



**Deneyisel Multipl Skleroz Modelinde (DAE) MSCOV'un
İyileştirici Etkilerinin Moleküler Mekanizmalarının
Saptanması**

Program Kodu: 1001

Proje No: 112S187

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Alaattin ŞEN

Araştırmacı:

Prof. Dr. Ufuk KOLAK

Prof. Dr. Dr. Bekir. U. ERGÜR

Doç. Dr. Şevki ARSLAN

Doç. Dr. Seda ÖZBAL

Danışman

Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU

ARALIK 2015

DENİZLİ

ÖNSÖZ

Multipl Skleroz (MS), hala etiyojisi tam olarak bilinmemekle beraber genetik ve çevresel faktörler tarafından tetiklenen, immun bozukluğunun neden olduğu, merkezi sinir sisteminin kronik, enflamatuar ve demiyelizan bir hastalığıdır. MS dünyanın en yaygın nörolojik bozukluklarından biridir. Pek çok ülkede genç erişkinlerde, trafik kazaları dışında meydana gelen nörolojik özürülüğün birinci nedenidir. 2008 yılında 2,1 milyon olan MS'li hasta sayısı, tahmini 400 bin kişi artarak bu rakam günümüzde 2,5 milyona yükselmiştir.

Günümüzde MS tedavisi için kullanılan mevcut olan ilaçların kullanımları ile karşılaşılan sıkıntı ve yan etkilerden dolayı, MS için alternatif tedavi ajanlarının saptanması ve ilaç geliştirilmesi çalışmaları devam etmektedir. Bu kapsamda, projede multipl skleroz deneysel hayvan modelinde *Capparis ovata* bitkisinden elde edilen ekstre (MScov) ve alt fraksiyonlar ile DAE oluşturulmuş CL57BL/6 farelerde, *Capparis ovata* bitkisinden izole edilen saf bileşiklerle de *in vitro* modellerde moleküler gen ifade değişkenlikleri, toksikolojik etki belirleme, histolojik ve immunohistokimyasal inceleme ve takipleri, tüm genom transkriptom analizleri, izolasyon ve yapı tayin deneyleri gerçekleştirildi. Bu çalışmalar neticesinde çok önemli çıktılar elde edildi.

Proje yürütücüsü olarak emeği geçen araştırmacı ve danışman hocalarımıza, bursiyelere, araştırmacı veya bursiyer olmadıkları halde bir şekilde katkı sağlayan ekip arkadaşlarımızdan Gurbet Ç. TURGUT'a, Veteriner Yrd. Doç. Dr. Barbaros ŞAHİN'e, bitkileri sağlayan Aşçı Murat Kapari Tatlı Dondurma Turşu İml.ve İhr. Şti'ne, proje önerimizi değerlendiren ve raporlarımızı okuyan raportör hocalarımıza, TÜBİTAK' ta projemizin değerlendirme sürecine katılan SBAG çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Tüm bu çalışma 112S187 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

1 GİRİŞ 1	
2 MATERYAL VE METOT 11	
2.1 Materyal	11
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	11
2.2 Metot.....	11
2.2.1 MSCov Ekstresinin Hazırlanması	11
2.2.2 MSCov Ekstresinin Fraksiyonlanması	12
2.2.2.1 <i>Capparis ovata</i> bitkisinin sulu ekstresi (MSCov) ve bitkinin her bir kısımları için (meyve, çiçek ve diğer toprak üstü kısımları ile kök) diğer ekstrelerin hazırlanması.....	12
2.2.2.1.1 <i>Capparis ovata</i> Direkt Su Ekstresinin (MSCov) ve Bundan Organik Çözücülerle Tüketilerek Geri Ekstraksiyon İle Diğer Ekstrelerinin Hazırlanması.....	12
2.2.2.1.2 <i>C. ovata</i> Sulu Metanol Ekstrelerinin Hazırlanması	13
2.2.3 Ekstrelerin Antikolinesteraz Aktivitelerinin Araştırılması	14
2.2.3.1 Ellman Metodu.....	14
2.2.3.2 AChE İnhibisyonu Aktivite Testi	14
2.2.3.2.1 Reaktiflerin Hazırlanışı:.....	15
2.2.3.3 Butiril kolinesteraz (BChE) inhibisyonu aktivite testi	15
2.2.3.3.1 Reaktiflerin Hazırlanışı	15
2.2.4 Ekstrelerin ve Elde Edilen Aktif Maddelerin LC-MS-MS Analizi	16
2.2.4.1 LC-MS-MS Analizi için Numunelerin Hazırlanması	16
2.2.4.1.1 Standart Çözeltilerin Hazırlanması	16
2.2.4.1.2 Enstrümantal Analiz ve Kromatografik Koşullar	16
2.2.4.1.3 LC-MS/MS Prosedürü	16
2.2.5 Hayvan Deneylemleri	17
2.2.5.1 Moleküler Toksikoloji (Moleküler Etki Saptayıcı Analizler) Çalışmaları	17
2.2.5.1.1 Karaciğer Dokusundan RNA izolasyonu	17
2.2.5.1.2 cDNA Sentezi	18

2.2.5.1.3 Toksikoloji Dizin (Array) Analizleri.....	18
2.2.5.2 MS Modeli (DAE) Çalışmaları	19
2.2.5.2.1 Dokuların Temini	19
2.2.5.3 MS Dizin (Array) Analizleri	20
2.2.5.3.1 Beyin Dokusundan RNA İzolasyonu	20
2.2.5.3.2 MSCov Ekstresinin ve Alt Fraksiyonlarının DAE Oluşturulan Hayvanlara Verilmesi	21
2.2.5.3.3 Total RNA'nın Agaroz Jel Elektrofrez İle Görüntülenmesi	22
2.2.5.4 mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi: Gerçek Zamanlı PZR	23
2.2.5.5 Protein Ekspresyon Düzeylerinin Tayini	24
2.2.5.5.1 Trizol Alt Fazından Protein İzolasyonu.....	24
2.2.5.5.2 Bişinşonik Asit ile Protein Tayini	24
2.2.5.5.3 SDS-Poliakrilamit Jel Elektrofrez (SDS-PAJE) ve Western Blot	25
2.2.5.6 Tüm Genom Transkriptom Analizleri	26
2.2.5.6.1 Örnek Hazırlanması	26
2.2.5.6.2 Örnek Etiketleme ve Safılaştırma	26
2.2.5.6.3 Hibritleştirme ve Tarama.....	27
2.2.5.6.4 Ham Veri Hazırlama ve İstatistik analiz	27
2.2.5.7 Histomorfolojik Analizler	27
2.2.5.7.1 Doku Hazırlığı.....	27
2.2.5.7.2 "Luxol Fast Blue" Histokimyasal Boyası.....	28
2.2.5.7.3 Toluidin Boyası	28
2.2.5.7.4 Miyelin Basic Protein (MBP) İmmünreaktivitesi	28
2.2.5.7.5 Miyelin-İlişkili Glikoprotein (MAG) İmmünreaktivitesi.....	29
2.2.5.7.6 CD45 İmmünreaktivitesi	29
2.2.5.7.7 Gliyal Fibriller Asidik Protein (GFAP) İmmünreaktivitesi	29
2.2.5.7.8 Görüntü Analiz Metodu	30
2.2.6 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	30
2.2.6.1 Besiyeri Hazırlanışı	30
2.2.6.2 Hücrelerin Büyütülmesi	30

2.2.6.3 Tripan Mavisi	31
2.2.6.4 Hücrelerin Pasajlanması	31
2.2.6.5 Sitotoksosite Çalışmaları	31
2.2.6.6 RNA İzolasyonu	33
3 SONUÇLAR	35
3.1 <i>Capparis ovata</i> Saf Madde İzolasyonu	35
3.1.1 <i>Capparis ovata</i> direkt su ekstresinin (MSCov) ve bundan organik çözücülerle tüketilerek geri ekstraksiyon ile diğer ekstralarının hazırlanması	35
3.1.2 Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları	35
3.1.3 MSCov, MSCov Etil Asetat (MSCov-E) ve MSCov Bütanol (MSCov-B) ekstrelerinin LC-MS-MS Analizleri	37
3.1.3.1 Elde Edilen Sekonder Metabolitlerin LC-MS-MS Validasyonu ve Ölçüm Belirsizliği Değerlendirmeleri	38
3.1.3.2 LC-MS/MS ile Analiz Edilen <i>C. ovata</i> Ekstrelerinin İçerdiği Sekonder Metabolitlerin Kantitatif Analiz Sonuçları (mg/kg)	40
3.1.4 Ekstrelerden Saf Maddelerin İzolasyonu	43
3.1.4.1 MSCov'dan saf madde izolasyonu	43
3.1.4.1.1 Diklorometan (MSCov-D) fraksiyonu çalışması.....	43
3.1.4.2 İşlenmemiş Bitki Bölümlerinden Madde Saflaştırılması	57
3.1.4.2.1 <i>Capparis ovata</i> Bitkisinin "Tomurcuk" Kısımından Hazırlanan Hekzan:Diklorometan Ekstresinin Fraksiyonlandırılması ve Saflaştırılması	57
3.1.4.2.2 <i>Capparis ovata</i> Bitkisinin "Meyve" Kısımından Hazırlanan Hekzan:Diklorometan Ekstresinin Fraksiyonlandırılması ve Saflaştırılması	69
3.2 Moleküler Toksikoloji (MT) Dizin Analizler	81
3.2.1 Apoptoz	82
3.2.2 Nekroz	84
3.2.3 DNA Hasarı Ve Tamiri Yolakları	86
3.2.4 Mitokondriyal Enerji Metabolizması	89
3.2.5 Yağ Asit Metabolizması	92
3.2.6 Oksidatif Stres Ve Antioksidan Tepki	94
3.2.7 Isı Şok Tepkisi	97
3.2.8 Katlanmamış Protein Stresi	99

3.2.9 Sitokrom P450 Ve İlaç Metabolizması	102
3.2.10 Steatoz 1	103
3.2.11 Kolestaz	106
3.2.12 Fosfolipidoz	107
3.2.13 İmmüntoksisite	110
3.3 Deneysel Alerjik Ensefalomyelit (DAE) Çalışmaları	114
3.3.1 Hayvanlarda DAE Oluşturulması	114
3.3.2 MS Dizin Analizleri	114
3.3.2.1 MS dizi ile analiz edilen genler:	115
3.3.3 mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi: Gerçek Zamanlı PZR	122
3.3.4 Protein Düzeyinde Ekspresyonların Tespit Edilmesi	134
3.3.5 Tüm Genom Transkriptom Analizleri	141
3.3.6 Beyin Dokularında Histolojik Analizler	147
3.3.6.1.1 "Luxol Fast Blue" Histokimyasal Boyası	147
3.3.6.1.2 Toluidin Boyası	149
3.3.6.1.3 Miyelin Basic Protein (MBP) ve Miyelin İlişkili Glikoprotein (MAG) immünreaktivitesi;	151
3.3.6.1.4 CD45 (Protein tyrosine phosphatase, receptor type C) İmmunreaktivitesi	154
3.3.6.1.5 GFAP (Glial fibriller asidik protein) İmmunreaktivitesi;	156
3.4 Hücre Kültürü Çalışmaları	158
3.4.1 SH-SY5Y Hücrelerinde MSCov Ekstresi Çalışmaları	158
3.4.1.1 MSCov Sitotoksisite Çalışması	158
3.4.1.2 MSCov Ekstresinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi	159
3.4.2 SH-SY5Y Hücrelerinde Diklorometan Alt Fraksiyonu Çalışmaları	167
3.4.2.1 Diklorometan Sitotoksisite Çalışması	167
3.4.2.2 Diklorometan Alt Fraksiyonunun SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi	168
3.4.3 SH-SY5Y Hücrelerinde Etil Asetat Alt Fraksiyonu Çalışmaları	176

3.4.3.1 Etil Asetat Sitotoksisite Çalışması	176
3.4.3.2 Etil Asetat Alt Fraksiyonunun SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi	177
3.4.4 SH-SY5Y Hücrelerinde n-Bütanol Alt Fraksiyonu Çalışmaları	185
3.4.4.1 n-Bütanol Sitotoksisite Çalışması	185
3.4.4.2 n-Bütanol Alt Fraksiyonunun SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi	186
3.4.5 SH-SY5Y Hücrelerinde İzole Edilen Saf Maddelerin Çalışmaları	195
3.4.5.1 SH-SY5Y Hücrelerinde Glucocapparin Aktif Maddesi Çalışmaları	195
3.4.5.1.1 Glucocapparin Sitotoksisite Çalışması	195
3.4.5.1.2 Glucocapparin Aktif Maddesinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi	196
3.4.5.2 SH-SY5Y Hücrelerinde Olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat - OPC Aktif Maddesi Çalışmaları	204
3.4.5.2.1 Olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat - OPC Sitotoksisite Çalışması	204
3.4.5.2.2 Olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat Aktif Maddesinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi	204
3.4.5.3 SH-SY5Y Hücrelerinde Olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat - OPC Aktif Maddesi ve Rutin Paralel Çalışmaları	212
3.4.5.3.1 Rutin Sitotoksisite Çalışması	213
3.4.5.3.2 Rutin ve Olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat Aktif Maddesinin Kombine Uygulanmasının SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi	213
3.4.5.4 SH-SY5Y Hücrelerinde Oleanolik Asit Aktif Maddesi Çalışmaları	220
3.4.5.4.1 Oleanolik Asit Sitotoksisite Çalışması	220
3.4.5.4.2 Oleanolik Asit Aktif Maddesinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi	221
3.4.5.5 SH-SY5Y Hücrelerinde Ursolik Asit Aktif Maddesi Çalışmaları	228
3.4.5.5.1 Ursolik Asit Sitotoksisite Çalışması	228
3.4.5.5.2 Ursolik Asit Aktif Maddesinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi	229

4 TARTIŞMA	237
5 SONUÇ	263
6 KAYNAKLAR.....	264

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Moleküler toksikoloji çalışma grupları	17
Tablo 2. MS takibinde kullanılan skorlama tablosu	19
Tablo 3. Kullanılan Deney Grupları.....	21
Tablo 4. Hayvan (fare) deneylerinde kullanılan primer dizileri ve yapışma sıcaklıkları	23
Tablo 5. SDS-PAJE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları.	25
Tablo 6. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan primer dizileri	34
Tablo 7. Elde edilen ekstrelerin kodları.....	35
Tablo 8. C. ovata'dan hazırlanan ekstrelerin Antikolinesteraz Aktivite sonuçları	36
Tablo 9. C. ovata'dan hazırlanan ekstrelerin asetilkolinesteraz sonuçları	37
Tablo 10. C. ovata ekstrelerindeki sekonder metabolitlerin LC/MS/MS ile analizi sonuçları.....	37
Tablo 11. Sekonder Metabolitlerin Validasyon ve Belirsizlik Parametreleri	39
Tablo 12. MSCov ekstrelerinin genişletilmiş (k=2) belirsizlik ile birlikte kg ekstre başına düşen mg sekonder bileşiklerin miktarları	40
Tablo 13. MSCov-D 14-15 nolu fraksiyonun GC-MS analiz sonuçları	46
Tablo 14. COM 2-7 fraksiyonunun GC-MS analiz sonucu (%).	76
Tablo 15. MT dizininde kullanılan apoptoz ilişkili genlerin listesi	82
Tablo 16. MT dizininde kullanılan nekroz ilişkili genlerin listesi	84
Tablo 17. MT dizininde kullanılan DNA hasarı ve tamir yolları ilişkili genlerin listesi	86
Tablo 18. MT dizininde kullanılan DNA hasarı ve tamir yolları ilişkili genlerin listesi	89
Tablo 19. MT dizininde kullanılan Yağ sit metabolizmasında yer alan genlerin listesi	92
Tablo 20. MT dizininde kullanılan oksidatif stres ve antioksidan tepki ilişkili genlerin listesi	94
Tablo 21. MT dizininde kullanılan ısı şok tepki ilişkili genlerin listesi	97
Tablo 22. MT dizininde kullanılan katlanmamış protein stresinde rol alan genlerin listesi.....	99

Tablo 23. MT dizininde kullanılan ilaç metabolizması ilişkili rol alan genlerin listesi	102
Tablo 24. MT dizininde kullanılan ilaç metabolizması ilişkili rol alan genlerin listesi	103
Tablo 25. MT dizininde kullanılan ilaç metabolizması ilişkili rol alan genlerin listesi.....	106
Tablo 26. MT dizininde kullanılan ilaç metabolizması ilişkili rol alan genlerin listesi	108
Tablo 27. MT dizininde kullanılan immuntoksisite ilişkili genlerin listesi	110
Tablo 28. MS PCR Dizi (array) Gen Tablosu	115
Tablo 29. MBP ve MAG İmmünreaktivitesinin skorlanması.....	151
Tablo 30. CD45 immünreaktivitesinin gruplara göre skorlanması	154
Tablo 31. GFAP immünreaktivitesinin skorlanması.....	156
Tablo 32. Hayvanlarda deney gruplarının beyin dokularında seçilen genlerde mRNA ekspresyon düzeylerinin kat değişim (“fold regulation”) sonuçları.	250
Tablo 33. MSCov ekstresinin ve Diklorometan, Etil asetat, n-Bütanol alt fraksiyonlarının SHSY-5Y hücrelerinde seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine etkilerinin kat değişim sonuçları.	258
Tablo 34. MSCov ekstresinden elde edilen Olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat (OPC), Olean-12-en-28-ol, 3 β pentacosanoat+Rutin kombine uygulaması ve Oleanolik asit aktif bileşenlerin SHSY-5Y hücrelerinde seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine etkilerinin kat değişim sonuçları.....	259
Tablo 35. MSCov ekstresinden elde edilen glukokapparin, ve ursolik asit aktif maddelerinin SHSY-5Y hücrelerinde seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine etkilerinin kat değişim sonuçları.	259

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. MS tipleri ve zamansal seyirleri.....	1
Şekil 2. MS hastalığının farklı tiplerinde hastalığın seyri ve semptomları.	2
Şekil 3. 2013 yılı küresel Multipl Skleroz prevalansı	3
Şekil 4. MS patolojisinde en önemli üç faktörün etkisi	4
Şekil 5. MSS dışında bağışıklık sisteminin düzensizlikleri ve otoreaktif T ve B hücrelerin çevresel sistemde aktive olmaları	5
Şekil 6. MSS içinde bağışıklık sistemi bozuklukları ve MSS içerisine bağışıklık sistemi hücrelerinin infiltrasyonu neticesinde enflamatuvar multipl skleroz oluşumu	6
Şekil 7. Etkinlik ve güvenilirliğine göre multipl skleroz için kullanılan ilaçların sınıflandırılması	9
Şekil 8. MSCOV ekstresinden geri ekstraksiyon yöntemiyle alt ekstrelerin eldesi.	13
Şekil 9. Asetilkolinesteraz inhibisyon reaksiyonu	15
Şekil 10. Sıvı azot ile doku öğütme.....	20
Şekil 11. Kontrol ve DAE kontrol beyin dokularından optimize edilmiş yöntem ile izole edilmiş total RNA agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	23
Şekil 12. SH-SY5Y hücreleri.....	31
Şekil 13. Kontrol ve MSCov muamele edilmiş SH-SY5Y hücrelerinden optimize edilmiş yöntem ile izole edilmiş total RNA agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	34
Şekil 14. (A) Hekzan ve diklorometan ekstreleri (B) Etil asetat, bütanol ve su ekstreleri. Sistem: Diklorometan/Aseton (9:1)	35
Şekil 15. MSCov ekstresinin analizleri için kullanılan standart bileşiklerin LC-MS/MS analiz kromatogramları	40
Şekil 16. Sekonder Metabolitlerin molekül yapıları.....	42
Şekil 17. Analiz edilen MSCov ekstrelerinin çözünürlük fotoğrafı.....	43
Şekil 18. MSCov-D 4-10 fraksiyonlarının İTK'sı	43
Şekil 19. MSCov-D 11-27 fraksiyonlarının İTK'sı	44
Şekil 20. MSCov-D 28-35 fraksiyonlarının İTK'sı	44
Şekil 21. MSCov-D 36-45 fraksiyonlarının İTK'sı	45
Şekil 22. MSCov-D 46-54 fraksiyonlarının İTK'sı	45

Şekil 23. MSCov-D (23-27) 1-24 fraksiyonlarının İTK'si.....	47
Şekil 24. MSCov-D (23-27) 31, 32 fraksiyonlarının İTK'si.....	47
Şekil 25. 1H-indol- 2-hidroksi, 3-karboksilik asit.....	48
Şekil 26. CDHT-2'nin MS spektrumu	48
Şekil 27. CDHT 2'nin 1H NMR spektrumu	49
Şekil 28. CDHT 2'nin 13C-NMR (APT) spektrumu.....	49
Şekil 29. MSCov-D (23-27) 16-17 nolu fraksiyonun prep İTK'si	50
Şekil 30 MSCov-D (23-27) 16-17-1 nolu fraksiyonun prep İTK'si.....	50
Şekil 31. CDHT 7 (Olean-12-en-28-ol, 3 β -pentakosanoat)	51
Şekil 32. CDHT 7'nin 1H NMR spektrumu	51
Şekil 33. CDHT 7'nin 13C-NMR (APT) spektrumu.....	52
Şekil 34. CDHT 7 bileşiminin kütle spektrumu	52
Şekil 35. MSCov-D (23-27) 19 nolu fraksiyonun prep İTK'si	53
Şekil 36. MSCov-D (28-29) 27-35 fraksiyonlarının İTK'si.....	54
Şekil 37. MSCov-D (28-29) 36-44 fraksiyonlarının İTK'si	54
Şekil 38. MSCov-D (48-56) 45-47 fraksiyonlarının İTK'si	54
Şekil 39. MSCov-D (48-56) 36-44 fraksiyonlarının İTK'si.....	55
Şekil 40. MSCov-D (28-29) 57-66 fraksiyonlarının İTK'si	55
Şekil 41. MSCov-D (28-29) 67-78 fraksiyonlarının İTK'si.....	56
Şekil 42. MSCov-D (28-29) 28-32 nolu fraksiyonun prep İTK'si.....	57
Şekil 43. Fr7-15 nolu fraksiyonların İTK'si	58
Şekil 44. Fr16-25 nolu fraksiyonların İTK'si	58
Şekil 45. Fr.11-17 nolu fraksiyonların prep. İTK'si	59
Şekil 46. Fr. 11-1, 11-2 ve 17 nolu maddeler ile β -sitosterol, stigmasterol, oleanolik asit ve ursolik asit İTK'si	59
Şekil 47. β -sitosterol.....	60
Şekil 48. β -sitosterol'ün 1H-NMR spektrumu	60
Şekil 49. β -sitosterol'ün 1H-NMR spektrumu	61
Şekil 50. β -sitosterol'ün 1H-NMR spektrumu	61
Şekil 51. β -sitosterol'ün 13C-NMR spektrumu	62
Şekil 52. Fr. 14'ün İTK'si	62

Şekil 53. 5 α ,6 α - epoksikolestan, 3 β -ol ve 5 β ,6 β - epoksikolestan, 3 β -ol	63
Şekil 54. 5,6,epoksikolestan-3 β -ol'ün 1H-NMR spektrumu	63
Şekil 55 5,6,epoksikolestan-3 β -ol'ün 1H-NMR spektrumu	64
Şekil 56.5,6,epoksikolestan-3 β -ol'ün 1H-NMR spektrumu	64
Şekil 57.5,6,epoksikolestan-3 β -ol'ün 1H-NMR spektrumu	65
Şekil 58. 5,6,epoksikolestan-3 β -ol'ün 1H-NMR spektrumu	65
Şekil 59 5,6,epoksikolestan-3 β -ol'ün 1H-NMR spektrumu	66
Şekil 60. 5,6,epoksikolestan-3 β -ol'ün 13C-NMR spektrumu	66
Şekil 61. Fr. 15'in prep İTK'sı.....	67
Şekil 62. 5 α ,6 α - epoksikolestan-3 β -ol.....	67
Şekil 63. 5 α ,6 α ,epoksikolestan-3 β -ol'ün 1H-NMR spektrumu	68
Şekil 64. 5 α ,6 α ,epoksikolestan-3 β -ol'ün 13C-NMR (APT) spektrumu.....	68
Şekil 65. COM1-12 fraksiyonlarının İTK'sı	69
Şekil 66. COM13-17 fraksiyonlarının İTK'sı	69
Şekil 67. COM17-29 fraksiyonlarının İTK'sı	70
Şekil 68. COM 3, 8, 11 nolu fraksiyonlar ile triterpenler ve stigmasterolün İTK'sı.....	70
Şekil 69. COM 3 nolu fraksiyonun prep. İTK'sı	71
Şekil 70. COM 3-2 ve COM 3-3 nolu maddenin prep. İTK'sı.....	71
Şekil 71. Stigmast-5,22-dien-3 β -ol, miristat	72
Şekil 72. Stigmast-5,22-dien-3 β -miristat'ın 1H-NMR spektrumu	72
Şekil 73. Stigmast-5,22-dien-3 β -miristat'ın 13C-NMR (APT) spektrumu	73
Şekil 74. Stigmast-5,22-dien-3 β -miristat'ın COSY spektrumu.....	73
Şekil 75.Stigmast-5,22-dien-3 β -miristat'ın HMBC spektrumu	74
Şekil 76 Stigmast-5,22-dien-3 β -miristat'ın HMQC spektrumu	74
Şekil 77 CDHM-4'ün kütle spektrumları	75
Şekil 78. bis 3 metiloktil ftalat.....	77
Şekil 79. CDHM-13'ün IR spektrumu	77
Şekil 80. CDHM-13'ün kütle spektrumu	77
Şekil 81. CDHM 13'ün 1H-NMR spektrumu.....	78
Şekil 82. CDHM 13'ün 13C-NMR (APT) spektrumu	78
Şekil 83. CDHM 13'ün n COSY spektrumu.....	79

Şekil 84. CDHM 13'ün HMBC spektrumu	79
Şekil 85. CDHM 13'ün HMQC spektrumu.....	80
Şekil 86. MSCov ekstresinin apoptoz genlerine etkisi I.....	83
Şekil 8. MSCov ekstresinin apoptoz genlerine etkisi II.....	83
Şekil 88 MSCov ekstresinin nekroz genlerine etkisi I.....	85
Şekil 89.MSCov ekstresinin nekroz genlerine etkisi II.....	86
Şekil 90 MSCov ekstresinin DNA hasarı ve tamiri yolları genlerine etkisi I.....	88
Şekil 91 MSCov ekstresinin DNA hasarı ve tamiri yolları genlerine etkisi II.....	89
Şekil 92 MSCov ekstresinin mitokondriyal enerji metabolizması genlerine etkisi I.....	91
Şekil 93 MSCov ekstresinin mitokondriyal enerji metabolizması genlerine etkisi II.....	91
Şekil 94 MSCov ekstresinin yağ asit metabolizması genlerine etkisi I.....	93
Şekil 95 MSCov ekstresinin yağ asit metabolizması genlerine etkisi II.....	94
Şekil 96 MSCov ekstresinin oksidatif stres ve antioksidan tepki genlerine etkisi I.....	96
Şekil 97 MSCov ekstresinin oksidatif stres ve antioksidan tepki genlerine etkisi II.....	96
Şekil 98 MSCov ekstresinin ısı şok tepkisi genlerine etkisi I.....	98
Şekil 99 MSCov ekstresinin ısı şok tepkisi genlerine etkisi II.....	99
Şekil 100. MSCov ekstresinin katlanmamış protein tepkisi genlerine etkisi I.....	101
Şekil 10. MSCov ekstresinin katlanmamış protein tepkisi genlerine etkisi II.....	101
Şekil 10 . MSCov ekstresinin sitokrom P450ler ve ilaç metabolizması genlerine etkisi.....	103
Şekil 10. MSCov ekstresinin steatoz genlerine etkisi I.....	105
Şekil 10. MSCov ekstresinin steatoz genlerine etkisi II.....	105
Şekil 10. MSCov ekstresinin kolestaz genlerine etkisi.....	107
Şekil 10. MSCov ekstresinin fosfolipidoz genlerine etkisi I.....	109
Şekil 107. MSCov ekstresinin fosfolipidoz genlerine etkisi II.....	109
Şekil 108. MSCov ekstresinin immüntoksisite genlerine etkisi I.....	112
Şekil 109. MSCov ekstresinin immüntoksisite genlerine etkisi II.....	112
Şekil 110. MSCov ekstresinin immüntoksisite genlerine etkisi III.....	113
Şekil 111. DAE (hasta), PDAE (paralel hasta) ve MSCov Tedavi grubu farelerde gözlenen klinik skorlar.	114
Şekil 112. MS dizin genleri ekspresyon düzeyleri I.....	119

Şekil 113. MS dizin genleri ekspresyon düzeyleri II	119
Şekil 114. MS dizin genleri ekspresyon düzeyleri III	120
Şekil 115. MS dizin genleri ekspresyon düzeyleri IV	120
Şekil 116. MS dizin genleri ekspresyon düzeyleri V	121
Şekil 17. MS dizin genleri ekspresyon düzeyleri VI	121
Şekil 11. MS dizin genleri ekspresyon düzeyleri VII	122
Şekil 119. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında APP mRNA seviyesine olan etkisi.	123
Şekil 10. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında BCL2 mRNA seviyesine olan etkisi.	123
Şekil 12. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında C1S mRNA seviyesine olan etkisi.	124
Şekil 12. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.	124
Şekil 13. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi	125
Şekil 124. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.	125
Şekil 12. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.	126
Şekil 12. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.	126

Şekil 127. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi..	127
Şekil 128. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.	127
Şekil 129. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında H2EB1 mRNA seviyesine olan etkisi.	128
Şekil 130. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında IL6 mRNA s eviyesine olan etkisi.	128
Şekil 131. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında MAG mRNA seviyesine olan etkisi.	129
Şekil 132. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında MBP mRNA seviyesine olan etkisi.	129
Şekil 133. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.	130
Şekil 134. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında NFkB mRNA seviyesine olan etkisi.	130
Şekil 135. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında PLP mRNA seviyesine olan etkisi.	131
Şekil 136. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.	131

Şekil 137. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında STAT mRNA seviyesine olan etkisi.	132
Şekil 138. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında SOD mRNA seviyesine olan etkisi.	132
Şekil 139. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi.	133
Şekil 140. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında TNF mRNA s eviyesine olan etkisi.	133
Şekil 141. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında YVHAH mRNA seviyesine olan etkisi.	134
Şekil 142. APP protein ekspresyon düzeyi ve blot görüntüsü. Sonuçlar ACTB proteini ile normalize edilmiştir.	135
Şekil 143. CCL5 protein ekspresyon düzeyi ve blot görüntüsü. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiştir.	135
Şekil 144. CXCL9 protein ekspresyon düzeyi ve blot görüntüsü.r.	136
Şekil 145. CXCL10 protein ekspresyon düzeyi ve blot görüntüsü.	137
Şekil 146. GFAP protein ekspresyon düzeyi ve blot görüntüsü.	137
Şekil 147. MAG protein ekspresyon düzeyi ve blot görüntüsü.	138
Şekil 148. MMP9 protein ekspresyon düzeyi ve blot görüntüsü.	139
Şekil 149. NFkB protein ekspresyon düzeyi ve blot görüntüsü.	139
Şekil 150. PLP protein ekspresyon düzeyi ve blot görüntüsü.	140
Şekil 151. TNF protein ekspresyon düzeyi ve blot görüntüsü.	140
Şekil 152. Her bir örnekte tespit edilen probe sayısı.	142
Şekil 153. Normalizasyonun "Box Plot" Gösterimi.	142
Şekil 154. Normalizasyonun "Density Plot" Gösterimi.	143
Şekil 155. Gruplar baz alınarak yapılan Kümeleme Analizi.	143

