capparis ovata*, Enflamasyon, NFκB, Nitrik Oksit, iNOS

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE *IN VITRO* ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF SOME COMPOUNDS ISOLATED FROM *CAPPARIS OVATA*

MSC THESIS

HAJARAT ABILO ALFA

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. ALAATTİN ŞEN))

DENİZLİ, MARCH 2019

Inflammation is a strong physiological response at the cellular and humoral level against infection and tissue damage and plays a critical role in the initiation and progression of a wide variety of diseases, including cancer. In the process of inflammation, the iNOS enzyme of macrophage origin is responsible for the production of excess nitric oxide produced in the damaged tissues. Application of lipopolysaccharide (LPS) to RAW 264.7 cells results in an increase in iNOS expression and nitric oxide synthesis. Nitric oxide is produced in excess by iNOS and plays a central role in many pathological processes such as carcinogenesis, atherosclerosis, autoimmune diseases, asthma, arthritis, multiple sclerosis, colitis, neurodegenerative diseases, tumor development and septic shock. iNOS inhibitors play a positive role in the pathology of many diseases such as osteoarthritis, experimental autoimmune myocarditis, multiple sclerosis, and septic shock. Inhibition of iNOS enzyme activity plays an important role in the treatment of many diseases. The aim of this study is to investigate the effect of ursolic acid, beta-sitosterol, olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat e and routine compounds isolated from *Capparis ovata* on nitric oxide synthesis by the inducible nitric oxide synthase enzyme (iNOS) and the NF κ B pathway. For this purpose, RAW 264.7 and HEK293T cell lines were selected. The stimulation of macrophage cells by lipopolysaccharide (LPS) increased the synthesis of iNOS and activation in the NF κ B pathway. In this induced macrophage cell system, the effects of ursolic acid, beta-sitosterol, olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat e and routine compounds on iNOS synthesis via the NF κ B pathway were demonstrated. According to the Griess method, nitrite levels were measured in extracellular supernatants of excited cells. As a result of the application of ursolic acid, olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat e and routine compounds, the amount of nitrite measured in the cells was significantly reduced compared to the amount of nitrite measured only in LPS- stimulated cells. It was also concluded that the increase in the NF κ B pathway in cells with NF κ B plasmid transfected and stimulated with LPS was inhibited by the selected compounds, supporting that the compounds have a good anti-inflammatory effect. As a result, it has been shown that, in particular, the OPC compound can be used as a natural anti-inflammatory agent.

KEYWORDS: *Capparis ovata*, Inflammation, NF κ B, Nitric oxide, iNOS

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
SEMBOL LİSTESİ	vi
ÖNSÖZ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1 Enflamasyon.....	1
1.1.1 Enflamasyonun Kimyasal Mediatorleri.....	3
1.1.1.1 Vazoaktif Aminler.....	4
1.1.1.2 Plazma Proteazları.....	4
1.1.1.3 Nitrik Oksit.....	5
1.1.1.3.1 Nitrik Oksit Sentezi.....	6
1.1.1.3.2 Nitrik Oksit Sentaz İzofomları.....	8
1.1.1.3.3 İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS).....	9
1.1.1.3.4 iNOS Ekspresyon Regülasyonu.....	11
1.2 <i>Capparis ovata</i>	13
1.3 Çalışmanın Amacı.....	15
2. MATERYAL VE METOD	16
2.1 Materyal.....	16
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	16
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	17
2.2 METOD.....	18
2.2.1 Kapari (<i>Capparis ovata</i>) Sulu Ekstresinin Hazırlanması.....	18
2.2.2 Kapari Eksresi Fraksiyonlama, Etkin Madde Ayırıştırma ve Tanımlama Çalışmaları.....	18
2.2.3 Hücre Kültürü Çalışması.....	20
2.2.3.1 Besiyeri hazırlanması ve Hücre Büyütmesi.....	20
2.2.3.2 Hücrelerin Pasajı.....	20
2.2.3.3 Sitotoksikite Çalışmaları.....	21
2.2.4 <i>Capparis ovata</i> 'dan İzole Edilen Bileşiklerinin NF-κB Aktivitesi Üzerine Olan Etkisi.....	22
2.2.4.1 Geçici Transfeksiyon ve Lusiferaz Deneyi.....	22
2.2.5 Nitrit Ölçümü.....	23
2.2.6 İstatistiksel Analiz.....	24
3. BULGULAR	25
3.1 Nitrit Ölçümü.....	25
3.2 Lipopolisakkaritin (LPS) Nitrik Oksit Düzeyi ve Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi.....	25
3.3 <i>Capparis ovata</i> 'dan İzole Edilen Bileşiklerinin Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkileri ve Nitrik Oksit Düzeyi.....	27
3.4 <i>Capparis ovata</i> 'dan İzole Edilen Bileşiklerinin NK-κB Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri.....	32
4. TARTIŞMA	36
5. SONUÇ	45

6. KAYNAK	46
7. ÖZGEÇMİŞ	59

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. İnflamasyon oluşumu (Mintern ve Villadangos, 2012).....	2
Şekil 2. Kompleman sistemi aktive eden yolaklar (Pickering, Agati, Nester, ve diğ .,2013).....	5
Şekil 3. Nitrik Oksit sentezi (Aktan, 2004).	6
Şekil 4. NOS Homodimerik Yapısı (Aktan, 2004; Chen ve ark., 2002).	7
Şekil 5. Üç Nitrik oksit sentaz izozimleri tarafından NO sentezi (Knowel ve Moncada., 1994).....	9
Şekil 6. NOS enzimlerin pimer yapısı (Knowels ve Moncada, 1994).....	9
Şekil 7. Gram negatif bakteri dış membran yapısı (Raetz ve Whitfield., 2002).....	10
Şekil 8. LPS sinyal iletim yolağı.	11
Şekil 9. NFκB sinyalinin klasik ve alternatif yolağı (Nichols, 2004).....	13
Şekil 10 . Nitrit standart eğri grafiğı. Veriler 3 farklı ölçümün ortalama değerleridir.	25
Şekil 11. LPS'nin doza bağımlı bağımlı olarak nitrit konsantrasyonu üzerindeki etkisi. (*p<0,05, **p<0,01; kontrol grubuna göre anlamlılık) (Veriler 3 farklı ölçümün ortalama değerleridir).	26
Şekil 12. LPS'nin doza bağımlı bağımlı olarak hücre canlılığındaki değişimi üzerine etkisi. Veriler 3 farklı ölçümün ortalama değerleridir.	27
Şekil 13. Capparis ovata'dan izole edilen Olean-12-en-28-ol, 3β pentacosanoat (OPC) hücre canlılığındaki değişim üzerine etkisi.	28
Şekil 14. Rutin bileşiğinin hücre canlılığındaki değişim üzerine etkisi.	29
Şekil 15. Capparis ovata'dan izole edilen Ursolik Asit (UA) bileşiğinin hücre canlılığındaki değişim üzerine etkisi.	29
Şekil 16. Capparis ovata'dan izole edilen beta-sitosterol (SIT) bileşiğinin hücre canlılığındaki değişim üzerine etkisi.	30
Şekil 17. 10µg/ml LPS ile indüklenmiş nitrit konsantrasyonları üzerine <i>Capparis ovata</i> 'dan izole edilen bileşiklerin etkisi. (*p<0,05 LPS grubuna göre anlamlılık). (Veriler 3 farklı ölçümün ortalama değerleridir.).....	31
Şekil 18. <i>Capparis ovata</i> 'dan izole edilen bileşiklerin hücre canlılığındaki değişim üzerine etkisi (Veriler 3 farklı ölçümün ortalama değerleridir).	32
Şekil 19. Farklı dozlardaki LPS konsantrasyonunun lusiferaz aktivite üzerine etkisi.	33
Şekil 20. Lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen NFκB aktivasyonu üzerinde Bortezomibin etkisi (BTZ: Bortezomib).Sonuçlar üç set deneyin ortalama ± Standart Sapma değerleri olarak verilmiştir.....	34
Şekil 21. <i>Capparis ovata</i> 'dan izole edilen bileşiklerinin belirlenen miktarlarının lüsiferaz aktivitesi üzerine etkisi.	35

SEMBOL LİSTESİ

COWE	: Capparis ovata sulu ekstresi
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil sulfoksit
FBS	: Fetal bovine serum
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
LPS	: Lipopolisakkarit
NFκB	: Nükleer faktör kaba B
NO	: Nitrik oksit
OPC	: Olean-12-en-28-ol, 3β pentacosanoat
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
RAW 264.7	: Murin makrofaj hücre serisi
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
UA	: Ursolik asit

ÖNSÖZ

Tez konumu belirlenmesinde ve araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Prof. Dr. Alaattin ŞEN'e çok teşekkür ediyorum.

Ayrıca Laboratuvar çalışmalarında, bana yardım ederek araştırmamı kolaylaştıran Özden Özgün ACAR, Elif KALE, Nazmiye BOZAĞAÇ'a ve diğer laboratuvar arkadaşlarım çok teşekkür ederim.

Maddi desteklerinden dolayı Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine;

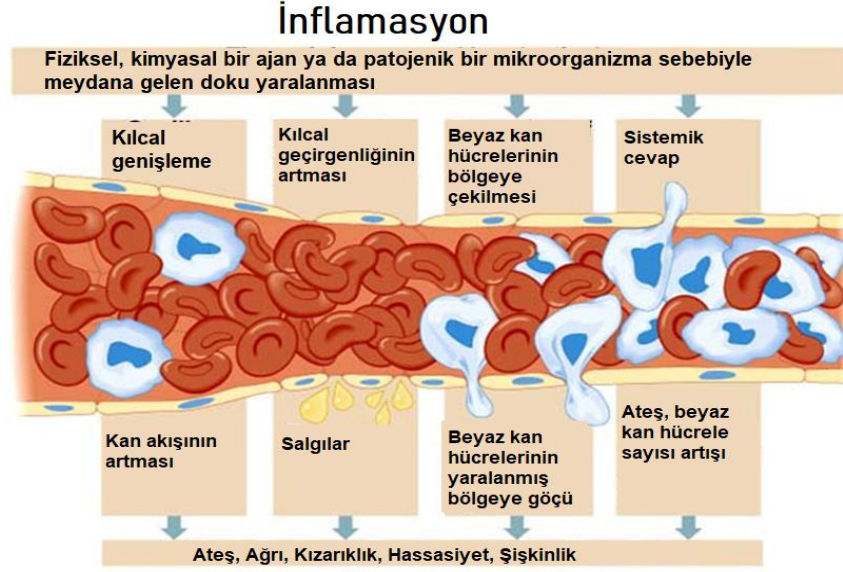
Hem de unutmamam gereken; beni okula gönderen sevgili aileme ve eğitim süresinde bana ders veren saygıdeğer öğretmenlerime ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ediyorum.

Hem de her zamanda bana destekleyen Şükür KOLUKİSA, Ramazam TARİK, Mehmet ÖZAR ve KASKÖSE Aileme çok teşekkür ediyorum.

1. GİRİŞ

1.1 Enflamasyon

Konakçı için koruyucu bir strateji olan enflamasyon, doku hasarı gibi hücreyel homeostazın bütünlüğünü tehdit eden herhangi bir zararlı etkiye karşın hücrenin hayatta kalmasını sağlayan bağışıklık sisteminin önemli bir yanıtıdır (Fujihara ve diğ., 2003). Bu yanıtın uzun süre kontrolsüz devamlılığı konakçı için zararlı sonuçlar oluşturabilir. Hücreyel fizyolojinin korunmasında yararlı rolünün aksine, olumsuz koşullarının herhangi bir şekilde ortaya çıkmasını önlemek için enflamatuvar yanıtın sıkı kontrol altında tutulması gerekmektedir (Medzhitov., 2010). Romatoidartrit, otoimmün hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıkların patogenezinde kontrol edilemeyen enflamasyon önemli rol oynar (Kumar ve diğ., 1992). Nötrofil ve monositler başta olmak üzere lökositlerin birikimi enflamatuvar reaksiyonun en önemli özelliğidir. Her ne kadar çeşitli tipteki hücreler (fibroblast, endotel ve epitel hücreleri gibi) enflamatuvar reaksiyona dahil olsalar da, makrofajların pro-enflamatuvar mediyatörlerin üretimini düzenlemede merkezi bir rol oynadığı bilinmektedir (Aktan., 2004).



Şekil 1. İnflamasyon oluşumu (Mintern ve Villadangos, 2012).

Enflamatuvar uyarılar, doğal ve adaptif bağışıklık sistemlerinin hücreleri tarafından “Pattern-recognition receptors (PRR)” adı verilen spesifik transmembran reseptörler vasıtasıyla konakçı hücreler tarafından tanınırlar. PRR'ler virüs ve mikroorganizmaların varlığının veya herhangi bir hücresel hasarın tespitinden sorumlu olan reseptörlerdir (Akira ve diğ., 2006). PRR'lar enflamatuvar etkenin patojen olarak tanınmasını sağlayan “Pathogen associated molecular patterns (PAMP)” desenlerini tanıyarak, etkene karşı uygun cevabı oluşturmak için uyarılırlar. PAMP'lar bazı durumlarda gram (-) bakterilerde bulunan lipopolisakkarit (LPS), gram (+) bakterilerdeki peptidoglikan, flagellin olabilirken bazı durumlarda bakterilere ait nükleik asitler olabilir. PAMP'lar, tespit eden Toll benzeri reseptörler (TLR), C-tipi lektin reseptörleri (CLR), RIG-1'e benzer reseptörler (RLR) ve NOD benzeri reseptörler (NLR) olarak tanımlanmıştır. Bu reseptörlerin uygun uyarılarla etkileşimleri, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel mekanizmalar vasıtasıyla sinyalin çekirdeğe iletimi ile sonuçlanır (Akira ve diğ., 2006; Medzhitov., 2007). Transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra, DNA üzerindeki hedef motiflerin tanımlanması sinyal iletim mekanizmasının en önemli adımlarından biridir. NK- κ B, diziye özgü DNA motifine bağlanması ile tanımlanan ilk transkripsiyon faktörüdür (Sen ve Baltimore., 1986). NK- κ B' nin yanı sıra, c-Jun, c-Fos, (Greenberg ve Ziff., 1984; Bohmann ve diğ., 1987), siklik AMP (cAMP) yanıt element bağlama proteini

(CREB), bir cAMP kaynaklı faktör (Montminy ve Bilezikjian., 1987); adenovirüs ile enfekte olmuş hücrelerde adenovirüs E1A proteini tarafından aktive edilen bir transkripsiyon faktörü olan E2F (Kovesdi ve diğ., 1986); gibi diğer transkripsiyon faktörleri de enflamatuvar genlerin seçici indüksiyonunda çok önemli roller oynarlar. Enflamatuvar uyarılara yanıt olarak bu transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ya da inhibisyonu, fosforilasyon- defosforilasyonu da içeren bir dizi posttranslasyonel mekanizmaya bağlıdır.

Mononükleer fagositik sistem (MFS)'in bir elemanı olan makrofajlar, özellikle kronik iltihapta önemli bir bileşenlerdir. Kemik iliğinde monoblast, promonosit halini alır. Promonositler süratle bölünüp çoğalır ve periferel kan akımına monosit olarak girerler. Monositler dokuya geçtiklerinde makrofaj (histiyosit) adını alır. Bu hücreler MFS'in elemanları olarak karaciğerde kupffer hücreleri, dalak ve lenf nodüllerinde sinus histiositleri, santral sinir sisteminde mikroglial hücreler, akciğerlerde alveolar makrofajlar ve kemik dokusunda osteoklastlar adını alır. Makrofajlar nispeten çok miktarlarda nitrik oksit üretme kapasitesine sahiptir. Çeşitli enflamasyon hastalıklarının başlatılması, ilerletilmesi ve ilerlemesine, nitrik oksit (NO), prostaglandin E2 (PGE2), tümör nekroz faktörü (TNF-a), interlökin 6 (IL6) gibi sitokinleri içeren birtakım pro-enflamatuvar araçlar aracılık eder (Cho ve diğ.,2014; Jung ve diğ., 2007; Koh ve DiPietro., 2011; Ohashi ve diğ., 2015).

1.1.1 Enflamasyonun Kimyasal Mediatörleri

Enflamasyonun olası yanıtları, plazma hücrelerinden enflamatuvar bir uyarın sayesinde oluşturulan kimyasal faktörlerin bir araya gelmesi ya da sırayla etki göstermeleri ile ortaya çıkmaktadır (Mullington ve diğ., 2001; Aghabeigi., 1992). Enflamasyon yanıtı enflamatuvar etkeni ortamdaki uzaklaştırarak yok etmeye çalışır. Aşırı artmış kotrolsüz devam eden bu yanıt konakçı için organ fonksiyonlarında bozulma, yetersizlik gibi zararlı sonuçlar oluşturabilir. Enflamatuvar yanıtın oluşmasını sağlayan histamin, ilk olarak keşfedilmiş kimyasal mediatörlerdendir. Plazma kökenli mediatörler (komplemanlar) biyolojik aktivitelerini kazanmak için proteolitik değişiklikler geçirirlerken, hücre kökenli mediatörler belirli bir uyarıya karşı ihtiyaç olduklarında salgılanırlar ve hemen hemen hepsi belirli bir reseptöre bağlanarak etkilerini gösterirler, lizozomal proteazlar ve serbest radikaller gibi bazı

medyatörler ise, direkt enzimatik ve toksik aktiviteyle etki yaparlar (Bienvenu., 1995).