Şekil 156.. Kümeleme Analizi (Probelu Gösterim)	144
Şekil 157. Gruplar arasında yukarı ve aşağı regüle edilen probe sayıları.....	145
Şekil 158. Kontrol ve DEA hayvanlarda karşılaştırmalı KEGG yolaz analiz sonuçları	145
Şekil 159. Kontrol ve PDEA hayvanlarda karşılaştırmalı KEGG yolaz analiz sonuçları	146
Şekil 160. Kontrol ve MSCov hayvanlarda karşılaştırmalı KEGG yolaz analiz sonuçları.....	147
Şekil 161. DEA ve DEA-MScov hayvanlarda karşılaştırmalı KEGG yolaz analiz sonuçları.....	147
Şekil 162.: Beyin dokusuna ait kesitlerin Luxol fast blue ile boyanmas	148
Şekil 163. Medulla spinalis dokusuna ait yarı ince kesitlerin	150
Şekil 164. Beyin dokusuna ait periventriküler alandaki beyaz cevherden alınan kesitlerin anti-MBP antikoru ile immunhistokimyasal boyanmasına ait resimler	152
Şekil 165. Beyin dokusuna ait periventriküler alandaki beyaz cevherden alınan kesitlerin anti-MAG antikoru ile immunhistokimyasal boyanmasına ait resimler	153
Şekil 166. Beyin dokusuna ait periventriküler alandaki beyaz cevherden alınan kesitlerin anti- CD45 antikoru ile immunhistokimyasal boyanmasına ait resimler	155
Şekil 167. Beyin dokusuna ait periventriküler alandaki beyaz cevherden alınan kesitlerin anti- GFAP antikoru ile immunhistokimyasal boyanmasına ait resimler	157
Şekil 168. MSCov ekstresinin hücre canlılığına etkisi.	158
Şekil 169. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) APP mRNA seviyesine olan etkisi.	159
Şekil 170. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) C1S mRNA seviyesine olan etkisi.....	160
Şekil 171. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....	160
Şekil 172. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.	160

Şekil 173. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.....	161
Şekil 174. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.....	161
Şekil 175. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.....	162
Şekil 17. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....	162
Şekil 177. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.....	163
Şekil 178. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MAG mRNA seviyesine olan etkisi. S.....	163
Şekil 19. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.....	164
Şekil 10. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) NFKB mRNA seviyesine olan etkisi. S.....	164
Şekil 18. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PLP mRNA seviyesine olan etkisi.....	165
Şekil 18. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.....	165
Şekil 183. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) STAT mRNA seviyesine olan etkisi.....	166
Şekil 184. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) SOD mRNA seviyesine olan etkisi.....	166
Şekil 185. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) TNF mRNA seviyesine olan etkisi.....	167
Şekil 186. Diklorometan alt fraksiyonunun hücre canlılığına etkisi.....	167
Şekil 187. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) APP mRNA seviyesine olan etkisi.....	168
Şekil 188. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) C1S mRNA seviyesine olan etkisi.....	169

Şekil 189. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....	169
Şekil 190. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi..	169
Şekil 191. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.	170
Şekil 192. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GFAPmRNA seviyesine olan etkisi.	170
Şekil 19. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.	171
Şekil 194. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....	171
Şekil 19. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.....	172
Şekil 16. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....	172
Şekil 19. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.	173
Şekil 198. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) NFkB mRNA seviyesine olan etkisi.	173
Şekil 19. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PLP mRNA seviyesine olan etkisi..	174
Şekil 20. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.	174
Şekil 201. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) STAT mRNA seviyesine olan etkisi.....	175
Şekil 202. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) SOD mRNA seviyesine olan etkisi.	175
Şekil 23. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) TNF mRNA seviyesine olan etkisi.....	176
Şekil 20. Etil Asetat alt fraksiyonunun hücre canlılığına etkisi.	177

Şekil 205. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
APP mRNA seviyesine olan etkisi. S	177
Şekil 206. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
C1S mRNA seviyesine olan etkisi.....	178
Şekil 207. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....	178
Şekil 208. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi..	179
Şekil 209. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi..	179
Şekil 210. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
GFAP mRNA seviyesine olan etkisi..	180
Şekil 211. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.	180
Şekil 212. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....	181
Şekil 213. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.....	181
Şekil 214. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....	182
Şekil 215. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.....	182
Şekil 216. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
NFkB mRNA seviyesine olan etkisi..	183
Şekil 217. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
PLP mRNA seviyesine olan etkisi..	183
Şekil 218. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
PTPN mRNA seviyesine olan etkisi..	184
Şekil 219. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
STAT mRNA seviyesine olan etkisi.....	184

Şekil 220. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
SOD mRNA seviyesine olan etkisi.....	185
Şekil 221. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
TNF mRNA seviyesine olan etkisi.....	185
Şekil 222. n-Bütanol alt fraksiyonunun hücre canlılığına etkisi.....	186
Şekil 223. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
APP mRNA seviyesine olan etkisi.....	187
Şekil 224. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
C1S mRNA seviyesine olan etkisi.....	187
Şekil 225. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi. S	188
Şekil 226. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.	188
Şekil 227. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.	189
Şekil 228. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.	189
Şekil 229. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
GNAI mRNA seviyesine olan etkisi	190
Şekil 230. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....	190
Şekil 231. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	IL6
mRNA seviyesine olan etkisi.....	191
Şekil 232. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....	191
Şekil 233. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.	192
Şekil 234. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
NFkB mRNA seviyesine olan etkisi.	192
Şekil 235. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
PLP mRNA seviyesine olan etkisi.	193

Şekil 236. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.	193
Şekil 237. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
STAT mRNA seviyesine olan etkisi.....	194
Şekil 238. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
SOD mRNA seviyesine olan etkisi.	194
Şekil 239. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
TNF mRNA seviyesine olan etkisi.....	195
Şekil 240. Glucocapparinin hücre canlılığına etkisi.	196
Şekil 241. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
APP mRNA seviyesine olan etkisi.....	197
Şekil 242. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....	197
Şekil 243. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.	197
Şekil 244. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.	198
Şekil 245. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
GFAP mRNA seviyesine olan etkisi..	198
Şekil 246. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
GNAImRNA seviyesine olan etkisi.	199
Şekil 247. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....	199
Şekil 248. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.....	200
Şekil 249. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....	200
Şekil 250. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.	201
Şekil 251. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y)	
NFkB mRNA seviyesine olan etkisi.	201

Şekil 252. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PLP mRNA seviyesine olan etkisi.....	202
Şekil 253. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.....	202
Şekil 254. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) SOD mRNA seviyesine olan etkisi. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.....	203
Şekil 255. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) TNF mRNA seviyesine olan etkisi.....	203
Şekil 256. Olean-12-en-28-ol, 3β pentacosanoat'ın hücre canlılığına etkisi.....	204
Şekil 257. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) APP mRNA seviyesine olan etkisi.....	205
Şekil 258. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) C1S mRNA seviyesine olan etkisi.....	205
Şekil 259. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....	206
Şekil 260. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.....	206
Şekil 261. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.....	207
Şekil 262. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.....	207
Şekil 263. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.....	208
Şekil 264. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....	208
Şekil 265. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) IL6 mRNA seviyesine olan etkisi.....	209
Şekil 266. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....	209

Şekil 267. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.....	210
Şekil 268. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.....	210
Şekil 269. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PLP mRNA seviyesine olan etkisi.....	211
Şekil 270. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.....	211
Şekil 271. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) STAT mRNA seviyesine olan etkisi.....	212
Şekil 272. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) TNF mRNA seviyesine olan etkisi.....	212
Şekil 273. Rutin'in hücre canlılığına etkisi.....	213
Şekil 274. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) APP mRNA seviyesine olan etkisi.....	214
Şekil 275. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....	214
Şekil 276. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.	215
Şekil 277. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.	215
Şekil 278. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.	216
Şekil 279. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.	216
Şekil 280. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....	217
Şekil 281. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....	217
Şekil 282. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.....	218

Şekil 283. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.	218
Şekil 284. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PLP mRNA seviyesine olan etkisi.	219
Şekil 285. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.	219
Şekil 286. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) SOD mRNA seviyesine olan etkisi.	220
Şekil 287. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) TNF mRNA seviyesine olan etkisi.....	220
Şekil 288. Oleanolik asitin hücre canlılığına etkisi.....	221
Şekil 289.Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) APP mRNA seviyesine olan etkisi.....	222
Şekil 290. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) C1S mRNA seviyesine olan etkisi.....	222
Şekil 291. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....	222
Şekil 292. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.	223
Şekil 293.Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.	223
Şekil 294. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GFAP mRNA seviyesine olan etkisi..	224
Şekil 295. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GNAI mRNA seviyesine olan etkisi..	224
Şekil 296. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....	225
Şekil 297. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....	225
Şekil 298. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi	226

Şekil 299. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) NFKB mRNA seviyesine olan etkisi.....	226
Şekil 300. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PLP mRNA seviyesine olan etkisi.....	227
Şekil 301. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PTPN mRNA seviyesine olan etkisi.....	227
Şekil 302. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) TNF mRNA seviyesine olan etkisi.....	228
Şekil 303. Ursolik asitin hücre canlılığına etkisi.....	229
Şekil 304. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) APP mRNA seviyesine olan etkisi.....	229
Şekil 305. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) C1S mRNA seviyesine olan etkisi.....	230
Şekil 306. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi.....	230
Şekil 307. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi.....	231
Şekil 308. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi.....	231
Şekil 309. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GFAP mRNA seviyesine olan etkisi.....	232
Şekil 310. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GNAI mRNA seviyesine olan etkisi.....	232
Şekil 311. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi.....	233
Şekil 312. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MAG mRNA seviyesine olan etkisi.....	233
Şekil 313. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi.....	234
Şekil 314. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) APP mRNA seviyesine olan etkisi.....	234

Şekil 315. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PLP mRNA seviyesine olan etkisi.....	235
Şekil 316. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PTPN mRNA seviyesine olan etkisi	235
Şekil 317. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) TNF mRNA seviyesine olan etkisi.....	236
Şekil 318. Tüm genom transkriptom analizlerinden hasta modeli DEA ve MSCov uygulaması ile değişik ifade edildiği tanımlanan transkriptlerin DAVID veri bankası kullanılarak elde edilen yolak analizleri.....	254
Şekil 319. Antijen işleme ve sunumu yolağında DAE modelinde baskılan 23 genden 12 tanesinin MSCov uygulaması ile tekrar artırılması	256
Şekil 320. Oleanolik asit (OA) ve ursolik asit (UA) karşılaştırmalı kimyasal yapıları	261

ÖZET

Multipl Skleroz (MS), hala etiyolojisi tam olarak bilinmemekle beraber genetik ve çevresel faktörler tarafından tetiklenen, immun bozukluğunun neden olduğu, merkezi sinir sisteminin kronik, enflamatuar ve demiyelizan bir hastalığıdır. Günümüzde MS tedavisi için kullanılan mevcut olan ilaçların kullanımları ile karşılaşılan sıkıntı, tam tedavi etmeni olmamaları ve yan etkilerden dolayı, MS için alternatif tedavi ajanlarının saptanması ve ilaç geliştirilmesi çalışmaları devam etmektedir. Bu kapsamda, projede öncelikle *Capparis ovata* bitkisinden elde edilen ekstre (MSCov) veya *Capparis ovata* bitkisinden doğrudan elde edilen ekstratlar çeşitli ekstraksiyon ve kromatografi teknikleri uygulanarak alt fraksiyonlar ve saf bileşikler elde edildi. Hem ana ekstre MSCov ile ve hem de alt fraksiyonlar ile multipl skleroz deneysel hayvan modeli olan DAE oluşturduğumuz CL57BL/6 farelerde, klinik skorlama, moleküler gen ifade değişkenlikleri, toksikolojik etki belirleme, histolojik ve immünohistokimyasal inceleme ve takipleri, tüm genom transkriptom analizleri gerçekleştirildi. Özellikle ana ekstre MSCov ile tedavi edilen DAE hayvanların hem klinik skorlar ve hem de moleküler gen ifade düzeyleri hastalığın kontrol hayvanlara benzer şekilde geri dönüştürüldüğünü teyit etti. Ayrıca histolojik ve immünohistokimyasal verilerimiz, DAE hayvanlarda tespit edilen miyelin tabakasındaki deformasyonların ve immünolojik tanılarının, MSCov uygulaması ile büyük oranda iyileştirildiği ve immünreaktivite kontrol skorlara yaklaştığını gösterdi. Bu ekstrenin olası yan etkilerini tanımlamak için yapılan toksikolojik gen profillemeye çalışmamız MSCov'un 500 mg/kg/gün dozda güvenilir olduğunu, önemli bir yan etki oluşturmadığını destekledi. Bu verilerimiz Tüm genom transkriptom analizleri ile de teyit edildi. DAE hayvanlarda bağışıklık yanıtı ile ilgili yollarda ifade düzeyleri artan transkriptlerin MSCov uygulamaları ile tekrar baskılandığını gösterildi. Ancak elde edilen alt ekstratların hiç birisi ile ana ekstreye benzer sonuçlar elde edilemedi. Bu nedenle, MSCov ile gözlenen bu iyileştirici etkilerin içerdiği çok farklı bileşenlerin pleiotropik etkileri olduğu; fraksiyonlama da birlikte pozitif etki oluşturan bileşenlerin bir birinden ayrılması yada kompleks yapılarının bozulması nedeni ile etkilerinin kaybolduğu önerilmektedir.

Capparis ovata bitkisinden yada ana MSCov ekstresinden proje kapsamında 8 bileşik [glukokapparin, β -sitosterol, 5 β ,6 β -epoksikolestan, 3 β -ol, 5 α ,6 α -epoksikolestan, 3 β -ol, stigmast-5,22-dien-3 β -ol, miristat, olean-12-en-28-ol, 3 β -pentakosanoat (yeni), Bis-(3-metiloktil) fitalat (yeni), 1H-indol-, 2-hidroksi, 3-karboksilik asit (yeni)] saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Bu bileşiklerin miktarları yeterli olmadığı için hayvan deneyleri yerine *in vitro* hücre kültüründe etkileri araştırılmıştır. Bu modellerde yapılan deneyler olean-12-en-28-

ol, 3 β -pentakosanoat bileşiminin, hem immun baskılayıcı ve hem de miyelin oluşumunu tetikleyici etkiler göstermesi nedeniyle; MSCov ile gözlenen etkilerden sorumlu olabilecek, önemli bir terapötik ajan potansiyeli taşıdığı tespit edildi. Diğer bileşiklerin MS için etkin olma özellikleri oluşturmadığı saptandı.

Sonuç olarak, proje ile önerilen hedefler başarı ile gerçekleştirildi ve patent dahil yeni araştırmalara temel oluşturacak çıktılar üretildi.

Anahtar Kelimeler: Kapari, Capparis ovata, Multipl Skleroz (MS), MSCov, olean-12-en-28-ol, 3 β -pentakosanoat (OPC), Patofizyoloji, İzolasyon, Deneysel Alerjik Ensefalomyelit, Terapötik ajan, Alternatif ve Tamamlayıcı Tedavi

ABSTRACT

Multiple Sclerosis (MS), though its etiology is still unclear but is known to be triggered by genetic and environmental factors, is an immune disorder with inflammation and demyelination of central nervous system. Today, due to the incomplete cure and side effects of current drugs used for the treatment of MS, studies for the development of new and alternative therapeutic agents for MS is in progress. In this context, first the plant extracts obtained from *Capparis ovata* together with the *C. ovata* water extract (MSCov; the main extract) were further fractionated to isolate pure compounds by applying various extraction and chromatography techniques.

Both the main extract MSCov and sub-fractions were tested in experimental animal model of multiple sclerosis, ie., EAE on CL57BL/6 mice, by studying clinical scoring, differential gene expression at molecular level, toxicological effects, histological and immunohistochemical staining and whole genome transcriptomes. In particular, EAE animals treated with the main extract MSCov, the disease was ameliorated and returned to almost normal status which was confirmed with both clinical scoring and molecular gene expression analysis. This healing effect of MSCov was further supported strongly by histological and immunohistochemical studies showing that deformations in the myelin layer seen in DAE were largely improved by the application of MSCov. Also the immunological staining of brain sections showed that the immunoreactivity scores recorded with of DAE animals were returned to the control scores almost. Toxicological gene profiling studies to identify the possible side effects of MSCov have stated that the 500 mg/kg/day dose is likely reliable without significant side effects. Those effect of MSCov was further confirmed with the data obtained using whole genome transcriptome analysis. It has shown that MSCov application was increased the levels of the transcript which had been suppressed in DAE back to approximately normal levels and these transcripts are found to be mainly involved in immune responses. However, none of the sub-fractions obtained either from plant parts or from main MSCov extract showed similar results with the MSCov treatment. Therefore, the therapeutic effect observed with MSCov is pleiotropic and might be due the interactions of many different compounds and complexes contained in this extract, which were either separated from each other or deteriorated during fractionation procedures may have caused the loss of healing effect seen with the parent extract. In this study, eight compounds [glucucappain, β -sitosterol, 5 β , 6 β - epoxycholestane, 3 β -ol, 5 α , 6 α - from epoxycholestane, 3 β -ol, sigmast-5,22-dien-3 β -ol, myristate, olean-12-en-28-ol, 3 β -pentacosanoate (new), bis-(3-methyloctyl) phthalate (new), 1H-indole, 2-hydroxy, 3-carboxylic acid (new)] were purified either from MSCov or *Capparis ovata* plant parts and structurally elucidated. These compounds have been investigated using in vitro cell culture

methods due to of sufficient amounts for animal experiments. In these models, the analysis with olean-12-en-28-ol, 3 β -pentacosanoate (OPC) have exhibited both the immunosuppressive affects and trigger of myelin regeneration. It may be the agent responsible for those effects observed with MSCov treatment in DEA animals. Thus, it is suggested that OPC were identified as being potentially important therapeutic agent for MS treatment. On the other hand, other compounds were found to be non-effective for MS treatment.

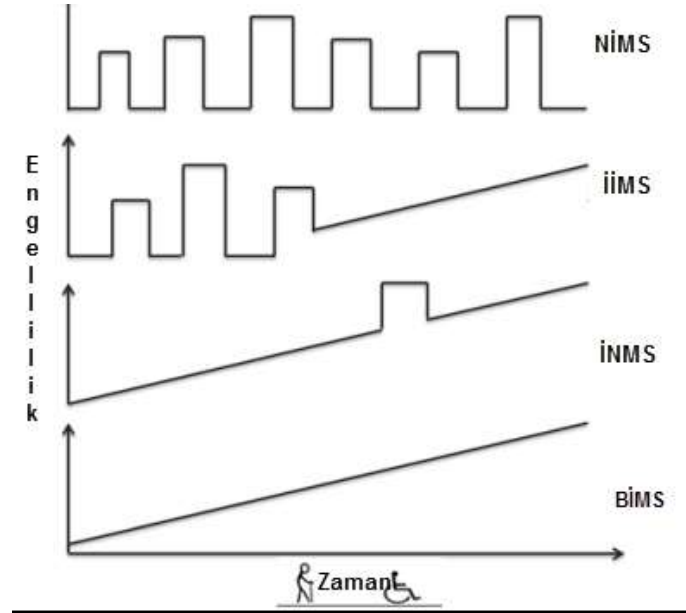
As a result, the project was successfully accomplished with the proposed targets and outcomes will form the basis for new research, including patented products.

Keywords: Caper, *Capparis ovata*, Multiple Sclerosis (MS), MSCov, Olean-12-en-28-ol, 3 β -pentacosanoate (OPC), Pathophysiology, Isolation, Experimental Allergic Encephalomyelitis, Therapeutic Agents, Alternative and Complementary Therapies

1 GİRİŞ

İlk olarak Carswell tarafından tanımlanmış olan Multipl Skleroz (MS), hala etiyojisi tam olarak netleşmemiş merkezi sinir sisteminin (MSS) kronik, enflamatuar ve demiyelizan bir hastalıdır (Compston ve Cole, 2002; Hicke, 1999; Szcucinski ve Losy, 2007). Özellikle genç erişkinleri etkileyen MS; MSS bozuklukları, görme bozuklukları ve motor bozukluklar ile karakterizedir (Mathew vd., 2013). Klinik belirtiler enflamatuar lezyonların oluşturduğu anatomik bölgeye ve akut demiyelinizasyon ve nöroaksonal yaralanma miktarına bağlı olarak heterojenlik gösterir (Polman vd., 2011). MS ile ilgili ilk bilgiler, Charles Prosper Ollivierd'Angers'in 1824 yılında yaptığı bildiriye dayanmaktadır. MS ile ilgili ilk makroskopik değişiklikler ise, "skleroz plak" tanımı Charcot tarafından 1868 yılında bildirilmiştir (Murray, 2009). Charcot hastalığı tanımlamış ilk patolojik sürecin miyelin yıkımı ile ortaya çıktığını ve miyelin kaybı olan alanlarda skleroz plakların oluştuğunu göstermiş ve hastalığa La Sclerose en Plaques adını vermiştir. MS'in hayvan modeli olan Deneysel Alerjik Ensefalomyelitin (DAE) 1932 yılında geliştirilmesi ile birlikte MS'in immün sistemin bir hastalığı olduğuna karar verilmiştir.

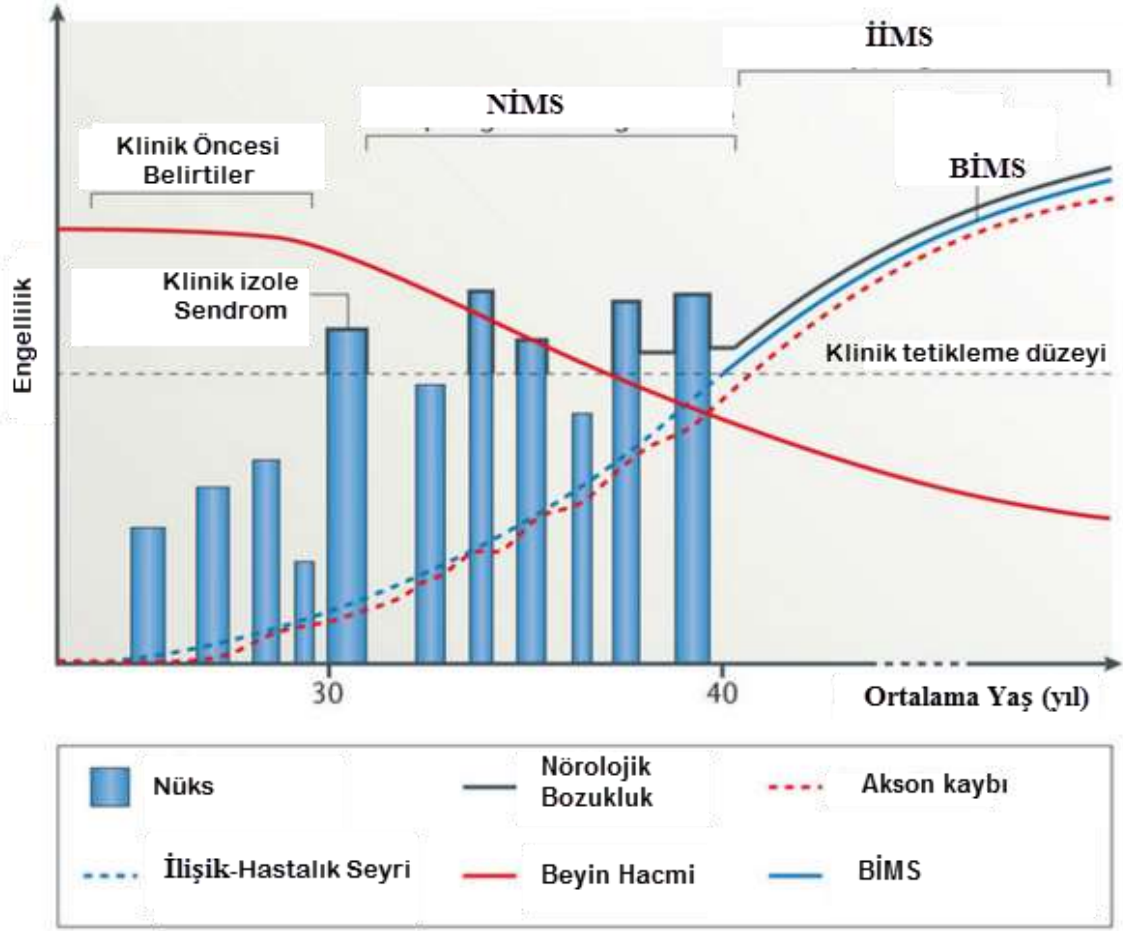
Hastalığın klinik sınıflandırılması büyük ölçüde hastalığın seyrine dayanmaktadır ve genel olarak 4 tipi vardır (Stauffer, 2006; Şekil 1):



Şekil 1. MS tipleri ve zamansal seyirleri

- i. Nükseden-İyileşen MS (Relapsing-Remitting MS - NİMS)
- ii. İkincil İlerleyen MS (Secondary-Progressive MS - İİMS)
- iii. Birincil İlerleyen MS (Primary-Progressive MS - BİMS)
- iv. İlerleyen-Nükseden MS (Progressive-Relapsing MS – İNMS)

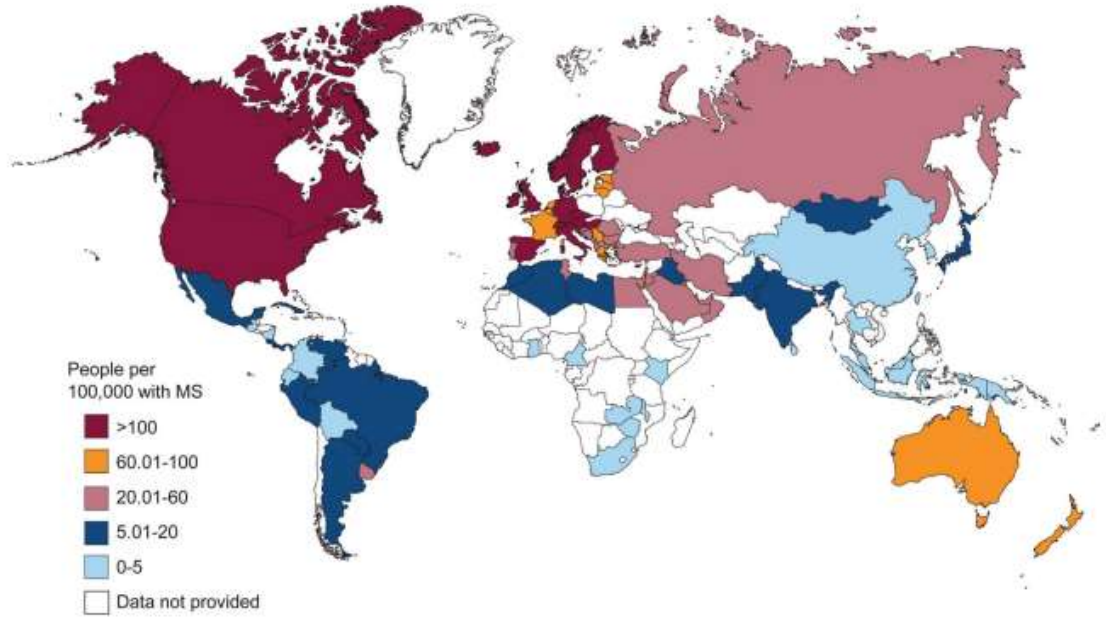
MS hastalığının kategorize edilmiş ve alt tipleri tanımlanmış olmasına rağmen, hastalığın seyri ve semptomları oldukça heterojendir. Bu karmaşıklık aşağıdaki Şekil 2’de ifade edilmektedir. Hastaların yaklaşık % 85’i en sık görülen formu NİMS tipinde olmasına rağmen, farklı hastalık belirtilerinin gerçekten nasıl teşhis edildiği ve bunun tek bir tip olarak sınıflandırılması gerçekten çok önemli bir zorluktur. Çünkü bu sınıflandırma farklı patofizyolojik mekanizmaların anlaşılması ve tedavi hedeflemesi üzerinde önemli etkileri vardır.



Şekil 2. MS hastalığının farklı tiplerinde hastalığın seyri ve semptomları.

MS dünyanın en yaygın nörolojik bozukluklarından biridir. Pek çok ülkede genç erişkinlerde trafik kazaları dışında meydana gelen nörolojik özürülüğün birinci nedenidir. Buna rağmen, MS epidemiyolojisi ve MS’li kişiler için gerekli kaynak ve hizmetlerin kullanılabilirliği hakkında küresel bilgi dünyanın birçok bölgesinde azdır (Browne, 2014). 2008 yılında Uluslararası MS Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından başlatılan ortak proje ile ilk dünya MS atlası

oluşturulmaya başlanmış ve 112 ülkeden toplanan bilgilerle bu konuda var olan bilgi açığını doldurilmaya çalışılmıştır.



Şekil 3. 2013 yılı küresel Multipl Skleroz prevalansı (Browne, 2014)

2008 yılında 2,1 milyon olan MS'li kişilerin tahmini sayısı 2013 yılında 200 bin kişi artarak 2,3 milyona ve günümüzde de bu rakam 2,5 milyona yükselmiştir (Compsten ve Cole, 2008; Dendrou vd., 2015). Bu rakamın daha da yüksek olduğu tahmin edilmektedir ve artış seyrinin yükselerek devam ettiği bildirilmektedir (Browne, 2014). Ülkemizde de 2008 yılına oranla MS prevalansı artmaktadır (Şekil 3).

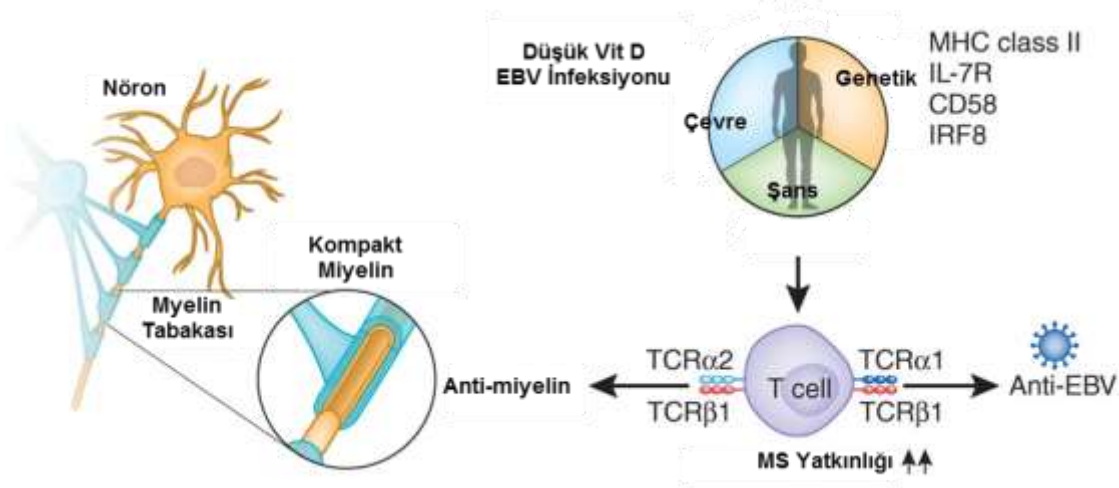
MS'in etiyolojisi tam bilinmemekle beraber genetik ve çevresel faktörler tarafından tetiklenen immün bozukluğun neden olduğuna inanılmaktadır (Ascherio ve Munger, 2007a,b). MS kalıtsal bir hastalık olmamasına rağmen, aynı aile içinde MS vakalarının görülebilirliği genetik bileşenlerle güçlü bir etkileşim olduğunu ortaya koyar niteliktedir. MS hastalarının birinci derece akrabalarında MS görülme riski normal popülasyonda görülme riskine (mutlak risk %2-5) göre 10-50 kat daha fazladır ki monozigotik ikizlerde risk yaklaşık üçte bir oranındadır (Weinshenker 1996; Kantarci 2008).

Tüm genom bağlantı analiz çalışmaları sayesinde MS ile ilişkili olduğu düşünülen birkaç gen lokusu belirlenmiştir. 1970'lerin başında belirlenen immün fonksiyonlarla ilişkili genleri kodlayan insan lökosit antijen kompleksi (HLA), ilk bulunan genetik risk faktörüdür (Jersild vd., 1972; Sawcer vd., 2011). Yakın zamanlarda yapılan çalışmalar ise HLA sınıf II uzantılı DRB1*1501, haplotipinin MS için oldukça güçlü bir genetik risk oluşturduğunu göstermektedir

(Oksenberg vd., 2004; Sawcer vd., 2011). Son zamanlarda interlökin 2 reseptör alfa geni (IL2RA) ve interlökin 7 reseptör alfa geni (IL7RA) alelleri de risk faktörleri olarak tanımlanmıştır (Hafler vd., 2007; Sawcer vd., 2011). Bunların yanı sıra bir dizi MS yatkınlığı ile ilişkili olan MHC olmayan gen/lokus tanımlandı (Sawcer vd., 2011).

Son yapılan tüm genom bağlantılı analiz çalışmalarında 14498 MS hastası ve 24091 sağlıklı kontrol örneklerde genotipleme dizi analizi yapılarak, 161311 otozomal varyantları taranarak 135 potansiyel MS ilişkili lokuslar belirlendi (Beecham vd., 2014). Bu genlerin çoğu (CXCR5, IL-2Ra, IL-7R, IL-12RB1, IL-22Ra2, IL-12A, IL-12B, IRF8, TNFRSF1A, TNFRSF14 ve TNFSF14, CD37, CD40, CD58, CD80, CD86, CLECL1, CBLB, GPR65, MALT1, RGS1, STAT3, TAGAP, TYK2) bağışıklık sistemi ile ilişkili olmasından dolayı, MS'in immün aracılı olduğunu desteklemektedir.

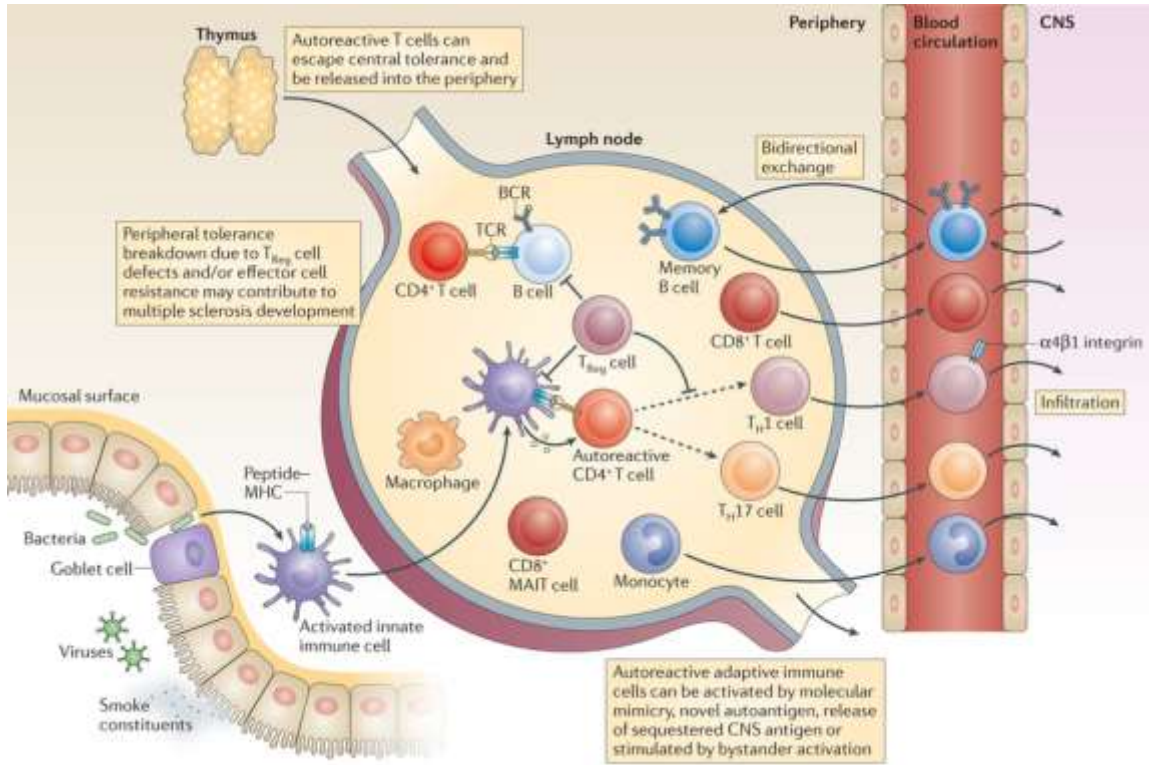
Bütün bunlara rağmen halen MS'e yatkınlığın altında yatan pek çok genetik faktör aydınlatılmamıştır. Dahası, genetik yatkınlık MS risk faktörlerinin tek başına nedeni değildir, bunun yanında çevresel faktörlerinde rol oynadığı bilinmektedir. Bu çevresel faktörler arasında D vitamini eksikliği ve Epstein-Barr virüs enfeksiyonunun MS oluşumu ile güçlü bağlantısı çalışmalarla gösterilmiştir (Ascherio ve Munger 2007a,b; Ransohoff, 2010) (Şekil 4). Sigara MS yatkınlığı için önemli bir başka çevresel risk faktörü olarak ortaya çıkmaktadır. Diğer risk faktörlerinde olduğu gibi, sigara, diğer genetik ve çevresel faktörler ile bağlantılı olarak MS'e yatkınlığı etkileyebilir (Wingerchuk, 2012).



Şekil 4. MS patolojisinde en önemli üç faktörün etkisi (Ransohoff 2010'dan revize edilmiştir).

Etiyolojisi tam olarak bilinmese de, çoğu kanıt hastalık oluşumunda otoimmün patojenezi destekler niteliktedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar MS'te otoimmün cevabın başlamasında miyelin spesifik CD4⁺ T hücrelerinin kritik rol oynadığını göstermektedir (Bielekova vd., 2000).

Merkezi tolerans oluşturulması sırasında timüs tarafından otoreaktif T hücreleri silinir. Ancak bu işlem mükemmel değildir. Zaman zaman bazı otoreaktif T hücreleri çevresel sisteme salınır. Sağlıklı bireylerde bu işleyiş periferik tolerans mekanizmaları ile kontrol altındadır. Ancak düzenleyici T hücrelerinin işlevlerinin baskılanması ve/veya efektör B ve T hücrelerinin artan dirençleri sayesinde bu mekanizmalar bastırılır. Böylelikle, merkezi sinir sistemi (CNS), otoreaktif T ve B hücreleri çevresel sistemde aktive olurlar (Şekil 5). Yukarıda bahsedilen enfeksiyöz ajanlar ve sigara gibi bileşenler de dahil olmak üzere, genetik ve çevresel faktörler, bu olaylara katkıda bulunur (Dendrou vd., 2015).

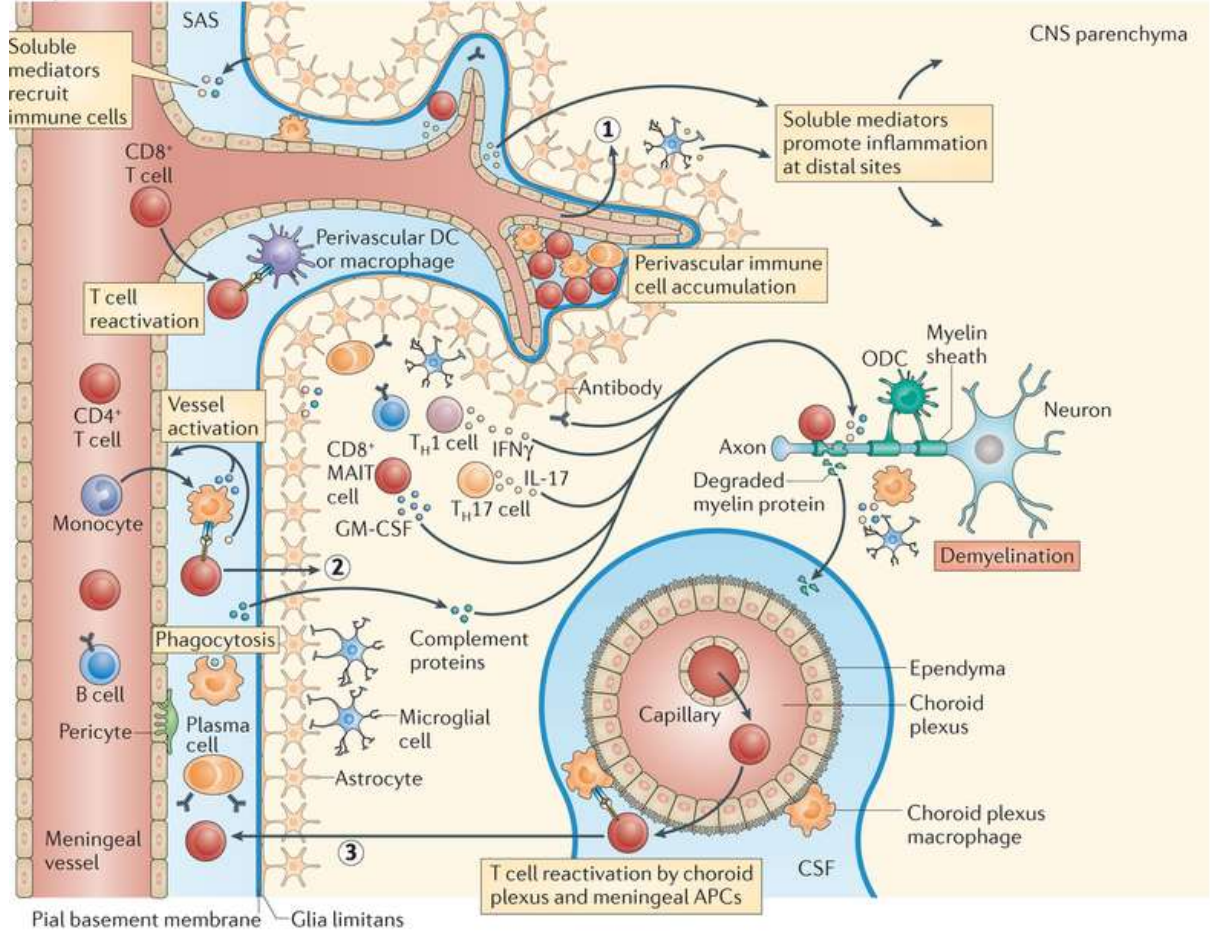


Şekil 5. MSS dışında bağışıklık sisteminin düzensizlikleri ve otoreaktif T ve B hücrelerin çevresel sistemde aktive olmaları (Dendrou vd., 2015'ten alınmıştır).

Aktif hale gelen CD8+ T hücreleri farklılaşmış CD4+ yardımcı T1 (Th1) ve TH17 hücreleri, B hücreleri ve doğal bağışıklık hücreleri, MSS'ne sızabilir (infiltrasyon)ve enflamasyon ve doku hasarına yol açar (Bielekova vd., 2004; Goverman, 2009; Henaka vd., 2014). Periferden MSS'ine immün hücre infiltrasyonu, beyin zarı kan damarlarında kan-beyin bariyerinin doğrudan geçişiyle, subaraknoid boşluk üzerinden veya kan-beyin-omurilik sıvısı (CSF) bariyeri boyunca koroidpleksus üzerinden olabilir.

Bu hücreler perivasküler alanlarda birikir ve merkezi sinir sistemi (MSS) parenşimasına girerler. Aktive olan MSS-yerleşik mikroglia ve astrositler ile birlikte bu giren hücreler, doğrudan hücre teması ilişkili mekanizmalar vasıtasıyla ve çözünür enflamatuar ve nörotoksik araçların

etkimesi ile oligodendrosit (ODC) hasarı, demiyelinasyon ve nöroaksonal yaralanmaları tetiklerler (Şekil 6). Hastalığın ilerleyen sürecinde bu hasarlar skleroz adı verilen plakların oluşumuna neden olur (Wu ve Tsirka, 2009, Mikita vd., 2011).



Şekil 6. MSS içinde bağışıklık sistemi bozuklukları ve MSS içerisine bağışıklık sistemi hücrelerinin infiltrasyonu neticesinde enflamatuar multipl skleroz oluşumu (Dendrou vd., 2015'ten alınmıştır). (APC=antijen sunan hücre; CD8+=MAIT hücresi, CD8+=T hücresi değişmez mukoza ilişkili; FDC=foliküler dendrit hücresi; IFN γ =interferon- γ ; IL-17=interlökin-17; NO=nitrik oksit; RNS=reaktif nitrojen türleri; ROS=reaktif oksijen türleri; TH1 hücre=T yardımcı 1 hücre)

MS'in hayvan modeli olan, miyelin proteini bileşenleri ile periferel immünizasyon yoluyla indüklenebilen, MSS enflamatuar demiyelinasyonu ile oluşan deneysel alerjik ensefalomyelit (DAE) ile yapılan çalışmalar sayesinde hastalığın immünopatojenezini ortaya çıkarmaya yönelik pek çok çalışma yapılmıştır. DAE aktif demiyelinizasyon, oligodendrosit ve akson kaybı ile gerçekleşir ve MS histolojik özelliklerini gösterir (Yong, 2004; Gold vd., 2006). DAE proteolipid protein (PLP), miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG) veya miyelin bazik protein (MBP) gibi miyelin türevli proteinler (veya peptidleri) ile hayvanların immünize edilmesiyle indüklenir ve büyük ölçüde miyelin spesifik CD4⁺-T hücreleri tarafından yürütülür (Fujinami ve

Oldstone, 1985; Gran vd., 1999; O'Connor vd., 2001). İmmünizasyondan sonra sekiz veya dokuzuncu günlerde MSS'e infiltre olan T hücreleri IL-17 ifade etmeye başlar (Korn vd., 2007). IL-17'nin farklı etkileri vardır; bunlar arasında matriks metalloproteinazların (MMP1, MMP3, MMP9, MMP13) ve IL6 gibi bazı sitokinlerin ve bir grup kemokinlerin (CCL2, CCL7, CCL2, CXCL1, CXCL2ve CXCL5) salınımı vardır. Ayrıca kan beyin bariyerinin (KBB) geçirgenliğinin bozulmasına da neden olur (Huppert vd., 2010).

MS tedavisinde günümüzde kullanılmaya devam edilen immünmodüler terapi ajanları olan glatiramer asetat ve natalizumab DAE çalışmalarından geliştirilmiştir (Sela vd., 1990; Yednok vd., 1992). Bununla birlikte, günümüzde MS'in semptomatik tedavisinde kullanılan yedi adet FDA tarafından onaylanmış, hastalığı modifiye edici ilaç bulunmaktadır ve bunlar da yine benzeri çalışmalar ile geliştirilmiştir. Ancak bugün çevresel faktörler tarafından genetik olarak hassas olan kişilerde tetiklenen "karmaşık karakterli" olarak kabul edilen MS için hala tamamen etkin bir tedavi yöntemi yoktur.

İnterferon beta (IFN β) son 20 yılda NİMS tedavisi için en yaygın olarak kullanılan terapötik olmuştur. Klinik çalışmalarda nüks oranı %30 azalma göstermiş (Paty ve Li, 1993; Jacobs vd., 1996; Kulakowska ve Drozdowski, 2014) olmasına rağmen, sakatlık-engellilik oluşumunu azaltması açısından uzun vadeli faydası tartışılmaktadır. Glatiramer asetat MBP'nin en yaygın dört amino asidini içeren rastgele bir peptid oluşumudur ve dünya çapında çok sık kullanılan bir MS immün modülatör tedavi ajanıdır (Caporro vd., 2014; Johnson vd., 1995). Tedavi edici etkinliği düşüktür. Natalizumab, lenfositlerin KBB'den MSS'ne ve diğer dokulara göçü için gerekli olan α 4 β 1 ve α 4 β 7 integrinlerinin önemli bir bileşeni olan α 4-integrin alt birimine bağlanır ve etkili bir tedavi ajanıdır (Havrdova vd., 2009). Ancak Natalizumab tedavisinde MS hastalarında progresif multi fokal lökoensefalopati (PML) şeklinde ciddi yan etkiler görülmüştür. Özellikle uzun tedavi süresi PML riskini arttırmaktadır (O'Connor vd., 2011; Sorensen vd., 2012). Natalizumab tedavisi kesildiğinde, hastalık seyrinin başlangıç seviyesine döndüğü görülmüştür (O'Connor vd., 2011).

Fingolimod ilk oral MS ilacıdır. *Isarias inclairii* mantarından izole edilmiştir. Fingolimod lenf nodlarından lenfosit çıkmasını engelleyen sfingozin 1-fosfat (S1P) reseptörünü modüle eder. Fingolimod doğal sfingozinin yapısal bir analogudur. S1P, enflamasyon ve onarımda önemli rol oynayan doğal bir biyoaktif sfingolipittir. Fingolimod lenfositler üzerindeki S1P1 reseptörlerini baskılayarak, lenf nodlarından lenfositlerin çıkışını önler. Bu da otoreaktif T- ve B-lenfositlerinin MSS gibi enflamasyon bölgelerine göçünü engeller (Massberg ve vonAndrian, 2006; Mehling vd., 2011). Hastalarda nüks oranı yaklaşık % 50 azalmıştır ve engellilik ilerlemesini yavaşlattığı bildirilmektedir (Kappos vd., 2010). Kalp krizi riski, yüksek karaciğer

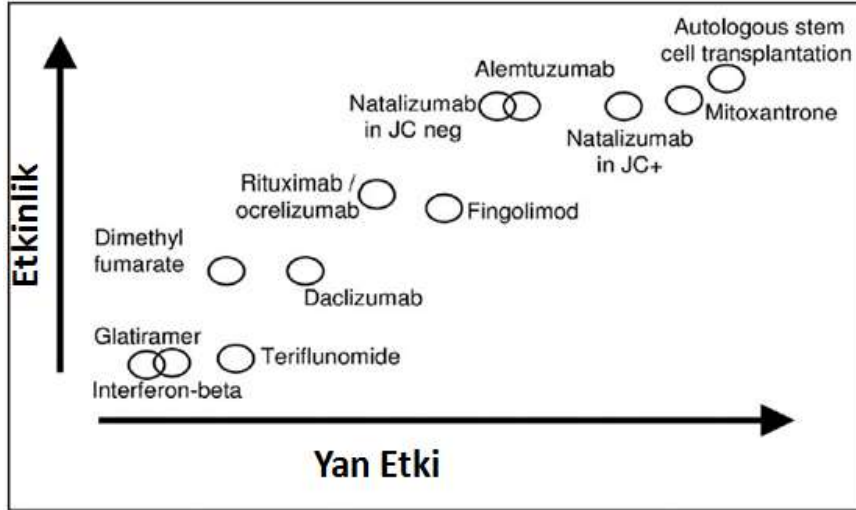
enzim düzeyleri, hipertansiyon ve cilt kanseri önemli yan etkileridir (Kappos vd., 2010; Cohen vd., 2010).

Mitoksantron bağışıklık sistemini baskılayıcı ve düzenleyici özelliği olan bir ilaçtır. Mitoksantron lenfosit proliferasyonunu engelleyen DNA sentezi ve topoizomerez II enzim inhibisyonu ile DNA onarımını bozarak etki gösterir. Mitoksantron IFN- γ , TNF- α , ve IL-2 salgılanması azaltır ayrıca B lenfositlerinin ve monositlerin apoptoza gitmesine neden olur (Lenk vd., 1987; Rosenberg vd., 1986; Fidler vd., 1986; Bellosillo vd., 1998). Ciddi yan etkileri yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Crossley ,1984; Martinelli vd., 2009; Ghalie vd., 2002).

Teriflunomid MS tedavisi için son onaylanan oral ilaçtır ve pirimidin sentezini inhibe ederek özellikle hızla çoğalan lenfositler gibi hücreler için çok önemli olan DNA sentezini inhibe ederek etki gösterir. Metodolojik olarak hızla çoğalan ve miyelini hedefleyen efektör hücrelerinin inhibisyonu ve dolayısıyla güçlü bir immün yanıtın bloke edilmesi, mitoksantron etkisine benzerdir. (O'Connor vd., 2011; Miller vd., 2012). Önemli yan etkileri arasında ishal, kusma, karaciğer enzim düzeylerinde yükselme görülür.

MS tedavisi için kullanılan başka bir oral ilaç fümariik asitin bir esteri olan dimetilfumarattır. Dimetilfumaratla yapılan DAE çalışmaları kan beyin bariyeri üzerindeki aktive lökosit göçünün azaldığını göstermiştir. Dimetilfumaratın nöron koruyucu etkisi de vardır. Genellikle iyi tolere edilmekte, deri döküntüleri ve ishal, bulantı, karın ağrısı gibi gastrointestinal olaylar sık bildirilen yan etkilerdir. Halen kullanılabilirliği ve yan etkileri ile ilgili yeterli veri yoktur (Lee vd., 2008; Moharregh-Khiabani vd., 2009).

1993 öncesi hiçbir etkili MS ilacı yoktu ve hastaların büyük çoğunluğu önemli sakatlıklar ve kalıcı hasarlara maruz kalıyordu. Bununla birlikte günümüze kadar yapılan çalışmalar neticesinde artık oral kullanılan ilaçlar dahi olmasına rağmen halen hastalığın kesin tedavisi yoktur ve çalışmalar halen devam etmektedir. Buradan yola çıkarak şu ana kadar kullanılan ilaçlar arasında etkinliği iyi olup yan etkisi az olan bir ilaç halen yoktur (Coles, 2015). Bununla birlikte, günümüzde MS'in semptomatik tedavisinde kullanılan, hastalığı modifiye edici ilaçlar etkinlik, güvenilirlik yönünden dikkate alınmalıdır (Şekil 7).



Şekil 7. Etkinlik ve güvenilirliğine göre multipl skleroz için kullanılan ilaçların sınıflandırılması (Coles, 2015)

İlaç kullanımlarında görülen yan etkiler ve ekonomik nedenler hastaların alternatif ve tamamlayıcı tıp arayışlarına yönelmesine neden olmaktadır. Kullanılan tıbbi ilaçların yanında Almanya’da yapılan bir araştırmada hastaların yaklaşık %62 oranında tamamlayıcı ve alternatif ürünlere yöneldiği gösterilmiştir (Apel vd., 2005). Alternatif tedavi için halk arasında kullanılan bir bitki de *Capparis ovata*’dır.

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 vd., 2006; Ölmez, 2011). Kapari, Capparidaceae familyasının en geniş iki cinsinden biri olup, dünya üzerinde 350 tür ile temsil edilmektedir. Türkiye’de *Capparis ovata* ve *Capparis spinosa* türleri bulunmaktadır. Arkeolog Krügerin araştırmasına göre, 7800 yıldan beri bu bitki bilinmektedir. Aristo ve Hipokrat zamanlarında da (M.Ö. 384-322, M.Ö. 400), bu bitkiden söz edilmektedir. Kapari Akdeniz mutfağının mevsimsel malzemelerinden olup özellikle İspanya, Fas ve İtalya tarafından ihraç edilmektedir. Son yıllarda Türkiye’den de Avrupa ülkelerine kapari ürünlerinin ihracatı başlamıştır. Halk arasında analjezik, diüretik, yara iyileştirici ve hücre yenileyici olarak kullanılan kapari bitkisinin tomurcuk ve yaprakları da ilaç ve kozmetik sanayide kullanılmaktadır (Bağcı ve Şimşek, 1998).

Kaparinin tomurcuklarında lipid, alkaloid, bazı glukozinolatlar ve antioksidan özelliği bulunan flavonoid ve diğer polifenoller bulunur. Rutin ise en sık rastlanan flavonoiddir. Ayrıca yapılan çalışmalarda metanolik ekstraktlarının de antioksidan özellikleri gösterilmiştir (Tesoriere vd., 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 vd., 2006; Angelini vd., 1991).

Yapılan çalışmalarda kapari ekstrelerinin hidrojen donörü olarak görev yaptığı, lipid radikallerle reaksiyon vererek antioksidan özellik gösterdiği kanıtlanmıştır. Ayrıca metanolik ekstraların demir oto-oksidasyonunu artırarak ferröz demiri ferrik hale dönüştürerek hidroksil radikal oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir ve antioksidan özelliğinin içerdiği fenollere bağlı olduğu düşünülmektedir (Germano vd., 2002). Ayrıca Kapari ekstrelerinin anti-enflamatuar özellikleri çeşitli çalışmalarda kanıtlanmıştır (Agel vd., 1986; Al Said vd., 1988).

Yukarıda belirtildiği gibi mevcut olan ilaçların kullanımları ile karşılaşılan sıkıntı ve yan etkilerden dolayı, MS için alternatif tedavi ajanlarının saptanması ve ilaç geliştirilmesi çalışmaları devam etmektedir. Bu kapsamda biz de, proje öncesi yürüttüğümüz çalışmalarda [KOSGEB Proje No: 2011/1-3] geliştirdiğimiz kapari sulu ekstresi (MSCov) ile yaptığımız araştırmalarda DAE oluşturulmuş CL57BL/6 farelerde ciddi düzeyde koruyucu ve iyileştirici etkiler saptamıştık. Bu çalışmalar hayvan deneylerinin yanı sıra insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) paralel olarak yürütüldü. Bu proje kapsamında, hem kapari sulu ekstresi ve hem de işlenmemiş bitki bölümlerinin (kök, yaprak, gövde, tomurcuk ve meyve) alt fraksiyonlara ayrıştırılarak MS üzerine etkilerinin saptanması ve bu etkilerden sorumlu olabilecek aktif madde tanımlaması çalışmalarının gerçekleştirilmesi hedeflendi

2 MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Mycobacterium tuberculosis H37Ra (Difco), Miyelin Oligodendrocyte Glycoprotein Peptide Fragment 35-55 Rat, Mouse (Anaspec, 60130-5), Pertussis toxin from Bordetella pertussis (Sigma, P7208), Qiagen RNeasy Plus Universal Kit (73404), RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, 78804), RT2 First Strand Kit (Qiagen, 330401), Easy Script Plus cDNA sentez kiti (Abm, G236)Kilogreen 2X qPCR Mastermix (MasterMix-KS), Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM:F-12) (Sigma, D6421), Fetal Bovine Serum (Sigma, F9665), penisilin/streptomisin (Sigma, P4333), Trypsin-EDTA Solution (Sigma, T4049), 100 bç DNA ladder (Fermentas, SM0323), 6X DNA izleme boyası (10mM Tris-HCL, %0,03 Bromfenol Blue, %0,03 Ksilen siyanol FF, % 60 gliserol, 60 mM EDTA ile 10 ml olacak şekilde hazırlandı), Agaroz (Sigma, A9539), Asetik asit (Sigma, 27225), Bromfenol Mavisi (Sigma, B6131), Trizma Base (Sigma, A2264), Ksilen siyanol FF (Sigma, X4126), DEPC (Sigma, D5758), EDTA (Sigma, 03620), Etanol (Riedel, 071029) (% 70 konsantrasyonunda etanol kullanılmıştır), Etidyum bromür (Sigma, E8751), Freund's adjuvant complete (Sigma, F5881), Gliserol (Sigma, G2289), Ketamin, Kloroform (Sigma, C2432), Ksilazin, Luxol Fast Blue Kluver Barrera (04-200812), Anti-MBP 1/100 (Santa Cruz Biotechnology, SC-71546), Entellan (Merck, UN 1866), Anti-MAG 1/100 (bs-0257R, Bioss), Diaminobenzidin (DAB)(Sigma, S3939), Mayer's hematoksilen (MHS1), Anti-CD45 1/100 (Abcam, ab25386), Luxol Fat Blue (Sigma, L0294), Toluidine Blue (Sigma, 89640), Formaldehyde (Sigma, F8775), Kafeik asit (%98, Sigma-Aldrich), Elajik asit (95%, Sigma-Aldrich), Fumarik asit (99%, Sigma-Aldrich), Gallik asit (97%, Sigma-Aldrich), Herniarin (90%), Izoramnetin (98 %, ExtraSynthese, Genay-France), Kampferol (90%, Sigma-Aldrich), Kampferol-3-O-Rutinosit (98%, Sigma-Aldrich), Luteolin (%98, Sigma-Aldrich), Penduletin (90%), Pirogallol (90%, Sigma-Aldrich), Kersetin (95%, Sigma-Aldrich), Rosmarinik asit (95%, Sigma-Aldrich), Rutin Hidrat (95%, Sigma-Aldrich), Sirinkjik asit (95%, Sigma-Aldrich), Ursolik asit (95%), Vanilin (95%, Cambrigde Isotope Laboratories), p-kumarik asit (98%, Sigma-Aldrich), t-ferulik asit (95%, Sigma-Aldrich).

2.2 Metot

2.2.1 MSCov Ekstresinin Hazırlanması

Deneylerde kullanılan *Capparis ovata* meyve, tomurcuk ve çiçek materyali Aşçı Murat Kapari Tatlı Dondurma Turşu İml. ve İhr. Ltd. tarafından sağlandı. Bu bitkisel ürünler Mayıs 2012 ayı başlangıcından Eylül 2012 sonuna kadar ki süreçte hem doğal ortamlardan hem de bitkinin

tarımı yapılan arazilerden toplanmıştır. Kapari sulu ekstresinin hazırlanması Türkiye Patent Enstitüsü, PT 2012/04 093 belge de tanımlandığı şekilde yapıldı. Hiçbir kimyasal kullanmadan, insanların doğal olarak kullandığı şekliyle %100 doğal ekstre hazırlandı.

2.2.2 MSCov Ekstresinin Fraksiyonlanması

2.2.2.1 *Capparis ovata* bitkisinin sulu ekstresi (MSCov) ve bitkinin her bir kısmı için (meyve, çiçek ve diğer toprak üstü kısımları ile kök) diğer ekstrelerin hazırlanması

C. ovata direkt su ekstresinin (MSCov) ve bundan organik çözücülerle tüketilerek geri ekstraksiyon ile diğer ekstrelerinin hazırlanması,

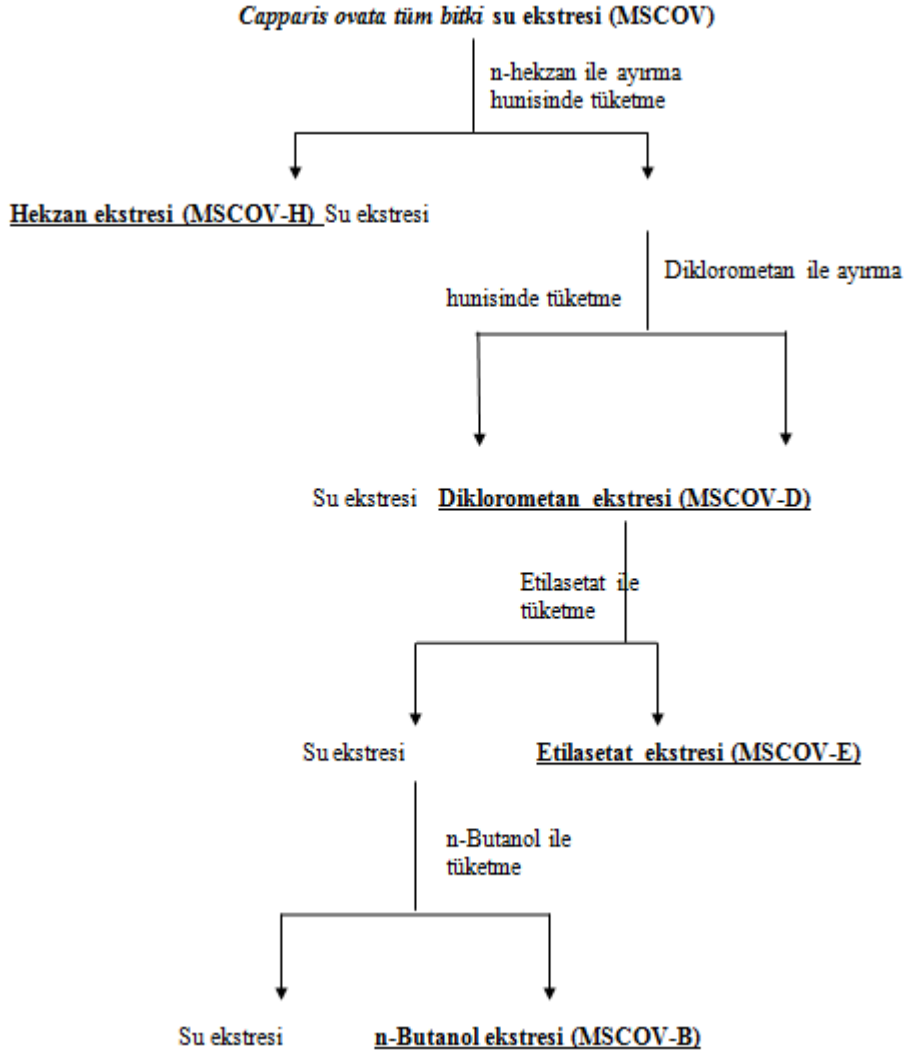
C. ovata sulu metanol ekstrelerinin hazırlanması,

C. ovata bitkisinin her bir kısmından ayrı ayrı direkt hekzan-diklorometan ekstrelerinin hazırlanması,

Yukarıdaki tüm ekstreler hazırlandıktan sonra aktivite testleri yapıldı ve bunlardan bazıları silika jel kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırıldı.