1.1.1.1 Vazoaktif Aminler

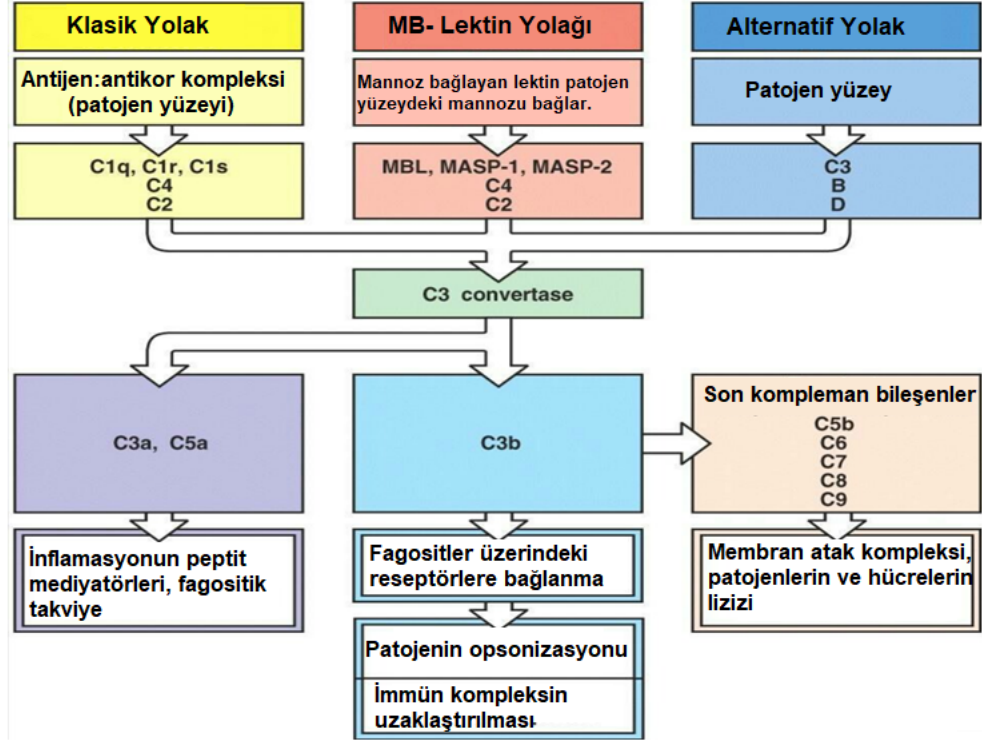
Histamin ve serotonin gibi vazoaktif aminler, vasküler permeabiliteyi arttırarak enflamatuvar yanıtı başlatan sinir liflerinden salgılanan küçük proteinlerdir. Histamin, çeşitli hücre tiplerinde farklı olarak eksprese edilen dört G-protein bağlı histamin reseptörüne bağlanarak hücrel olaylarda patofizyolojik bir düzenleyici rol oynamak üzere kurulmuştur. Histamin, mast hücrelerinin, bazofillerin, trombositlerin granüllerinde depolanır. Bu histamin, bu hücrelerden akut iltihap, histamin serbest bırakıcı faktörleri uyaran uyaranlarla serbest bırakılır ve vazodilatasyonu arttırır (Paul ve William., 1984).

Serotonin, trombositlerde ve mast hücrelerinde depolanır. Serotonin, trombositler ve enflamasyon ile yakından ilişkili olduğunu yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir (Davis ve diğ., 1960). Serotonin, monositleri ve lenfositleri uyarır dolayısıyla sitokinlerin sekresyonunu etkiler (Dürk ve diğ., 2005; Iken ve diğ., 1995).

1.1.1.2 Plazma Proteazları

Kompleman sistemi, total serum proteinlerinin yaklaşık %10'unu oluşturan bir grup moleküllerdir. Yapım yeri başlıca karaciğerdir, aktive makrofajlarda da az miktarlarda sentezlenebilir. Bu sistemde çok sayıda kompleman proteini bulunur. Kompleman proteinleri pro-enzimdirler ve aktive olmaları için daha önce aktive olmuş enzimlerle proteolitik parçalanmaları gereklidir. Aktive olmuş bir enzim daha sonraki basamakta birkaç molekülü aktive eder ve etkileşim böylece artarak devam eder. Sistem kontrol edilmezse gittikçe güçlenerek biyolojik bir hasar oluşur. Normal durumlarda sistemin düzeni, özellikle enzimlerin inhibisyonu ile sağlanır ve sistem kontrol altında tutulur. Kompleman kaskadı başlıca üç yol ile aktive olur: Klasik

yolu, lektin yolu ve alternatif yol (Pickering ve diğ., 2013). Her üç yolda da ortak basamak, kompleman 3'ün (C3) daha küçük iki fragmana (C3a ve C3b) ayrılmasıdır. C3a fagositleri ve mast hücrelerini aktive eder.



Şekil 2. Kompleman sistemi aktive eden yolaklar (Pickering, Agati, Nester, ve diğ .,2013).

1.1.1.3 Nitrik Oksit

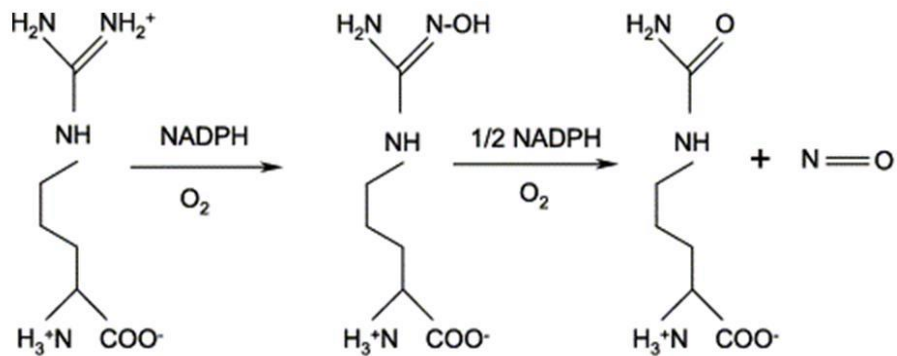
Nitrik oksit (NO), ilk kez, endotel kaynaklı gevşeme faktörü olarak tanımlanmıştır. Birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol oynayan önemli bir sinyal molekülüdür. NO vasküler ve immunolojik görevlerinin yanı sıra hücre içi ve hücre arası sinirsel iletim ajanı olarak görev görür (Ignarro ve diğ., 2001, Ulbrich ve diğ., 2006). Memeli hücrelerinde vazodilasyon, trombosit agregasyonunun inhibisyonu ve immün regülasyon gibi pek çok fizyolojik rolü oynar üstlenmesine rağmen, düzenlenemeyen nitrik oksit üretimi sitotoksik etkiler sergileyerek, DNA ve doku hasarına neden olur ve septik şok, romatoid artirit hipertansiyon, hipertkolesterolemi, diyabet ve kalp hastalıklarının gibi çeşitli hastalıkların patogeneze katkıda bulunur

(Knowels ve Moncada, 1994; Sessa, 1994; Drexler., 1999; Alexandrova ve diğ., 2001). Nitrik oksitin yapısal olarak küçük (30 kDa) ve lipofilik bir molekül olmasından dolayı, membranları rahatlıkla geçebilir. DNA, protein, tiyoller gibi pek çok farklı molekül ile reaksiyona girebilen reaktif bir serbest radikaldir (Moncada ve Higgs., 1993; Culotta ve Koshland., 1992; Bredt ve diğ., 1991).

1.1.1.3.1 Nitrik Oksit Sentezi

NO, omurgalılarda sitokrom P450 redüktaz homoloğu olan nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L- arjininden iki ardışık monooksijenaz reaksiyonu sonucunda sentezlenir. NO sentezinde, moleküler oksijen ile kofaktör olarak, nikotinamid adenin dinükleotide (NADPH), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve tetrahidrobiopterin (BH3) gerekmektedir. NO sentezi iki basamakta gerçekleşir.

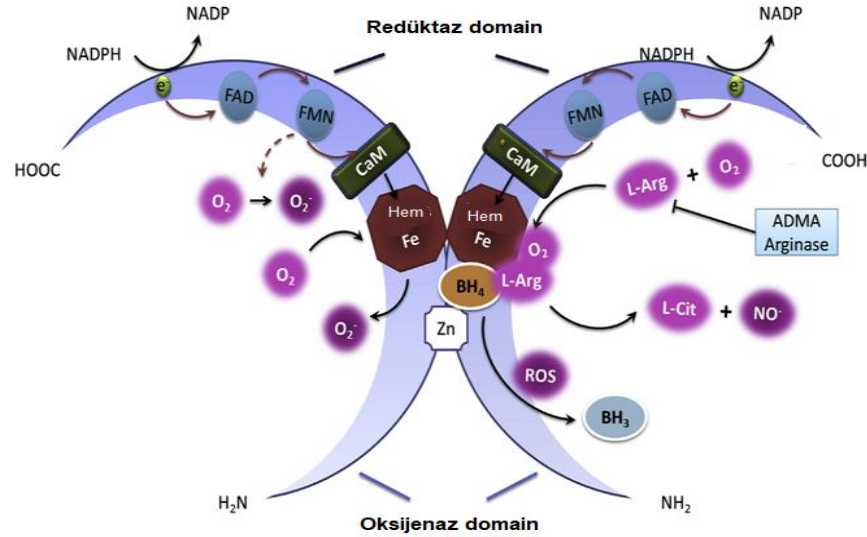
Birinci basamak; L-arjininin N⁰-hidroksi-L-arjinine hidroksilasyonudur. İkinci basamak ise, N⁰-hidroksi-L-arjinin, L-sitrüllin ve NO'e oksidasyonudur. Reaksiyonda toplam 1,5 molekül NADP⁺ ve iki molekül su yardımcı ürünler olarak meydana gelir (Aktan, 2004; Stuehr ve diğ., 1991).



Şekil 3. Nitrik Oksit sentezi (Aktan, 2004).

Nitrik oksit sentaz enzimi iki terminal domaine sahiptir; amino terminal ve

karboksi terminal içerir. Amino terminalini, BH4 ve L-arjinin için bağlama bölgeleri içeren oksijenaz domainidir. Karboksi terminal ise FAD, FMN ve NADPH bağlanma domainlerini içerir (Alderton ve diğ., 2001). NOS sentezlendikten sonra, FMN, CaM ve FAD'e bağlanır ve “hem” içermeyen monomeri oluşturur. Memelilerde NOS dimerik formda fonksiyonel hale gelir ve NOS “hem” moleküllere bağlanarak işlevini gerçekleştirir. “Hem”in oksijenaz domaine katılımı ile L-arjinin ve BH4 için bağlanma bölgesi oluşturulur ve ancak bu sayede iki monomer gevşek dimer oluşabilir. BH4 ve L-arjinin bağlanması gevşek formundan sıkı ve aktif NOS dimerine dönüşmesini sağlar (Chen ve ark., 2002; Aktan, 2004).



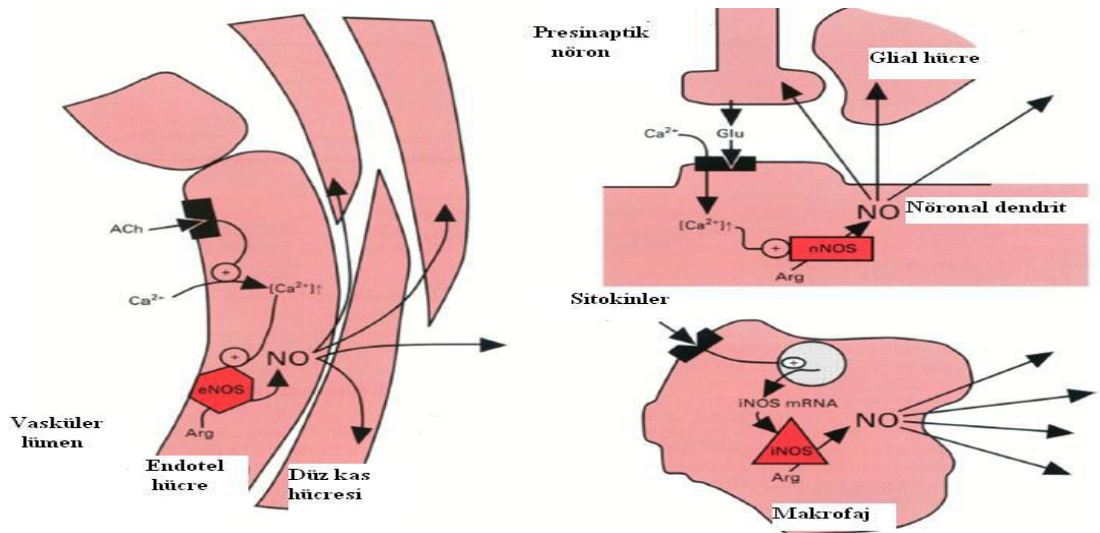
Şekil 4. NOS Homodimerik Yapısı (Aktan, 2004; Chen ve ark., 2002).

Asetikolin, histamin, trombin, serotonin, ADP, bradikinin, nerepinefrin ve izoproterenol gibi çeşitli antagonistler endotelden NOS sentez ve salınımını arttırabilmektedir (Cannon, 1998; Carr ve Frei, 2000; Sessa, 2005). NOS sentezini inhibe eden moleküler de vardır, bu inhibitörler biyolojik sistemlerde NO'in rollerini araştırmada çok yararlıdır. NOS biyosentezinde L-arjinin NO'ye dönüştürmektedir. Buna karşılık çeşitli L-arjinin analogları L-arjinin yerine gerçek NO yapımını kompetitif bir yolla inhibe edebilirler (Moncada ve diğ., 1991; Nathan, 1992;

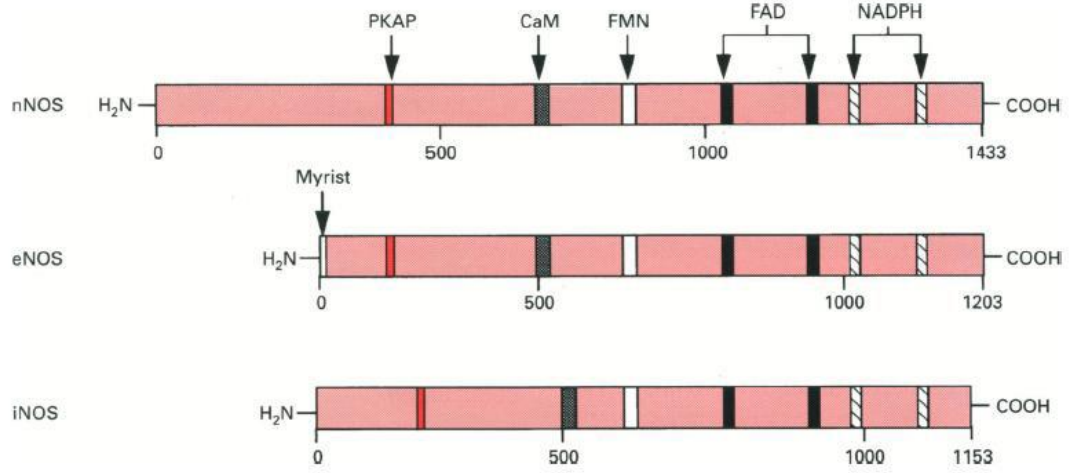
O'Donnell ve Liew, 1994). Nitro- arjinin (NNA) kovalent bağ oluşturarak NOS proteinini yapısını değiştirmeden geri dönüşümsüz olarak inhibe eder (Stefanovic-Racic ve diğ., 1993).

1.1.1.3.2 Nitrik Oksit Sentaz İzofomları

Nitrik oksit sentaz enziminin, nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS veya NOS1), endotelial nitrik oksit sentaz (NOS III veya eNOS) ve indüklenebilen (iNOS ve NOS II) nitrik oksit sentaz olarak üç izoformu vardır. Bu üç izoform fizyokimyasal ve kinetik özelliklerine göre yapısal ya da indüklenebilen, aktivitelere göre kalsiyum bağımlı veya bağımsız ve doku dağılımına göre ayrılırlar (Moncada ve diğ., 1997). nNOS ve eNOS, pek çok hücrede bulunan yapısal enzimlerdir (Sessa, 1994; Norman ve Cameron, 1996; Lapointe ve ark., 2006). NOS enzimin izoformları birbirleri ile %50-%60 sekans homolojisi gösterirken, amino terminal bölgelerinde belirli farklılıklar görünmektedir. eNOS'un amino terminal bölgesi diğerlerinden daha kısadır, ve konsensus N- miristilasyon bölgesi bulunmaktadır. Miristatin bağlanarak membran bağımlı olmasına neden olur. nNOS ise amino terminalinde spesifik regülasyon işlevi yapan olan 300 aminositik bir bölgeye sahiptir (Knowels ve Moncada, 1994).



Şekil 5. Üç Nitrik oksit sentaz izozimleri tarafından NO sentezi (Knowel ve Moncada., 1994).



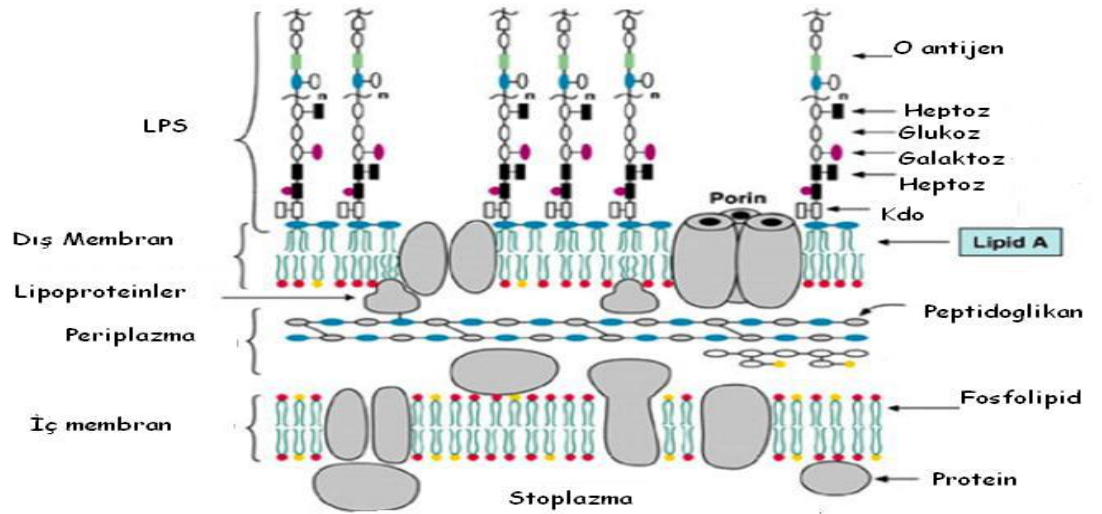
Şekil 6. NOS enzimlerin pimer yapısı (Knowels ve Moncada, 1994).

1.1.1.3.3 İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS)

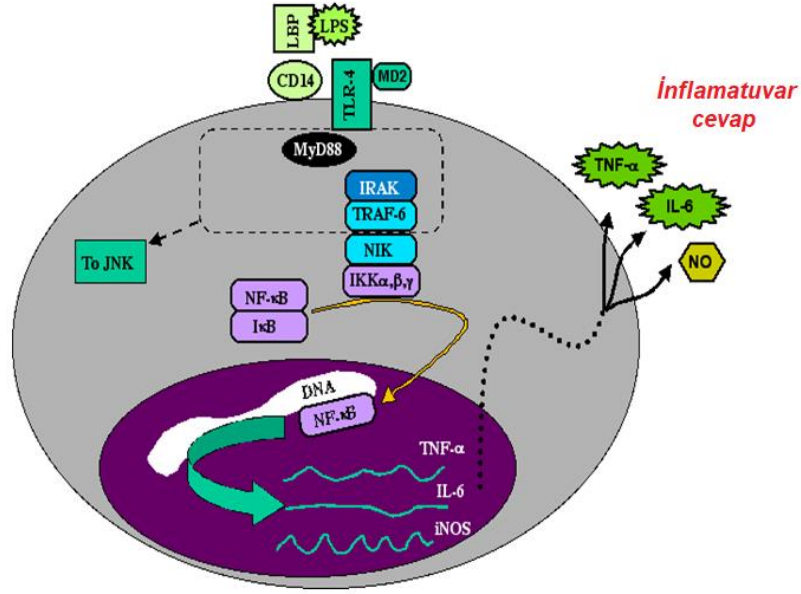
Hücre dışı uyarıcılar tarafından farklı sinyal yollarını aktifleştirilerek iNOS ekspresyonu uyarılmış olur. Bakteriyel lipopolisakkarit (LPS), hipoksi, oksidatif stres ve enflamatuvar sitokinler ($IL-1\beta$, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$) fazla iNOS ekspresyonuna neden olan moleküllerdir (Yang ve diğ., 2009). Bu moleküllerden en çok LPS, $TNF\alpha$ ve $IFN\gamma$ çalışılmıştır. $IFN\gamma$, JAK-STAT sinyal yolu ile iNOS'u indüklerken, LPS ve $TNF\alpha$ ise $NK-\kappa B$ aktivasyonu uyararak iNOS transkripsiyonuna neden olur. Bağırsak epitelyal hücreler ve makrofaj hücreleri dahil, STAT1 ve $NK-\kappa B$ en çok bilinen iNOS transkripsiyon faktörleridir (Aktan, 2004).