2.2.2.1.1 *Capparis ovata* Direkt Su Ekstresinin (MSCov) ve Bundan Organik Çözücülerle Tüketilerek Geri Ekstraksiyon İle Diğer Ekstrelerinin Hazırlanması

Capparis ovata Desf. Bitkisinin tüm kısımları bir arada (çiçek, yaprak, tomurcuk, meyve, kök) direkt su ile ekstre edildi (MSCov). MSCov ekstresi az bir miktarı aktivite testleri için ayrıldı. Su ekstresinden geri ekstraksiyon yöntemiyle hekzan, diklorometan, etilasetat ve butanol ekstreleri hazırlandı (Şekil 8). Bu ekstrelerde biyolojik aktivite çalışması yapıldı.



Şekil 8. MSCOV ekstresinden geri ekstraksiyon yöntemiyle alt ekstrelerin eldesi.

2.2.2.1.2 *C. ovata* Sulu Metanol Ekstrelerinin Hazırlanması

Toz haline getirilen *Capparis ovata* (CO) bitkisinin tomurcuk, meyve, kök, yaprak, çiçek kısımları gösterildiği gibi ayrı ayrı masere edildi. Tomurcuk, meyve, kök, yaprak, çiçek kısımları sulu metanol (8:2 Metanol/su) ile 4 gün masere edildi, yani oda sıcaklığında ekstraksiyon yapıldı.

C. ovata Bitkisinin Her Bir Kısımından Ayrı Ayrı Hekzan-Diklorometan Ekstrelerinin Hazırlanması

Toz edilen bitkinin çok apolar yağsı bileşiklerini ayırmak için bitkinin her bir kısmı (tomurcuk: 1792 g, meyve: 1280 g, çiçek: 222 g, yaprak: 420 g, kök: 935 g) ayrı ayrı hekzan-diklorometan ile tüketilerek ekstreleri hazırlandı.

2.2.3 Ekstrelerin Antikolinesteraz Aktivitelerinin Araştırılması

Ekstrelerin antikolinesteraz aktiviteleri asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BChE) enzimlerine karşı Ellman metoduyla (Ellman vd., 1961) *in vitro* olarak incelendi.

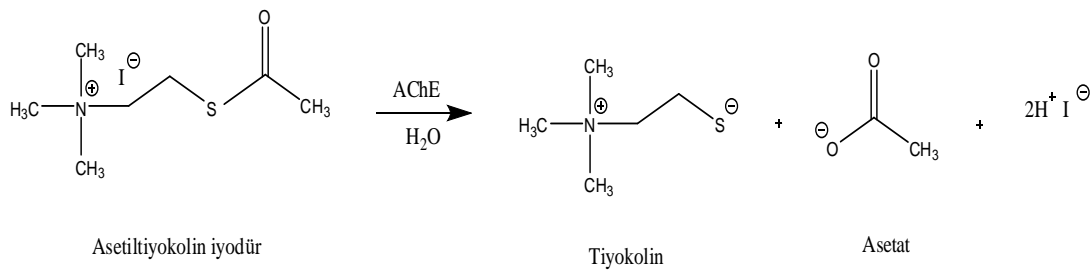
Alzheimer demansla seyreden nörodejeneratif bir hastalıktır ve diğer Parkinson, MS ve benzeri nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisi araştırılmaktadır (Pike vd., 1993; Muller vd., 2013). Bilindiği gibi günümüzde Alzheimer hastalığının tedavisinde en çok asetilkolinesteraz inhibitörleri, özellikle de bitkisel kökenli bileşikler (galantamin gibi) kullanılmaktadır (Munoz-Torrero vd., 2008; Zhang vd., 2006). Bu nedenle ve daha önceki çalışmalarımıza dayanarak (Kıvrak vd., 2009; Öztürk vd., 2011) ekstrelerin antikolinesteraz aktivitelerinin araştırılmasının anlamlı olacağını düşündük ve ekstrelerin asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz enzimlerine karşı inhibisyonu araştırıldı.

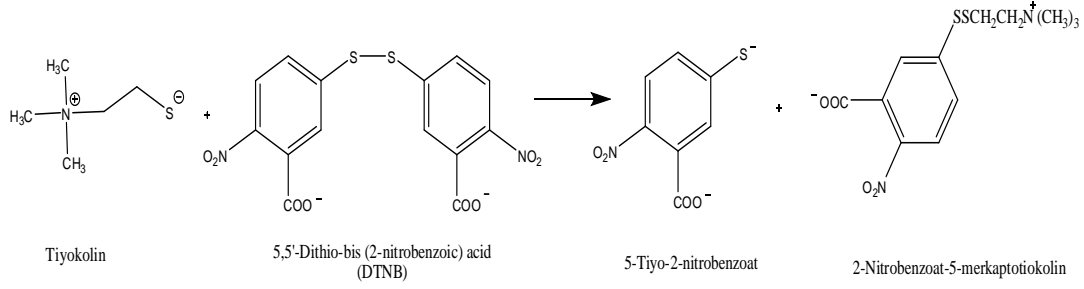
2.2.3.1 Ellman Metodu

Bu metot asetilkolinin sulu ortamda AChE enzimi tarafından tiyokoline parçalanmasından sonra bu tiyokolin'in 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) bileşiği ile reaksiyonu sonucu verdiği sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunun kolorimetrik olarak ölçümüne dayanır. Bu amaçla önce tampon çözelti ve numuneler (aktivitesi incelen örnek çözeltiler) mikropalakaya ilave edilir. Sonra AChE enzimi mikropalakalara eklenerek 25°C de 10 dak. inkübe edilir ve absorbanslar 412 nm de ölçülür, ardından DTNB ve substrat ilave edilerek 412 nm de tekrar ölçümler yapılır ve özel bir bilgisayar programının yardımı ile sonuçlar değerlendirilerek aktivite belirlenir (Ellman vd., 1961). Aynı şekilde BChE ve onun substratı ile BChE aktivite testi gerçekleştirilir.

2.2.3.2 AChE İnhibisyonu Aktivite Testi

Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak asetilkolinesteraz enzimi, substrat olarak ise asetiltiyokolin iyodür kullanılmaktadır. Reaksiyon Şekil 9'da gösterilmektedir:





Şekil 9. Asetilkolinesteraz inhibisyon reaksiyonu

Reaksiyon sonunda oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunun konsantrasyonu 412 nm'de spektrofotometrede ölçüldü.

2.2.3.2.1 Reaktiflerin Hazırlanışı:

DTNB: 16 mg DTNB 1 ml fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü, 7.5 mg NaHCO₃ 1 ml fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü ve iki çözelti karıştırıldı. Daha sonra 2 ml pH=7 tamponu ile hacmi 4 ml'ye tamamlandı. Kullanmadan önce 4 ml pH=8 tamponu eklendi.

Substrat: 32,8 mg asetilkolin iyodür 8 ml deiyonize suda çözüldü. Kullanmadan önce 8 ml pH=8 tamponu ile hacmi 16 ml'ye tamamlandı.

Enzim Çözeltisi: 0,2 mg asetilkolinesteraz enzimi 3 ml fosfat tamponunda (pH=8) çözünerek hazırlandı.

2.2.3.3 Butiril kolinesteraz (BChE) inhibisyonu aktivite testi

Butiril kolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak at serumundan elde edilen butirilkolinesteraz enzimi, substrat olarak ise butiril tiyokolin iyodür kullanılmıştır.

2.2.3.3.1 Reaktiflerin Hazırlanışı

DTNB: 16 mg DTNB 1 ml fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü, 7,5 mg NaHCO₃ 1 ml fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü ve iki çözelti karıştırıldı. Daha sonra 2 ml pH=7 tamponu ile hacmi 4 ml'ye tamamlandı. Kullanmadan önce 4 ml pH=8 tamponu eklendi.

Substrat: 4 mg butiriltiyokolin iyodür 8 ml deiyonize suda çözüldü. Kullanmadan önce 8 ml pH=8 tamponu ile hacmi 16 ml'ye tamamlandı.

Enzim Çözeltisi: 0,2 mg butirilkolinesteraz enzimi 1,8 ml fosfat tamponunda (pH=8) çözünerek hazırlandı.

Mikroplakadaki kuyucuklara 130 µl fosfat tamponu (pH =8),ekstrelerin metanol içinde 4000 ppm konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µl ve enzim çözeltisinden 20 µl konuldu ve 412 nm'de ilk absorbansları ölçüldü. 10 dak. süre ile 25°C de inkübe edildi. İkinci 10

dakikadan sonra 20 µl DTNB reaktifi ve substrat (20 µl) her bir kuyucuğa ilave edildi. Antikolinesteraz aktivite tayininde şu anda Alzheimer'ı tedavi amacıyla kullanılan ve etkin maddesi bir alkaloid olan galantamin kullanıldı. 96 kuyulu mikroparka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorban okundu ve Gen 5 adlı bilgisayar programının yardımı ile sonuçlar değerlendirildi.

2.2.4 Ekstrelerin ve Elde Edilen Aktif Maddelerin LC-MS-MS Analizi

2.2.4.1 LC-MS-MS Analizi için Numunelerin Hazırlanması

20 mg ekstre eppendorf tüplere konuldu, 1,5 ml metanol içerisinde 20.000 ppm ana stok çözeltiler hazırlandı. İç standart (IS) olarak Curcumin (Kurkumin) kullanıldı, metanol içerisinde 100 ppm'lik IS stok çözeltisi hazırlandı. LC-MS/MS cihazında analiz edilmek üzere hazırlanan enjeksiyon viallerine, ekstrelerin derişimi 4000 ppm ve iç standardın derişimi 5 ppm olacak şekilde metanol:su ile (v:v,60:40) seyreltildi ve analiz edilmeden önce +4 °C de bekletildi.

2.2.4.1.1 Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Sekonder metabolitlerin metanol içerisinde 100 ppm derişimlerde ana stok çözeltileri hazırlandı. Çalışmaya başlamadan önce her bir standart bileşik için 10 ppm stoktan 5, 2,5, 1, 0,5, 0.25 ve 0,1 ppm arasında farklı derişimlerde MeOH-Su (v:v,60:40) çözeltiler hazırlanarak LC-MS/MS'de analiz edilmeden önce +4°C de bekletildi.

2.2.4.1.2 Enstrümantal Analiz ve Kromatografik Koşullar

Analizlerde Zivak Tandem Gold Triple Quadrupole kütle spektrometresi kullanıldı. Kromatografi kolonu olarak Synergy Max C18 kolon (250 x 2 mm i.d, 5 µm partikül büyüklüğü) kullanıldı. Hareketli faz olarak içerisinde % 0,05 formik asit bulunan saf su (A) ve MeOH (B) kullanıldı. Pompa programı dakikada 0,25 ml akış hızında olup, akış gradienti 0.00-1.00 dakikalarda % 55 A ve %45 B, 1.00-20.00 dakikalarda %100 B, 20.01-23.00 dakikalarda %55 A ve %40 B olacak şekilde kullanıldı. Kolon sıcaklığı 30 °C ve enjeksiyon hacmi 10 µl'dir.

2.2.4.1.3 LC-MS/MS Prosedürü

Numunelerin analizlerinde Zivak Tandem Gold Triple Quadrupole kütle spektrometresi kullanıldı. CID gaz basıncı 2,0 mTorr, 4000 V ESI iğne voltajı, 600 V sprej koruma voltajı, 300°C kurutma gaz sıcaklığı, 55 psi nebulizer gaz basıncı ve 35 psi kurutma gaz basıncı olmak üzere optimum ESI parametreleri kullanıldı. Standart bileşiklerin LC-MS/MS karakteristikleri belirlenerek ölçüm metodu oluşturuldu ve ölçümler yapıldı.

2.2.5 Hayvan Deneyleri

2.2.5.1 Moleküler Toksikoloji (Moleküler Etki Saptayıcı Analizler) Çalışmaları

MS modelinde (DAE) kullanılan MSCOV ekstresinin olası toksik ya da yan etkilerini belirlemek için her grupta 6'şar fare olmak üzere aşağıdaki tabloda verildiği gibi toplamda 4 gruba ayrılan hayvanlara belirtilen dozlarda MSCOV intragastrik gavaj yoluyla 21 gün boyunca verildi (Tablo 1). Projede daha doğru sonuçlar elde edilmesi amacıyla dozajlama çalışmaları da yapıldı.

Tablo 1.Moleküler toksikoloji çalışma grupları

Grup Adı	Ö. Sayısı	Açıklama
Kontrol	6	Bu gruptaki hayvanlara intragastrik gavaj ile sadece içme suyu verildi.
Kapari Kontrol I	6	Bu grupta farelere 250mg/kg olacak şekilde ham kapari ekstresi intragastrik gavaj ile 21 gün boyunca verildi.
Kapari Kontrol II	6	Bu grupta farelere 500mg/kg olacak şekilde ham kapari ekstresi intragastrik gavaj ile 21 gün boyunca verildi.
Kapari Kontrol III	6	Bu grupta farelere 750mg/kg olacak şekilde ham kapari ekstresi intragastrik gavaj ile 21 gün boyunca verildi.

2.2.5.1.1 Karaciğer Dokusundan RNA izolasyonu

Toksikoloji çalışmaları için karaciğer dokularından total RNA izolasyonu "Qiagen RNeasy Plus Universal Kit" kullanılarak üretici firmanın talimatları baz alınarak kendi optimize ettiğimiz prosedür ile yapıldı.

-80 °C'de bulunan fare karaciğer dokuları DEPC ile muamele edilmiş havanda sıvı azotla iyice öğütüldü. 2 ml'lik eppendorf tüplere 0,9 ml "Qiazol Lysis" Solüsyonundan eklendi. Darası alınan eppendorf tüplere 50 mg olacak şekilde öğütülen beyin dokusu tartıldı ve iyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dak. inkübe edildikten sonra üzerine 100 µl kitin içinde bulunan "gDNA elimination" solüsyonu eklenerek 15sn karıştırıldı. Daha sonra 200 µl kloroform eklendi ve tekrar iyice karıştırıldı. 3 dak. oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 12.000xg'de ve 4°C'de 15 dak. santrifüj edildi. Üst faz alınıp yeni 2 ml'lik eppendorf tüpe alındı ve alınan üst fazın üzerine eşit miktarda %70 etanol eklendi ve iyice karıştırıldı. Karışım "RNeasy mini spin" kolona eklendi ve 30 saniye 9.000 xg'de santrifüj edildi alta geçen kısım döküldü. Kolonun üzerine 700 µl kitin içinde bulunan yıkama tamponu (RWT) eklendi ve 30 saniye 9.000 xg'de santrifüj edildi. Alta geçen kısım döküldü ve kolonun üzerine kitin içinde bulunan "RPE" tamponundan 500 µl eklendi ve 30 saniye 9.000 xg'de santrifüj edildi, alta geçen kısım yine

döküldü. Kolonun üzerine 500 µl RPE tamponu eklendi ve 2 dak. 15 saniye 9.000 xg'de santrifüj edildi. Alta kesen kısım döküldü. Son olarak, kolon yeni tüpe alındı ve üzerine 50 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 1 dakikada 15 saniye 9.000 xg'de santrifüj edilerek RNA'ların alta geçmesi sağlandı.

2.2.5.1.2 cDNA Sentezi

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

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

total RNA	3,2µg
gDNA yok etme tamponu	2.0µl
Yüksek kalite su	10.0µ lson hacime

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

b) Bu arada RT Kokteyli aşağıdaki şekilde hazırlandı:

RT tamponu	4 µl
Primer	1 µl
RT Enzim	2 µl
Yüksek kalite su	10µl son hacime

RT kokteyli (b) yukarıda (a) elde edilen genomik DNA uzaklaştırma reaksiyonu ile karıştırıldıktan sonra 42 °C'de 20 dak. inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi. Süre sonunda enzimin inhibisyonu için karışım 95 °C'de 5 dak. inkübe edildi. İnkübasyon süre ve sıcaklıkları, RNA miktarları laboratuvarımız koşullarında optimize edildi. Eğer elde edilen cDNA aynı gün kullanılacaksa buz üzerinde tutuldu, aksi halde -80 ° C'de saklandı. Elde edilen cDNA 91 µl yüksek kalite su ile seyreltilerek dizinlerde her bir kuyu için 1,1µl olacak şekilde kullanıldı (Not: ilk aşamalarda cDNA kalite kontrolü bilinen bir primer seti ile kontrol edildi).

2.2.5.1.3 Toksikoloji Dizin (Array) Analizleri

Toksikoloji dizin analizleri için laboratuvarımızda bulunan 96 örneklilik bloklu cihaza (Bioneer) uygun olması için "Custom design" dizinler oluşturulmuştur. Ayrıca hem cihazımızla uyumlu olması hem de daha ekonomik olması nedeniyle Bioneer firmasının Türkiye temsilcisi Gen Plaza firmasının da yardımları ile firma ile doğrudan iletişime girilerek bu dizinlerin siparişi ve

sentezi sağlanmıştır. Toksikoloji dizinler Toksikoloji array A, B, C ve D olmak üzere 384 genin analizleri yapılmıştır (Dizinlerin içerdiği genler sonuçlar kısmında verilmiştir).

2.2.5.2 MS Modeli (DAE) alışmaları

Hayvanlarda deneysel hayvan modeli oluşturmak için %95 saflıktaki Miyelin Oligodendrosit Glikoprotein 35-55 aminoasit peptid (MOG35-55), Mycobacterium tuberculosis (ısı inaktive edilmiş) ve Freund Adjuvan kullanıldı. Freund adjuvant ile emülsifiye edilmiş 250 µg MOG 35-55 ve 400 µg ısı inaktive edilmiş Mycobacterium tuberculosis karışımı, her hayvanın deri altına enjekte edildi. Bu işlemden hemen sonra ve 48 saat sonra 400 ng pertussis toksin karın boşluğuna enjekte edildi. 14 gün boyunca deney hayvanları her gün kontrol edildi ve farelerin gösterdikleri davranışlar 5 basamaklı bir ölçek kullanılarak belirlendi ve video ile kayıt edildi. Kullanılan lek Tablo 2'deki gibidir.

Tablo 2. MS takibinde kullanılan skorldama tablosu (Zheng ve diğ. 2008).

Skor	Gözlenen Etki
0	Herhangi bir etki yok
1	Kuyruk zayıflığı
2	Arka uzuvlarda zayıflık ve anormal yürüme
3	Arka uzuvlardan 1 ya da 2 tanesinin tamamen felci
4	n ve arka uzuvların felci; 4 uzuvda da fel durumu
5	Can ekişme-lm

2.2.5.2.1 Dokuların Temini

Deney işlemleri süreci sonunda anestezi (ksilazin/ketamin) ile ötanazi edilen farelerden beyin dokusunun yanı sıra karaciğer, dokuları steril bir şekilde alındı. Alınan dokuların moleküler etki çalışmaları için kullanılacak olan kısımları ve immünohistokimya çalışmalarında kullanılacak kısımları ayrıldı. Moleküler etki belirleme çalışmaları için kullanılan kısımlar önce steril 2ml'lik ependorf tüplere alınıp etiketlendi ve sıvı azotta donduruldu. Ardından Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyokimya ve Moleküler Toksikoloji Laboratuvarına getirilen dokular -80°C'ye kaldırıldı. Bunun yanında immünohistokimya çalışmaları için kullanılacak olan kısımları beyin bir bölümü ve medulla spinalis (omurilik) %10'luk formol çözeltisine alındı. Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Laboratuvarına götürüldü.

2.2.5.3 MS Dizin (Array) Analizleri

MS dizin analizi için laboratuvarımızda bulunan 96 örneklilik bloklu cihaza (Bioneer) uygun olması için "Custom design" dizin oluşturulmuştur. Ayrıca hem cihazımızla uyumlu olması hem de daha ekonomik olması nedeniyle Bioneer firmasının Türkiye temsilcisi Gen Plaza firmasının da yardımları ile firma ile doğrudan iletişime girilerek bu dizinlerin siparişi ve sentezi sağlanmıştır. MS dizini ile 96 genin analizi kontrol, DAE kontrol, MSCOV tedavi grubundan örnekler seçilerek her biri için ayrı ayrı yapılmıştır. MS dizin genleri sonuçlar kısmında verilmiştir. MS dizin çalışmaları ile gruplar arasında farklılık olan genler belirlenmiş ve bundan sonraki çalışmalarda bu genler çalışılmıştır.

2.2.5.3.1 Beyin Dokusundan RNA İzolasyonu

Beyin dokusundan Total RNA izolasyonu "Qiagen RNeasy Lipid Tissue Mini Kit" kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı. -80°C'de bulunan fare beyin dokuları DEPC ile muamele edilmiş havanda sıvı azotla öğütüldü (Şekil 10).



Şekil 10. Sıvı azot ile doku öğütme

2 ml'lik eppendorf tüplere 1 ml Qiazol Lysis Solüsyonundan eklendi. Darası alınan eppendorf tüplere 50 mg olacak şekilde öğütülen beyin dokusu tartıldı ve iyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dak. inkübe edildikten sonra üzerine 200 µl kloroform eklendi ve iyice karıştırıldı. 3 dak. oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 12.000 xg'de 4°C'de 15 dak. santrifüj edildi. Üst faz alınıp yeni 2 ml'lik eppendorf tüpe alındı ve alınan üst fazın üzerine eşit miktarda %70 etanol eklendi ve iyice karıştırıldı. Karışım RNeasy mini spin kolona eklendi ve 30 saniye 9.000 xg'de santrifüj edildi alta geçen kısım döküldü. Kolonun üzerine 700 µl kitin içinde bulunan yıkama tamponu (RW1) eklendi ve 30 saniye 9.000 xg'de santrifüj edildi. Alta geçen kısım döküldü ve kolonun üzerine kitin içinde bulunan RPE tamponundan 500 µl eklendi ve 30 saniye 9.000 xg'de santrifüj edildi, alta geçen kısım döküldü. Kolonun üzerine 500 µl RPE tamponu eklendi ve 2 dak. 15 saniye 9.000 xg'de santrifüj edildi. Alta kesen kısım döküldü. Kolon yeni

tüpe alındı ve üzerine 50 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 1 dakikada 15 saniye 9.000 xg'de santrifüj edilerek RNA'ların alta geçmesi sağlandı. Elde edilen RNA kalitesi agaroz jel elektroforezinde görüntüledi ve konsantrasyonları Nano Drop cihazında ölçüldü. RNA izolasyonundan sonra konsantrasyonları hesaplanan RNA'lardan cDNA sentezi yapıldı (yukarıda anlatıldı).

2.2.5.3.2 MSCov Ekstresinin ve Alt Fraksiyonlarının DAE Oluşturulan Hayvanlara Verilmesi

MS array yapıp çalışılacak genler belirlendikten sonra hayvanlarda tekrar DAE oluşturuldu. Deney hayvanları deneysel alerjik ensefalomyelit indüksiyonu gerçekleştirilenler ve kontrol grupları olarak toplamda 8 gruba ayrıldı. Bu gruplar Tablo 3'teki gibidir.

Tablo 3. Kullanılan Deney Grupları

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

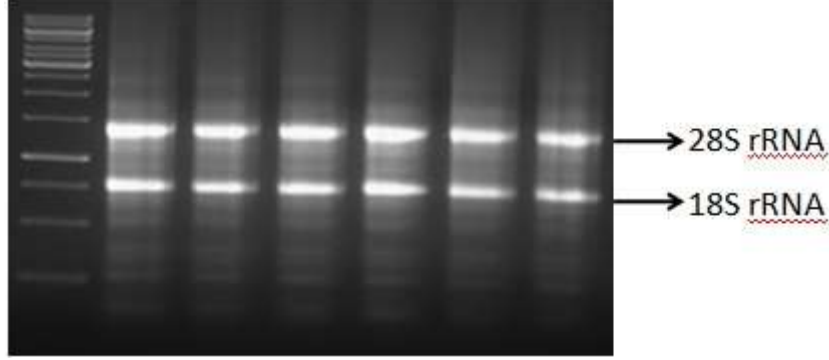
DEA→n-Bütanol (Tedavi)	8	Bu gruptaki hayvanlarda DAE oluşturulduktan sonra (Antijen Enjeksiyonundan yaklaşık 14 gün sonra) n-Bütanol fraksiyonu intragastrik gavaj ile 21 gün boyunca hayvan başına 230 mg/kg ağırlık olacak şekilde verildi ve takip edildi.
DEA→Diklorometan (Tedavi)	8	Bu gruptaki hayvanlarda DAE oluşturulduktan sonra (Antijen Enjeksiyonundan yaklaşık 14 gün sonra) Diklorometan fraksiyonu intragastrik gavaj ile 21 gün boyunca hayvan başına 25 mg/kg ağırlık olacak şekilde verildi ve takip edildi.
DEA→Etil Asetat *(Tedavi)	8	Bu gruptaki hayvanlarda DAE oluşturulduktan sonra (Antijen Enjeksiyonundan yaklaşık 14 gün sonra) Etil asetat fraksiyonu intragastrik gavaj ile 21 gün boyunca hayvan başına 3 mg/kg ağırlık olacak şekilde verildi ve takip edildi.
DEA→Jelimsi Faz (Tedavi)	8	Bu gruptaki hayvanlarda DAE oluşturulduktan sonra (Antijen Enjeksiyonundan yaklaşık 14 gün sonra) Jelimsi faz fraksiyonu intragastrik gavaj ile 21 gün boyunca hayvan başına 150 mg/kg ağırlık olacak şekilde verildi ve takip edildi.

Deney aşaması tamamlandıktan sonra dokular yukarıda anlatıldığı şekilde temin edildi ve Qiagen Lipid Tissue Mini Kit kullanılarak yine yukarıda anlatıldığı gibi beyin dokularından total RNA izolasyonu yapıldı.

2.2.5.3.3 Total RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi İle Görüntülenmesi

İzole edilen RNA'lar %1'lik agaroz jel hazırlanarak Thermo yatay agaroz jel elektroforezi ile yürütüldü. %1'lik agaroz jel, Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponu ile hazırlandı. Agaroz çözünene kadar mikrodalga fırında kontrollü bir şekilde ısıtma işlemi yapıldı. Çözünme işleminden sonra agaroz solüsyonu soğutulurken üzerine 1 µL EtBr (Etidyum bromür) eklendi ve elektroferez tablasına dökülerek katı hal oluşuncaya kadar beklendi. Katı hal alan agaroz jel, elektroferez tankına, kuyucuklar RNA'nın '- den +' ya yürüebilmesi için elektroferezin (-) kutbuna doğru yerleştirildi. Elektroferez tankı RNA' yı yürütmek için 1X TAE yürütme tamponuyla doldurulmuştur. 3 µL RNA örneği, 5 µL steril su ve 2µl yürütme boyası ile muamele edilerek mikro pipet ile jelde bulunan kuyucuklara yüklendi. Elektroferez güç kaynağına bağlandı ve 90 Volt, maksimum 500 mA de 45 dak. süre ile yürütüldü. Yürütme bitince jel UV

transilluminatörde görüntülenip DNR LightBis Prolmage Analysis System (DNR Bioluminescence Imaging System Ltd. Jerusalem, Israel) cihazında fotoğraflandı (Şekil 11).



Şekil 11. Kontrol ve DAE kontrol beyin dokularından optimize edilmiş yöntem ile izole edilmiş total RNA agaroz jel elektroforez görüntüsü

2.2.5.4 mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi: Gerçek Zamanlı PZR

Gerçek zamanlı PZR çalışmaları laboratuvarımızda bulunan Bioneer marka cihazımız ile yapıldı. Gerçek zamanlı PZR reaksiyonları ABM Kilogreen qPCR Mastermix kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği talimatlara göre gerçekleştirildi. Primer ve cDNA miktarları, yapışma sıcaklıkları, eklenen Mg²⁺ laboratuvarımızda optimize edildi. Bununla ilgili sonuçlar aşağıda verilmektedir. Gerçek zamanlı PZR sonucunda elde edilen sonuçlar Exicycler 3 programı kullanılarak hesaplandı ve “house keeping” gen olan beta aktin’e (ACTB) göre normalize edildi. Her gen için ayrı ayrı amplifikasyon analizi ile standart kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve erime eğrisi analizleri yapıldı, Amplifikasyon sonucunda elde edilen Ct (threshold) değerleri kullanılarak MS dizi çalışmaları yaparak belirlediğimiz 21 adet genin Kontrol, MSCov kontrol DAE, PDAE, MSCov tedavi, n-bütanol, diklorometan, etil asetat, ve jelimsi faz alt fraksiyonları ile tedavi uygulanması sonucunda farelerde mRNA düzeyinde ekspresyonları belirlendi. Hayvan (fare) deneyleri için dizayn edilen primer dizileri Tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 4. Hayvan (fare) deneylerinde kullanılan primer dizileri ve yapışma sıcaklıkları

GenAdı	Kodu	F_Dizisi (5'→3')	R_Dizisi (5'→3')	Yapışma Sıcaklığı
NM_007471	mAPP	GTCCGAGTTCCCACGACAG	GGGACATTCTCTCTCGGTGC	63°C
NM_009741	mBCL2	GAAGTGGGGGAGGATTGTGG	CATCCCAGCCTCCGTTATCC	64°C
NM_013653	mCCL5	GCCCTCACCATCATCCTCAC	GGGAGAGGTAGGCAAAGCAG	64°C
NM_013488	mCD4	GCACAGCTATCACGGCCTAT	GAGTGGGAGCGTTTCCTTCA	62°C
NM_021274	mCXCL10	GAGAGACATCCCAGCCAAC	CCAGCAGGATGAGGCAGAAA	63°C
NM_008599	mCXCL9	AAGTTAGCCTGTGTGGGAGC	TACCGAAGGAGGTGGACAA	62°C

NM_010277	mGFAP	GACTCGAAGCAGGAGCACAA	CAGCACACAGGCAGAAAACC	62°C
NM_010382	mH2-EB1	TCCTGTGTCTCCTCTCCTGC	GCAGGTTCTCCTCCAGGTTG	64°C
NM_010431	mHIF1A	GCCTTAACCTGTCTGCCACT	GCTGCTTGAAAAAGGGAGCC	62°C
NM_031168	mIL6	GGAGTCACAGAAGGAGTGCC	CGCACTAGGTTTGCCGAGTA	63°C
NM_010758	mMAG	AGGTCAGTTGTATGGTGCCG	CGAACTGCAAGGTGGTGTG	62°C
NM_010777	mMBP	CCAAGT TCACCCCTACTCCA	TAAGTCCCCGTTTCTGTTG	61°C
NM_013599	mMMP9	CGCTCATGTACCCGCTGTAT	CCGTGGGAGGTATAGTGGGA	63°C
NM_008689	mNFKB1	ATGTAGTTGCCACGCACAGA	GGGGACAGCGACACCTTTTA	61°C
NM_011123	mPLP1	CAGGCTCCTGCTAGA AATGG	TCCGTTCTGCTCTCCTCAGT	60°C
NM_011202	mPTPN11	ATGACTTCTGGCGGATGGTG	CCTGGAGTAGAGCTTGTCCG	63°C
NM_011434	mSOD1	AGACCTGGGCAATGTGACTG	CGGCCAATGATGGAATGCTC	62°C
NM_011486	mSTAT3	ACCATTTCATTGATGCAGTTTG GA	ATATGGGGTTCGGCTGCTTA	64°C
NM_011577	mTGFB1	AGGGCTACCATGCCAACTTC	CCACGTAGTAGACGATGGGC	63°C
NM_013693	mTNF	CGTCAGCCGATTTGCTATCT	CGGACTCCGCAAAGTCTAAG	60°C
NM_011738	mYVHAH	CCCACCACCCCATATCAC	AGCAACCATCAGTCCAGCAA	62°C
NM_007393	mACTB	AGCCATGTACGTAGCCATCC	GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA	60°C

2.2.5.5 Protein Ekspresyon Düzeylerinin Tayini

2.2.5.5.1 Trizol Alt Fazından Protein İzolasyonu

Western blot analizi için beyin dokusundan izole edilen proteinler RNA izolasyonu için kullanılan Qiazol'ün alt fazından yapıldı. Alınan alt faza 0,15mL %1 gliserol içeren %100 EtOH eklendi ve 5.000 rpm de 5 dak. santrifüj edildi. Süpernatant alınıp üzerine %1 gliserol içeren isopropil alkolden 0,75mL eklendi ve 13000 rpm de 10 dak. santrifüj edildi. Pelet alınıp cam homojenizatörde 0,2ml 0,3M Guanidin-HCl ve %1 gliserol içeren %95 EtOH ile 4 defa homojenize edildi ve 10.000 rpm de tekrar 10 dak. santrifüj edildi. Alınan pelet 2 kere 1mL 0,3M Guanidin-HCl ve %1 gliserol içeren %95 EtOH eklenerek tekrar cam homojenizatör yardımıyla homojenize edilerek 10000 rpm de 5 dak. santrifüj edildi. Oluşan pelete 1 ml %1 gliserol içeren %95 EtOH eklenip vorteksle karıştırıldı ve 10.000 rpm de 5 dak. santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılıp pelet havada kurutuldu ve %0,1 ml %8 SDS içeren 0,1M Tris HCl (pH 6,8) ve 0,4 ml saf suda çözüldü. İzole edilen proteinler -200C'ye SDS-PAGE'de kullanılmak üzere kaldırıldı.