Lipopolisakkarit (LPS), gram negatif bakteriyel dış membran komponenti ve makrofajların aktivatörüdür. LPS tarafından makrofajların aktivasyonu indüklendikten sonra, iNOS ekspresyonu aktivasyonu ile NO konsantrasyonunda artış meydana gelir. Organizmada makrofajlar tarafından aşırı iNOS aktivasyonu ve NO artışı enflamasyon, septik şok ve kronik enflamatuvar hastalıkların patolojisinden sorumludur (Kim ve Ha, 2009).

LPS O-oligosakkarit zinciri, merkez oligosakkarit ve bir lipid komponenti olan lipid A yapısına sahiptir. O-oligosakkarit zinciri LPS' nin yüzeyinde bulunur. Tek başına enflamatuvar bir yanıt oluşturamaz. Makrofajlarda, LPS CD14 hücrese reseptörü üzerinden etki gösterir. Bu reseptör intraselüler domaine sahip olmadığı için, LPS'nin enflamatuvar cevapları indükleyen ve sinyali başlatan, intraselüler domaini bulunan Toll bezeri reseptör 4 (TLR4) gerekmektedir. TLR4 hücre dışı domainlerinde tekrarlayan lōsine zengin motifler taşır ve stoplazmik domaini, homolog olan interlōkin-1 (IL-1) reseptör sinyal domainine IL-1 reseptör assosiyasyon kinaz (IRAK)'a bağımlıdır. NFκB gibi transkripsiyon faktörlerini aktive eden IRAK, otofosforilasyon ile reseptör kompleksinden ayrılır ve TNF reseptör assosiyasyon faktör 6 (TRAF6) ile inhibitör kappara B kinazı (IKK) aktive ederek NFκB sinyal yolağını aktive eder ve iNOS'un ekspresyonunun indüklenmesine neden olur (Ulevitch ve Tobias, 1995; Akira, 2000). Şekil 7'de LPS' nin yapısı ve Şekil 8'de LPS sinyal yolağı gösterilmektedir.



Şekil 7. Gram negatif bakteri dış membranının yapısı (Raetz ve Whitfield., 2002).



Şekil 8. LPS sinyal iletim yolağı.

1.1.1.3.4 iNOS Ekspresyon Regülasyonu

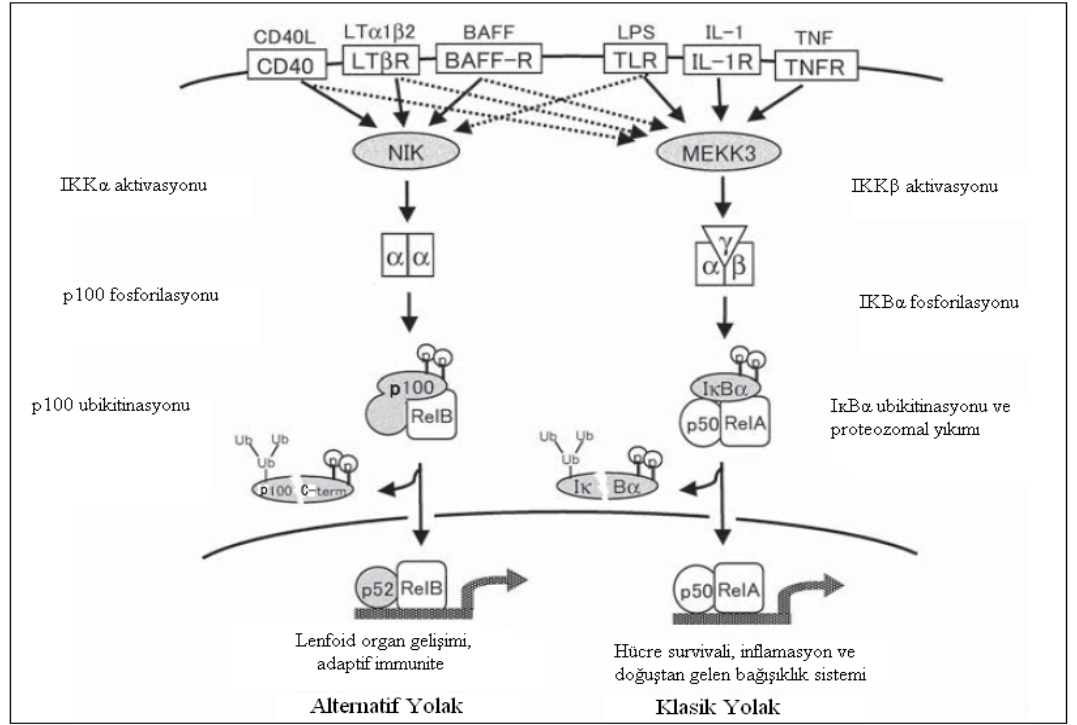
iNOS tarafından üretilen NO fizyolojik ve patofizyolojik bakımdan önemli rol oynarken, organizmada ihtiyaç duyduğundan daha fazla miktarının üretmesi çeşitli hastalıklara yol açar. Organizma için iNOS tarafından üretilen NO'nun kontrol edilmesi çok önemlidir (Galea ve Feinstein., 1999).

iNOS sentezi genelde transkripsiyonel seviyesinde regüle edilir. iNOS, aktivatör protein-1 (AP-1), interferon regülatör faktör-1 (IRF-1), NFκB, CREB, sinyal transdüksiyon transkripsiyon aktivatör-1 alfa (STAT-1α) vb. transkripsiyon faktörü bağlama bölgelerine sahiptir ve bu faktörlerin aktivasyonu veya inhibisyonu ile iNOS ekspresyonu regüle edilir (Pautz ve diğ., 2010; Mautz ve Rao, 2000). Posttranslasyonel regülasyon ise iNOS proteinin stabilizasyonunu, fosforilasyonunu ve kofaktör bağlanmasını içerir (Aktan., 2004).

Nükleer faktör-KB, insan bağışıklık yanıtında görev yapan ve interlökin-1,

interlökin-2 ve tümör nekroz faktörü- α gibi çeşitli enflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür (Baeuerle ve Henkel, 1994). NK- κ B, RAW

264.7 makrofaj ve diğer hücrelerde iNOS ekspresyonunun regülasyonunda görevli temel transkripsiyon faktörüdür. Hücre proliferasyonunu, enflamatuvar cevapları, hücre adezyonunun kontrolünde yer alan genlerin ekspresyonunu regüle eder. NK- κ B, iNOS ekspresyonunun inhibitörleri ve aktivatörleri için merkezi bir hedefdir. LPS, TLR, ILR, TNF α ve oksidatif stres, iNOS ekspresyonunu farklı hücre tiplerinde NK- κ B'yi aktive ederek indükler (Ghosh ve diğ., 1998; Oeckinghaus ve Ghosh, 2009; Perkins ve Gilmore, 2006). Yapılan çalışmalarda resveratrol, kersetin, hesperidin gibi bitki flavanoidlerinin iNOS ekspresyonunu NK- κ B üzerinden inhibe ederek anti enflamatuvar etki gösterdikleri ortaya çıkartılmıştır (Tsai ve diğ., 1999; Karunaweera ve diğ., 2015; Parhiz ve diğ., 2015). NK- κ B klasik ve alternatif yolak olmak üzere iki şekilde aktive olur (Bonizzi ve Karin, 2004). Klasik yolda NK- κ B aktivasyonunu, mikrobiyal ürünler ve TNF alpha ve IL-1 gibi pro-enflamatuvar sitokinler, Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler), tümör nekrozis faktör reseptörleri (TNFR), antijen reseptörleri ve İnterlökin-1 reseptörleri (IL-1R) gibi uyarıcılar tetikleyebilir (Oeckinghaus ve Ghosh, 2009; Perkins ve Gilmore, 2006). Bu kanonik (klasik) yolak genellikle anti-apoptotiktir, tümör teşvik eder ve ayrıca romatoid artrit, enflamatuvar bağırsak hastalık ve astım gibi kronik enflamatuvar hastalıkla patogeneğinde rol oynamıştır (Coward ve diğ., 2004). Alternatif NK- κ B aktivasyon yolu ise kanonik olmayan veya atipik yoldur; IKK2 ve NEMO aktivitesinden bağımsız ve bazen tümör baskılanması ve apoptozun kolaylaştırılması gibi farklı fonksiyonları gerçekleştirebilir (Bentes, 2001).



Şekil 9. NFκB sinyalinin klasik ve alternatif yolağı (Nichols, 2004).

1.2 *Capparis ovata*

Halk arasında gebere, gebre otu, karga kavunu, deve diken, gevil, bubuşebellah gibi isimlerle bilinen kapari (*Capparis ovata* Defs.) 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). Gebre otu kumlu ve killi topraklarda metrelerce derine inebilen kök sistem ve toprağı sımsıkı sarmasında dolay erozyon kontrolünde T.C. Orman Bakanlığınca dikimi teşvik edilen çok önemli bir bitkidir (Kan ve Arslan, 2002). 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). Kaparinin çiçek, tomurcuk ve kök kabukları yıllardır kan dolaşım ve sindirim hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır (Baytop., 1894). Protein, mineral ve vitamin açısından zengindir (Tansi ve diğ., 1997; Tansi, 1966). *Capparis ovata*, Capparidaceae familyasına dahil olup, dünya üzerinde 350 tür ile temsil edilmektedir. Türkiye’de *Capparis ovata* ve *Capparis spinosa* türleri

bulunmaktadır. Arkeolog Krügerin araştırmasına göre, 7800 yıldan beri bilinen *Capparis ovata*, analjezik, diüretik, yara iyileştirici ve hücre yenileyici olarak kullanılmakla beraber; tomurcuk ve yaprakları da ilaç ve kozmetik sanayide kullanılmaktadır (Bağcı ve Şimşek, 1998). Ayrıca bu bitkinin anti-nöroenflamatuvar etkinliği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Ozgun-Acar ve diğ., 2016). Kapari tomurcuklarında lipid, alkaloid, bazı glukozinolatlar ve antioksidan özelliği bulunan flavonoid ve diğ.er polifenoller bulunur. Rutin ise en sık rastlanan flavonoiddir. 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). Kapari ekstralarının hidrojen donörü olarak görev yaptığı, lipid radikallerle reaksiyon vererek antioksidan özellik gösterdiği kanıtlanmıştır (Germano ve diğ., 2002).

1.3 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, Capparis ovata'dan izole edilen ursolik asit, beta-sitosterol, 5,6-epoksi kolestan 3-beta-ol, Olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat (OPC) ve rutin bileşiklerinin nitrik oksit sentezi üzerindeki etki mekanizmasının, indüklenbilir nitrik oksit sentaz enzimi (iNOS) ve NF κ B yolağı üzerinden araştırılması amaçlanmaktadır. RAW 264.7 hücrelerine LPS uygulanmasının, iNOS ekspresyonunda ve nitrik oksit sentezinde artışa neden olduğu bilindiğinden bu hücreler belirlenen miktarda lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılarak iNOS sentezinde artış ve NF κ B yolağında aktivasyon sağlanacaktır. Uyarılmış RAW 264.7 hücrelerinde, ursolik asit, beta-sitosterol, 5,6-epoksi kolestan 3- beta-ol, Olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat ve rutin bileşiklerinin, NF κ B yolağı aracılığıyla iNOS sentezi üzerindeki etkisinin ortaya konması amaçlanmıştır. Capparis ovata'dan izole edilen ursolik asit, beta-sitosterol, 5,6-epoksi kolestan 3-beta-ol, Olean- 12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat ve rutin bileşiklerinin İNOS inhibitörü olma potansiyelleri aydınlatılacaktır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada, soğutmalı ve soğutmasız santrifüj (Sigma 1-14), Nuare Biological Safety Cabinets. Class II Laminar Flow, Nuare DHD Auotoflow CO2 Air Jacketed inkübatör, Nexcellom Hücre Sayıcı, Nuare -85 °C Ultralow Freezer, Human Power Scholar -UV saf su sistem, otoklav (Nuve OT 4060; Hiclave HVE-50), Vortex (DragonLab MX-F), Klasik ve hassas Terazisi (Precisa XB 220A), (Metteler Toledo AB 265-S; Metteler Toledo PB 602-L), Mikrodalga Fırın (SHOV M7017-P), Olympus ters mikroskop, Olympus CX31 mikroskop, Metteler Toledo MP 220 pH metre, Nüve ST 420 su banyosu, NanoDrop, Labnet vorteks Karıştırıcı, Biotek Synergy çok modlu Luminametrik okuyucu, Labconco Freze Dryer (Liyofilizatör), Hirayama Hiclave HVE- 50 otoklav, Precisa hassas tartı, Gerhardttekrasyon cihazı kullanılmıştır.

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmalarda, Sülfanilamid , Naftiletlen diamine, PBS, Thiazol blue tetrazolium bromide, Tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich, T4049), Dulbeco's Modified Eagle's Medium (DMEM, 12-741F), L- ; Glutamin (Sigma- G8540); Fetal Dana Serumu (Sigma-Aldrich, F9665), Tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich, T4049), Penisilin-Streptomisin (Sigma-Aldrich, P4333), Ethanol (Riedel, 071029) (%70 konsantrasyonunda etanol kullanılmıştır) EDTA (Sigma, 03620), Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma, D4550), Kristal Viyole (Fluka,61135), FuGene HD transfeksiyon reaktifi (Promega-0000139198), Dual-Glo lüçiferaz Assay Kiti (Promega-0000220660), Pureyield plasmid miniprep izolasyon kiti (Promega-0000129329), 10X-Flexi-enzim karışımı (Promega), PGL4.26 [luc2/minp/hygro] vektör (Promega) , PGL4.73 [hrluc/sv40] vektör kullanılmıştır.

2.2 METOD

2.2.1 Kapari (*Capparis ovata*) Sulu Ekstresinin Hazırlanması

Bu çalışmalarda kullanılan *Capparis ovata* meyve, tomurcuk ve çiçek materyali Aşçı Murat Kapari Tatlı Dondurma Turşu İml. ve Ltd. tarafından sağlandı. Kapari sulu ekstresi Gerhardt ekstrasyon cihazı kullanılarak 130 °C'de gerçekleştirildi. Ekstraksiyon işleminden sonra ekstre doğrudan Labconco Freze dryer (Liyofilizatör) kullanılarak liyofilize edildi ve *Capparis ovata* sulu eksresi (COWE) elde edildi (Ozgun Acar vd., 2016).

2.2.2 Kapari Eksresi Fraksiyonlama, Etken Madde Ayırıştırma ve Tanımlama Çalışmaları

COWE ekresinini fraksiyonlaması işlemi şu şekilde gerçekleştirildi: Hekzan (apolar bir çözücü) ile muamele edildi ve bir ayırma hunisinde hekzana geçen kısımlar toplandı. Hekzanda çözünen maddeleri kapsayan fraksiyondan silikaljel bir adsorbanla doldurulmuş kolon üzerinde fraksiyonlandırma ile saf madde elde edilmesine çalışıldı. Geri kalan sulu kısım bu kez biraz daha polar bir çözücü olan diklorometan ile tüketildi ve bu tüketme işlemi akabinde geriye kalan sulu ekstreden sırasıyla etilasetat ve son olarak ta butanole geçen maddeleri kapsayan fraksiyonlar elde edilerek re- ekstraksiyon işlemi tamamlandı. Elde edilen fraksiyonlar, kolon kromatografisi (ki bu bazen vakum likit kromatografisi veya flaş kromatografisi de olabilir) üzerinde yapılan ilk fraksiyonlandırmaları takiben; saf madde eldesi için farklı adsorban maddeleri içeren küçük kolon kromatografileri (Silikajelin yanı sıra Polyclar veya Al₂O₃ vb.), preparatif kolon kromatografileri ya da Sephadex LH-20 kolonlar üzerinde fraksiyonlandırma ve saflaştırma işlemlerine tabi tutuldu. Ayrıca, orta polarite veya apolar bileşikler taşıma potansiyeline sahip ekstraların fraksiyonlandırılması ve de bu fraksiyonlardan saf madde eldesi için adı geçen kolon dolgu maddelerinin kullanıldığı Chromatotron ve MPLC (mediumpressure kolon kromatografisi) ve/veya özellikle polar saf maddelerin eldesinde HPLC (high pressure kolon kromatografisi) cihazları kullanıldı.

Saf bileşiklerin yapıları ise IR (infrared), UV (ultraviyole), NMR (nükleer manyetik rezonans) ve mass (kütle) spektroskopisi teknikleriyle ve hatta gerekirse X-ray analizleriyle incelenerek belirlendi. Bu çalışmalar Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognasi ABD'nda Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU ve Dr. Işıl GAZIOĞLU yönetiminde gerçekleştirildi ve saf bileşikler laboratuvarımıza gönderildi.

2.2.3 Hücre Kültürü Çalışması

2.2.3.1 Besiyeri hazırlanması ve Hücre Büyütmesi

Bu Çalışmada RAW 264.7 ve HEK 293T hücre hatları kullandı. HEK 293T hücre hattı için için %10 fetal bovine serum (FBS) ve %1 peniciline/streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyeri, RAW 264.7 hücre hattı için ise %10 FBS ve %1 peniciline/streptomisin içeren Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) besiyeri kullanıldı. Hücreleri 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda inkübe edilerek büyümeleri sağlandı. -80°C'de %10 Dimetil sulfoksit (DMSO) içerisinde olan hücreler, 37 C'de eriyene kadar bekletildi. Eridikten sonra petrilere hücre ekildi ve üzerine 5 ml uygun besi ortamında 24 saat inkübe edildi. 24 saat inkübasyonu sonunda, ortamdaki DMSO'dan kurtamak için besiyeri değiştirildi. Hücrelerin besiyeri günde bir değiştirildi ve canlılıkları, çoğalma hızları takip edildi. Yeterli hücre yoğunluğuna sahip petrilere besiyeri çekilerek boşaltıldı. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ tuzları içermeyen steril PBS (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile yıkandı.

2.2.3.2 Hücrelerin Pasajı

Hücrelerin çoğaltıldığı kültür kaplarında, hücreler tek tabaka olduklarında pasajları yapıldı. Pasaj işlemi için öncelikle kültür besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 2 ml %0,25'lik tripsin ile yaklaşık 5 dakika muamele edilecek 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 dakika de santrifüj edildikten sonra supernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 1 ml besi ortamı eklenerek, ependorfta hazırlanan trapan mavisi (1:1000) ve hücre karışımı (1:1) thoma lamında sayılacak ve hücreler deney planına göre ekim için hazır hale getirildi.

2.2.3.3 Sitotoksosite Çalışmaları

B Çalışmamızda kullanılan hücrelerinin büyüme ve gelişmesi sağlandı. *Capparis ovata*'dan izole edilen ursolik asit, beta-sitosterol, 5,6-epoksi kolestan 3-beta-ol, Olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat ve rutin bileşiklerinin LPS ile indüklenmiş RAW 264.7 hücrelerinde canlılığa olan etkilerinin belirlenebilmesi için sitotoksosite testi yapıldı. Ursolik asit, beta-sitosterol, 5,6-epoksi kolestan 3-beta-ol, Olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat ve rutin bileşikleri sitotoksosite deneyi için uygun çözücülerle çözüldükten sonra steril etmek için 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi. 96'lık plakaya ekilecek olan hücrelerin sayısı hesaplandı. Bunun için büyütülen hücreler 96 kuyulu plakalara ekmek için tripsin ile kaldırıldı. 15 ml'lik steril Falcon tüplere besiyeri içinde olan hücreler alınıp, 1500 rpm de 24 °C de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp, dibe çöken hücreler 1 ml besiyeri içinde çözüldü. Ependorfta hazırlanan tripan blue ve hücre karışımı (1:1) thoma lamında sayıldı. Hücre sayısı hesaplandıktan sonra her kuyucukta 8×10^4 hücre olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekilmiş ve plakaların üzeri toplamda 100 μ l olacak şekilde besiyeri ile tamamlandı ve 24 saat hücrelerin plakaya yapışması için %5 lik CO₂ inkübatöründe, %95 nem ortamında bekletildi.

96'lık plakaya (8×10^4 hücre/kuyucuk) 24 saat önce ekilmiş olan hücrelerin 24 saatin sonunda eski besiyerleri çekilip hücreler üzerine yerine FBS ve antibiyotik içermeyen uygun besiyeri ve 10 μ g/ml LPS ile eklendi. Hücrelerin LPS ile yeterince indüklenmesini sağlamak için hücreler 24 saat %5 lik CO₂ inkübatöründe, %95 nem ortamında inkübe edildi.

24 saatin sonunda belirlenen konsantrasyonlarda ursolik asit, beta-sitosterol, 5,6- epoksi kolestan 3-beta-ol, Olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat ve rutin bileşikleri hücrelere ayrı ayrı uygulandı. 24 saatin sonunda 96 kuyulu plakadaki besiyeri uzaklaştırıldı. Her kuyucuk 100 μ l kristal viyole ile boyanıp 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Plaka çeşme altında tutularak boya uzaklaştırdı. Her kuyucuğa 100 μ l 0,1 M%50 etanol içindeki Na-Sitrat eklendi ve 15 dakika 100 rpm de çalkalandı. Oluşan renk 630nm de plaka okuyucuda ölçüldü.

Belirlenen konsantrasyonlardaki ursolik asit, beta-sitosterol, 5,6-epoksi kolestan 3- beta-ol, Olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat, rutin bileşikleri ve

uygulanan LPS ile muamele edilen gruplar kontrol grubu ile karşılaştırarak, uygulanan bileşiklerin hücre canlılığına olan etkileri saptandı.

2.2.4 *Capparis ovata*'dan İzole Edilen Bileşiklerinin NF-κB Aktivitesi Üzerine Olan Etkisi

2.2.4.1 Geçici Transfeksiyon ve Lusiferaz Deneyi

Transfeksiyon, DNA gibi yabancı bir molekülün ökaryotik hücre içerisine aktarılmasıdır. Katyonik lipozomal transfeksiyon, kullanım kolaylığı ve transfeksiyon etkinliğinden dolayı transfeksiyon amacıyla en yaygın kullanılan yöntemdir. Çalışmamızda lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen NF-κB aktivasyonu üzerinde *Capparis*'dan izol edilen ursolik asit, beta-sitosterol, 5,6-epoksi kolestan 3-beta-ol, olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat (OPC) ve rutin bileşiklerin ve Bortezomib ilaç etkisinin belirlenmesi amacıyla NF-κB plazmidi (pNF-κB luc) kullandı. Transfeksiyon, promega firmasından temin edilen "Fugene HD transfection reagent" kullanılarak gerçekleştirildi.

Memelilerde aktif olan NF-κB proteini, humoral bağışıklıkta görev alan pek çok genin ekspresyonunu kontrol eden kappa (κ) enhancer elemente bağlanır. pNF-κB luc. plazmidi, NFκB sinyal transdüksiyon yolağının aktivasyonunun görüntülenmesi için dizayn edilen ateş böceği lusiferaz raportör geni ve κ enhancer elementinin dört tandem kopyasını içerir. Uygun hücreye aktarılıp, ortama LPS gibi NF-κB sinyal transdüksiyon yolağını aktive eden ajanların eklenmesi, vektörde raportör genin upstreaminde lokalize olan endojen NF-κB'nin, kappa enhancer elemente bağlanmasına neden olur. NF-κB'nin bağlanması, raportör gen olan lusiferaz geninin transkripsiyonuna neden olur. Ateş böceği lusiferazı, kosubstrat olarak ATP ve Mg⁺² kullanarak, lusiferin substratının oksidasyonunu katalizler, ürün olarak oksilusiferin oluşur ve ışık ortaya çıkar. Lusiferaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, Promega'dan temin edilen lusiferin substratı kullanılarak açığa çıkan luminesans lumino metrede ölçüldü. Böylece kontrol Bortezomib ve test bileşiklerinin LPS ile indüklenen NF-κB üzerindeki etkileri test edildi.

Bu çalışmamızda, hücrelerinin NF-κB plazmidi (pNF-κB luc) ile transfekte edilmesi ve bortezomib, ursolik asit, beta-sitosterol, 5,6-epoksi kolestan 3-beta-ol,

olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat ve rutin bileşiklerinin lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen NF- κ B aktivasyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla aşağıda belirtilen işlemi yapıldı:

1. Gün: 1×10^4 hücre, antibiyotik ve FBS içermeyen, DMEM besiyeri içeren 96'lı plakaya ekildi.
2. Gün: Her kuyu için 0,15 μ g NF κ B plazmit DNA ve 0,6 μ l Fugene transfection reaktifi yavaşça karıştırıldı ve 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra her kuyu için son hacim 10 μ l olacak şekilde DMEM besiyeri eklendi. Bu işlemin ardından her kuyuya 90 μ l besiyeri eklendi hazırlanan karışım her kuyuya 10'ar μ l dağıtıldı.
3. Gün: Besiyeri dökülüp hücrelere Lipopolisakkarit (LPS) ve seçilen bileşikler uygulandı
4. Gün: Lusiferaz aktivitesi ölçüldü.

2.2.5 Nitrit Ölçümü

Hücre dışı süpernatantlarında nitrit düzeyleri Griess metoduna göre 550nm' de ölçüm yapılarak belirlendi (Schmidt ve Kelm., 1996). Griess reaktifi, 5% fosfat asit içinde hazırlanmış %1 sülfanilamid ve 0.1% naftiletilediaminin eşit hacimlerde karıştırılması ile hazırlandı. 96'lık plakaya (8×10^4 hücre/kuyucuk) 24 saat önce ekilmiş olan hücrelerin eski besiyerleri çekilip hücreler üzerine yerine FBS ve antibiyotik içermeyen uygun besiyeri ve 10 μ g/ml LPS ile eklendi. Hücrelerin LPS ile yeterince indüklenmesini sağlamak için hücreler 24 saat %5 lik CO₂ inkübatöründe, %95 nem ortamında inkübe edildi. 24 saatin sonunda belirlenen konsantrasyonlarda ursolik asit, beta-sitosterol, 5,6-epoksi kolestan 3-beta-ol, Olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat ve rutin bileşikleri hücrelere ayrı ayrı uygulandı. 24 saatin sonunda uygulama yapılan RAW 264.7 hücrelerinin supernatantları eşit hacimde Griess reaktifi ile karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon ardından oluşan rengin 550 nm'de verdiği absorbans mikropłaka okuyucuda ölçüldü.

(Schmidt ve Kelm., 1996). Süpernatanlardaki nitrit konsantrasyonları sodyum nitrit standart eğrisi ile karşılaştırılarak belirlendi.

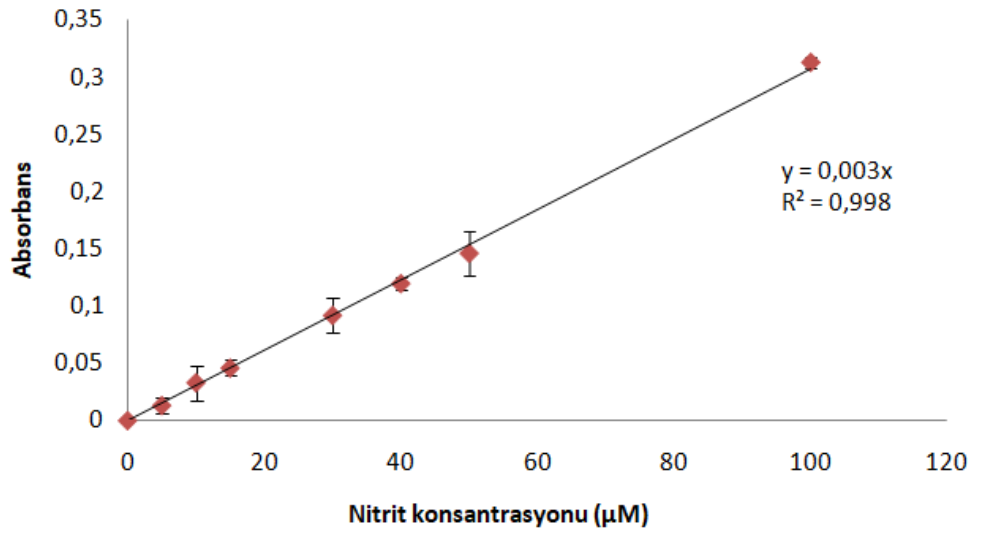
2.2.6 İstatistiksel Analiz

Elde edilen sonuçlar Elde edilen sonuçlar her biri veri için Ortalama \pm Standart Sapma olarak ifade edildi. Farklı gruplar içinde ve arasında kayda değer bir fark olup olmadığını analiz etmek için Student's t-test kullanıldı

3. BULGULAR

3.1 Nitrit Ölçümü

Griess metoduna göre hücre dışı süpernatanda nitrit düzeyleri Şekil 10'da çizilen sodyum nitrit standart eğrisi ile karşılaştırılarak belirlendi.

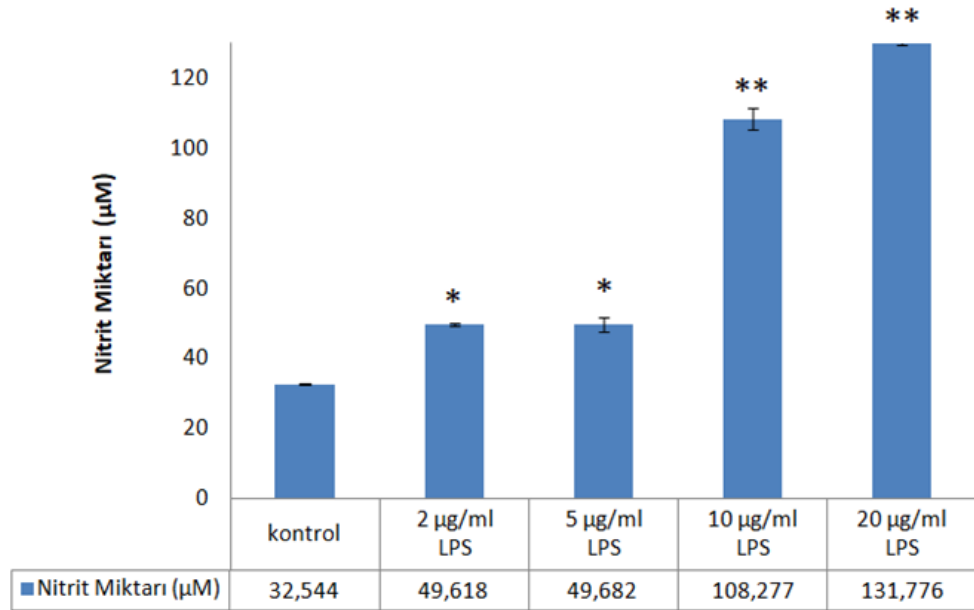


Şekil 10 . Nitrit standart eğri grafiği. Veriler 3 farklı ölçümün ortalama değerleridir.

3.2 Lipopolisakkaritin (LPS) Nitrik Oksit Düzeyi ve Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi

RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde LPS ile indüklenen nitrik oksit sentezi üzerine ursolik asit, beta-sitosterol, 5,6-epoksi kolestan 3-beta-ol, Olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat ve rutin bileşiklerinin etkisinin değerlendirilmesi amacıyla, induksiyon için gerekli olan en etkin LPS dozu belirlendi. Bu amaç doğrultusunda öncelikle 96 kuyucuklu plaklara 8×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekildi. Hücrelerin plakaya yapışmasının sağlanması amacıyla 24 saat %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren besiyeri içinde %5' lik CO2 inkübatöründe, %95 nem ortamında

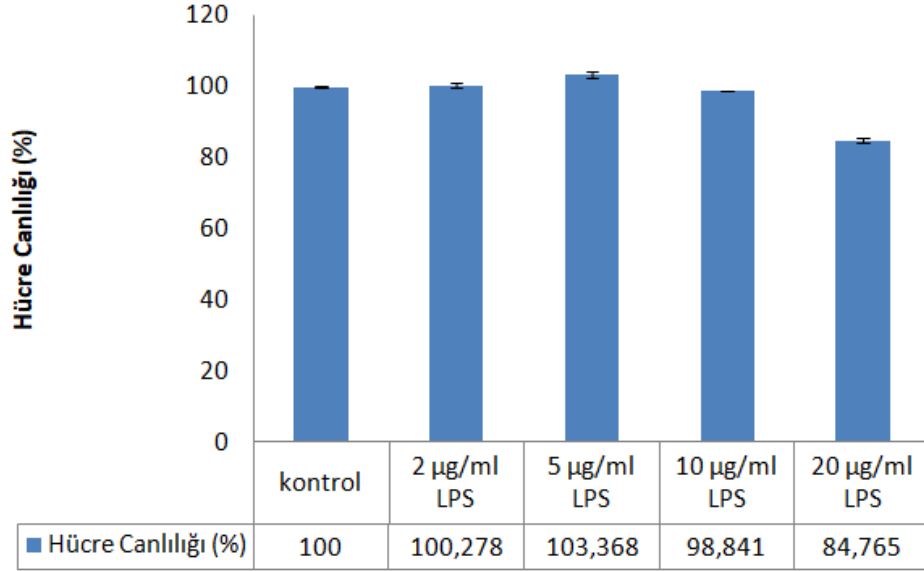
inkübe edildi. Sonrasında sırasıyla 2, 5, 10 ve 20 µg/ml LPS ile 24 saat FBS ve antibiyotik içermeyen besiyeri içinde inkübasyona bırakıldı. LPS uygulanmayan hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı. İnkübasyon sürelerinin sonunda Griess metodu ile hücre dışı süpernatandan nitrit tayini bununla birlikte uygulanan LPS dozlarının hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi amacıyla sitotoksinite testi yapıldı. Şekil 11’de görüldüğü gibi, 24 saatin sonunda 10µg/ml LPS uygulanan hücrelerde nitrit üretimi kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmaktadır. Bu veriler doğrultusunda, RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde 10µg/ml LPS uygulamasının, nitrit konsantrasyonlarını anlamlı olarak artırdığı sonucuna varıldı.



Şekil 11. LPS'nin doza bağımlı bağımlı olarak nitrit konsantrasyonu üzerindeki etkisi. (*p<0,05, **p<0,01; kontrol grubuna göre anlamlılık) (Veriler 3 farklı ölçümün ortalama değerleridir).

24 saat ve dört farklı doz LPS ile inkübe edilen hücreler ve kontrol grubu nitrit düzeyleri arasında 2 µg/ml LPS uygulamasında 1,52 kat; 5 µg/ml LPS uygulamasında 1,52 kat; 10 µg/ml LPS uygulamasında 3,32 kat ve en son olarak da 20 µg/ml LPS uygulamasında 4,04 kat fark olduğu görüldü. LPS uygulanan hücreler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hücre dışı süpernatant nitrit düzeylerinde en anlamlı artışın 10µg/ml LPS uygulamasında olduğu belirlendi ve uygulanacak doz

olarak 10µg/ml LPS belirlendi.



Şekil 12. LPS'nin doza bağımlı olarak hücre canlılığındaki değişimi üzerine etkisi. Veriler 3 farklı ölçümün ortalama değerleridir.

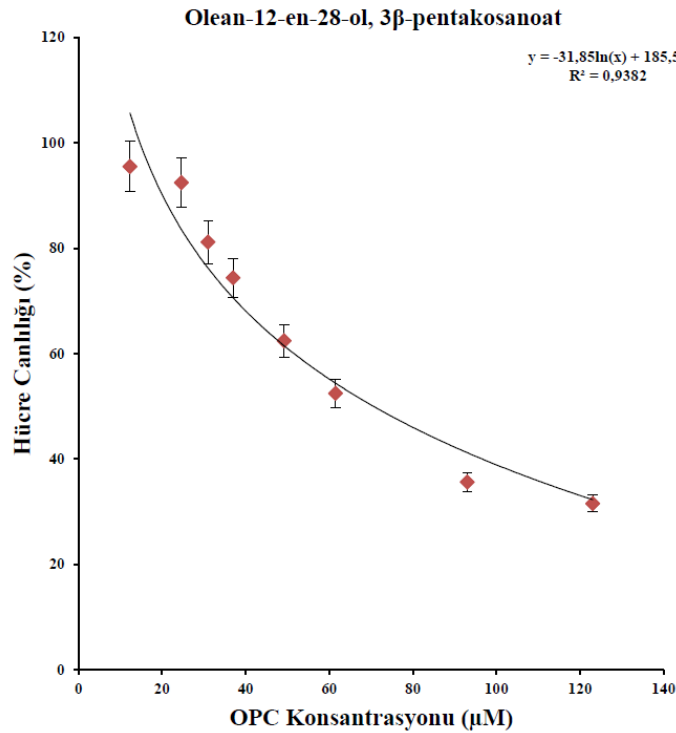
Sitotoksitesite testi sonunda, 24 saat boyunca 2, 5, 10 ve 20 µg/ml LPS ile inkübe edilen hücrelerde, uygulanan LPS dozlarının hücre canlılığını anlamlı derecede azaltmadığı sonucuna varıldı.