2.2.5.5.2 Bişinşonik Asit ile Protein Tayini

Beyin dokusundan izole edilen proteinlerin protein tayini yapıldı. Protein tayini için gerekli olan Bişinşonik Asit solüsyonu (BCA), Micro BCA Reaktif A (0.65 M sodyum karbonat monohidrat ve 0.65 M sodyum potasyum tartarat hazırlanıp, pH 11,25'e 10 N sodyum bikarbonat ile titre edilir.), Micro BCA Reaktif B (0.1 M Bişinşonik asit suda çözünerek hazırlanır) ve Micro BCA

Reaktif C (0.015 M bakır sülfat) 25:1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı. 96 kuyucuklu plakalara 0,1 ml seyreltilmiş örnek (10X -25X) veya Standard protein solüsyonu (Sığır serum albümin) ve 0,1 ml BCA solüsyonu eklenerek karıştırıldı. 15 dak. 600C'de inkübe edildi ve 590nm'de Eliza okuyucuda ölçüldü.

2.2.5.5.3 SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforez (SDS-PAJE) ve Western Blot

İzole edilen proteinler Laemmli (1970)'de belirtildiği gibi dikey elektroforez tekniği uygulanarak SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforez (SDS-PAJE) yöntemi ile ayrıştırılmış ve protein profilleri elde edilmiştir. Her bir protein için spesifik antikolar kullanılarak Western blot tekniği ile her bir enzimin protein düzeyleri immünolojik olarak tayin edilmiştir.

Poliakrilamit jel elektroforezi (PAJE) iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS), varlığında Laemmli (1970) tarafından tanımlanmış olan kesintili bir tampon sisteminde %8,5 ayırma ve %4 sıkıştırma jellerinde yapılmıştır. Ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonları Tablo 5'de belirtildiği gibi verilen miktarların karıştırılması ile verilen sırayla kullanımdan hemen önce hazırlanmıştır.

Tablo 5. SDS-PAJE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları.

Stok Çözeltiler	Ayrıştırıcı Jel	Sıkıştırıcı Jel (%4)
Jel Çözeltisi (ml)	8,5	1,5
Saf Su (ml)	13,55	5,88
Ayrıştırıcı Jel Tamponu (ml)	7,5	-
Sıkıştırıcı Jel Tamponu (ml)	-	2,5
%10 SDS (ml)	0,4	0,16
%10 APS (ml)	0,15	0,065
TEMED (ml)	0,015	0,012

Poliakrilamit jelleri, jel sandviçinin hazırlanması ile Hoefer MiniVe elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Elektroforetik ayrıştırma güç kaynağına bağlandı. Yol gösterici boya tabana ulaşacağı zaman (ayrıştırıcı jelin başlangıcından yaklaşık 6-7 cm) güç kaynağı kapatıldı. Elektroforez tamamlandıktan sonra, jel bloğu aparattan alınıp ve jel sandviçten çıkarılarak oda sıcaklığında 45 dak. süreyle %0,2 Coomassie Pirlanta Mavis R 250, %50 metanol ve %12 glasiyal asetik asit içeren boya çözeltisiyle bir ayrıştırıcı kullanarak hem boyanmış ve hem de sabitlendi. Uygun bir süre bağlanmayan çözünmüş boyanın uzaklaştırılması için %7'lik asetik asit içeren %30'luk metanol çözeltisi ile inkübe edildi (bu süre zarfında solüsyon birkaç kez değiştirildi). Sonuç olarak, jel fotoğraflanmış ve %7'lik asetik asit çözeltisi içinde saklandı.

Aynı koşullar altında y¼r¼t¼len diğer bir jel ise boyama işlemine tabi tutulmadan Western blot analizi (Khyse-Anderson (1984) ile Tovey ve Baldo (1987) tarafından tanımlandığı gibi) için elektroforezi takiben transfer tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin ve %10 metanol) içerisinde 10 dak. s¼reyle sabit hızlı bir çalkalayıcıda ink¼basyona bırakıldı. Elektroforetik transfer Hoefer miniVE elektrotransfer sistemi kullanılarak yapıldı. MiniVe Blotter'ın katot (siyah) kısmı alta gelecek şekilde sistem kurulmaya başlanır. En alta s¼nger konuldu, bunun ¼zerine ¼nceden nemlendirilmiş Whatman # 1 filtre kağıdı yerleştirildi ve olası kalabilecek hava kabarcıklarını gidermek amacıyla bir deney t¼p¼ ¼zerinde yuvarlandı. Whatman # 1 ¼zerine dikkatlice yerleştirilen jelin ¼zerine nitrosel¼loz membran da dikkatlice yerleştirilmiştir. Daha sonra membran ¼zerine ¼nceden ıslatılmış başka bir Whatman # 1 kondu ve en ¼ste tekrar s¼nger yerleştirilip sandviç tamamlandı. Sandviç hazırlandıktan sonra sistem kapatıldı. Tankın içine katot kısmı arkaya gelecek şekilde yerleştirildi. Sistem ¼zerine 300-350 ml transfer tamponu kondu. 1- 1,2 litre su ile tank dolduruldu. Sistem g¼ kaynağına bağlanıp 90Volt, 90Miliamper, 90dakika transfer gerçekleştirildi.

S¼re sonunda g¼ kaynağı kapatılmış ve sistemin vidaları aıldı. Sonuç olarak ¼zerinde transfer edilmiş proteinleri barındıran membran, 'blot', elde edildi. Transfer tamamlandıktan sonra transferin ne derecede gerçekleştiğini tespit etmek için jel yukarıda tanımlandığı gibi boyandı. Membran, protein içeren y¼zeyi ¼ste gelecek şekilde k¼¼k plastik bir tepsinin içine yerleştirildi. 1 saat s¼reyle bloke özeltisi (TBST içinde yağsız %5'lik s¼t tozu) ile çalkalayıcıda ink¼be edildi. S¼re sonunda membran ¼nce bloke çözeltisi içinde hazırlanan primer antikorlar ve daha sonra işaretleyici enzim-horseradish peroksidaz (anti-rabbit/anti-mouse IgG-HRP konjugatı) ile bağlı olan ikincil antikorlarla ink¼be edildi. İşaretleme oda sıcaklığında 1 saat yapıldıktan sonra, ECL özeltisi kullanılarak kemil¼minesans reaksiyonu başlatıldı ve ¼zg¼n protein bantları kemil¼minesansa duyarlı film kullanılarak belirlendi.

2.2.5.6 T¼m Genom Transkriptom Analizleri

2.2.5.6.1 ¼rnek Hazırlanması

Firmaya kuru buz içerisinde 5 gruba ait 12 farklı RNA g¼nderilmiřtir [Kontrol (c1, c2); Hasta (DEA1, DEA2); MSCov Kontrol (MSCov1, MSCov2); Paralel Hasta (PDEA1, PDEA2, PDEA3) ve Tedavi (DEA-MScov1, DEA-MScov2, PDEA-MScov3)]. Firma g¼nderilen bu RNA'ların kalite kontrollerini ND-1000 NanoDrop Spektrofotometre ve Agilent 2100 Bioanalyzer (ile kontrol ve teyit etmiştir.

2.2.5.6.2 ¼rnek Etiketleme ve Saflaştırma

RNA etiketleme ve melezleme Agilent Tek Renk mikrodizi tabanlı gen ekspresyon analizi protokol¼ (Agilent Technology, V6.5, 2010) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca, her

numune toplam RNA'nın 50ng doğrusal olarak çoğaltılmış ve Cy3-dCTP ile işaretlenmiştir. Etiketli cRNAs RNAeasy Mini Kit (Qiagen) ile saflaştırılmıştır. Etiketli cRNAs (pmol Cy3/μg cRNA) konsantrasyonu ve spesifik aktivitesi N ND-1000 NanoDrop Spektrofotometre ile ölçülmüştür.

2.2.5.6.3 Hibritleştirme ve Tarama

Her bir işaretlenmiş 600ng cRNA ve 1 μl 25X parçalama tamponu ve 5 μl 10X bloke tamponu eklenerek parçalanmış ve daha sonra 30 dak. boyunca 60 °C'de ısıtılmıştır. Son olarak 25 μl 2X hibritleme tamponu eklenerek seyreltilmiştir. Seyreltilen cRNA'lar conta ile sızdırmazlık sağlanan slayt içine verilmiş ve Agilent SurePrint G3 Fare GE 8X60K Mikroarray'ler (Agilent®) monte edilmiştir. Slaytlar bir Agilent hibridizasyon fırınında 65 °C'de 17 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra, Agilent Tek Renk mikrodizi tabanlı gen ekspresyon analizi protokolü (Agilent Technology, V 6,5, 2010) kullanarak, oda sıcaklığında yıkanmıştır ve hibritlenmiş dizi derhal bir Agilent "Microarray" Tarayıcı ile taranmıştır.

2.2.5.6.4 Ham Veri Hazırlama ve İstatistik analiz

Elde edilen ham veri "Agilent Feature Extraction Software (v11.0.1.1)" ile elde edilmiştir. Aynı gen için ham veriler daha sonra dizideki tanınacak her gen için ifade verisi sağlayan, ham veri metin dosyası oluşturulmuştur. Örnekleri işaret kullanılarak filtrelenmiş ve seçilen sinyal değeri logaritmik olarak dönüştürülmüş ve "quantile" yöntemiyle normalize edilmiştir. Gruplar arasındaki karşılaştırmalı analiz LFE testi kullanılarak "kat değişim" olarak gerçekleştirilmiştir. Yanlış keşif oranı (FDR) Benjamini-Hochberg algoritmasını kullanarak p değeri ayarlanarak kontrol edilmiştir. Gruplar arası hiyerarşik kümeleme analizi benzerlik ölçüsü olarak tam bağlantı ve Öklid mesafesi kullanılarak yapılmıştır. Önemli prob listesi için Gen-zenginleştirilmesi ve Fonksiyonel ek açıklama analizi DAVID kullanarak (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) gerçekleştirildi.

Farklı ifade genlerin tüm veri analizi ve görselleştirme R 3.1.2 kullanılarak gerçekleştirilmiştir (www.r-project.org).

2.2.5.7 Histomorfolojik Analizler

2.2.5.7.1 Doku Hazırlığı

Histolojik çalışma için beyin ve medulla spinalis (omurilik) dokuları alındı. Dokular ışık mikroskopik incelemeler için %4'lük paraformaldehit ile 3 gün fikse edilerek rutin ışık mikroskopik doku takip işlemlerinin ardından parafine gömüldü. Parafin bloklardan beyinden Paxinos and Watson sıçan beyin atlasına göre 13-15-17. düzlemlerden 5-6 μm kalınlığında koronal kesitler ve medulla spinaliste servikal bölgeden transvers kesitler alındı. Alınan kesitler

deparafinize edildi. Medulla spinalis kesitleri "toluidin blue" ile boyanırken, beyin kesitleri MBP immün reaktivitesi ile değerlendirildi. Tüm kesitler ışık mikroskobu altında incelendi.

2.2.5.7.2 "Luxol Fast Blue" Histokimyasal Boyası

Elde edilen kesitler Bioptica standart boya kiti ile boyandı (Luxol Fast Blue Kluver Barrera 04-200812). Kesitler deparafinize edildi ve 95°C'lik alkole getirildi. Bir gece boyunca 56 °C'lik etüvde "luksol fast blue" alkolik solüsyonunda inkübe edildi. Daha sonra rezidüel kristaller eriyene dek %95'lik etanolde çalkalandı ve saf su ile yıkandı. Önce 30 saniye bazik differansiyasyon tamponunda, daha sonra %95'lik etanolde miyelinik fibriller mavi ve art alan renksiz olana dek differansiye edildi. Tekrar saf ile yıkandıktan sonra krezil viole aköz solüsyon ve asid aktivasyon tamponunda 56°C'lik etüvde 20 dak. bekletildi. %95'lik etanolde Nissl cisimcikleri pembe renk olana dek differansiye edildi. Daha sonra saf alkolde dehidrate edildi, ksilende şeffaflandırıldı ve entellan ile kapatıldı.

2.2.5.7.3 Toluidin Boyası

Medulla spinalise ait dokular Karnovski solüsyonunda (pH 7,4) +4°C'de 48 saat bekletilerek fikse edildi. Rutin takip aşamaları için 0,1M sodyumfosfat tamponu ve 0,1M sükröz karışımında 3 kez 15 dk bekletildi. %2 sodyumfosfat tampon osmium tetroksid (pH 7,4) solüsyonu ile 90 dk post fiksasyon için muamele edildi. 0,1M sodyumfosfat tampon (pH 7,4) ile yıkandıktan sonra %50 aseton ile dehidratasyonu yapıldı. Dokular %70 aseton, %0,5 uranilasetat ve %1 fosfotungstik asit karışımında kontrastlama amacıyla + 4°C' de 1 gece bekletildi. Daha sonra sırasıyla %80, 90 ve 96'lık aseton ile 2 kez 15 dak. muamele edilen dokular %100'lük asetonunda 2 kez 20 dk tutuldu. Propilen oksitte 2 kez 15 dak. bekletilen dokular sırasıyla 30 dak. 2:1, 1:1 ve 1:2 oranında hazırlanan propilen oksit: epon karışımlarında bekletildi. Epon solüsyonunda + 4°C'de 1 gece bekletildi. 3. gün dokular yeni epon solüsyonuna alındı. 48 saat 65°C' lik etüvde polimerizasyon için bekletildi. Daha sonra 1 µ kalınlığında yarı ince kesitler alınarak Toluidin blue ile boyandı ve ışık mikroskobu altında incelendi.

2.2.5.7.4 Miyelin Basic Protein (MBP) İmmunreaktivitesi

İmmunohistokimyasal inceleme için deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra saf suya getirildi. Dokuya zarar vermeden dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandırıldı. Sitrat tampon (pH:6) içerisinde mikrodalgada 10 dak. kaynatıldıktan sonra kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dak. %3'lük hidrojen peroksit uygulandı. PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile yıkanan kesitler 1 saat oda ısısında bloklama solüsyonu ile inkübe edilecek ve ardından yıkama yapılmadan anti-MBP 1.100 (SC-71546, Santa Cruz Biotechnology, USA) antikoruna +4 °C'de inkübe edildi. Ardından kesitler önce biyotinlenmiş sekonder antikor ile daha sonra avidin-biyotin kompleksi

(streptavidin) ile 30'ar dak. inkübe edildi. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. Zemin boyaması Mayer's hematoksilen ile yapıldı, dehidratasyon ve şeffaflaştırma işleminden sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı ve dijital olarak fotoğraflandı.

2.2.5.7.5 Miyelin-İlişkili Glikoprotein (MAG) İmmünreaktivitesi

İmmunohistokimyasal inceleme için deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra saf suya getirildi. Dokuya zarar vermeden dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandırıldı. Sitrat tampon (pH:6) içerisinde mikrodalgada 10 dak. kaynatıldıktan sonra kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük hidrojen peroksit uygulandı. PBS ile yıkanan kesitler 1 saat oda ısısında bloklama solüsyonu ile inkübe edilecek ve ardından yıkama yapılmadan anti-MAG 1/100 (bs-0257R, Bioss, USA) antikoru ile +4 °C'de inkübe edildi. Ardından kesitler önce biyotinlenmiş sekonder antikor ile daha sonra avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) ile 30'ar dak. inkübe edildi. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. Zemin boyaması Mayer's hematoksilen ile yapıldı, dehidratasyon ve şeffaflaştırma işleminden sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı ve dijital olarak fotoğraflandı.

2.2.5.7.6 CD45 İmmünreaktivitesi

İmmunohistokimyasal inceleme için deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra saf suya getirildi. Dokuya zarar vermeden dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandırıldı. Sitrat tampon (pH:6) içerisinde mikrodalgada 10 dak. kaynatıldıktan sonra kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dak. %3'lük hidrojen peroksit uygulandı. PBS ile yıkanan kesitler 1 saat oda ısısında bloklama solüsyonu ile inkübe edilecek ve ardından yıkama yapılmadan anti-CD45 1/100 (anti-CD45 mouse monoclonal antibody, ab25386, Abcam Inc, USA)) antikoru ile +4 °C'de inkübe edildi. Ardından kesitler önce biyotinlenmiş sekonder antikor ile daha sonra avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) ile 30'ar dak. inkübe edildi. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. Zemin boyaması Mayer's hematoksilen ile yapıldı, dehidratasyon ve şeffaflaştırma işleminden sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı ve dijital olarak fotoğraflandı.

2.2.5.7.7 Gliyal Fibriller Asidik Protein (GFAP) İmmünreaktivitesi

İmmunohistokimyasal inceleme için deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra saf suya getirildi. Dokuya zarar vermeden dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandırıldı. Sitrat tampon (pH:6) içerisinde mikrodalgada 10 dak. kaynatıldıktan sonra kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dak.

%3'lük hidrojen peroksit uygulandı. PBS ile yıkanan kesitler 1 saat oda ısısında bloklama solüsyonu ile inkübe edilecek ve ardından yıkama yapılmadan anti-CD45 1/100 (anti-GFAP mouse monoklonal antikor, ab25386, Abcam Inc, USA) antikorunu ile +4 °C'de inkübe edildi. Ardından kesitler önce biyotinlenmiş sekonder antikor ile daha sonra avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) ile 30'ar dak. inkübe edildi. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. Zemin boyaması Mayer's hematoksilen ile yapıldı, dehidratasyon ve şeffaflaştırma işleminden sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı ve dijital olarak fotoğraflandı.

2.2.5.7.8 Görüntü Analiz Metodu

Kesitlerden elde edilen görüntülerin incelenmesinde bilgisayarlı video kamera esaslı görüntü analiz yöntemi kullanıldı (UTHSC Image software). Tüm kesitler (her doku için en az 4 kesit) analize edildi; sadece boyamaya bağlı belirgin artefaktları olan kesitler değerlendirme dışı tutuldu. Boyama tamamlandıktan sonra kesitler ışık mikroskopunda (Olympus BX-50 Tokyo, Japonya) incelendi ve görüntüler yüksek çözünürlüğe sahip kamera yardımıyla bilgisayara aktarıldı (Olympus DP71, Japonya). Bütün kesitler dijital olarak fotoğraflandı.

Gruplar arasındaki histomorfolojik farklılıklar skorlanarak değerlendirildi. Skorum için onluk büyütmede birbiriyle örtüşmeyen alanlar rastgele yöntemle seçildi. İmmünopozitif boyanmanın derecesi, yoğunluk ve dağılım açısından 0'den 3'e kadar olan bir gösterge çizelgesi kullanılarak semikantitatif skorlama ile değerlendirildi. İmmünreaktivite yok ise 0, hafif ise 1, orta ise 2 ve belirgin olması durumunda 3 puan verildi (Tuzun vd., 2011).

2.2.6 Hücre Kültürü Çalışmaları

2.2.6.1 Besiyeri Hazırlanışı

+4 °C de olan 500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM:F-12)'ye, %10 olacak şekilde Fötal Dana Serumu (FBS, Sigma) ve %1 penisilin/streptomisin (Sigma), eklendi ve 37 °C kullanıldı.

2.2.6.2 Hücrelerin Büyütülmesi

Çalışma boyunca kullanılan insan nöroblast hücreleri (SH-SY5Y) "American Type Culture Collection" (ATCC)'dan satın alınarak Mart 2014 içerisinde teslim alındı. Deneilerimizde kullandığımız SH-SY5Y hücre hattı haftada 2 kez düzenli pasajlandı. Üretim sırasında kontaminasyonu önlemek amacıyla filtre kapaklı hücre kültürü flaskları kullanıldı. %10 Dimetil sulfoksit (DMSO) içeren ortamda sıvı azot ile dondurulmuş olarak kuru buz içerisinde korunarak bize gelen hücreler 37 °C'de eriyene kadar bekletildi, eridikten sonra flaska ekildi ve üzerine 10 ml DMEM:F-12 besi ortamı eklenerek 37°C'de, %5 CO2 ve %95 nem içeren

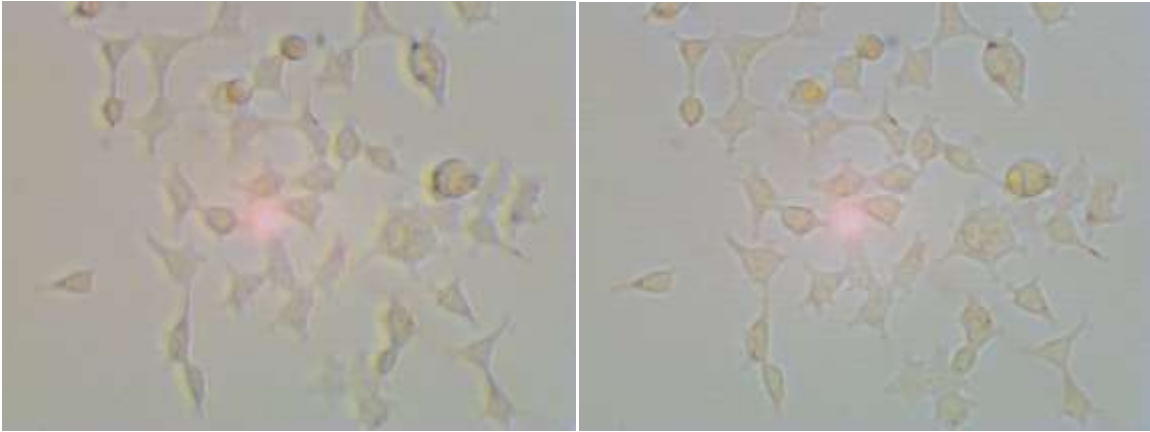
ortamda 1 gün inkübe edildi. Ertesi gün DMSO'dan kurtarmak için flasktaki besiyeri değiştirildi. Hücreler flaskı doldurduktan sonra besiyeri pipetle uzaklaştırıldı, hücreler bir kez Ca^{+2} ve Mg^{+2} tuzları içermeyen steril PBS ile yıkandı.

2.2.6.3 Tripan Mavisi

1:1000 sulandırılmış tripan mavisi kullanıldı. 0,05 gr tripan mavisi 10ml dH₂O'da çözülüp 0,22 mikronluk filtrelerden süzülerek kullanıldı.

2.2.6.4 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler çoğaltıldıkları kültür kaplarında tek tabaka olduklarında pasajları yapıldı. Bu işlem hücreler yeni alındığı için mikroskopik kontrol ve takip ile belirlendi. Pasaj işlemi için öncelikle kültür besiyeri uzaklaştırıldı. Daha sonra hücreler 2 ml % 0,25'lik tripsin (Gibco Lab.) ile yaklaşık 5 dak. muamele edilerek hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Süspansiyon haline getirilen hücreler steril santrifüj tüpüne alındıktan sonra tripsinin inaktif hale gelmesi için üzerine 10 ml DMEM:F12 besiyeri eklendi. 2000 xg hızda 5 dak. santrifüj edildikten sonra supernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 1ml besiyeri eklenerek, ependorfta hazırlanan tripan mavisi ve hücre karışımı (1:1) thoma lamında sayıldı ve hücreler deney planına göre ekim için hazır hale getirildi. Her ne kadar hücre sayımı ve sitotoksosite testleri için farklı testler (hücre sayıcı, WST, MTT gibi) kullanılmış olmasına rağmen hücrelerin görsel olarak kontrolünü sağlamak amacıyla diğer deneylere paralel olarak klasik tripan mavisi deneyi uygulandı (Şekil 12).



Şekil 12. SH-SY5Y hücreleri

2.2.6.5 Sitotoksosite Çalışmaları

Çalışmamızda SH-SY5Y hücrelerinin kendi laboratuvar koşullarımızda büyüme ve gelişmesi optimize edildi. Hücreler ilk defa temin edildiklerinden dolayı öncelikle istenilen morfolojik karaktere ulaşmaları ve büyümeleri sağlandı ve bu safhadan sonra yeterli sayıda düşük pasaj

sayısında stok hücre uygun ortamlarda stoklandı. Bu evreden sonra hücreler kullanılarak sitotoksisite çalışmaları gerçekleştirildi. Projemizin bundan önceki bölümlerinde hazırlanan MSCov ekstresi ve bundan elde edilen etil asetat ve n-bütanol fraksiyonları (hekzan fraksiyonunda herhangi bir madde elde edilemediği için n-bütanol ve etil asetat fraksiyonları ana fraksiyonlar olarak kullanıldı) sitotoksisite deneyleri için uygun çözücülerle çözüldükten sonra steril etmek için 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi.

Sitotoksisite testi için farklı konsantrasyonlarda MSCov ekstresi suda çözüldü. 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 dak. santrifüj edildi. Süpernatant atılıp, dibe çöken hücreler 1 ml besiyeri içinde çözüldü. Ependorfta hazırlanan tripan mavisi ve hücre karışımı (1:1) thoma lamında sayıldı. Hücre sayısı hesaplandıktan sonra her kuyucukta 1×10^3 hücre olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekildi ve plakaların üzeri toplamda 200 μ l olacak şekilde besiyeri ile tamamlandı. Hücrelerin plakaya yapışması için 24 saat %5'lik CO₂ inkübatöründe, %95 nem ortamında bekletildi. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda MSCov ekstresi hücrelere uygulandı. 24 saatin sonunda 96 kuyulu plakadaki besiyeri uzaklaştırıldı, sonrasında her kuyucuğa 100 μ l yeni besiyeri eklendi. Hücreler üzerine sitotoksisite deneylerinde kullanılan 10 μ l WST reaktifi eklendi. Hücrelerin yaşam oranları ELISA okuyucu kullanılarak 450-690 nm'de 30 dakikalık inkübasyon sonunda ölçüldü. Hiç özüt ile muamele etmediğimiz kontrol grubuna sadece besiyeri konuldu. Değişik konsantrasyonlar da ki MSCov ile muamele ettiğimiz gruplar kontrol grubu ile karşılaştırarak, değişik dozlardaki ekstrenin hücre canlılığına olan etkisi saptandı.

MSCov ekstresinden elde edilen diklorometan, etil asetat ve n-bütanol fraksiyonları oleanolik asit (OA) ve ursolik asit (UA) olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat (OPC), glukokapparin (GC) aktif maddeleri ve rutin suda çözünmediği için hücre kültürü işlemlerinde iyi bir çözücü olarak bilinen dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldü. 96'lık plakaya (1×10^3 /kuyucuk) 24 saat önce ekilen hücreler 24 saat süresince değişik konsantrasyonlarda DMSO konsantrasyonu %0,1 olacak şekilde etil asetat veya n-bütanol fraksiyonlarına maruz bırakıldı. Diklorometan, etil asetat ve n-bütanol sitotoksisite deneyinde kontrol grubuna ise %0,1 DMSO içeren besi yeri konuldu.

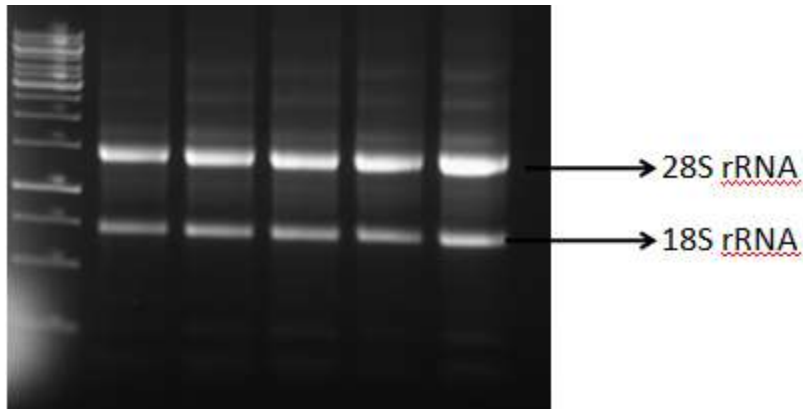
SH-SY5Y hücrelerine MSCov ekstresi, Diklorometan, Etil asetat ve n-Bütanol Fraksiyonları ve Oleanolik Asit (OA) ve Ursolik Asit (UA) olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat (OPC), Glucocapparin (GC) aktif maddelerinin uygulanması

Hücrelerde MSCov ekstresi, diklorometan (DKM), etil asetat (EA), n-bütanol (B) fraksiyonları, oleanolik asit (OA) ve ursolik asit (UA) olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat (OPC),

glucocapparin (GC) aktif maddelerinin LD₀₅₋₁₀ değerleri sitotoksisite deneyi ile belirlendikten sonra bu dozların SH-SY5Y hücrelerinde belirlenen genlerin ekspresyon düzeylerindeki etkisini test etmek için MSCov ekstresi, diklorometan, etil asetat ve n-bütanol fraksiyonları, oleanolik asit (OA) ve ursolik asit (UA) olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat (OPC), olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat (OPC)+ rutin, glucocapparin (GC) aktif maddeleri hücre kültürü ortamında steril şartlarda hücrelere uygulandı. Bunun için 10mm petrilere 106 hücre ekildi ve 24 saat inkübasyonun ardından belirlenen dozlar bu hücrelere uygulandı. İkinci bir 24 saatin sonunda hücreler RNA izolasyonu için 600 μ l "Qiazol Lysis" reaktifi ile toplandı.

2.2.6.6 RNA İzolasyonu

"Qiazol Lysis" reaktifi ile toplanan hücrelerden ayrı ayrı total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA izolasyonu 'QIAGEN RNeasy Plus Universal' kit kullanılarak üretici firmanın talimatları baz alınarak ve hücreden RNA izole etmek için kendi laboratuvarımızda optimize ettiğimiz prosedür ile yapıldı. "Qiazol Lysis" reaktifi ile toplanan hücreler 5 dak. oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra üzerine 100 μ l kit içinde bulunan gDNA eliminatör solüsyonundan eklendi ve 15 saniye karıştırıldı. Daha sonra 180 μ l kloroform eklendi ve tekrar karıştırıldıktan sonra 3 dak. oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda 12.000 xg'de ve +4°C'de 30 dak. santrifüj edildi. Üst faz alınıp 2 ml'lik steril ependorf tüpe toplandı ve alınan üst faza eşit miktarda %70 etanol eklenip iyice karıştırıldı. Karışım "RNeasy mini spin" kolona yüklendi ve 30 saniye 9.000 xg'de santrifüj edildi ve alta geçen kısım dökülmüştür. Kolunun üzerine 700 μ l kit içinde bulunan yıkama tamponu "RWT" eklendi ve 30 saniye 9.000 xg'de santrifüj edildi. Alta geçen kısım dökülüp kolonun üzerine 500 μ l kit içinde bulunan yıkama tamponu "RPE" eklendi ve 30 saniye 9.000 xg'de santrifüj edilerek alta geçen kısım döküldü. Kolon üzerine tekrar "RPE" tamponu eklendi ve 150 saniye 9.000 xg'de santrifüj edilerek alta geçen kısım tekrar döküldü. Son olarak kolan yeni tüpe alındı ve üzerine 50 μ l RNaz içermeyen su eklendi ve 75 saniye 9.000 xg'de santrifüj edildi. Elde edilen RNA kalitesi agaroz jel elektroforezinde görüntülendi ve konsantrasyonları Nano Drop cihazında ölçüldü.