Edinilen tüm sonuçlar analiz edildiğinde RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin LPS farklı dozlarıyla inkübasyonun hücre dışı süpernatantındaki nitrit düzeylerinde artışa sebep olduğu bununla birlikte inkübasyon süresince ve sonunda hücre canlılığını etkilemediği bulundu.

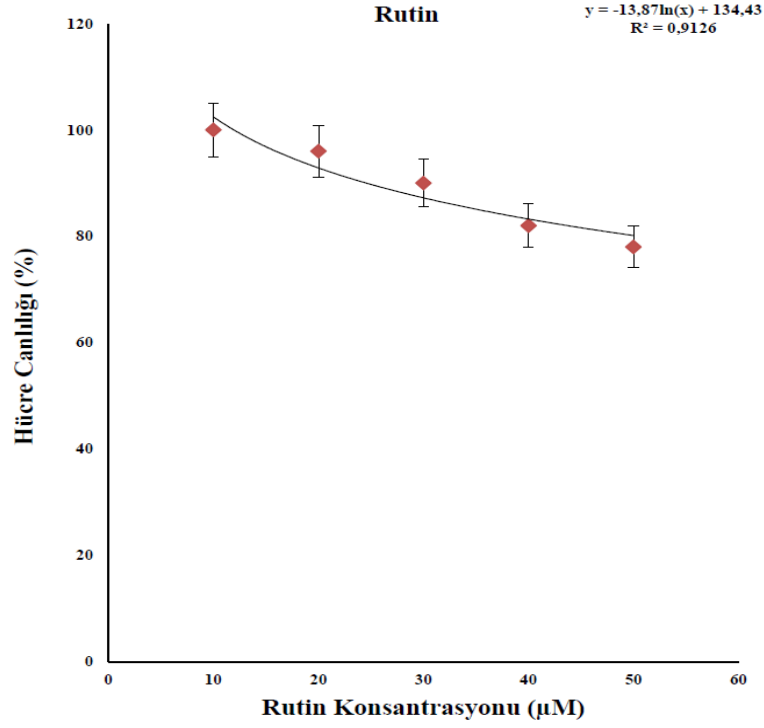
3.3 *Capparis ovata*'dan İzole Edilen Bileşiklerinin Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkileri ve Nitrik Oksit Düzeyi

RAW 264.7 makrofaj hücre hattında LPS ile indüklenen nitrik oksit sentezi üzerine ursolik asit, beta-sitosterol, Olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat ve rutin bileşiklerinin etkisinin değerlendirilmesi amacıyla yaptığımız çalışmada öncelikle

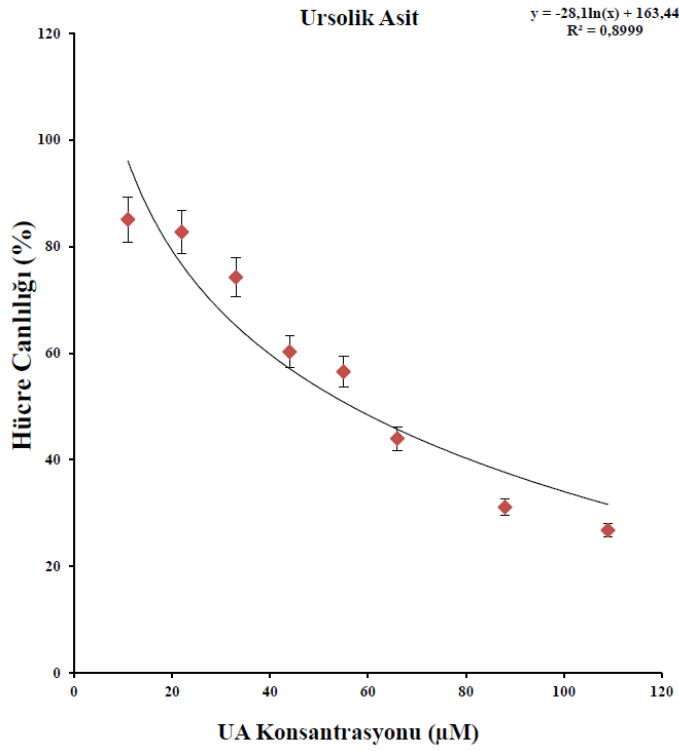
uygulanacak bileşiklerin hücreler için toksik olmayan doz aralığı belirlendi. Bu amaç doğrultusunda öncelikle 96 kuyucuklu plaklara 8×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler ekildi. Hücrelerin plakaya yapışmasının sağlanması amacıyla 24 saat %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren besiyeri içinde inkübe edildi. Sonrasında bileşik uygulaması yapılabilmesi amacıyla eski besiyeri ortamdaki uzaklaştırıldı ve %20 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirilmiş değişik konsantrasyondaki bileşikler hücrelere uygulanarak, hücrelerin FBS ve antibiyotik içermeyen besiyeri içinde inkübasyonu sağlandı. Bileşik uygulanmayan hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı. İnkübasyon sürelerinin sonunda Griess metodu ile hücre dışı süpernatandan nitrit tayini ve bununla birlikte uygulanan bileşik dozlarının hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi amacıyla sitotoksitesite testi yapıldı.



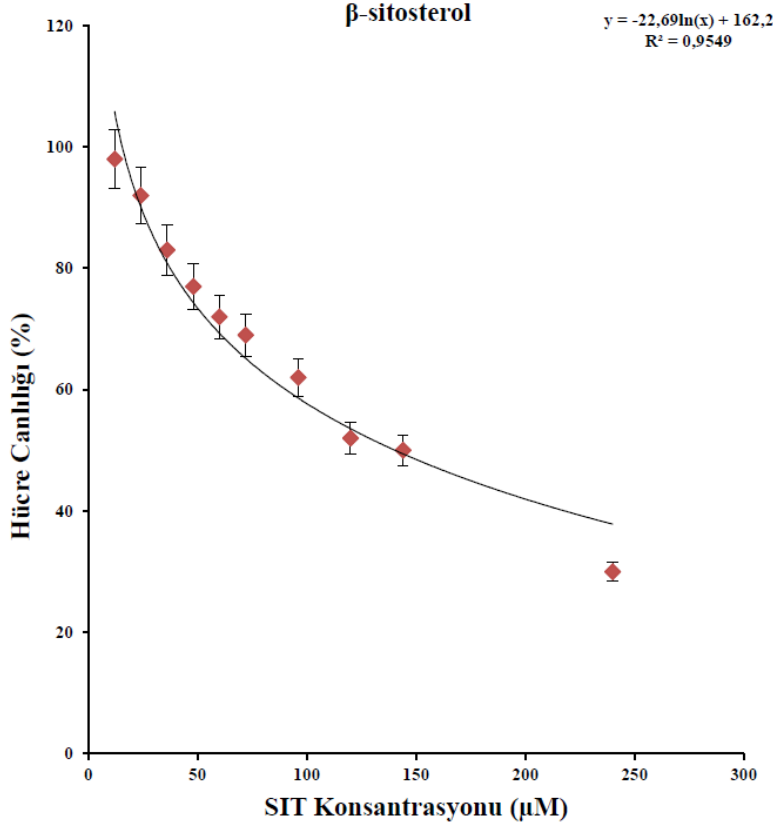
Şekil 13. Capparis ovata'dan izole edilen Olean-12-en-28-ol, 3 β pentacosanoat (OPC) hücre canlılığındaki değişim üzerine etkisi.



Şekil 14. Rutin bileşiğinin hücre canlılığındaki değişim üzerine etkisi.



Şekil 15. Capparis ovata'dan izole edilen Ursolik Asit (UA) bileşiğinin hücre canlılığındaki değişim üzerine etkisi.

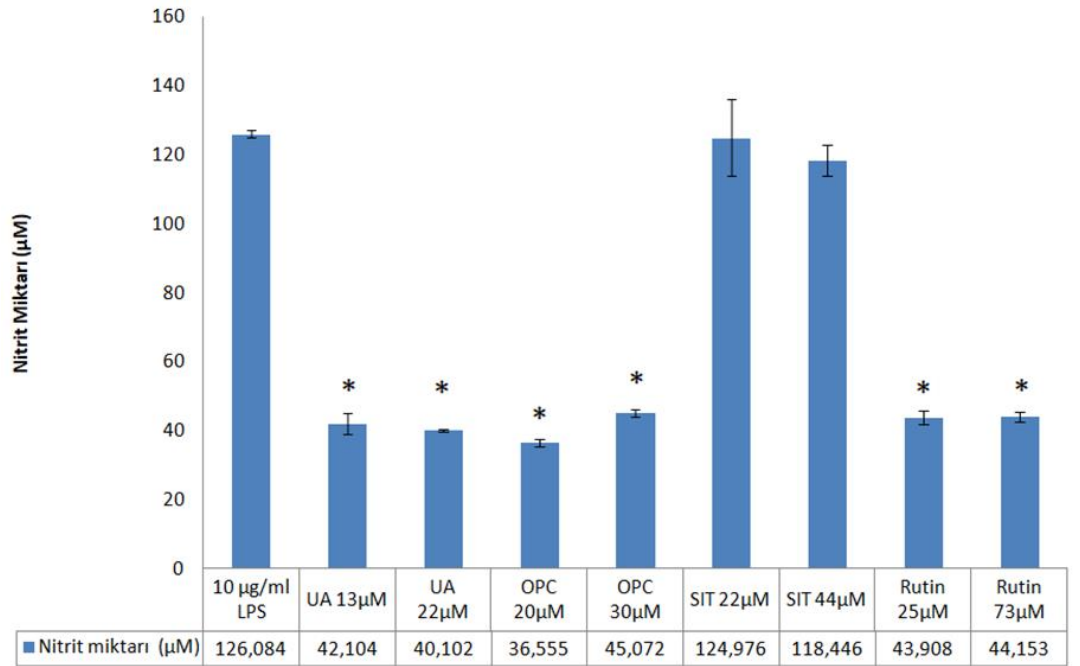


Şekil 16. *Capparis ovata*'dan izole edilen beta-sitosterol (SIT) bileşiğinin hücre canlılığındaki değişim üzerine etkisi.

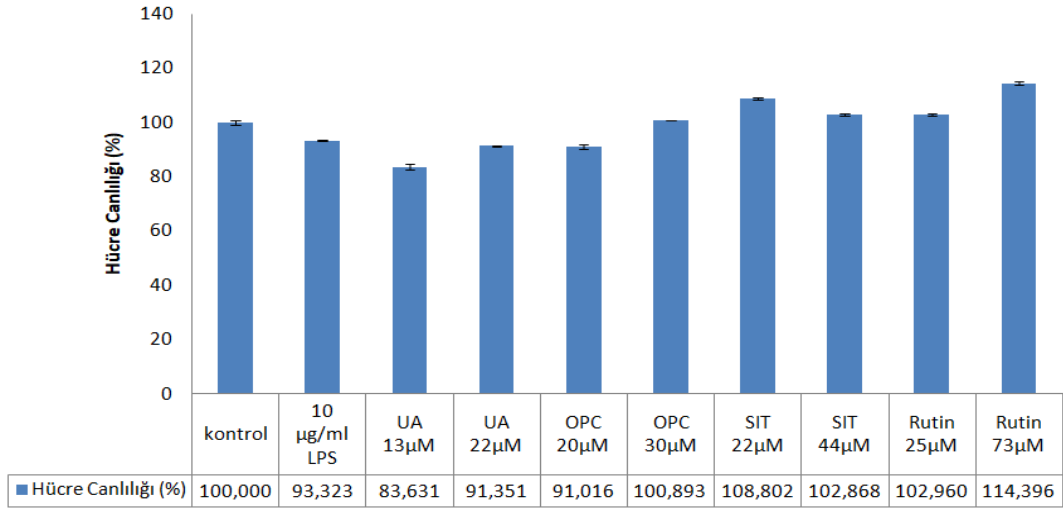
Sitotoksosite testi sonunda $y=ax+b$ denkleminde yola çıkarak yaklaşık EC10 ve EC25 değerleri hesaplandı. Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda Olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat (OPC) bileşiği için sırasıyla 20 μM ve 30 μM konsantrasyonlarının; rutin bileşiği için sırasıyla 25 μM ve 73 μM konsantrasyonlarının; ursolik asit bileşiği için sırasıyla 13 μM ve 22 μM konsantrasyonlarının son olarak da beta-sitosterol bileşiği için sırasıyla 22 μM ve 44 μM konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi.

LPS ile indüklenen nitrik oksit sentezi üzerine üzerine *Capparis ovata*'dan izole edilen bileşiklerinin etkisinin değerlendirilmesi amacıyla öncelikle 96 kuyucuklu plaklara 8×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekildi. Hücrelerin kuyucuklara etkin bir şekilde yapışmasını sağlamak için hücreler %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren besiyeri içinde %5' lik CO2 inkübatöründe, %95 nem ortamında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından eski besiyeri urtamdan uzaklaştırdı ve en etkin doz olarak belirlenen 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS ile hücrelerin indüklenmesini sağlamak için FBS ve

antibiyotik içermeyen besiyeri içinde 24 saat inkübe edildi. Hücrelerin indüklendiklerinden emin olmak amacı ile inkübasyon sonunda hücre dışı süpernatantdan Griess metodu ile nitrit ölçümü yapıldı. LPS uygulanan hücrelerin hücre dışı süpernatant nitrit konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı tespit edildi. Hücrelerin LPS ile indüklendiklerinden emin olunduktan sonra hücrelerin besiyerleri yeni FBS ve antibiyotik içermeyen besiyeri ile değiştirildi. Ardından ursolik asit, beta-sitosterol, olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat ve rutin bileşiklerinin belirlenen dozları hücrelere uygulandı ve hücrelerin 24 saat inkübasyonu sağlandı. İnkübasyon sonrasında bütün kuyucuklardaki hücrelerin hücre dışı süpernatantından Griess metoduna göre nitrit ölçümü yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 17’de verilmektedir. Eş zamanlı olarak hücrelere uygulanan LPS ve bileşiklerin hücre canlılığına olan etkileri sitotoksosite testi ile belirlendi. Sonuçlar Şekil 18’de gösterildiği gibidir.



Şekil 17. 10µg/ml LPS ile indüklenmiş nitrit konsantrasyonları üzerine *Capparis ovata*’dan izole edilen bileşiklerin etkisi. (*p<0,05 LPS grubuna göre anlamlılık). (Veriler 3 farklı ölçümün ortalama değerleridir.)



Şekil 18. *Capparis ovata*'dan izole edilen bileşiklerin hücre canlılığındaki değişim üzerine etkisi (Veriler 3 farklı ölçümün ortalama değerleridir).

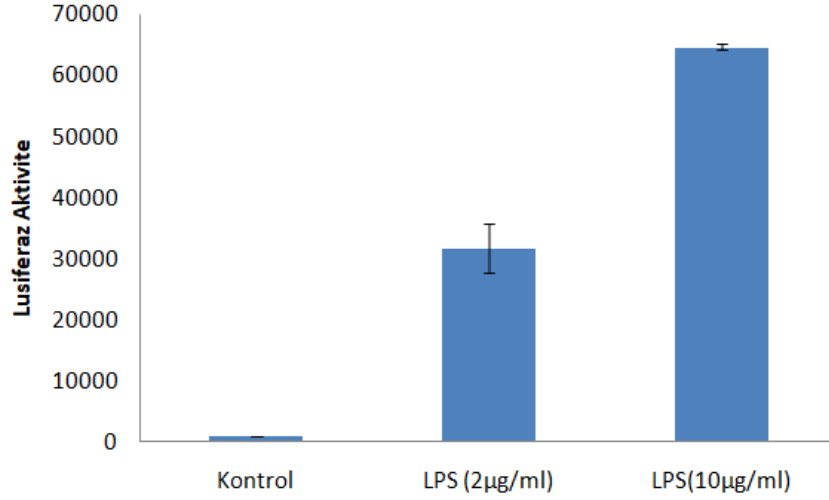
Elde edilen tüm bu sonuçlara kapsamında 10µg/ml LPS ile indüklenmiş olan RAW 264,7 makrofaj hücrelerine *Capparis ovata*'dan izole edilen bileşiklerinin belirlenen dozlarının uygulanması sonucunda Olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat (OPC) bileşiğinin sırasıyla 20 µM ve 30 µM konsantrasyonları; rutin bileşiğinin sırasıyla 25 µM ve 73 µM konsantrasyonları; ursolik asit bileşiğinin sırasıyla 13 µM ve 22 µM konsantrasyonları LPS kontrol grubuna göre hücre dışı süpernatant nitrit düzeylerini anlamlı olarak azaltmış olduğu belirlendi ancak beta-sitosterol bileşiğinin uygulanan dozlarında herhangi bir anlamlılık bulunamadı.

3.4 *Capparis ovata*'dan İzole Edilen Bileşiklerinin NK-κB Aktivitesi Üzerine Olan Etkileri

NK-κB, makrofaj ve diğer hücrelerde iNOS ekspresyonunun regülasyonunda görevli temel transkripsiyon faktörüdür. LPS'nin iNOS ekspresyonunu NK-KB'yi aktive ederek indüklemesi sebebiyle çalışmamızda HEK293 hücrelerine lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen NFκB aktivasyonu üzerinde *Capparis ovata*'dan izole edilen bileşiklerinin ve kontrol ilaç olarak bortezomibin (BTZ) etkisinin belirlenmesi amacıyla NFκB plazmitinin transfeksiyonu yapıldı.

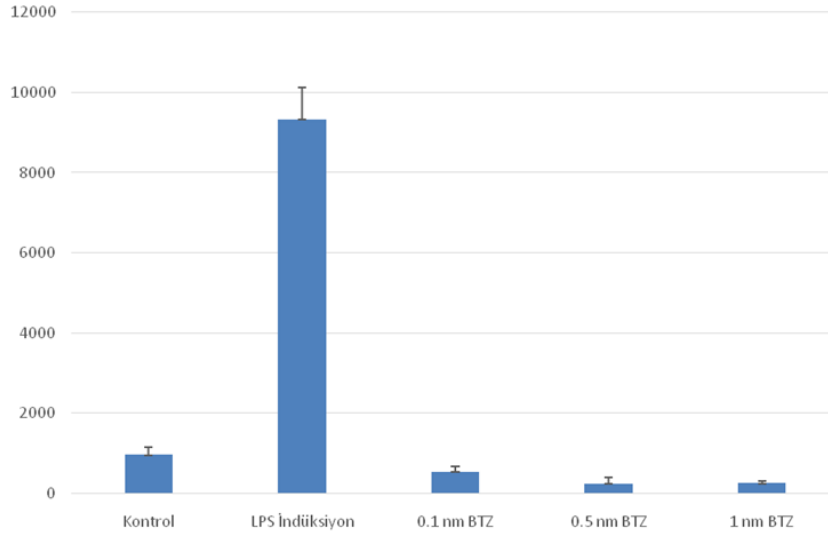
Transfeksiyon işlemi bir gün önceden 96 kuyucuklu plakalara 1×10^4

hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilen HEK293 hücreleri ile yapıldı. Transfeksiyon işlemi sonrasında hücrelerin eski besiyerleri ortamdan uzaklaştırılarak hücrelerin indüklendiği en etkin LPS dozun bulunabilmesi için hücelere yeni besiyeri eklenerek sırasıyla 2µg/ml ve 10µg/ml LPS uygulaması yapıldı. Şekil 19’da uygulanan LPS miktarlarının lüsiferaz aktivitesi üzerine etkisi gösterilmektedir.