Şekil 13. Kontrol ve MSCov muamele edilmiş SH-SY5Y hücrelerinden optimize edilmiş yöntem ile izole edilmiş total RNA agaroz jel elektroforez görüntüsü

RNA izolasyonundan sonra cDNA sentezi ve PZR aşaması hayvan deneylerinde yapılan şekilde gerçekleştirildi. Ancak hücre kültürü çalışmaları için insan genomuna özgü primerler çalışılan genler için dizayn edildi (Tablo 6).

Tablo 6. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan primer dizileri

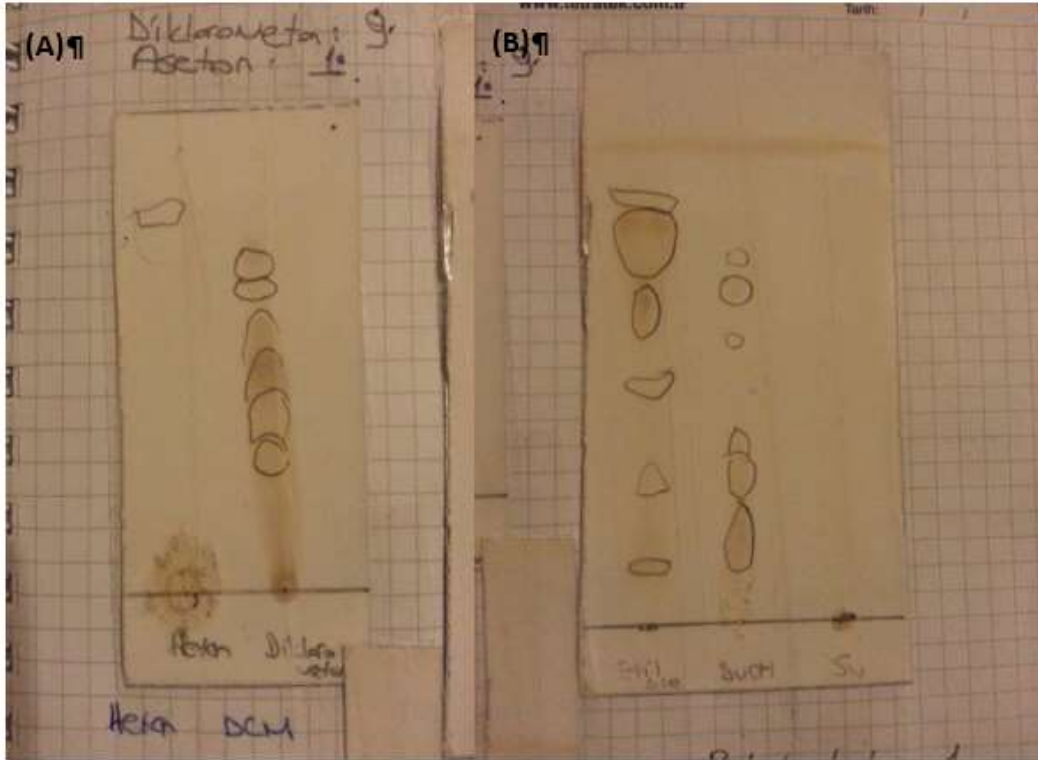
Gen Kodu	Gen Adı	F_Dizisi (5'->3')	R_Dizisi (5'->3')	Yapışma Sıcaklığı
NM_000484	hAPP	GCCCTGCGGAATTGACAAG	CCATCTGCATAGTCTGTGTCTG	61°C
NM_001734	hC1S	TTTGGCATGGGTTTATGCTGA	GGGTGAAGTAGAGGTGAATCCC	51°C
NM_002985	hCCL5	CAGTCGTCTTTGTACCCGA	AGAGCAAGCAGAAACAGGCA	62°C
NM_002416	hCXCL9	GGCTCTTTCCTGGCTACTCC	TCCCTGGTCCCTGTAGTGAG	61°C
NM_001565	hCXCL10	ACCAGAGGGGAGCAAAATCG	GGAAGTGATGGGAGAGGCAG	62°C
NM_002055	hGFAP	GTGTCAGAAGGCCACCTCAA	TCAGGTCTGGGGAAATGTGC	62°C
NM_002070	hGNAI2	TGATCGACAAGAACCTGCGG	TGCTTGACGATGGTGCTCTT	61°C
NM_001530	hHIF1A	GGCGCGAACGACAAGAAAAA	GTGGCAACTGATGAGCAAGC	61°C
NM_000600	hIL6	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG	59°C
NM_002361	hMAG	CCAAGTAGTCCACGAGAGCTT	CAGGTCCCCACGGAAGTAGT	62°C
NM_004994	hMMP9	GGGACGCAGACATCGTCATC	TCGTCATCGTCGAAATGGGC	62°C
NM_003998	hNFKB1	TCGCGCTGAGTATAAAAAGCC	GGCAAAGTTTCGTGGATGCG	61°C
NM_000533	hPLP1	GAAAGCCCTTTTCATTGCAGGA	GGCTAGTCTGCTTTGTGGCT	56°C
NM_002834	hPTPN11	GACGTTCCCAAACCATCCA	TCTTCTTCAATCCTGCGCTGT	56°C
NM_003150	hSTAT3	AACAGGATGGCCCAATGGAA	GAAGCGGCTATACTGCTGGT	61°C
NM_000454	hSOD1	TAAAGTAGTCGCGGAGACGG	CTTCGTCGCCATAACTCGCT	62°C
NM_000594	hTNF	TGGGATCATTGCCCTGTGAG	GGTGTCTGAAGGAGGGGGTA	62°C
NM_001101	hACTB	GCCGCCAGCTCACCAT	GATGCCTCTCTTGCTCTGGG	59°C

3 SONUÇLAR

3.1 *Capparis ovata* Saf Madde İzolasyonu

3.1.1 *Capparis ovata* direkt su ekstresinin (MSCov) ve bundan organik çözücülerle tüketilerek geri ekstraksiyon ile diğer ekstralarının hazırlanması

Geri ekstraksiyonla hazırlanan hekzan, diklorometan, etilasetat ve butanol ekstralarının İTK'ları Şekil 14'de verilmektedir.



Şekil 1. (A) Hekzan ve diklorometan ekstraları (B) Etil asetat, bütanol ve su ekstraları. Sistem: Diklorometan/Aseton (9:1)

3.1.2 Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

Capparis ovata'dan elde edilen farklı ekstraların kodları Tablo 7'de ve bu ekstraların 200 µg/mL konsantrasyonda kolinesteraz üzerine etkinlikleri araştırılan ekstraların sonuçları da Tablo 8 ve 9'da verilmektedir.

Tablo 1. Elde edilen ekstraların kodları

Ekstre Kodu	Ekstre Adı
COMM	<i>C. ovata</i> meyve kısmı sulu metanol ekstresi

COMT	<i>C. ovata</i> tomurcuk kısmı sulu metanol ekstresi
COMÇ	<i>C. ovata</i> çiçek kısmı sulu metanol ekstresi
COMK	<i>C. ovata</i> kök kısmı sulu metanol ekstresi
COMY	<i>C. ovata</i> yaprak kısmı sulu metanol ekstresi
MSCov	<i>C. ovata</i> tüm kısımlar su ekstresi
CDHM	<i>C. ovata</i> meyve kısmı hekzan-diklorometan ekstresi
CDHT	<i>C. ovata</i> tomurcuk kısmı hekzan-diklorometan ekstresi
CDHÇ	<i>C. ovata</i> çiçek kısmı hekzan-diklorometan ekstresi
CDHK	<i>C. ovata</i> kök kısmı hekzan-diklorometan ekstresi
CDHY	<i>C. ovata</i> yaprak kısmı hekzan-diklorometan ekstresi

Tablo 2. *C. ovata*'dan hazırlanan ekstrelerin Antikolinesteraz Aktivite sonuçları (200 µg/mL)^a

Ekstreler	AChE (%) İnhibisyon)	BChE (%) İnhibisyon)
COMM	77.95 ± 0.41	65.73 ± 0.29
COMT	NA	57.08 ± 2.31
COMÇ	NA	63.10 ± 3.53
COMK	NA	62.85 ± 2.17
COMY	NA	46.73 ± 1.81
MSCov	33.35 ± 0.49	56.98 ± 1.25
CDHM	3.46 ± 0.05	NA
CDHT	20.22 ± 2.98	25.78 ± 0.22
CDHÇ	4.42 ± 1.42	56.91 ± 0.99
CDHK	15.37 ± 3.02	NA
CDHY	8.12 ± 1.17	31.81 ± 2.31
Galantamin^b	89.98 ± 0.61	82.47 ± 0.63

^aÜç paralel çalışmanın sonuçları standart sapmalarla birlikte verilmiştir (p < 0.05).

^bGalantamin standart olarak kullanıldı.

Tablo 8'de görüldüğü gibi kapari bitki bölümlerinden elde edilen hiçbir ekstre standart olarak kullanılan galantamin eşdeğeri asetilkolin ve bütirilkolin esteraz aktivite inhibisyonu göstermedi. Bununla birlikte, meyve metanol ekstresi her iki aktivite içinde en yüksek inhibisyon gösteren ekstre oldu.

MSCov sulu ekstresinin ve farklı çözücülerle MSCov'dan elde edilen alt ekstrelerin asetil- ve bütirilkolin esteraz aktivite inhibisyon değerleri Tablo 9'da verilmektedir. Burada da butanol ekstresi en yüksek inhibisyon etkisi gösteren fraksiyon oldu.

Tablo 3. *C.ovata*'dan hazırlanan ekstrelerin asetilkolinesteraz sonuçları (200µg/ml)

Örnek	AChE (%) İnhibisyon	BChE (%) İnhibisyon
MSCov	33.35 ± 0.49	56.98 ± 1.25
MSCov- H	3.46 ± 0.05	NA
MSCov- D	4.42 ± 1.42	6.81 ± 0.99
MSCov- E	65.78 ± 0.42	73.89 ± 0.67
MSCov- B	87.48 ± 0.02	89.36 ± 0.85
Galantamina	89.98 ± 0.61	82.47 ± 0.63

^aStandart madde
NA: Aktif değil

3.1.3 MSCov, MSCov Etil Asetat (MSCov-E) ve MSCov Bütanol (MSCov-B) ekstrelerinin LC-MS-MS Analizleri

MSCov ve elde edilen alt fraksiyonlarının literatürde yaygın olarak bilinen antioksidan bileşikler açısından içerikleri kantitatif olarak analiz edildi. Bu sonuçlar aşağıdaki Tablo 10'da verilmektedir.

Tablo 4. *C. ovata* ekstrelerindeki sekonder metabolitlerin LC/MS/MS ile analizi sonuçları

Bileşik	Ana iyon (m/z)	Parçalanma İyonu (Çarpışma Enerjisi, V)	MSCov	MSCov- E	MSCov-B
Kafeik asit	179	135 (14)	< LOD	12.01 ± 2.38	5.16 ± 1.02
Ellajik asit	301	228.3 (25)	< LOD	122.72 ± 8.22	41.99 ± 2.81
Fumarik asit	115	71 (8)	6.01 ± 0.42	118.66 ± 8.23	9.40 ± 0.65
Gallik asit	168.6	124 (13)	4.81 ± 1.19	4.92 ± 1.22	4.98 ± 1.24
Herniarin	177	121 (20)	< LOD	5.39 ± 0.54	< LOD
İsorhamnetin	315	300 (20)	< LOD	78.47 ± 6.93	22.69 ± 2.00
Kaempferol	287	152.3 (30)	66.98 ± 4.73	1881.2 ± 132.7	1740.4 ± 122.8
Kaempferol-3-O rutinosid	593	284.4 (26)	2.72 ± 0.25	176.1 ± 15.92	229.8 ± 20.78
Luteolin	285	132 (34)	< LOD	14.67 ± 3.77	5.60 ± 1.44
Penduletin	345.2	311 (25)	< LOD	25.00 ± 2.53	1.60 ± 0.16
Pirogallol	125	80 (16)	8.25 ± 0.55	9.69 ± 0.64	9.41 ± 0.63
Kuercetin	301	178.5 (16)	1.04 ± 0.14	357.94 ± 47.59	114.19 ± 15.18

Rosmarinic asit	359.2	160.5 (15)	< LOD	4.03 ± 0.31	< LOD
Rutin hidrat	609	301 (16)	13.30 ± 0.87	56.40 ± 3.69	131.05 ± 8.58
Sirinjik asit	196.7	181.4 (12)	< LOD	148.88 ± 10.03	9.38 ± 0.63
Ursolik asit	455.6	455.1 (10)	< LOD	< LOD	66.95 ± 4.65
Vanilya	150.7	135.4 (12)	< LOD	4.34 ± 0.40	< LOD
P-kumarik asit	163.2	118.7 (14)	< LOD	245.42 ± 37.78	28.11 ± 4.33
t-Ferulik asit	193	133 (15)	< LOD	110.09 ± 7.69	27.59 ± 1.93
Kurkumin^a	369.3	176.9 (20)			

^aİç standart

Burada elde edilen sonuçlar ana ekstremizin özellikle kamferol ve rutin açısından zengin olduğunu göstermektedir ve birçok bileşik tayin limitinin altındadır. Ancak alt fraksiyonlarda bu bileşikler zenginleştiği için tayin edilir hale gelmiştir. Yukarıda belirtilen bileşikler yanı sıra MSCov elajik asit ve isorhamnetin açısından da önemlidir.

3.1.3.1 Elde Edilen Sekonder Metabolitlerin LC-MS-MS Validasyonu ve Ölçüm Belirsizliği Değerlendirmeleri

Metot validasyonu prosedüründe, doğrusallık, çalışma aralığı, algılama sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ), doğruluk ve tekrarlanabilirlik gibi birçok parametre incelenmektedir.

LOD ve LOQ belirlenmesinde standart sapmaya dayalı tespit yaklaşımı kullanılmıştır. Bunun için kör örnek veya kör örneğe algılama sınırına yakın derişimde örnek ilave edilerek bir seri okuma yapıldı. Aşağıdaki formül kullanılarak LOD ve LOQ değerleri hesaplandı.

$$LOD=3 \times SD \quad LOQ=10 \times SD$$

Doğrusal aralık kalibrasyon grafiğinin doğrusal olduğu derişim aralığıdır. Bu aralık hesaplanırken en az 5 farklı derişimde en az 3'er defa kalibrasyon çözeltisi hazırlanır ve cihazda en az 3 defa ölçüm yapılarak elde edilen sonuçlarla kalibrasyon grafiği çizilir. Çalışma aralığı kalibrasyon grafiği üzerinde herhangi bir yer olabilir. Genelde doğrusal aralıktadır, ancak logaritmik de olabilir. Standart bileşiklerin doğrusal aralıkları Tablo 6' da verildi. Pik alanı (y) derişime (x) karşı çizilen grafiklerde her bir standart bileşik için regresyon katsayısı $R^2 \geq 0.96$ 'dır.

Keskinlik ölçülen büyüklük için bağımsız ölçüm sonuçlarının birbirlerine olan yakınlığının ölçüsüdür. Standart sapma (s) veya bağıl standart sapma (%RSD) ile ifade edilir. Ölçüm belirsizliği, ölçüm sonucu ile birlikte verilen ve belirlenen güvenilirlik seviyesinde ölçüm değerlerinin dağılımını gösteren parametredir. Bu değerler Tablo 11'de verilmektedir. Hesaplaması yapılan belirsizlik bileşenleri örnek tartımı belirsizliği, stok çözelti belirsizliği,

kalibrasyon eğrisinden gelen belirsizlik, tekrarlanabilirlik belirsizliği hesaplandıktan sonra toplam belirsizliğe katkıları rapor sonunda değerlendirildi.

Numunelerdeki standart bileşik içerikleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

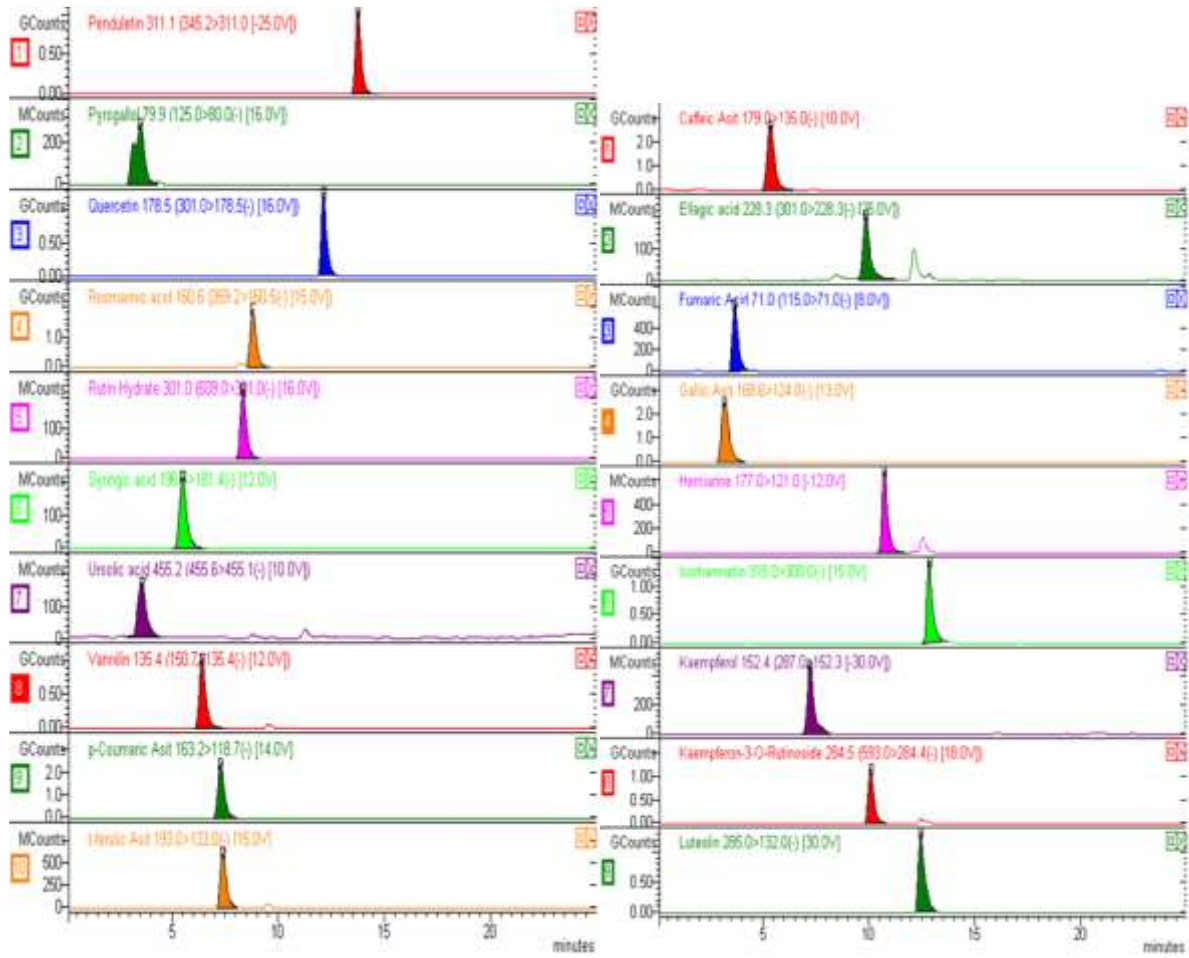
$$Miktar (mg / kg) = \frac{C_a \times V_{son}}{m \times V_{ilk}} \times 1000$$

Ca kalibrasyon eğrisinden gelen analit derişimi (mg/L), Vson örnek hacmi, m (g) numune miktarı, Vilk başlangıçtaki örnek hacmi.

Tablo 5. Sekonder Metabolitlerin Validasyon ve Belirsizlik Parametreleri

Analit	Ölçü denklemleri	eğrisi R2	LOD (ppb)	LOQ (ppb)	RSD (%)
Kafeik asit	y=0,351x-0,022	0,9923	0,028	0,093	8,04
Elajik asit	y=0,0244x+0,0048	0,9951	0,020	0,068	11,1
Fumarik asit	y=0,0568x+0,0176	0,9913	0,003	0,010	5,44
Gallik asit	y=0,4008x-0,0201	0,9985	0,550	1,820	7,23
Herniarin	y=0,0999x+0,021	0,9931	0,370	1,233	9,47
İsorhamnetin	y=0,251x+0,115	0,9608	0,088	0,294	3,67
Kaempferol	y=0,0224x+0,016	0,9842	0,002	0,008	5,47
Kaempferol-3-O rutinosid	y=0,1078x+0,0135	0,9919	0,014	0,045	8,15
Luteolin	y=0,2068x+0,144	0,9632	0,062	0,207	15,9
Penduletin	y=0,145x+0,0438	0,9916	0,089	0,297	9,47
Pirogallol	y=0,039x+0,014	0,9813	0,001	0,002	5,47
Kuersetin	y=0,1108x+0,069	0,9746	0,001	0,002	11,4
Rosmarinic asit	y=0,177x+0,014	0,9933	0,022	0,072	3,73
Rutin hidrat	y=0,023x+0,001	0,9902	0,010	0,034	7,90
Sirinjik asit	y=0,031x+0,0111	0,9936	0,022	0,073	8,39
Ursolik asit	y=0,0137x+0,005	0,9861	0,008	0,027	3,04
Vanilya	y=0,098x+0,0158	0,9982	0,019	0,064	6,57
P-kumarik asit	y=0,289x+0,153	0,9872	0,006	0,021	6,39
t-Ferulik asit	y=0,086x+0,015	0,9822	0,047	0,158	5,21

Hesaplamalar için kullanılan standart bileşikler için tek tek elde edilen kromatogramlarda Şekil 15'de verilmektedir.



Şekil 2. MSCov ekstresinin analizleri için kullanılan standart bileşiklerin LC-MS/MS analiz kromatogramları

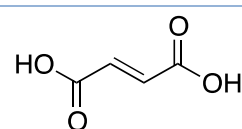
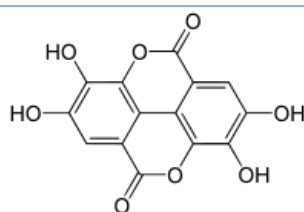
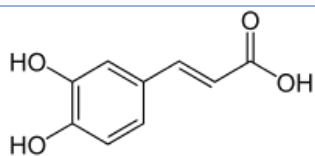
3.1.3.2 LC-MS/MS ile Analiz Edilen *C. ovata* Ekstrelerinin İçerdiği Sekonder Metabolitlerin Kantitatif Analiz Sonuçları (mg/kg)

LC-MS/ML analizi sonuçları ile ilgili veriler Tablo 12'de ve elde edilen sekonder metabolit şekilleri Şekil 16'da verilmektedir.

Tablo 6. MSCov ekstrelerinin genişletilmiş (k=2) belirsizlik ile birlikte kg ekstre başına düşen mg sekonder bileşiklerin miktarları

	MSCov	MSCov-B	MSCov-E
Kafeik asit	<LOD	5,16±1,02	12,01±2,38
Elajik asit	<LOD	41,99±2,81	122,72±8,22

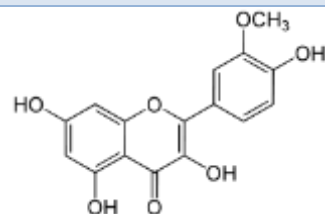
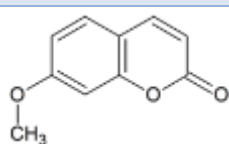
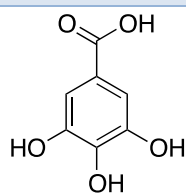
Fumarik asit	6,01±0,42	9,40±0,65	118,66±8,23
Gallik asit	4,81±1,19	4,98±1,24	4,92±1,22
Herniarin	<LOD	<LOD	5,39±0,54
İsorhamnetin	<LOD	22,69±2,00	78,47±6,93
Kaempferol	66,98±4,73	1740,43±122,84	1881,25±132,78
Kaempferol-3-O rutinosid	2,72±0,25	229,89±20,78	176,17±15,92
Luteolin	<LOD	5,60±1,44	14,67±3,77
Penduletin	<LOD	1,60±0,16	25,00±2,53
Pirogallol	8,25±0,55	9,41±0,63	9,69±0,64
Kuersetin	1,04±0,14	114,19±15,18	357,94±47,59
Rosmarinik asit	<LOD	<LOD	4,03±0,31
Rutin hidrat	13,30±0,87	131,05±8,58	56,40±3,69
Sirinjik asit	<LOD	9,38±0,63	148,88±10,03
Ursolik asit	<LOD	66,95±4,65	<LOD
Vanilya	<LOD	<LOD	4,34±0,40
P-kumarik asit	<LOD	28,11±4,33	245,42±37,78
t-Ferulik asit	<LOD	27,59±1,93	110,09± 7,69



Kafeik asit

Elajik asit

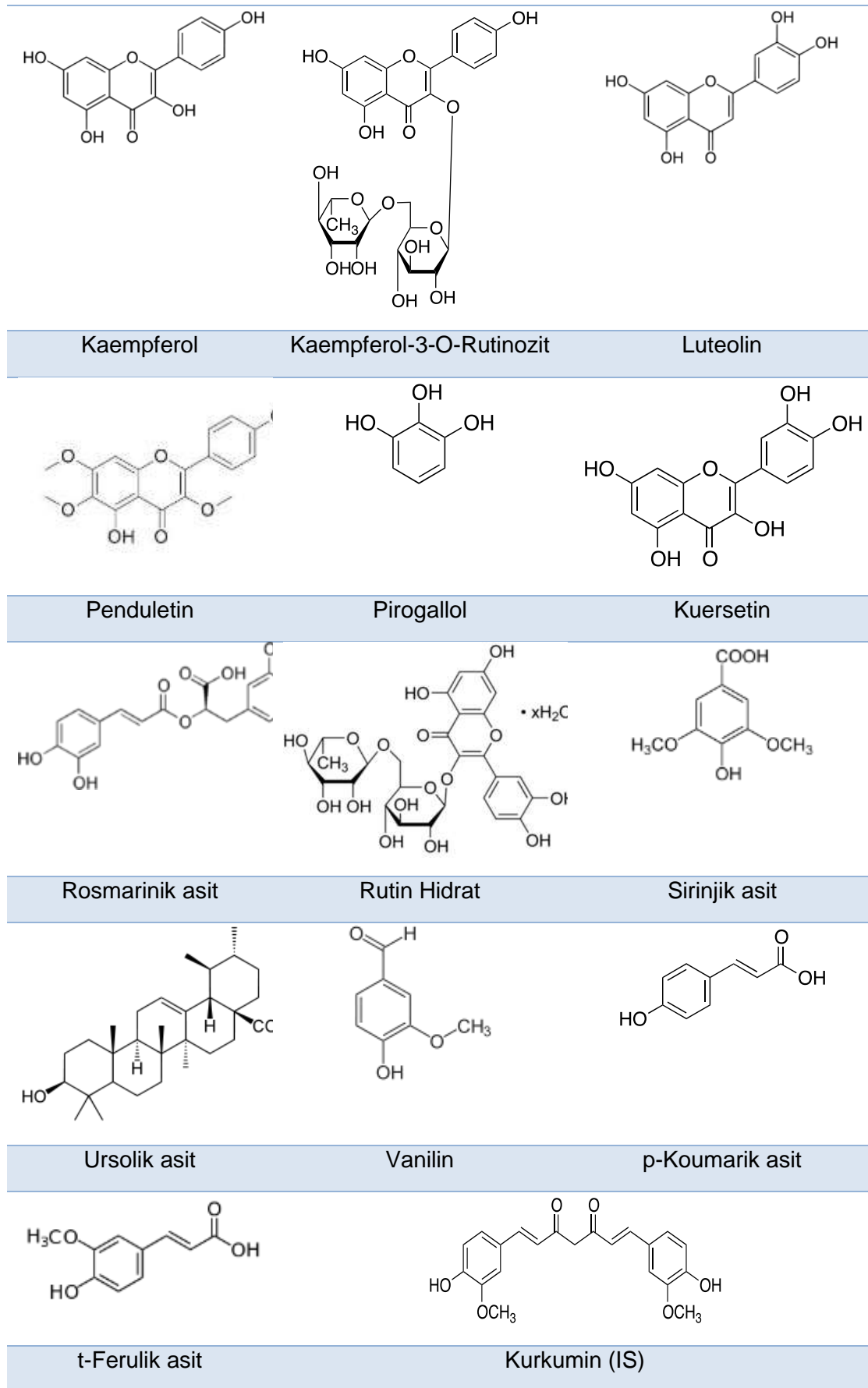
Fumarik asit



Gallik asit

Herniarin

Isorhamnetin



Şekil 3. Sekonder Metabolitlerin molekül yapıları

Analizlerde kullanılan ekstrelerin çözünlükleri de aşağıdaki Şekil 17'de verilmektedir.



Şekil 4. Analiz edilen MSCov ekstrelerinin çözünlük fotoğrafı

3.1.4 Ekstrelerden Saf Maddelerin İzolasyonu

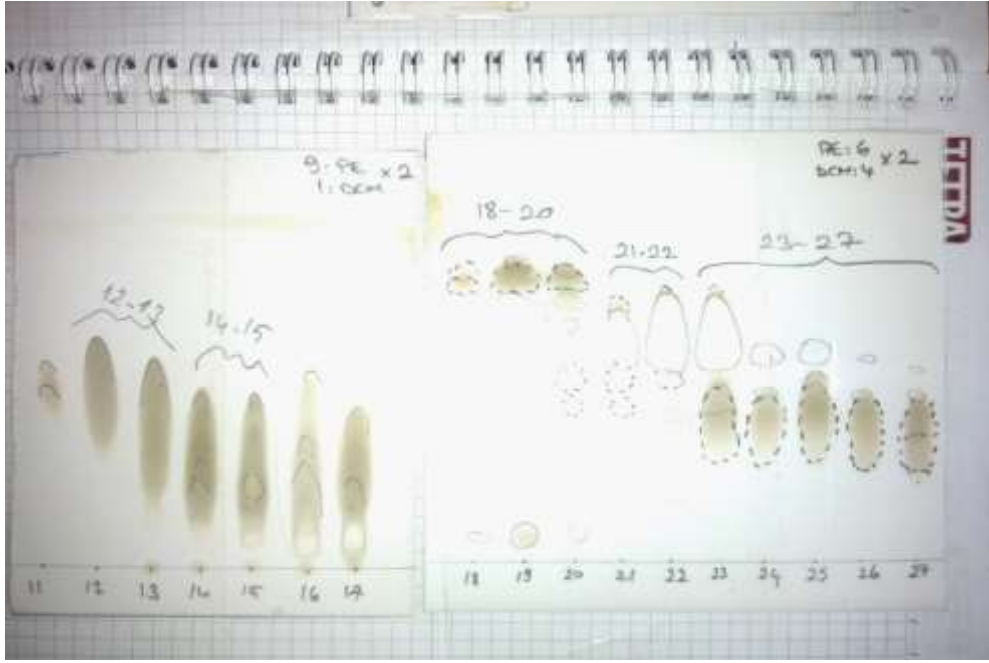
3.1.4.1 MSCov'dan saf madde izolasyonu

3.1.4.1.1 Diklorometan (MSCov-D) fraksiyonu çalışması

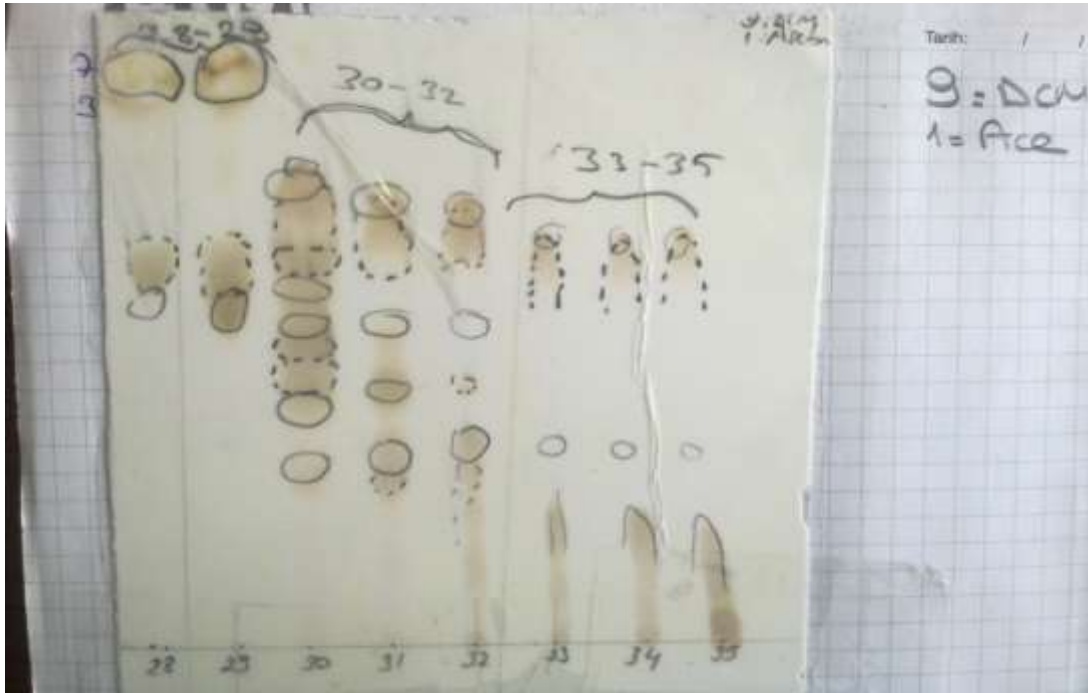
Diklorometan ekstresi (MSCov-D) kurutulduktan sonra silika jelin adsorban olarak kullanıldığı bir kolon üzerinden fraksiyonlandırıldı. Elüsyona % 100 petrol eteri ile başlandı ve polarite arttırılarak % 100 diklorometana geçildi, bundan sonra da polarite aseton ilavesi ile arttırılıp % 100 asetona ve daha sonra çok küçük oranlarla metanol ilavesiyle başlayarak % 100 metanole kadar devam edildi. Bu işlemler neticesinde toplam 54 fraksiyon elde edildi. İTK sonuçlarına göre benzer fraksiyonların birleştirilmesi sonucu aşağıdaki 13 fraksiyon elde edildi.



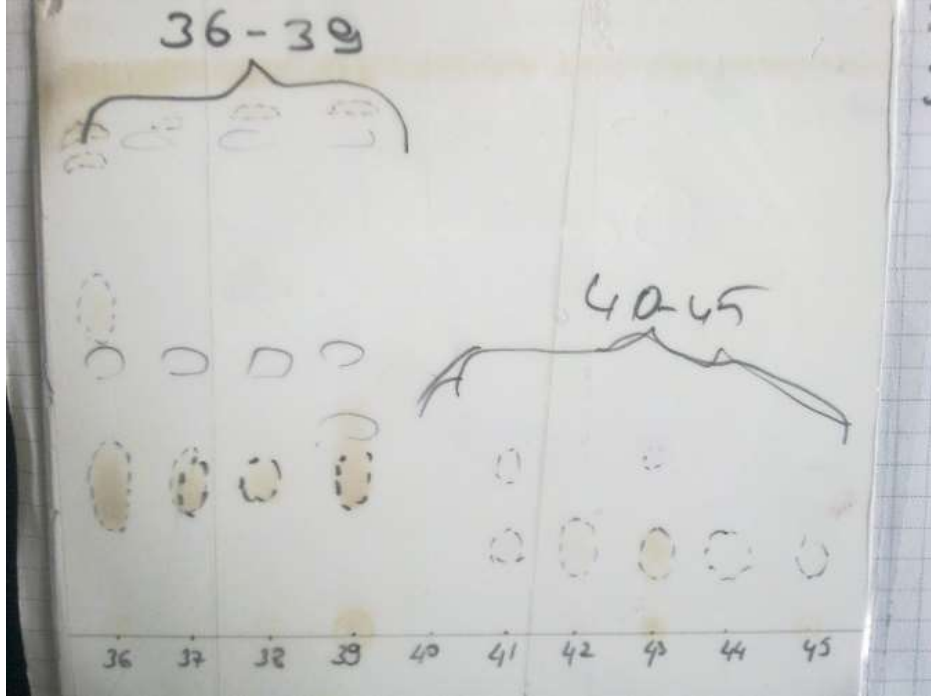
Şekil 5. MSCov-D 4-10 fraksiyonlarının İTK'sı



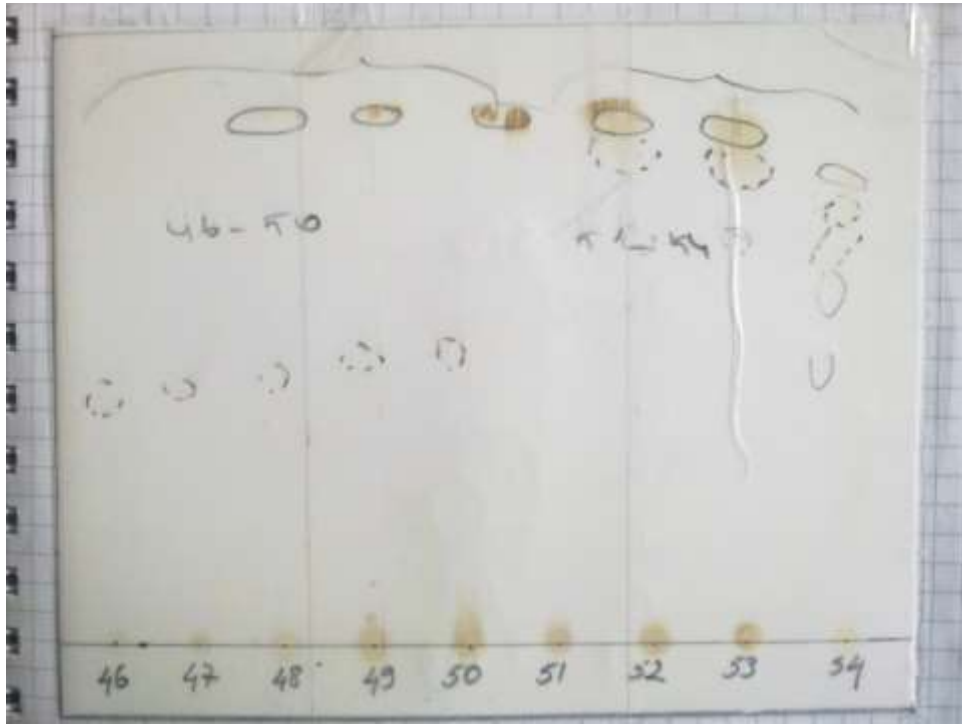
Şekil 6. MSCov-D 11-27 fraksiyonlarının İTK'sı



Şekil 7. MSCov-D 28-35 fraksiyonlarının İTK'sı



Şekil 8. MSCov-D 36-45 fraksiyonlarının İTK'sı



Şekil 9. MSCov-D 46-54 fraksiyonlarının İTK'sı

MSCov-D 14-15 nolu fraksiyon ise yağ asidi bileşenlerinin belirlenmesi için gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile analiz edildi. Kullanılan GC-MS analiz koşulları şöyledir:

Sistem: Thermo Scientific POLARIS GC-MS/MS

Kolon: Rtx-5Sil MS (30 m x 0.25mmID x 0.25 µm)

Sıcaklık Programı: 50 °C-5 dak. // 5 °C/dak.// 250 °C-10 dak.

MS iletim hattı sıcaklığı: 230°C

Taşıyıcı Gaz: Helyum (Akış hızı: 1 mL/dak.)

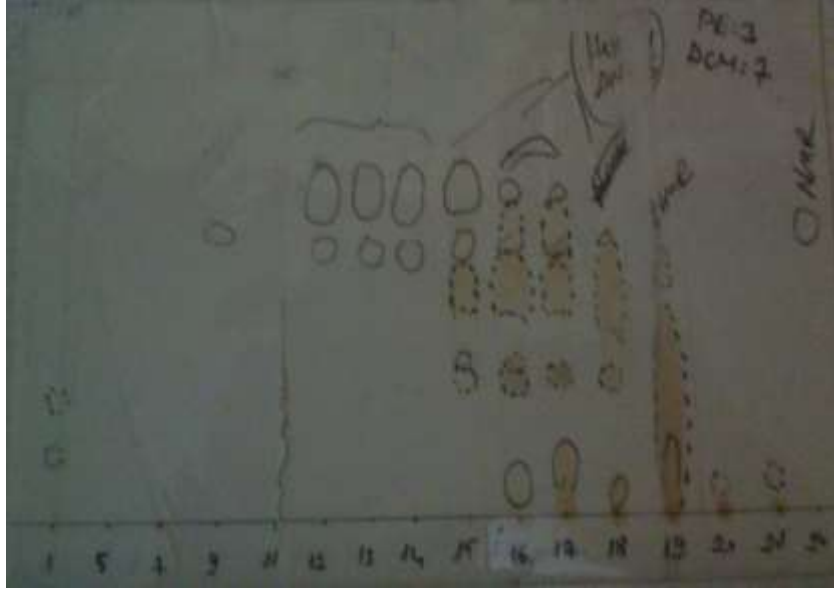
Kütle Aralığı: m/z 50-650

MSCov-D 14-15 nolu fraksiyonun GC-MS analizi sonucu çoğu yağ asitlerinden oluşan 16 bileşik elde edilmiştir. Sonuçları Tablo 13'de verilmektedir.

Tablo 7. MSCov-D 14-15 nolu fraksiyonun GC-MS analiz sonuçları

No	Alınma Zamanı (Rt)	Bileşen	% Oran
1	22.11	2,5-Di-tert-butilfenol, metil ester	8,5
2	26.75	Tetradekanoik asit, metil ester	0,1
3	30.12	Pentadecanoik asit, metil ester	0,4
4	32.21	Margarik asit, metil ester	1,2
5	32.74	Decandioik asit, metil ester	1,1
6	33.96	9,12-octadekanoik asit, metil ester	12,8
7	34.08	Oleik asit, metil ester	28,7
8	34.54	Stearik acid, metil ester	10,0
9	37.97	Arachidic acid, metil ester	4,4
10	39.61	Decandioik asit, metil ester	2,0
11	41.12	Trikosanoik asit, metil ester	11,5
12	42.60	Eikosanoik acid, metil ester	5,1
13	44.07	Tetrakosanoik asit, metil ester	10,3
14	45.46	Pentakosanoik asit, metil ester	2,1
15	46.76	Hexakosanoik asit, metil ester	1,2
16	49.83	Oktakosanoik asit, metil ester	0,7
TOPLAM			100.1

Diklorometan ekstresinin diğer bir fraksiyonlarından olan MSCov-D 23-27 nolu fraksiyon (574 mg) silika jelin adsorban olarak kullanıldığı bir kolon üzerinden tekrar fraksiyonlandırıldı. Elüsyona %100 petrol eteri ile başlandı ve polarite artırılarak %100 diklormetana geçildi ve sonrasında polarite aseton ilavesi ile artırılıp %100 asetona ve daha sonra metanol ilavesine başlanarak %100 metanole kadar devam edildi ve toplam 32 fraksiyon elde edildi. Şekil 23'de fraksiyonların İTK sonuçları yer almaktadır.

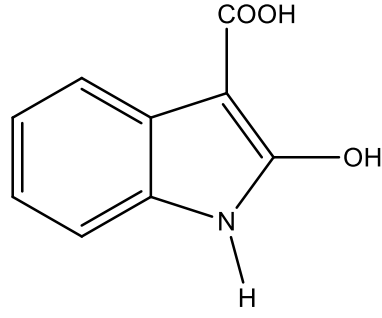


Şekil 10. MSCov-D (23-27) 1-24 fraksiyonlarının İTK'sı [Sistem: Petrol eteri: Diklormetan (3:7)]



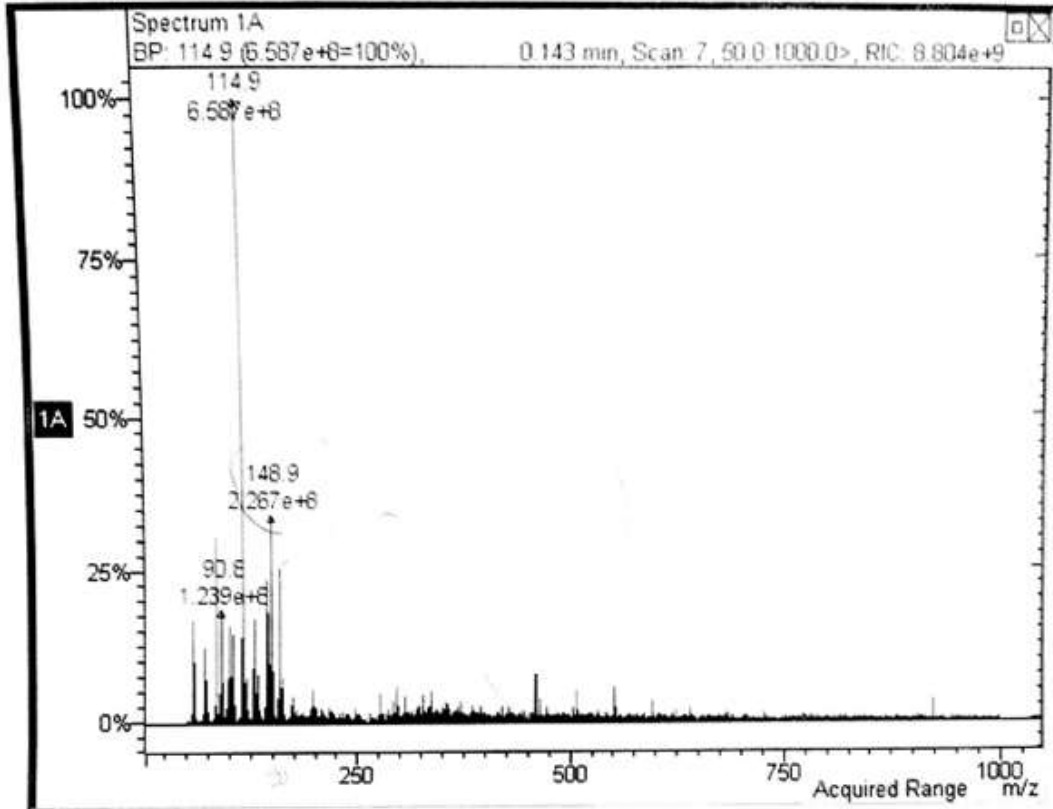
Şekil 11. MSCov-D (23-27) 31, 32 fraksiyonlarının İTK'sı [Sistem: Aseton: Diklormetan (9:1)]

MSCov-D (23-27) 32 nolu fraksiyon prep. İTK uygulandı ve elde edilen madde CDHT-2 olarak kodlanarak NMR spektroskopisine gönderildi. Yapılan spektroskopik analizler ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) sonucu madenin dolik asit yapısında olduğu belirlendi (Şekil 25).

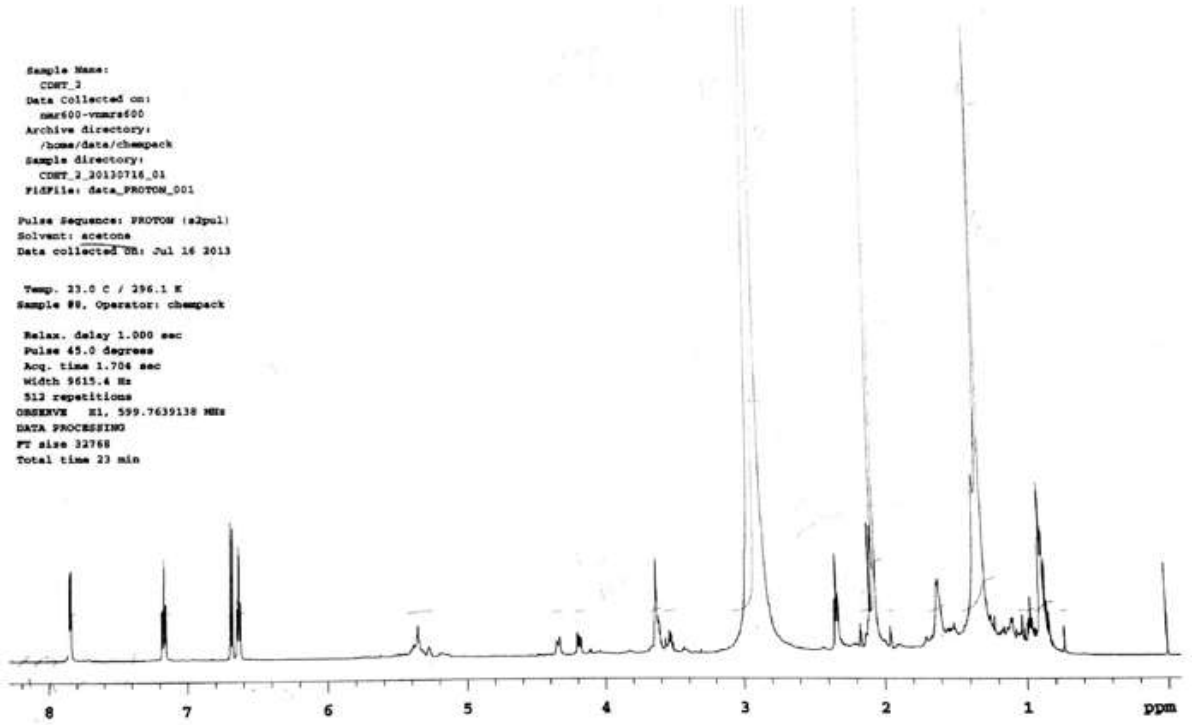


Şekil 12. 1H-indol- 2-hidroksi, 3-karboxilik asit

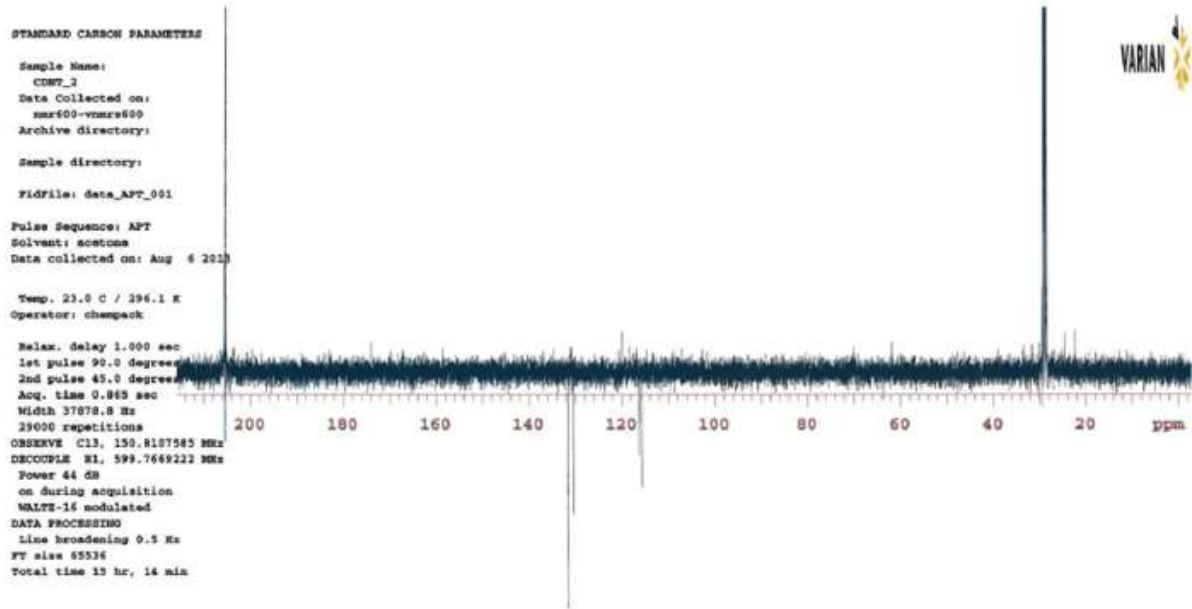
Kahverengi renkte olan CDHT-2 maddesi amorf halde elde edildi (20 mg). Molekülün 1H NMR, 13C NMR (CDCl₃, 600 MHz) spektrumları molekülde bir indol halkasının varlığına işaret etti (Şekil 15-17). Kütle spektrumlarında [M⁺] 177, [M-CO₂]133 ve diğer parçalanma pikleri izlendi. 1H-indol-2-hidroksi, 3-karboxilik asit formülüne sahip bileşik doğadan ilk kez elde edildi.



Şekil 13. CDHT-2'nin MS spektrumu



Şekil 14. CDHT 2'nin 1H NMR spektrumu (CDCl₃, 600 MHz, 2.2-4.2 ppm)

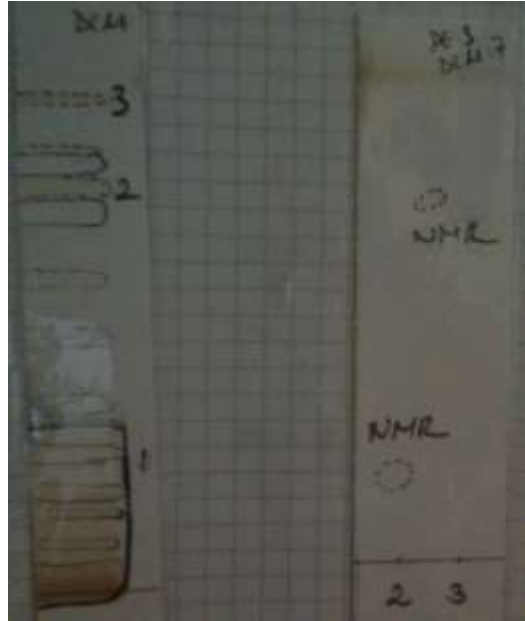


Şekil 15. CDHT 2'nin 13C-NMR (APT) spektrumu (CD₃COCD₃, 125 MHz)

MSCov-D (23-27) 16-17 nolu fraksiyona prep. İTK yapıldı (Şekil 29-30).

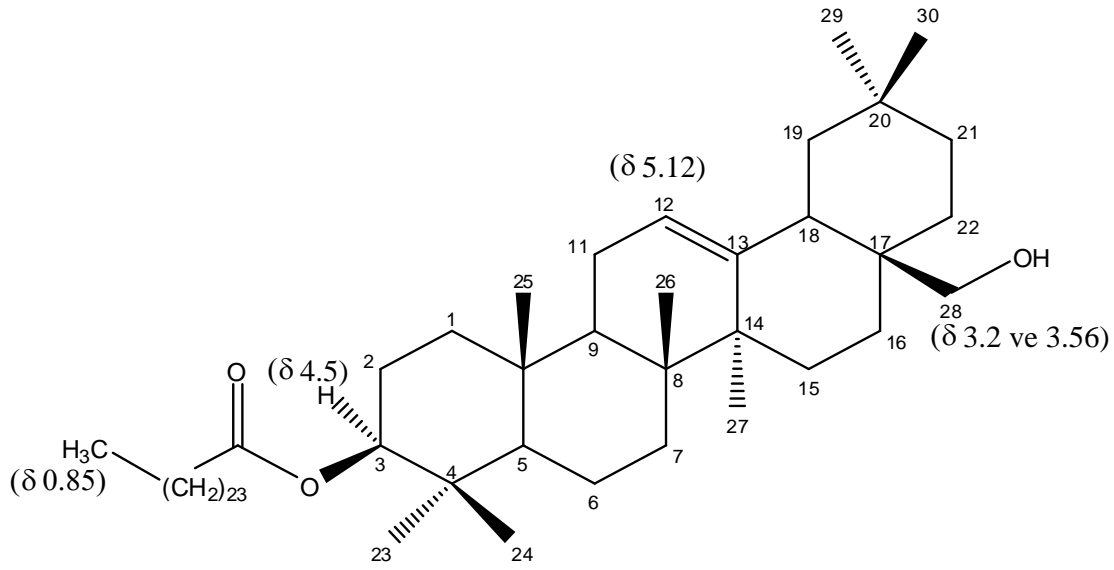


Şekil 16. MSCov-D (23-27) 16-17 nolu fraksiyonun prep İTK'sı



Şekil 17. MSCov-D (23-27) 16-17-1 nolu fraksiyonun prep İTK'sı

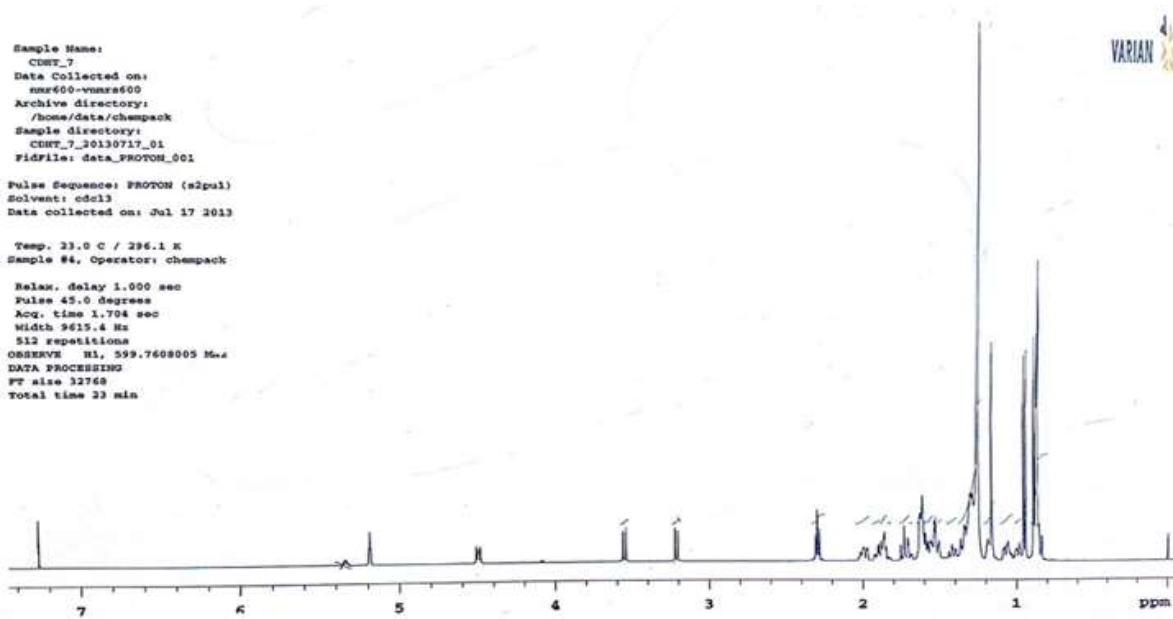
NMR kodu CDHT-7 olarak verilen ve MSCov (23-27) 16-17 nolu fraksiyondan preparatif ince tabaka kromatografisiyle saflaştırılan bileşiğin yapısının spektroskopik analizler (1H NMR, 13C NMR) sonucu olean iskeletine sahip bir triterpen olduğu belirlendi (Şekil 31).



Şekil 18. CDHT 7 (Olean-12-en-28-ol, 3β-pentakosanoat)

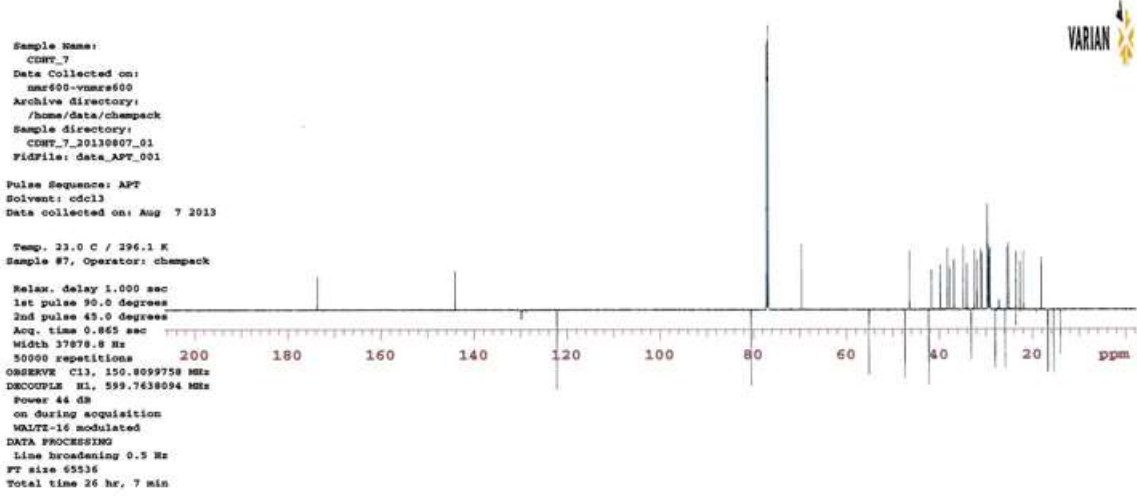
Beyaz renkli olan CDHT 7 maddesi kristal halde elde edildi (16,4 mg). Molekülün ¹H NMR, ¹³C NMR (CDCl₃, 600 MHz) ve kütle spektrumları Şekil 21-23'de verildi. CDHT 7 maddesinin spektral değerleri literatürdeki benzer bileşiklerin değerleri ile karşılaştırıldı ve bileşiğin Olean-12-en-28-ol, 3β-pentakosanoat formülüne sahip yeni bir triterpen olduğu belirlendi.

APCI (Atmospheric pressure chemical ionization) tekniğiyle alınan kütle spektrumunda (Şekil 32) [M+1] piki 803'te gözlenmiştir. Ayrıca C-3'e bağlı esterli yan zincirin kopmasıyla oluşan aglukana (ana iskelete) ait [(M-yan zincir)+1] piki 413'te izlenmesi yapıyı doğrulamaktadır.

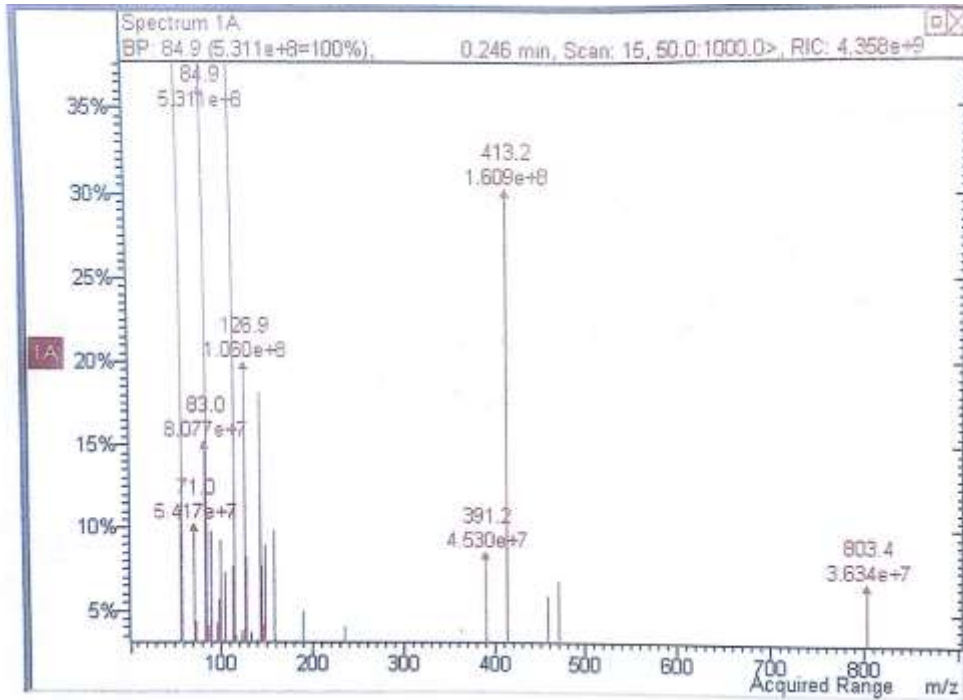


Şekil 19. CDHT 7'nin ¹H NMR spektrumu (CDCl₃, 600 MHz, 2.2-4.2 ppm)

Bu bileşik doğadan ve dolayısıyla Capparis türlerinden ilk kez elde edildi.