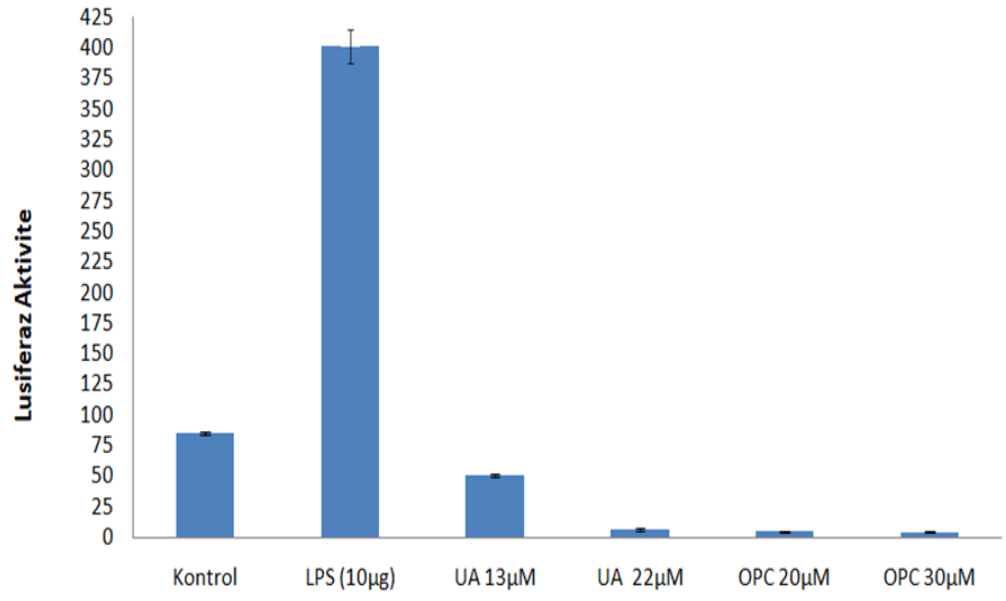
Şekil 19. Farklı dozlardaki LPS konsantrasyonunun lüsiferaz aktivite üzerine etkisi.

Bu sonuçlar göz önüne alındığında HEK293 hücrelerinin indüklenebilmesi için 10µg/ml LPS konsantrasyonunun optimum olduğuna karar verildive bundan sonraki çalışmalarda bu konsantrasyon kullanıldı. LPS uygulaması ile NF-κB indüklenmesi sonrasında çalışmamızın kontrol ilacı olan bortezomibin belirlenen dozlarının ortama eklenmesinin NF-κB aktivasyonu üzerine olan etkisi lüsiferaz deneyi ile belirlendi. Şekil 20’de LPS ile indüklenmiş olan hücrelerin kontrol ilacı olan bortezomibin belirlenen dozlarının lüsiferaz aktivitesi üzerine etkisi gösterilmektedir.



Şekil 20. Lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen NFκB aktivasyonu üzerinde Bortezomibin etkisi (BTZ: Bortezomib).Sonuçlar üç set deneyin ortalama ± Standart Sapma değerleri olarak verilmiştir.

LPS ile indüklenen NF-κB aktivasyonu üzerinde ursolik asit, olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat bileşiklerinin etkisinin belirlenmesi çalışmamızda hücreler transfeksiyon işleminin ardından 10µg/ml LPS ile indüklendi. Eski besiyerin ortamdan uzaklaştırıldı ve bileşiklerin belirlenen dozları uygulandı. Şekil 21’de *Capparis ovata*’dan izole edilen bileşiklerin belirlenen miktarlarının lüsiferaz aktivitesi üzerine etkisi gösterilmektedir. Griess metodu ile nitrit ölçümü yöntemi sonuçları dahilinde beta-sitosterol bileşiğinin etkinliğinin anlamlı bulunmaması sebebiyle transfeksiyon işlemi sırasında kullanımı tercih edilmedi.



Şekil 21. *Capparis ovata*'dan izole edilen bileşiklerinin belirlenen miktarlarının lüsiferaz aktivitesi üzerine etkisi.

4. TARTIŞMA

Konakçı için koruyucu bir strateji olan enflamasyon, doku hasarı gibi hücrel homeostazın bütünlüğünü tehdit eden herhangi bir zararlı etkiye karşın hücrenin hayatta kalmasını sağlayan bağışıklık sisteminin önemli bir yanıtıdır (Fujihara ve diğ., 2003).Bağışıklık sistem innate ve adaptif yol ıla gerekli transkripsiyon faktörler active eder. Bu enflamasyonla ilişkili olan transtripsiyon faktörlerini etkin ederek, pro-enflamatuar mediatörler sentezlenir ve hücre alımında ve aktivasyonunda önemli görev yapan yüzel molekülerin ekspresyonunu indüklenmektedir. (Kawai T. ve Akira S., 2006). Bu yanıtın enflamasyonun önemine rağmen, uzun süre kontrolsüz devamlılığı olursa konakçı için romatoid artrit ve sepsis gibi enflamasyon rahatsızlığı üreterek zararlı sonuçlar oluşturabilir. Hücrel fiziolojinin korunmasında yararlı rolünün aksine, olumsuz koşullarının herhangi bir şekilde ortaya çıkmasını önlemek için enflamatuvar yanıtın sıkı kontrol altında tutulması gerekmektedir (Medzhitov, R., 2010 ; Akira S., 2006). Sonuç olarak , anti-enflamatuar tedavi için yeni terapötik ajanlar geliştirmek , enflamatuar hastalığın terapötik kontrolü için gereklidir (Dinarello CA., 2010). Birçok çalışmada, bitki kaynaklı fenolikler ve flavonoidlerin, IL-1, IL-6, IL-10, TNF-a, NF-κB, NO, iNOS LOX, COX-1 ve COX-2 dahil olmak üzere çeşitli enflamatuar sitokinler veya mediatörlerin seviyelerini düzenleyerek mükemmel bir anti-enflamatuar aktivite gösterdiği bildirildi (Wu ve diğerleri, 2011). Biz de bu çalışmamızda, *Kapari ovata*'dan izol edilen bileşikleri hiç bir kimyasal madde kullanmadan doğal yolu ıla NF-κB yollağın inhibe ederek, iNOS ekspresyonu azaltarak, enflamasyon etkisi azaldığı sunulmuştu.

LPS Lipopolisakkarit (LPS), gram negatif bakteriyede bulunan dış membran komponentidir. LPS tüm bakteriye hücre duvarı bileşenleri arasında en etkili immüno-stimulanttır (Masuura S., 2014). LPS ile indüklenmiş hücreler makrofajların uyarılarak, TLR-4 komplekslerini aktive ederek çeşitli enflamatuar sinyal kaskadlarını indüklenmesin neden olur. Bu etkileşim ile miyeloid farklılaşma primer yanıt geni ve interkin -1-reseptör ilişkili kinazlar ve nükleer faktör (NF-κB) ve AP-1 aktive eden tümör nekroz faktörü reseptörleri ilişkili faktör-6 (TNFR6) uyarır (Kawai

T. ve Akira S., 2006). LPS, makrofajları aktive edebilir özelliğinden dolayı enflamasyon modeli oluşturulması amacıyla sıklıkla kullanılır. LPS ile aktive edilen makrofaj hücreleri; sitokinler, kemokinler, prostaglandinler, koloni stimule edici faktörler, lizozimler, proteazlar, büyüme faktörleri, eikazonoidler ve nitrik oksit (NO) üreterek enflamatuvar cevapta merkezi rol oynarlar (Qi ve Shelhamer, 2005; Rhee ve Hwang, 2000). LPS, oksidatif stres ve enflamatuvar sitokinler (IL-1 β , TNF α , IFN γ , IL-12p40) fazla miktarda iNOS ekspresyonu neden olan moleküllerdir (Schimmer ve Parker, 2001; An et al., 2006; Yang ve diğ., 2009). Organizmada makrofajlar tarafından fazla miktarda üretilen NO artışı çoğunlukla enflamatuvar hastalıkların patolojisinden sorumludur (Kim ve Ha, 2009).

iNOS TNF α , COX, gibi bir enflamasyon makardır (Arora et al., 2016) ve çoğu çalışmalarda LPS indüksiyonu ile organizmada iNOS miktarı atırdığın görülmektedir. Canlılınlarda iNOS ekpreayonu faydalı olursa rağmen fazla ise zararlıdır ve regülasyonu için bilim insanlar baya çalışmayı devam etmektedir. Bizde bu çalışmamızda iNOS ekspresyonu azaltmak hedef ile çoğu geni transtripsiyon faktör olan NK- κ B'yi yolağı inhibe ederek denetirmiştik. Çalışmamızda iNOS'un en çok bilinen indükleyic olan LPS farklı dozlarda eklerek 24-48 saat arasında RAW 264.7 hücreye maruz bıraktılmıştik. iNOS'un ekpresyonuda LPS etkisi belirlenmek için çalışmamız hem kontrol ve deneyi grup (LPS uygulanmış grup) olarak iki ayrılmıştik. 24-48 saat sonunda kontrol ve deneyi grup arasında *p<0,05 anamlı bulunmuştu.

NK- κ B, yalnızca uygun bir uyarıcı tarafından indüklenen ve özgül bir sekans ile DNA'ya bağlanma aktivitesi sahip ilk tanımlanan transkripsiyon faktörüdür (Sen ve Baltimore, 1986). Farklı gen kümeleri ifadesinde ve seçici aktivasyonunda sofistike mekanizma düzenlemsi hakkında da büyük bir içgörü sağlayan en çok inceleyen transkripsiyon faktörlerden biridir. NF- κ B hem enflamatuvar hem de anti-enflamatuvar sitokinleri üretilmesi düzeleyen bir transkripsiyon faktördür (Caoet al., 2006). NF- κ B, RAW 264.7 makrofaj ve diğeri hücrelerde iNOS ekspresyonun regülasyonunda görevli temel transkripsiyon faktörüdür. NF- κ B, LPS ile indüklenmiş mürin hücrelerin tarafından indüklenabilen NOS ve TNF α gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin ekpresyonunda önemli bir görev yapar ve bu transkripsiyon faktörlerin aktivasyonunda engeleyen molekülleri ise anti-enflamasyon özellikleri sahip olduğunu belirlenmektedir (Ban ve arkadaşları, 2004). Hücre

proliferasyonunu, enflamatuvar cevapları, hücre adezyonunun kontrolünde yer alan genlerin ekspresyonunu regüle eder. NF- κ B, iNOS ekspresyonunun inhibitörleri ve aktivatörleri için merkezi bir hedeftir. LPS, TLR, ILR, TNF α ve oksidatif stres, iNOS ekspresyonunu farklı hücre tiplerinde NF- κ B'yi aktive ederek indükler (Ghosh ve diğ., 1998; Oeckinghaus Ghosh., 2009; Perkins ve Gilmore, 2006).

NF- κ B, DNA'ya doğrudan bağlanarak gen ekspresyonu kontrolünde rol oynayan normal fizyolojik süreç için önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Ayrıca NF- κ B hormonlar gibi çeşitli uyarıcı moleküller tarafından aktive olan ve çok sayıda genin transkripsiyonunu düzenleyen sinyal yolağı molekülü olarak görev yapar. B ve T lenfositleri, monositler, makrofajlar, tarafından eksprese edilen NF- κ B; sitokinler kemokinler, sitokin reseptörleri, büyüme faktörleri, immün düzenleyiciler gibi bağışıklıkta rol oynayan çok sayıda genin indüklebilir düzenleyicisidir. Bu özellikleri NF- κ B'nin bağışıklık yanıtına, enflamasyona etkin olarak katılımını sağlar.

NF- κ B'nin istenmeyen aşırı aktivasyonu metabolik, enflamatuvar, nörodejeneratif ve kanser gibi pek çok hastalığın patofizyolojik süreçlerinde rol oynar. NF- κ B'nin alt birimlerinin etkinliği proteozom aracılığıyla düzenlenir. Uyarılmayan hücrelerde hücre sitoplazmasında NF- κ B, I κ B (NF- κ B inhibitörü) ile kompleks oluşturarak inaktif halde bulunur. Hücre uyarı alınca I κ B ubikütilenerek fosforlanır. Bunun sonucunda sitoplazmada protein degradasyonundan sorumlu proteozom kompleksleri (26S proteozom kompleksi) aktifleşmiş I κ B'yi parçalayarak NF- κ B'den ayırır. NF- κ B serbest kalınca aktif bir transkripsiyon faktörü olarak hücre nükleusuna geçip DNA'ya bağlanarak, DNA'da canlılığı, proliferasyonu, enflamasyon ve antiapoptotik ilişkili birçok genin ekspresyonunu uyarır. 26S proteozom kompleksi NF- κ B'nin fonksiyonunun düzenlenmesinde ve bununla ilişkili temel hücre içi ve hücre dışı olaylarda önemli bir rol oynar. Proteozom aktivitesi, NF- κ B fonksiyonunda aktivite artışına ve buna bağlı olarak da hücrede birçok patofizyolojik sürecin başlamasına sebep olur. Proteozom inhibitörleri NF- κ B'nin potent inhibitörleridir. Proteozom inhibitörleri 26S proteozom inhibisyonuna bağlı olarak I κ B'nin parçalanmasını engelleyerek, I κ B'nin birikimine sebep olur ve NF- κ B inhibisyonu gerçekleşirler. NF- κ B'nin inhibe edilmesi üzerine bitkisel içerikli ek tıbbi tedavi ajanı geliştirilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda resveratrol, kersetin, hesperidin gibi bitki flavanoidlerinin iNOS ekspresyonunu NF- κ B üzerinden inhibe ederek anti enflamatuvar etki gösterdikleri ortaya çıkartılmıştır (Tsai ve diğ., 1999;

Karunaweera ve diğ., 215; Parhiz ve diğ., 2015). Bu çalışmamızda hiç bir kimyasal madde kullanmadan , doğal yolu ıla NK-κB yolağın inhibe ederek ,iNOS ekspresyonu azaltarak enflamasyonu etkisi azaltmak için kapari ovatadan izol edilen bileşikleri (Ozgun Acar ve diğ., 2016) kullanılmıstır ve sonuçlarımız göre kapari ovatan izol edilen bileşiklerimiz eklediğimiz hücrelerin NO miktarı azaltılmış gözölmektedir ve bu bileşikleri NK-κB yolağın inhibe ederek iNOS enzim ekspresyonu azaltarak anti-enflamatuvar özellik kazandırmaktadır.

Halk arasında gebere, gebre otu, karga kavunu, deve dikenı, gevil, bubuşebellah gibi isimlerle bilinen kapari (*Capparis ovata* Defs.) Ege ve Akdeniz bölgelerinde yaygın olarak yetişen, çok yıllık çalımsı yapıda, yatık veya yarı yatık yapıda büyüyen bir bitkidir (Akgöl, 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. 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). Ayrıca bu bitkinin anti- nöroenflamatuvar etkinliğı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Ozgun-Acar ve diğ., 2016).

Transfeksiyon, DNA gibi yabancı bir molekülün ökaryot hücre içerisine aktarılmasıdır. Katyonik lipozomal transfeksiyon, kullanım kolaylığı ve transfeksiyon etkinliğinden dolayı transfeksiyon amacıyla en yaygın kullanılan yöntemdir.

RAW 264.7 hücre RAW 264.7 makrofaj hücreler LPS stimulasyonun, iNOS transkripsiyonunu ve protein sentezini indüllendiğı, NO sentezi, IκB proteolizini ve NF-κB'nın sitoplazmadan nükleer ggeçmesini artırdığı gösterilmiştir (Xie ve ark., 1994; Henkel ve ark., 1993; Hwang ve ark., 2011). Çalışmamızda kapari ovatan izol edilmiş bileşikleri anti-enflamtuvar etkisi sahip olup olmadığın projemizde , literatürlerde LPS ile uyarılabildiğini gösteren epey çalışmalarda vardı (Liu ve ark., 2011; Tao ve ark., 2008; Kanno ve ark., 2007; Luo ve ark., 2009; Quang ve ark.,

2006) ve o çalışmalarda iNOS ve NO üretiminde karşı potansiyeli inhibitörlerin değerlendirilmesinde RAW 264.7 en uygun hücre görülmektedir ((Yang ve ark.,2009). Araştırmamızda elde ettiğimiz sonuçların, literatür verileri ile uyumlu olduğu ve kullandığımız hücre modelinin ve sistemimizin kimyasal maddelerin antioksidan etkilerinin değerlendirilmesi açısından uygun olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda, *Capparis ovata*'dan izole edilen ursolik asit, beta-sitosterol, olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat ve rutin bileşiklerinin lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen nitrik oksit sentezi üzerindeki etki mekanizmasının, indüklenebilir nitrik oksit sentaz enzimi (iNOS) ve NF κ B yolağı üzerinden araştırılması amacı ile RAW 264.7 hücreleri farklı miktarlarda lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılarak iNOS sentezinde artış ve NF κ B yolağında aktivasyon sağlandı. 10 μ g/ml LPS uygulamasının nitrit oksit düzeyinde en anlamlı artışa neden olduğu belirlendi ve uygulanan dozların inkübasyon süresince hücre yaşamını olumsuz etkileyecek bir etkilerinin olmadığı saptandı.

Uyarılmış RAW 264.7 hücrelerinde, ursolik asit, beta-sitosterol, olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat ve rutin bileşiklerinin, nitrit oksit sentezi üzerindeki etkisinin ortaya konması amacıyla hücelere nitrik oksit düzeyini en etkin arttıran 10 μ g/ml LPS dozu uygulandı. Hücrelerinin 10 μ g/ml LPS ile 24 saat inkübasyonu neticesinde hücre dışı süpernatantından uygulanan LPS dozunun hücreleri indüklediğinden emin olabilmek için ölçülen nitrik oksit konsantrasyonunun kontrol grubu'na göre 3,32 kat arttığı belirlendi. Bunun yanında LPS dozunun inkübasyon süresi boyunca hücre yaşamını anlamlı bir şekilde ve olumsuz olarak etkilemediği bulundu. Hücrelerin indüklendiğinden emin olunduktan sonra sitotoksisite çalışmaları neticesinde hücreler için toksik olmayan bileşik dozları hücelere uygulandı. Bu dozlar ursolik asit bileşiği için EC10 dozu 13 μ M, EC25 dozu 22 μ M; beta-sitosterol bileşiği için EC10 dozu 22 μ M, EC25 dozu 44 μ M; olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat (OPC) bileşiği için EC10 dozu 20 μ M, EC25 dozu 30 μ M ve son olarak rutin bileşiği için EC10 dozu 25 μ M, EC25 dozu 75 μ M olarak belirlendi. Bileşiklerin hücelere uygulanması ve 24 inkübasyonu sonunda yine tüm hücrelerin hücre dışı süpernatantından nitrit ölçümü yapıldı. Elde edilen sonuçlar analiz edildiğinde hücrelerin LPS ile inkübasyonunun ardından ölçülen nitrit miktarının 126,08 μ M olduğu tespit edildi. *Capparis ovata*'dan izole edilen bileşiklerin uygulanmasının ardından gerçekleştirilen hücre dışı süpernatant nitrit ölçümü

neticesinde saptanan nitrik miktarları ise; ursolik asit bileşiğinin EC10 dozu için 42,1 µM, EC25 dozu için 40,1 µM olarak saptandı. Olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat (OPC) bileşiğinin EC10 dozu için 36,6 µM, EC25 dozu için 45,1 µM olarak; rutin bileşiğinin EC10 dozu için 43,9 µM, EC25 dozu için 44,2 µM olarak belirlendi. Bileşik uygulamalarının ardından hücre dışı süpernatantlarda belirlenen nitrit miktarlarında görülen bu anlamlı azalma ursolik asit, OPC ve rutin bileşiklerinin uygulanan dozlarının anti-enflamatuvar özellik göstermekte olduklarına işaret eder. Diğer çalışmaları göre *Capparis ovata* Diyabet çalışmalarda ve MS hastalıklarda anti- enflamatuvar özellikleri sahip olduğu gösterilmiştir (Okur ve arkadaşları, 2018; Ozgün Acar ve diğ., 2017). Aynı zamanda bu bileşiklerin uygulanan dozlarının inkübasyon süresince hücre yaşamını olumsuz bir şekilde etkilemiyor olması da kullanılan ve anlamlı etkinlik görülen bu bileşiklere anti-enflamatuvar ajan olarak oldukça avantajlı birer karakter kazandırır.

Rutin sıçan üzerinde çalışmalarda ödemi ve nitrofil kemotaksisi ve degradasyonunda etkilerle kendisi anti-enflamatuvar özellikle kazandırılmıştı (Selloum ve diğ., 2003). Rutin, beyin iskemisi üzerinde nöron korucu etkiyi göstermiştir (Khan ve ark., 2009). Hipoksik, glutamat ve oksidatif strese faydalı olduğu bulunmuştur (Pu ve ark., 2009). Diğer çalışmalarda, rutin uygulanarak Alzheimer tipinde sporadik demans (Javed ve diğerleri, 2012) sıçan modelinde nöron enflamasyon azalması ve x deksametazon ile tedavi edilen farelerde rop nöroprotektif etkileri gözlenmektedir (Tongjaroenbuangam ve diğerleri, 2011). Çalışmamızda rutin uygulanmış olan hücreleri nitrik miktarı azaldığı gösterilmiştir ve bunu onu anti-enflamatuvar etkisi sahip olduğunu tekrar gözlemektedir.

Ursolik asit, (UA; 3β-hidroksi-12-urs-12-en-28-oic asit), doğada bulunan bir pentasiklik triterpenoid karboksilik asittir. Kappari ovata (Ozgun-Acar vb., 2016), elma, fesleğen, yaban mersini, kızılçık, nane biberiye, kekik gibi çok çeşitli bitkilerde bulunur (Liu J., 1995). Anti-inflamatuvar, antioksidan, anti-proliferatif, anti-kanser, anti-mutajenik, anti-aterosklerotik, anti-hipertansif, anti-lösemik ve antiviral özellikler gibi UA'nın çeşitli biyokimyasal ve farmakolojik etkileri bir dizi deney sisteminde bildirilmiştir (Ikeda Y, Murakami A. ve Ohigashi H., 2008; Tsai SJ. ve Yin MC., 2008). UA, indüklenbilir nitrik oksit sentaz ve siklooksijenaz-2 ekspresyonunu hafifleterek RAW264.7 hücrelerinde (Fare monosit makrofaj hücre hattı) antiinflamatuvar etkiler göstermiştir (Suh N., Honda T.ve diğ., 1998; Ryu SY.

ve diğ., 2000). Triterpenoidlerin karsinogenezin bastırılmasını NFkB ve STAT3 gibi pro-enflamatuvar mediyatörlerin inhibisyonuyla ilişkilendirilmesi bu bileşiklerin otoimmün ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde potansiyel rolünü sorgulamaya itmiştir (Liby ve diğ. 2006; Choi ve diğ. 2014).Diğer çalışmalarda, Anti-proliferatif, anti-tümör ve anti-lösemik özelliklerin, NF-KB aktivasyonunun bastırılması ve lipoksijenaz, COX-2, MMP-9 ve iNOS gibi NF-κB düzenlenmiş genlerin ekspresyonunu inhibe ederek aracılık ettiği gösterilmiştir (Shishodia S ve diğ., 2003; Ringbom T, Segura ve diğ., 1998; Cha HJ, Bae SK. ve diğ.1996; Najid A, Simon A. ve diğ., 1992). Çalışmamızda güçlü anti-enfamatuar ajan olanı (Rahul C., Santosh K.ve diğerleri, 2012) ve atrit hastalık tedaveside kullanılan ((Jong Yeong L. ve arkadaşları, 2017) UA eklemiş olan hücreleri nitrik miktarı azaldığı görülmektedir ve diğer çalışmalara göre anti-enflamatuvar etkisi bir madde olduğunu tekrar kanıtlanmıştır .

Olean-12-en-28-ol, Zeytinde, fındıkta , kapari ovatada gibi bitkelerde bulunan bir bileşiktir (Bayram ve ark.,2012 ; Ozgun Acar vb., 2017). Toplam LDL kolesterol ve trigliserit miktarını azaltılan (López ve ark., 2008), OA kolon, akciğer, göğüs ve prostat kanseri oluşum riskini azaltır (Yamakı ve diğ., 2002). Diğer görevleri is insulin hassasiyetini azaltması ve plazma glikoz ve insülin miktarını azaltılır (Barberger-Gateau ve ark., 2007; Paniagua ve ark., 2007; Solfrizzi ve ark., 2006). Ek olarak, anti-enflamatuvar aktiviteler denenmiş ve izole edilmiş metabolitler için değerlendirilmiştir. Metabolitlerin çoğu, RAW 264.7 hücrelerinde lipopolisakaritlerin neden olduğu NO üretimi üzerinde önemli inhibe edici aktiviteler gösterdi (Sensen Yan ve ark., 2018). Bileşik uygulamalarının ardından hücre dışı süpernatantlarda belirlenen nitrit miktarlarında görülen bu anlamlı azalma OA bileşik uygulanan dozlarının anti-enflamatuvar özellik göstermekte olduklarına işaret eder.

Beta-sitosterol, kaparı bitki dahil pirinç, buğday, mısır, fıstık, yer fıstığı bulunur ve iltihaplanma, viral hasar, ülser, kanser gelişimi ve bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde önemli bir ajandır (Heitzman ve ark., 2005; Ling ve Jones, 1995). Ayrıca, BS'nin inflamatuvar sitokinlerin üretimini kontrol ederek bağışıklık fonksiyonunu, inflamasyonu ve ağrı düzeylerini modüle etmesi önerilmektedir

(Awad ve Fink, 2000). 2017'de Paniagua-Pérez ve arkadaşları, BS'yı spesifik ve spesifik olmayan güçlü bir anti-inflamatuar kapasitesi sahip olduğunu belirledi. LPS uyarılmış RAW 264.7 hücreyi beta-sitosterol ekledikten sonra diğer çalışmaları göre nitrit miktarı azalması beklenirken , hiç bir değişiklik olmadığını gözlemelenmektedir. Beta-sitosterol bileşiğinde gözlemlenen olumsuz değişim bileşiğin hücreler üzerinde oksidatif strese sebep olarak artışa neden olduğu ileri sürülebilir yada çözülcümüz içinde çözemediği belirlenmektedir. Tabi ki bu hipotezi test etmek ve doğrulamak için daha ilave deneyler yapmak gereklidir.

Çalışmamızda lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen NFκB aktivasyonu üzerine proteozom inhibitörü olarak görev alan ve kontrol ilacı olarak kullandığımız bortezomibin ve *Capparis ovata*'dan izole edilen bileşiklerin etkisinin belirlenmesi amacıyla NF-κB plazmidi (pNK-κB luc) kullanıldı. Memelilerde aktive olan NF-κB proteini, humoral bağışıklıkta görev alan pek çok genin ekspresyonunu kontrol eden kappa (κ) enhancer elemente bağlanır. pNFκB luc plazmidi, NF-κB sinyal transdüksiyon yolağının aktivasyonunun görüntülenmesi için dizayn edilen ateş böceği lusiferaz raportör geni ve κ enhancer elementinin dört tandem kopyasını içerir. Çalışmamızda kullanıldığı üzere LPS gibi NFκB sinyal transdüksiyon yolağını aktive eden ajanların eklenmesi, vektörde raportör genin upstreaminde lokalize olan endojen NFκB'nin, kappa enhancer elemente bağlanmasına neden olur. NF-κB'nin bağlanması, raportör gen olan lusiferaz geninin transkripsiyonuna neden olur. Ateş böceği lusiferazı, kosubstrat olarak ATP ve Mg⁺² kullanarak, lusiferin substratının oksidasyonunu katalizler, ürün olarak oksilusiferin oluşur ve ışık ortaya çıkar.

Lusiferaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, lusiferin substratı kullanılarak açığa çıkan luminesansın luminometrede ölçülmesi ile bortezomib ve uygulanan bileşiklerin LPS ile indüklenen NF-κB üzerindeki etkisi test edildi. Bunun için öncelikle etkin LPS dozu belirlendi. Griess metoduna göre hücre dışı süpernatanttan nitrit ölçümü sonucunda elde ettiğimiz değerler referans alınarak 96 kuyucuklu plakalara önceden ekilip NFκB plazmidi transfekte edilmiş olan HEK293 hücrelerine iki değişik LPS dozu uygulandı (2µg/ml ve 10 µg/ml). Elde edilen sonuçlar uygulanan 10 µg/ml LPS konsantrasyonunun daha etkili bir indükleme sağladığını ortaya koydu. Uygulanacak LPS konsantrasyonunun belirlenmesi sonrasında bortezomib ve *Capparis ovata*'dan izole edilen bileşiklerin LPS ile indüklenen HEK293 hücrelerinde NF-κB üzerindeki etkisi test edildi. Çalışmamız sonucunda

elde ettiğimiz veriler LPS ile indüklenen NF- κ B aktivasyonunu bir proteozom inhibitörü olarak görev alan bortezomibin uygulanan 0,1nM, 0,5nM, 1nM'lık dozlarının NF κ B inhibitörü olan I κ B'nin ubikütilenerek proteozom kompleksi tarafından degrade edilmesini engelleyerek NF κ B'nin etkisinin inhibisyonunu sağlayabileceğini gösterdi. Aynı zamanda elde edilen yine Griess metoduna göre ölçülen nitrit miktarı sonuçları referans alınarak uygulanan bileşiklerden olan ursolik asit ve OPC bileşiklerinin NF- κ B aktivasyonunu inhibe ediyor olduğunu gösterdi. Nitrit ölçümü sonuçlarına paralel olarak uygulanan ursolik asit ve OPC bileşiklerinin NF- κ B aktivasyonunu inhibe ediyor olması bileşiklerin anti- enflamatuvar etki gösteriyor olduğunu destekledi. Hücrede birçok patofizyolojik süreçte rol alan NF- κ B aktivasyonunun inhibe edilmesi anti-enflamatuvar etki, apoptotik etki başta olmak üzere birçok etki gösterir.

5. SONUÇ

Çalışmamızın sonucunda elde edilen veriler bize *Capparis ovata*'dan izole edilen ursolik asit, olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat ve rutin bileşiklerinin LPS tarafından indüklenen RAW 264. 7 hücrelerinde iNOS ekspresyonu aktivasyonu ile NO konsantrasyonu artışını inhibe ettiklerini gösterdi. Beta-sitosterol bileşiğinde ise diğer bileşiklerden elde edilen sonuçların aksi sonuçların elde edilmiş olması beta-sitosterol bileşiğinin hücrede oksitadif strese neden olabileceğini gösterdi.

NF- κ B plazmidi transfekte edilmiş olan HEK293 hücrelerine, nitrit ölçüm sonuçları referans alınarak seçilen ursolik asit ve OPC bileşiklerinin yanı sıra bir proteozom inhibitörü olarak görev alan ve çalışmamızda kontrol ilaç olarak kullandığımız bortezomibin uygulanması neticesinde elde edilen sonuçlar; uygulanan bu bileşiklerin kontrol ilaç olan bortezomibin gösterdiği etki paralelinde NF- κ B aktivasyonunu inhibe ediyor olduğunu gösterdi. Griess metoduna göre hücre dışı süpernatantdan ölçümü ile yapılan nitrit miktar tayini ve NF- κ B plazmidi transfekte edilmiş olan hücrelerden elde ettiğimiz sonuçların birbirleriyle tutarlı olması *Capparis ovata*'dan izole edilen ursolik asit, olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat ve rutin bileşiklerinin anti-enflamatuvar etki gösteriyor olduğunu destekledi. Tüm bu sonuçlar kapsamında tıbbi bitkilerin terapötik açıdan önemli olabilecek aktif bileşiklerinin tıbbi ve farmakolojik yararları bir kez daha ortaya konuldu ve *Capparis ovata*'dan izole edilen aktif bileşiklerin yeni ve potansiyel anti-enflamatuvar birer ajan olabileceğini gösterdi.

6. KAYNAK

Aghabeigi B., "The pathophysiology of the pain", *British Dental Journal*, 173, 91- 7, (1992). Ahmed, Afsar U., "An overview of inflammation: mechanism and consequences ", *Frontiers in Biology*, 6 (4), 274, (2011).

Aktan, F., "iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation", *Life sciences*, 75(6), 639- 653, (2004).

Änggård, E., "Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine", *The Lancet*, 343 (8907), 1199- 1206, (1994).

Arslan, Rana, Nurcan Bektas, and Yusuf Ozturk, "Antinociceptive activity of methanol extract of fruits of *Capparis ovata* in mice", *Journal of ethnopharmacology* 131(1), 28-32, (2010).

Barberger-Gateau, P., Raffaitin, C., Letenneur, L., Berr, C., Tzourio, C., Dartigues, J. F., & Alpérovitch, A., "Dietary patterns and risk of dementia The Three-City cohort study", *Neurology*, 69(20), 1921-1930, (2007).

Bayram, B., & Özçelik, B., "Zeytinyağının biyoaktif bileşenleri ve sağlık üzerine yararları", *Akademik Gıda*, 10(1), 77-84, (2012).

Bektas, N., Arslan, R., Goger, F., Kirimer, N., & Ozturk, Y., "Investigation for anti-inflammatory and anti-thrombotic activities of methanol extract of *Capparis ovata* buds and fruits" , *Journal of ethnopharmacology*, 142 (1), 48-52, (2012).

Bienvenu J., "Exploration of cytokines in biological fluids", *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales*, 189(4),545-555, (1995).

Canbolat, E., "Araşidonik asit metabolitlerinin oluşum mekanizması ve bazı hastalıklardaki rolü", *Ejovoc (Electronic Journal of Vocational Colleges)*, 5 (6), 20-29, (2015).

Carbone, C., Musumeci, T., & Pignatello, R., "Non-steroidal anti-inflammatory drugs", *Drug– Biomembrane Interaction Studie*, 281-303, (2013).

Chan, E. D., Morris, K. R., Belisle, J. T., Hill, P., Remigio, L. K., Brennan, P. J., & Riches, D. W., "Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase-NO \cdot by Lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis Is Mediated by MEK1-ERK, MKK7-JNK, and NF- κ B Signaling Pathways", *Infection and immunity*, 69 (4), (2001).

Cheekavolu, C., & Muniappan, M., "In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of indazole and its derivatives", *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR 10* (9), FF01, (2016).

Chen, Jing-yi, Zi-xin Ye, Xiu-fen W., Jian C., Mei-wen Y., Hua-hua Z., Fen-fang H., and Shu- long Y., "Nitric oxide bioavailability dysfunction involves in atherosclerosis", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 423-428, (2018).

Chevreur, M. E., "Des corps qu'on a appelés adipocire, c'est-à-dire, de la substance cristallisée des calculs biliaries humains, du spermacéti et de la substance grasse des cadavres", *Ann. Chim*, 95, 5-50, (1815).

Cho, B. O., Ryu, H. W., So, Y., Lee, C. W., Jin, C. H., Yook, H. S., ... & Jeong, I. Y., " Anti-inflammatory effect of mangostenone F in lipopolysaccharide-stimulated RAW264. 7 macrophages by suppressing NF- κ B and MAPK activation", *Biomolecules & therapeutics*, 22(4), 288-294, (2014).

Çevikbaş U., "Temel Patoloji", *Nobel Tıp Kitabevi*, İstanbul, 25-60, (1995).

Da Costa, B. R., Reichenbach, S., Keller, N., Nartey, L., Wandel, S., Jüni, P., & Trelle, S., "Effectiveness of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of pain in knee and hip osteoarthritis: a network meta-analysis" , *The Lancet*, 390 (10090), e21-e33, (2017).

Davenport, G. C., Hittner, J. B., Otieno, V., Karim, Z., Mukundan, H., Fenimore, P. W., ... & Perkins, D. J., "Reduced parasite burden in children with Falciparum

malaria and Bacteremia Coinfections: role of mediators of inflammation" , *Mediators of inflammation*, (2016).

Davis, Richard B., William R. Meeker, and Donald G., Mc QD., "Immediate effects of intravenous endotoxin on serotonin concentrations and blood platelets", *Circulation research*, 8(1), 234-239, (1960).

de Padilla, C. M. L., & Niewold, T. B., "The type I interferons: basic concepts and clinical relevance in immune-mediated inflammatory diseases", *Gene*, 576(1), 14-21, (2016).

Dinarello CA., " Anti-inflammatory agents: present and future", *Cell* ,140, 935-50, (2010).

Doğan, N., Akcam, M., Koca, T., Doğuç, D., K., & Özgöçmen, M., "The protective effect of Capparis ovata in acute hepatotoxicity induced by paracetamol", *Turkish journal of medical sciences*, 46(2), 561-566, (2016).

Doycheva, Deshka, Christoph D., and Rafael G., "Topical Corticosteroids and Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in the Therapy of Non-infectious Uveitis" , *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 235(5) , 586-591, (2018).

Dürk, T., Panther, E., Müller, T., Sorichter, S., Ferrari, D., Pizzirani, C., ... & Idzko, M., "5- Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS-primed human monocytes via stimulation of different 5-HTR subtypes", *International immunology*, 17(5), 599-606, (2005).

Düzgün, N., "İmmün sistemin tanıtımı", *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Romatoloji Bilim Dalı*, Ankara, (2014).

Formica, J. V., & Regelson, W., "Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids",*Food and chemical toxicology*, 33(12), 1061-1080, (1995).

Ganeshpurkar, Aditya, and Ajay K. Saluja, "The pharmacological potential of rutin" ,*Saudi pharmaceutical journal*, 25(2), 149-164, (2017).

Göktürk, H. S., "Non-Steroidal Anti-Enflamatuvar İlaçlar, Endikasyon, Kontrendikasyon, Endikasyonsuz Kullanım, Komplikasyonları Önlemek İçin Ne Yapmalı?".

Guardia, T., Rotelli, A.E., Juarez, A.O. and Pelzer, L.E., "Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat", *Ifarmaco*, 56(9), pp.683-687, (2001).

Harel, M., Garraud, T., Le Goff, B., & Blanchard, F., "P060 IL-38 in arthritis maturation and degradation of this new IL-1 family anti-inflammatory cytokine", A38-A39, (2018).

Heppner, Frank L., Richard M. Ransohoff, and Burkhard B., "Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease", *Nature Reviews Neuroscience* 16 (6), 358, (2015).

Hoogland, I. C., Houbolt, C., Westerloo, D. J., Gool, W. A., & Beek, D., "Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments", *Journal of neuroinflammation*, 12 (1), 114, (2015).

Iken, K., Chheng, S., Fargin, A., Goulet, A. C., & Kouassi, E., "Serotonin Upregulates Mitogen- Stimulated B Lymphocyte Proliferation through 5-HT1A Receptors", *Cellular immunology*, 163(1), 1-9, (1995).

Jung, C. H., Jung, H., Shin, Y. C., Park, J. H., Jun, C. Y., Kim, H. M., ... & Ko, S. G., "Eleutherococcus senticosus extract attenuates LPS-induced iNOS expression through the inhibition of Akt and JNK pathways in murine macrophage", *Journal of ethnopharmacology*, 113(1), 183-187, (2007).

Karabay, A. Z., Koc, A., Gurkan- Alp, A. S., Buyukbingol, Z., & Buyukbingol, E., "Inhibitory effects of indole α -lipoic acid derivatives on nitric oxide production in LPS/IFN γ activated RAW 264.7 macrophages", *Cell biochemistry and function*, 33 (3), 121-127, (2015).

Kawai T, Akira S., "TLR signaling", *Cell Death Differentiation*, 13, 816-25, (2006).

Kim, N. J., Ahn, K. B., Jeon, J. H., Yun, C. H., Finlay, B. B., & Han, S. H., "Lipoprotein in the cell wall of *Staphylococcus aureus* is a major inducer of nitric oxide production in murine macrophages", *Molecular immunology*, 65 (1), 17-24, (2015).

Koç A., "RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde nitrik oksit sentezi üzerine L-karnitinin etkisi", Doktora Tezi, *T.C. Ankara Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (2011).

Koh, Timothy J., DiPietro and Luisa A., "Inflammation and wound healing: the role of the macrophage", *Expert reviews in molecular medicine* 13, (2011).

Kuralay, Filiz, and Zahide Ç., "İnflamatuar medyatörlere toplu bir bakış", *Genel Tıp Dergi*, 16 (3), 143-152 , (2006).

Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C., & Hermoso, M. A., "Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment", *Journal of immunology research*, (2014).

Lee, S. H., Kwak, C. H., Lee, S. K., Ha, S. H., Park, J., Chung, T. W., ... & Lee, Y. C., "Anti- Inflammatory Effect of Ascochlorin in LPS- Stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells Is Accompanied With the Down- Regulation of iNOS, COX- 2 and Proinflammatory Cytokines Through NF- κ B, ERK1/2, and p38 Signaling Pathway", *Journal of cellular biochemistry*, 117(4), 978-987, (2016).

Leiva, M., Ruiz-Bravo, A., Moreno, E., & Jiménez-Valera, M., " Telithromycin inhibits the production of proinflammatory mediators and the activation of NF- κ B in in vitro-stimulated murine cells", *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 53(3), 343-350 (2008).

Leonardi, G. C., Accardi, G., Monastero, R., Nicoletti, F., & Libra, M., "Ageing: from inflammation to cancer", *Immunity & Ageing*, 15 (1), 1, (2018).

Li, Jiancheng, Xiaobin Fu, and Jie Fu., "Exhaled Nitric Oxide Is Useful in Symptomatic Radioactive Pneumonia: A Retrospective Study", *Mediators of inflammation*, (2017).

Liu, T., Zhang, L., Joo, D. and Sun, S.C., "NF- κ B signaling in inflammation", *Signal transduction and targeted therapy*, 2, 17023, (2017).

López, S., Bermúdez, B., Pacheco, Y. M., Villar, J., Abia, R., & Muriana, F. J., "Distinctive postprandial modulation of β cell function and insulin sensitivity by dietary fats: monounsaturated compared with saturated fatty acids", *The American journal of clinical nutrition*, 88(3), 638-644, (2008).

Machado, G. C., Maher, C. G., Ferreira, P. H., Day, R. O., Pinheiro, M. B., & Ferreira, M. L., "Non-steroidal anti-inflammatory drugs for spinal pain: a systematic review and meta- analysis", *Annals of the rheumatic diseases*, 76 (7), 1269-1278, (2017).

Manrique-Moreno, M., Heinbockel, L., Suwalsky, M., Garidel, P., & Brandenburg, K., "Biophysical study of the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) ibuprofen, naproxen and diclofenac with phosphatidylserine bilayer membranes", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1858 (9), 2123-2131, (2016).

Matsuura M., "Structural modifications of bacterial lipopolysaccharide that facilitate gram-negative bacteria evasion of host innate immunity", *Front Immunol*, 4, 109, (2014).

Medzhitov, R., "Inflammation 2010: New adventures of an old flame", *Cell*, 140(6), 771-776, (2010).

Miller, S. A., White, J. A., Chowdhury, R., Gales, D. N., Tameru, B., Tiwari, A. K., & Samuel, T., "Effects of consumption of whole grape powder on basal NF- κ B signaling and inflammatory cytokine secretion in a mouse model of inflammation", *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, 11, 1-8, (2018).

Morel, I., Lescoat, G., Cogrel, P., Sergent, O., Padeloup, N., Brissot, P., & Cillard, J., "Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures", *Biochemical pharmacology*, 45(1), 13- 19, (1993).

Morito, Daisuke, and Kazuhiro N., "ER stress proteins in autoimmune and inflammatory diseases", *Frontiers in immunology* 3, 48, (2012).

Mullington JM., Hinze-Selch D., Pollmavher T., "Mediators of inflammation" *Annals of the New York Academy of Sciences*, 933, 201-10, (2001).

Mürüvvet, D. Ü. Z., and A. Fatih F., "Biyojen Aminler ve Etkileri", *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 9 (2), 114-121, (2017).

Obaid, M., Udden, S. N., Deb, P., Shihabeddin, N., Zaki, M. H., & Mandal, S. S., "LncRNA HOTAIR regulates lipopolysaccharide-induced cytokine expression and inflammatory response in macrophages", *Scientific reports*, 8(1), 15670, (2018).

O'Connor, T. M., O'Connell, J., O'Brien, D. I., Goode, T., Bredin, C. P., & Shanahan, F., "The role of substance P in inflammatory disease", *Journal of cellular physiology*, 201 (2), 167- 180, (2004).

Ohashi, W., Hattori, K., & Hattori, Y., "Control of macrophage dynamics as a potential therapeutic approach for clinical disorders involving chronic inflammation", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 354(3), 240-250, (2015).

Okur, Mehmet Evren, et al., "Hypoglycemic activity of Capparis ovata desf. var. palaestina zoh. methanol extract", *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* ,54(3), (2018).

O'shea, J. J., & Murray, P. J., " Cytokine signaling modules in inflammatory responses", *Immunity*, 28 (4), 477-487, (2008).

Ouyang, W., Kolls, J. K., & Zheng, Y., "The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation", *Immunity*, 28 (4), 454-467, (2008).

Ozgun-Acar, O., Celik-Turgut, G., Gazioglu, I., Kolak, U., Ozbal, S., Ergur, B. U., ... & Topcu, G., "(*Capparis ovata* treatment suppresses inflammatory cytokine expression and ameliorates experimental allergic encephalomyelitis model of multiple sclerosis in C57BL/6 mice", *Journal of neuroimmunology*, 298, 106-116, (2016).

Paillasse, M. R., Saffon, N., Gornitzka, H., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., & De Medina, P., "Surprising'un' reactivity of cholesterol-5, 6-epoxides towards nucleophiles" *Journal of lipid research*, jlr-M023689, (2012).

Pan, P., Huang, Y. W., Oshima, K., Yearsley, M., Zhang, J., Yu, J., ... & Wang, L. S., " Could Aspirin and Diets High in Fiber Act Synergistically to Reduce the Risk of Colon Cancer in Humans?", *International journal of molecular sciences*, 19 (1), 166, (2018).

Paniagua-Pérez, R., Flores-Mondragón, G., Reyes-Legorreta, C., Herrera-López, B., Cervantes-Hernández, I., Madrigal-Santillán, O., ... & Madrigal-Bujaidar, E., "Evaluation of the anti-inflammatory capacity of beta-sitosterol in rodent assays", *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14 (1), 123-130, (2017).

Paniagua, J. A., de la Sacristana, A. G., Sánchez, E., Romero, I., Vidal-Puig, A., Berral, F. J., ... & Pérez-Jiménez, F., "A MUFA-rich diet improves postprandial glucose, lipid and GLP-1 responses in insulin-resistant subjects", *Journal of the American College of Nutrition*, 26(5), 434-444, (2007).

Park, S. M., Lee, T. H., Zhao, R., Kim, Y. S., Jung, J. Y., Park, C. A., ... & Kim, Y. W., "Amelioration of inflammatory responses by Socheongryong-Tang, a traditional herbal medicine, in RAW 264.7 cells and rats", *International journal of molecular medicine*, 41 (5), 2771-2783, (2018).

Paul, William, "Fundamental Immunology", *New York, NY: Raven Press*, 716- 720, (1984).

Perrin, E., "Effect of Ursolic Acid Consumptoin from Apple Wax on Cytokine Levels in the Blood and Handgrip Strength ", *Doctoral dissertation, Appalachian State University, Appalachian*, (2017).

Pierre, S., Linke, B., Suo, J., Tarighi, N., Del Turco, D., Thomas, D., ... & Dos Santos, S. M., " GPVI and thromboxane receptor on platelets promote proinflammatory macrophage phenotypes during cutaneous inflammation", *Journal of Investigative Dermatology*, 137 (3), 686-695, (2017).

Pluskota, R., & Koba, M., "Indandione and its derivatives-chemical compounds with high biological potential", *Mini reviews in medicinal chemistry*, (2018).

Poirot, M., & Silvente-Poirot, S., "Cholesterol-5, 6-epoxides: chemistry, biochemistry, metabolic fate and cancer", *Biochimie*, 95(3), 622-631, (2013).

Prof. Dr. Taha Ü., " İltihap", *Ege Üniversitesi Fakülty patoloji Birimi, Diş hekiml Anabilim Dalı*, Ege, (2012).

Puxeddu, I., Pratesi, F., Ribatti, D., & Migliorini, P., " Mediators of Inflammation and Angiogenesis in Chronic Spontaneous Urticaria: Are They Potential Biomarkers of the Disease?", *Mediators of inflammation*, (2017).

Roh, K. B., Kim, H., Shin, S., Kim, Y. S., Lee, J. A., Kim, M. O., ... & Park, D., "Anti-inflammatory effects of Zea mays L. husk extracts", *BMC complementary and alternative medicine*, 16 (1), 298, (2016).

Rothschild, D. E., McDaniel, D. K., Ringel- Scaia, V. M., & Allen, I. C., "Modulating inflammation through the negative regulation of NF- κ B signaling", *Journal of leukocyte biology*, 103 (6), 1131-1150, (2018).

Rubio-Perez, J. M., & Morillas-Ruiz, J. M., "A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines", *The Scientific World Journal*, (2012).

Saluja, Ajay K., and Aditya Ganeshpurkar, "The Pharmacological Potential of Rutin", (2016).

Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., De Sanctis, P., Giovannini, C., D'Archivio, M., & Masella, R., "Anti-inflammatory Activity of Extra Virgin Olive Oil Polyphenols: Which Role in the Prevention and Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases?", *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets- Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 18 (1), 36-50, (2018).

Saura, M., Pérez-Sala, D., & Lamas, S., "Role of tetrahydrobiopterin availability in the regulation of nitric-oxide synthase expression in human mesangial cells", *Journal of Biological Chemistry*, 271 (24), 14290-14295, (1996).

Seigner, J., Basilio, J., Resch, U., & de Martin, R., "CD40L and TNF both activate the classical NF- κ B pathway, which is not required for the CD40L induced alternative pathway in endothelial cells", *Biochemical and biophysical research communications*, 495 (1), 1389- 1394, (2018).

Selloum, L., Bouriche, H., Tigrine, C., & Boudoukha, C., "Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation", *Experimental and Toxicologic Pathology*, 54(4), 313-318, (2003).

Serhan, C. N., "Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints from decoding resolution mediators and mechanisms", *The FASEB Journal*, 31 (4), 1273-1288, (2017).

Simon, P., Sharman, S., Lu, C., Yang, D., Paschall, A., & Liu, K., " The NF- κ B p65 and p50 homodimer cooperate with pSTAT1 to synergistically activate iNOS transcription in cancer cells and myeloid cells (INM1P. 440)", (2015).

Smith, C. E., Soti, S., Jones, T. A., Nakagawa, A., Xue, D., & Yin, H., "Non-steroidal anti- inflammatory drugs are caspase inhibitors", *Cell chemical biology*, 24 (3), 281-292, (2017).

Solfrizzi, V., Colacicco, A. M., D'Introno, A., Capurso, C., Torres, F., Rizzo, C., ... & Panza, F., "Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: a 8.5-year follow-up of the Italian Longitudinal Study on Aging", *Neurobiology of aging*, 27(11), 1694-1704, (2006).

Soromou, L. W., Zhang, Z., Li, R., Chen, N., Guo, W., Huo, M., ... & Deng, X., " Regulation of inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage by 7-O-methyl-naringenin", *Molecules*, 17(3), 3574-3585, (2012).

Sun, S. C., "The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation", *Nature Reviews Immunology*, 17 (9), 545, (2017).

Surh, Young-Joon, Kyung-Soo Chun, Hyun-Ho Cha, Seong Su Han, Young-Sam Keum, Kwang-Kyun Park, and Sang Sup Lee, "Molecular mechanisms underlying

chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX- 2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation", *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 480, 243-268, (2001).

Szabo, C., "Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock", *New horizons (Baltimore, Md.)*, 3(1), 2-32, (1995).

Takabayashi, T., Vannier, E., Clark, B. D., Margolis, N. H., Dinarello, C. A., Burke, J. F., & Gelfand, J. A., "A new biologic role for C3a and C3a desArg: regulation of TNF-alpha and IL-1 beta synthesis", *The Journal of Immunology*, 156(9), 3455-3460, (1996).

Tilborghs, S., Corthouts, J., Verhoeven, Y., Arias, D., Rolfo, C., Trinh, X. B., & Van Dam, P. A., "The role of Nuclear Factor-kappa B signaling in human cervical cancer", *Critical reviews in oncology/hematology*, 120, 141-150, (2017).

Tuğba A., & Çimen, B., "Nitrik oksit'in fizyolojik önemi ve çeşitli hastalıklardaki rolü", *T.C. Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi*, T.C., (2010).

Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J., " Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843 (11), 2563-2582, (2014).

Türköz, Y., & Özerol, E., "Nitrik oksit'in etkileri ve patolojik rolleri", *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, Turgut, 4(4), (1997).

Vannini, Federica, Khosrow K., and Niharika N., "The dual role of iNOS in cancer" , *Redox biology* , 6, 334-343 , (2015).

Varvara, G., Bernardi, S., Cutilli, T., Bianchi, S., Sinjari, B., & Piattelli, M., "Anti-inflammatory steroid use in impacted third molar surgery: a systematic review", *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 31 (4), 1095-1099, (2017).

Wakai, A., Lawrenson, J. G., Lawrenson, A. L., Wang, Y., Brown, M. D., Quirke, M., ... & Lang, E., "Topical non-steroidal anti-inflammatory drugs for analgesia in traumatic corneal abrasions", *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (5), (2017).

White, M., "Mediators of inflammation and the inflammatory process", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103 (3), S378-S381, (1999).

Xu, Weiming, Charles, I. G., Liu, L., Moncada, S., & Emson, P., "Molecular cloning and structural organization of the human inducible nitric oxide synthase gene (NOS2)", *Biochemical and biophysical research communications*, 219 (3), 784-788, (1996).

Yamaki, T., Yano, T., Satoh, H., Endo, T., Matsuyama, C., Kumagai, H., ... & Hagiwara, K., "High oleic acid oil suppresses lung tumorigenesis in mice through the modulation of extracellular signal-regulated kinase cascade", *Lipids*, 37(8), 783, (2002).

Yan, S., Lin, H., Huang, H., Yang, M., Xu, B., & Chen, G., "Microbial hydroxylation and glycosidation of oleanolic acid by *Circinella muscae* and their anti-inflammatory activities" *Natural product research*, 1-7, (2018).

Yang, G. Y., Taboada, S., & Liao, J., "Induced nitric oxide synthase as a major player in the oncogenic transformation of inflamed tissue", In *Inflammation and Cancer*, (Humana Press), 119-156, (2009).

Yoon, W. J., Ham, Y. M., Kim, K. N., Park, S. Y., Lee, N. H., Hyun, C. G., & Lee, W. J., "Anti-inflammatory activity of brown alga *Dictyota dichotoma* in murine macrophage RAW 264.7 cells", *Journal of Medicinal Plants Research*, 3 (1), 001-008, (2009).

Zhao, Y., Vanhoutte, P. M., & Leung, S. W., "Vascular nitric oxide: Beyond eNOS", *Journal of pharmacological sciences*, 129(2), 83-94, (2015).

Zou, Y. H., Zhao, L., Xu, Y. K., Bao, J. M., Liu, X., Zhang, J. S., ... & Tang, G. H., "Anti-inflammatory sesquiterpenoids from the Traditional Chinese Medicine *Salvia plebeia*: Regulates pro-inflammatory mediators through inhibition of NF- κ B and

Erk1/2 signaling pathways in LPS-induced Raw264. 7 cells", *Journal of ethnopharmacology*, 210, 95-106, (2018).

7. ÖZGEÇMİŞ

- Adı Soyadı : Hajarat Abilo ALFA
- Doğum Yeri ve Tarihi : Nijerya, 03.09.1992
- Lisans Üniversite : Pamukkalae Üniversitesi
- Y. Lisans Üniversite (varsa) : Pamukkalae Üniversitesi
- Elektronik posta : hajaratalfa92@gmail.com
- İletişim Adresi : ZeytinköyMah.5057.Sokat No10.daire 003
Denizli Turkey
- Konferans listesi : International Congress of the Molecular
Biology Association of Turkey, İzmir Turkey