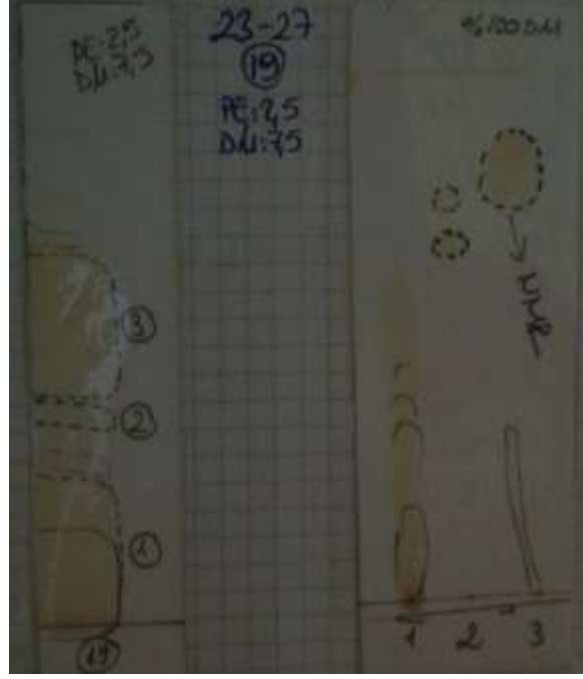


Şekil 20. CDHT 7'nin ¹³C-NMR (APT) spektrumu (CDCl₃, 125 MHz)



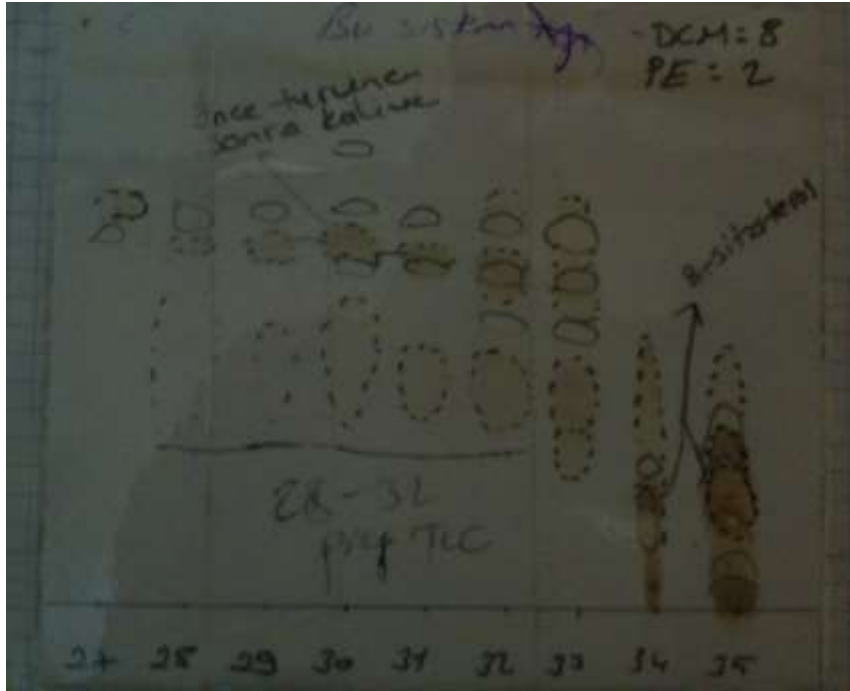
Şekil 21. CDHT 7 bileşiminin kütle spektrumu

Madde saflaştırmasına MSCov-D (23-27) 19 nolu fraksiyon ile devam edildi. Prep İTK'sı ve bu fraksiyondan saflaştırılan maddelerin İTK'sı Şekil 35'de verildi.

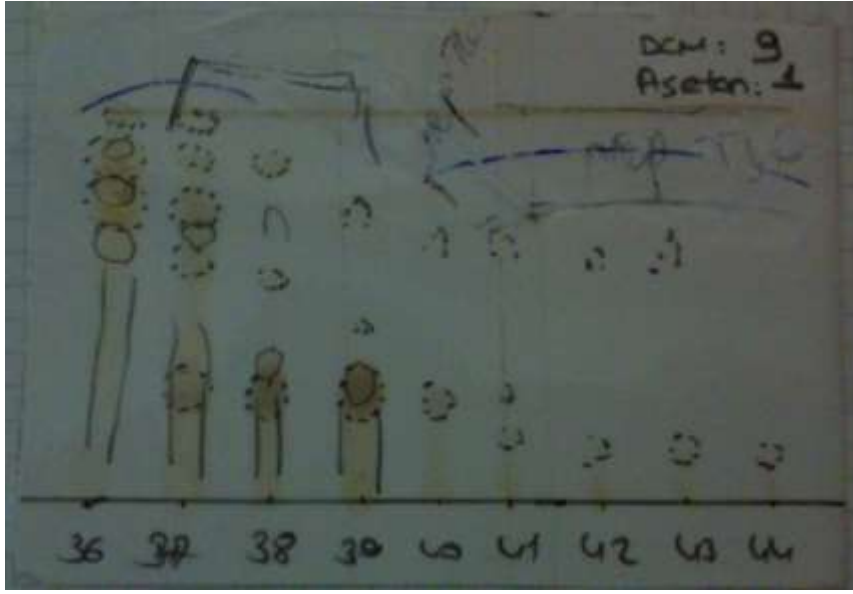


Şekil 22. MSCov-D (23-27) 19 nolu fraksiyonun prep İTK'sı

Fraksiyonlandırma işlemlerine; diklormetan ekstresi (MSCov-D) fraksiyonlarından 28-29 nolu fraksiyonun (4,074 g) silika jelin adsorban olarak kullanıldığı bir kolon üzerinden tekrar fraksiyonlandırılmasıyla devam edildi. Elüsyona %100 petrol eteri ile başlandı ve polarite arttırılarak %100 diklormetana geçildi ve sonrasında polarite aseton ilavesi ile arttırılıp %100 asetona ve daha sonra metanol ilavesine başlanarak %100 metanole kadar devam edildi ve toplam 78 fraksiyon elde edildi. Şekil 36-41'de fraksiyonların İTK sonuçları yer almaktadır.



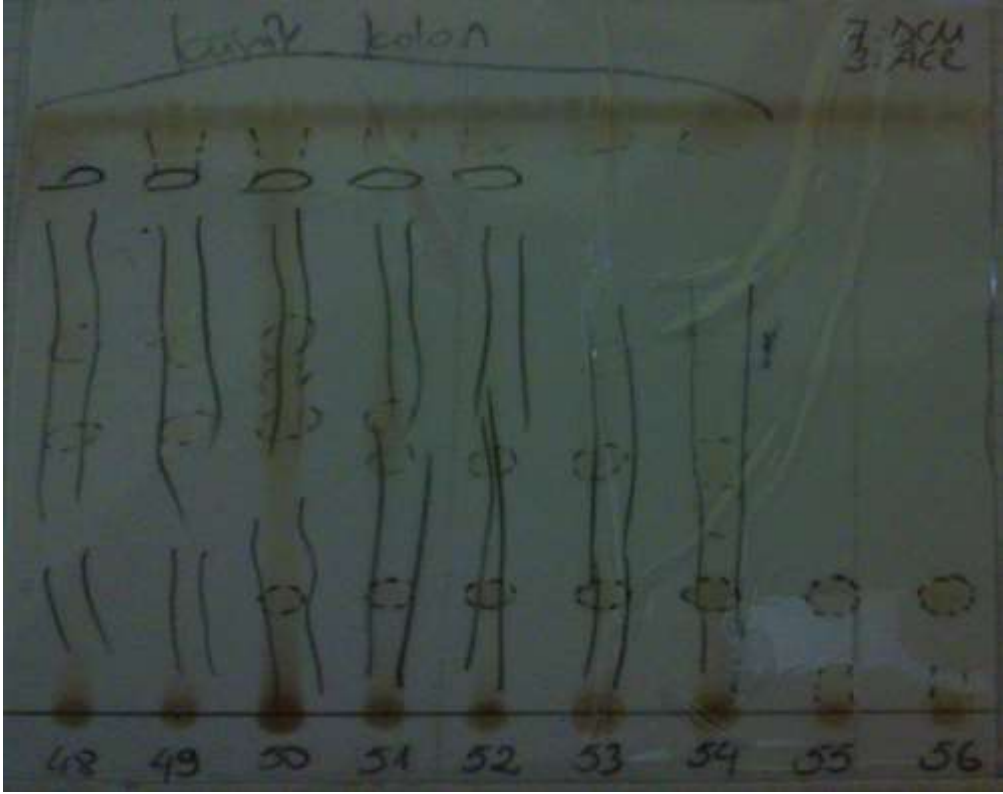
Şekil 23. MSCov-D (28-29) 27-35 fraksiyonlarının İTK'sı [Sistem: DCM:PE (8:2)]



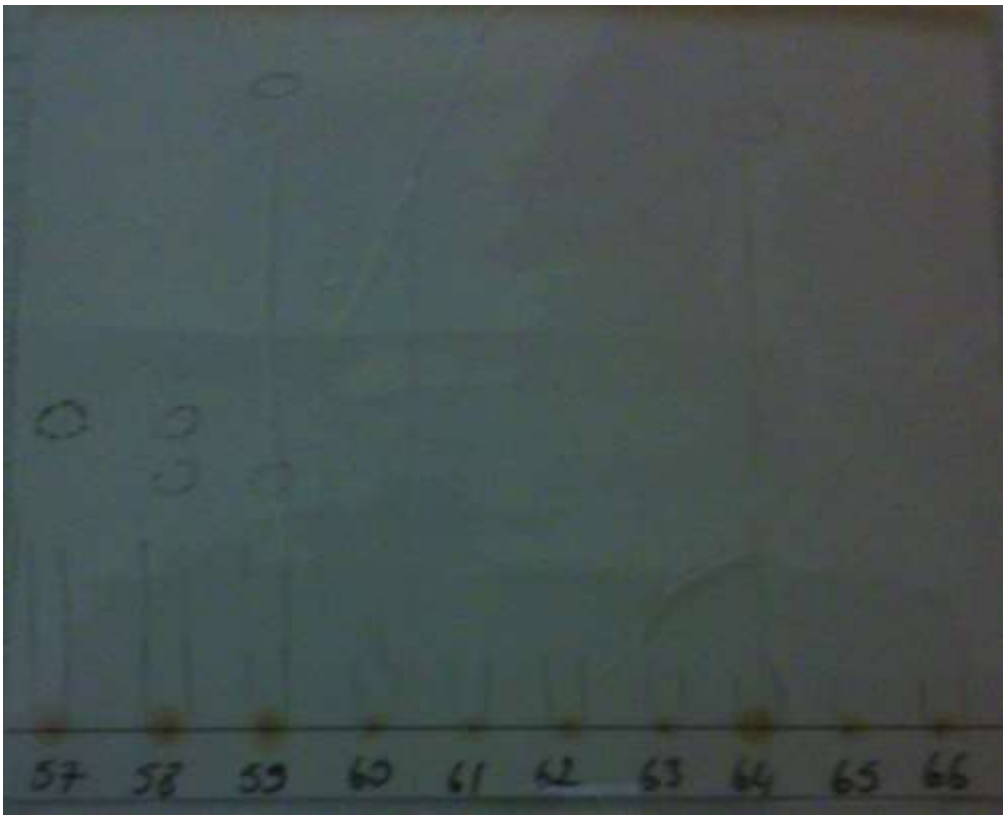
Şekil 24. MSCov-D (28-29) 36-44 fraksiyonlarının İTK'sı [Sistem: DCM:Aseton (9:1)]



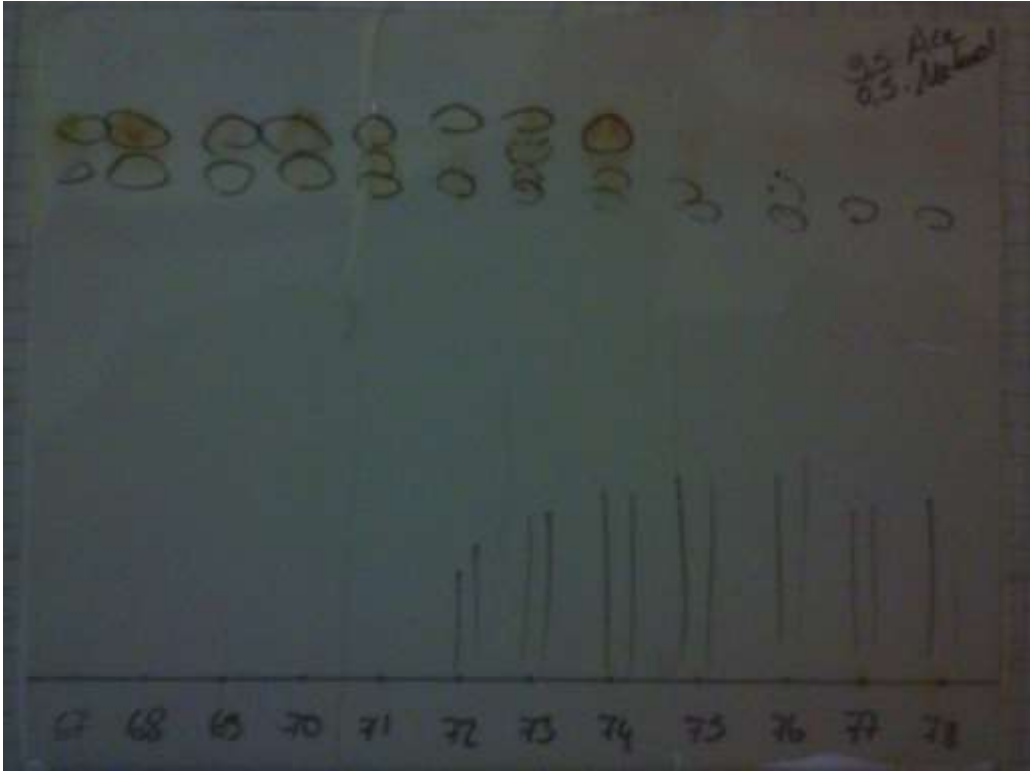
Şekil 25. MSCov-D (48-56) 45-47 fraksiyonlarının İTK'sı [Sistem: DCM:Aseton (5:5)]



Şekil 26. MSCov-D (48-56) 36-44 fraksiyonlarının İTK'sı [Sistem: DCM:Aseton (7:3)]

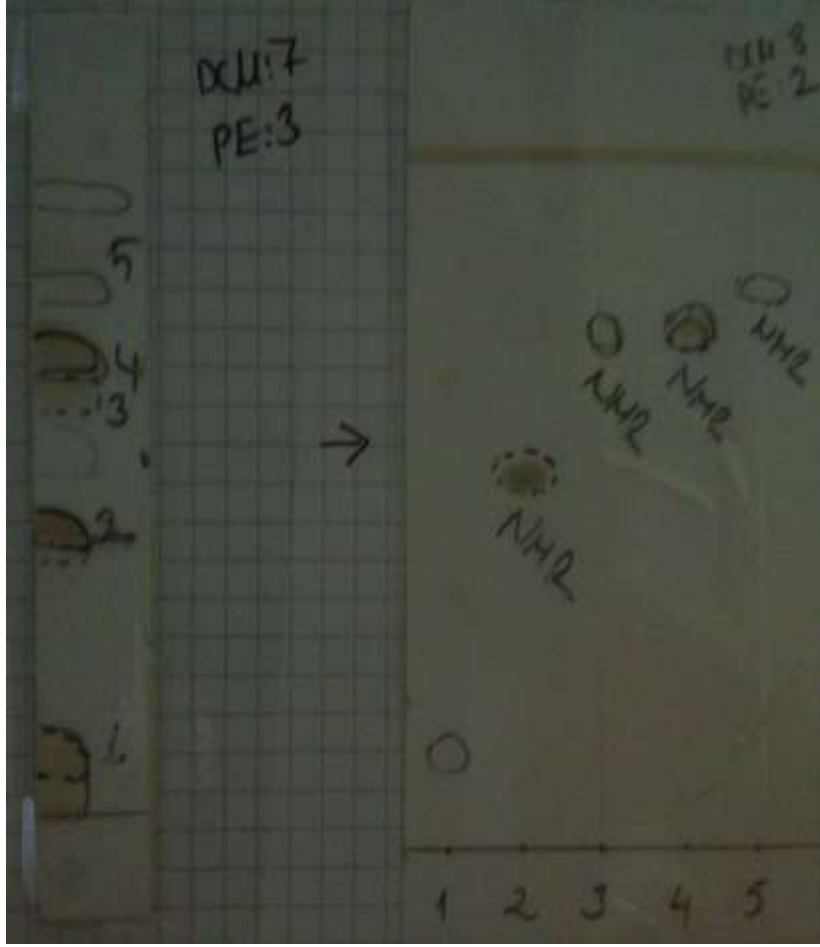


Şekil 27. MSCov-D (28-29) 57-66 fraksiyonlarının İTK'sı [Sistem: DCM:Aseton (7:3)]



Şekil 28. MSCov-D (28-29) 67-78 fraksiyonlarının İTK'sı [Sistem: Aseton:Metanol (9,5:0,5)]

Bu fraksiyonlardan ilk olarak MSCov-D (28-29) 28-32 nolu fraksiyon preparatif ince tabaka kromatografisi (prep İTK) ile saflaştırıldı. Prep İTK'sı ve bu fraksiyondan saflaştırılan maddelerin İTK'sı aşağıda yer almaktadır (Şekil 42).



Şekil 29. MSCov-D (28-29) 28-32 nolu fraksiyonun prep İTK'sı

MSCov'un diğer alt fraksiyonları olan butanol ve etilasetat fraksiyonları polar fraksiyonlar olduklarından prep. İTK yöntemi ile izolasyon yapılamadı.

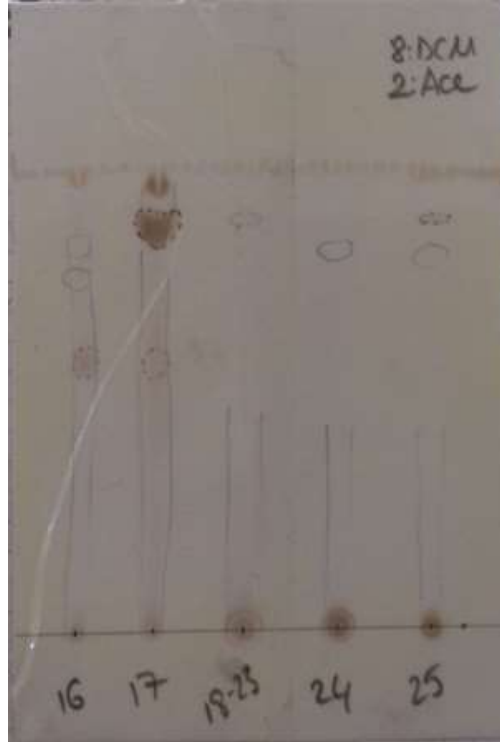
3.1.4.2 İşlenmemiş Bitki Bölümlerinden Madde Saflaştırılması

3.1.4.2.1 *Capparis ovata* Bitkisinin "Tomurcuk" Kısmından Hazırlanan Hekzan:Diklorometan Ekstresinin Fraksiyonlandırılması ve Saflaştırılması

Önceden toz ettiğimiz tomurcuk kısmı (1795 g) su:metanol (20:80) ile tüketildi. Tomurcuk sulu metanol ekstresi hekzan:diklorometan (1:1) ile tekrar ekstraksiyona (re-ekstraksiyon) tabi tutuldu. Elde edilen *Capparis ovata* Tomurcuk ekstresi kısaca COT olarak kodlandı ve silikajelin adsorban olarak kullanıldığı bir kolon üzerinden fraksiyonlandırıldı. Elüsyona %100 petrol eteri ile başlanarak ve polariteyi belli oranda arttırarak %100 diklorometana; diklorometandan yine polarite arttırılarak %100 asetona ve ardından %100 metanole kadar devam edildi. Şekil 43-44'de fraksiyonların İTK sonuçları yer almaktadır. Bunlardan fraksiyon 9'dan elde edilen ve saflaştırılan COT-3 ve COT-4'ün daha önce tüm bitki ekstresinden elde edilen CDHT-7 ile aynı triterpen olduğu belirlendi.

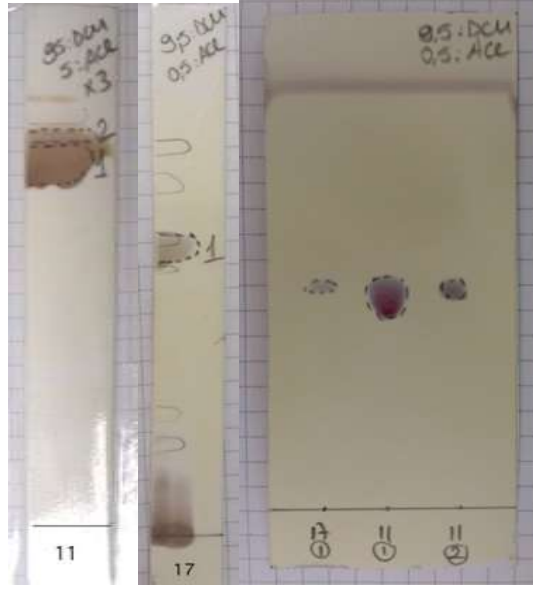


Şekil 30. Fr7-15 nolu fraksiyonların İTK'sı



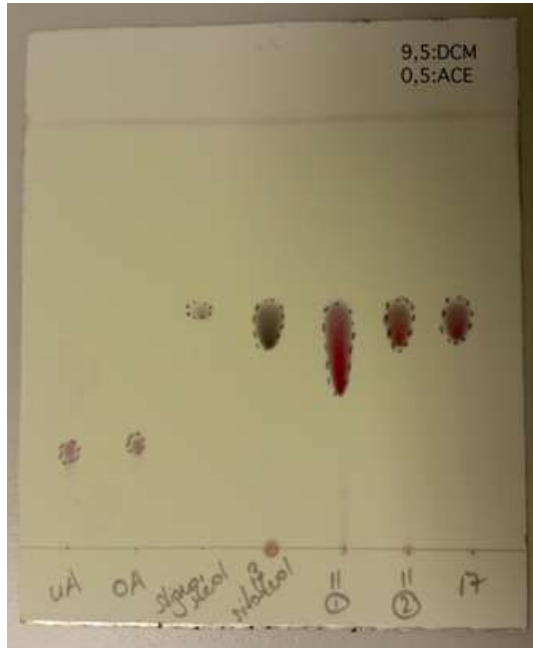
Şekil 31. Fr16-25 nolu fraksiyonların İTK'sı

İTK sonuçları değerlendirilerek 11 ve 17 nolu fraksiyonlara prep. İTK yöntemi uygulandı ve 3 madde elde edildi. Bu fraksiyonların prep. İTK'sı ve saflaştırılan maddelerin yan yana İTK'sı aşağıda yer almaktadır. Saflaştırma, silikajel plaklar üzerinde gerçekleştirilmiş ve genelde diklorometan aseton karışımları kullanılmıştır. Prep. İTK için kullanılan çözücüler aşağıda plaklar üzerinde gösterilmiştir (Şekil 45).



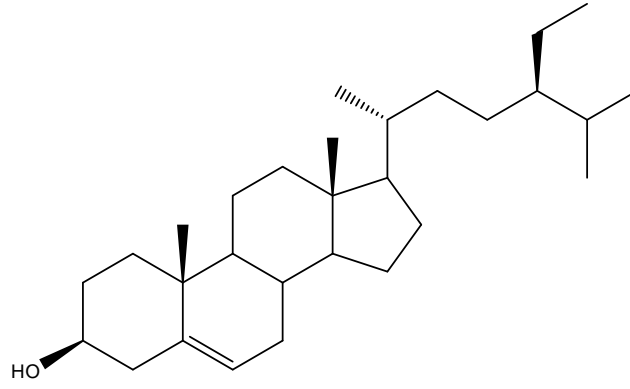
Şekil 32. Fr.11-17 nolu fraksiyonların prep. İTK'sı

Sonrasında, saflaştırılan Fr. 11-1, 11-2 ve 17 nolu maddeler karşılaştırma amacıyla β -sitosterol, stigmasterol, ursolik asit ve oleanolik asit ile yan yana tatbik edilerek İTK yapıldı (Şekil 46) ve yapı tayini için spektroskopik analizleri yapıldı ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$). NMR spektrumlarına dayanarak 11-1, 11-2 ve 17'nin β -sitosterol olduğu belirlendi.

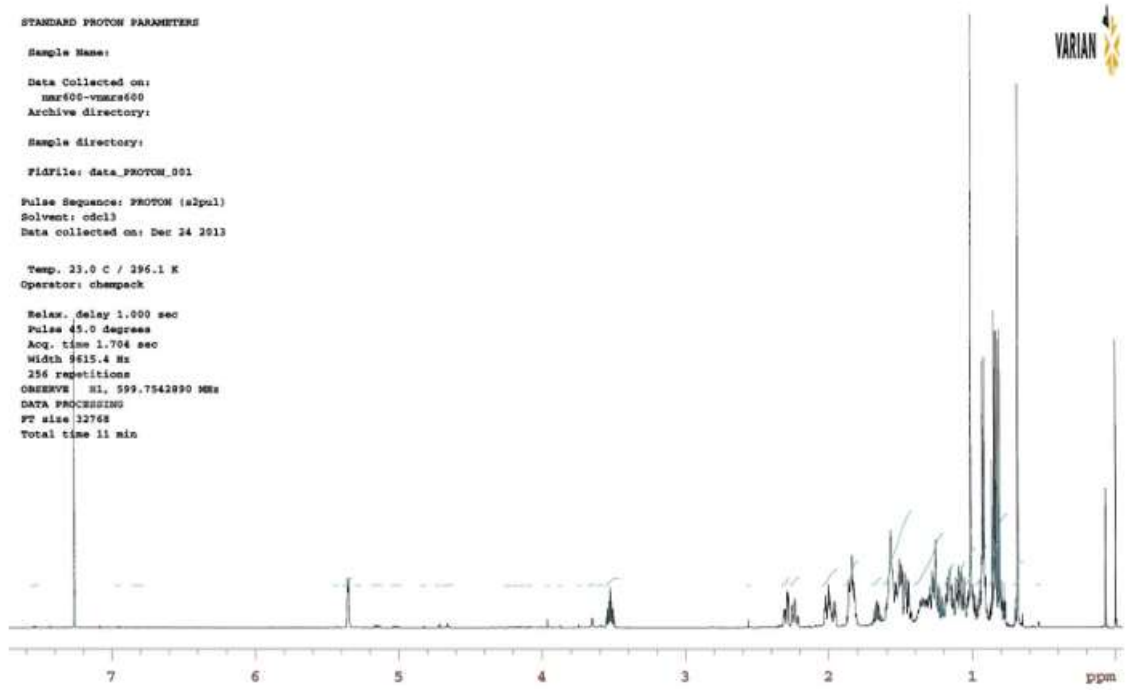


Şekil 33. Fr. 11-1, 11-2 ve 17 nolu maddeler ile β -sitosterol, stigmasterol, oleanolik asit ve ursolik asit İTK'sı

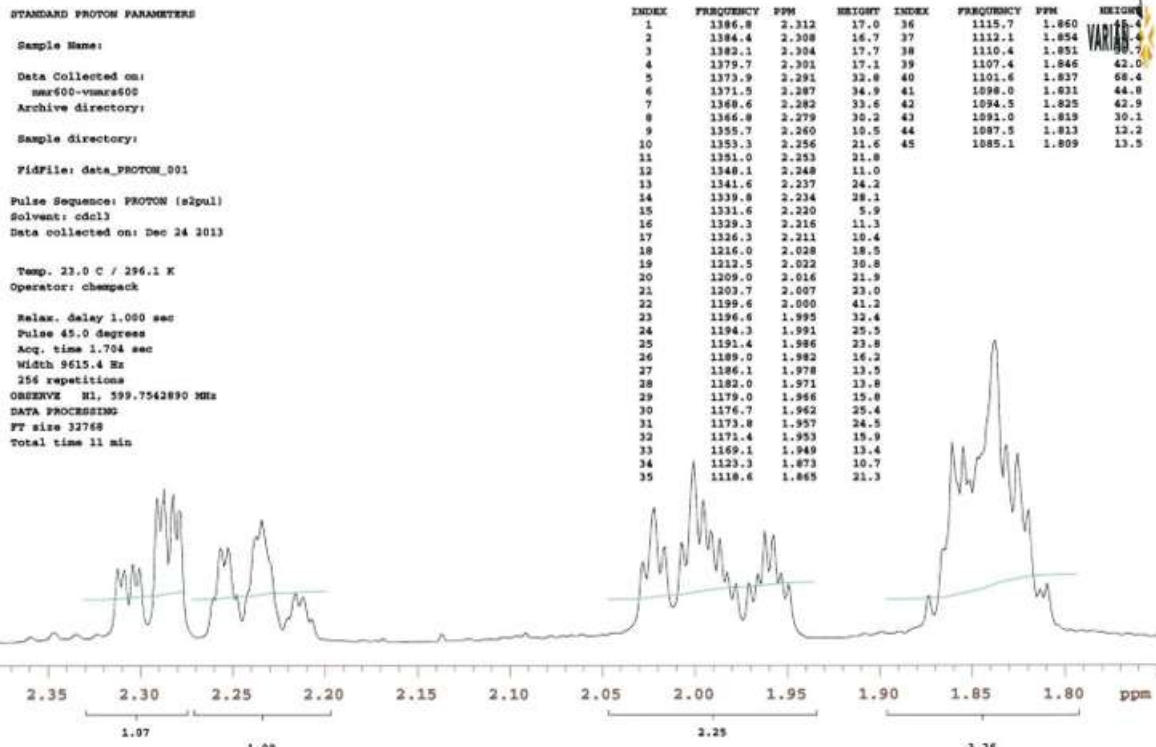
Maddenin yapısı ve spektrumları Şekil 47'de gösterilmektedir.



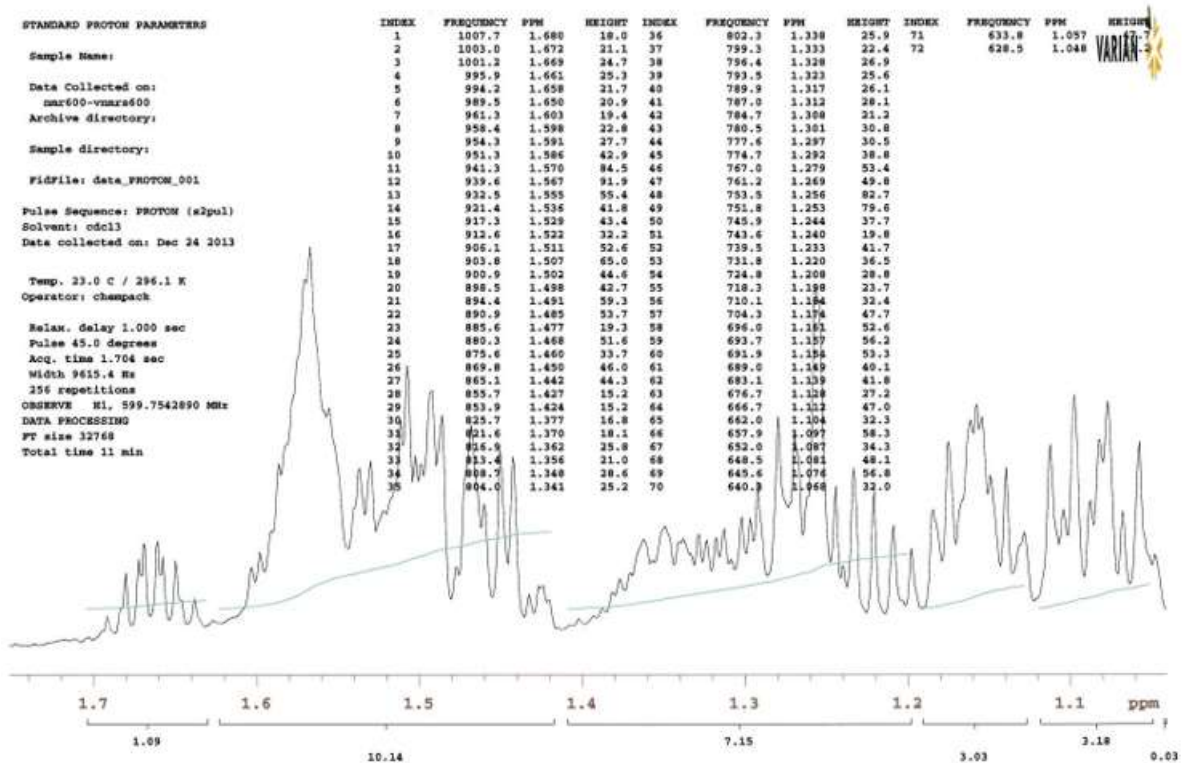
Şekil 34. β -sitosterol



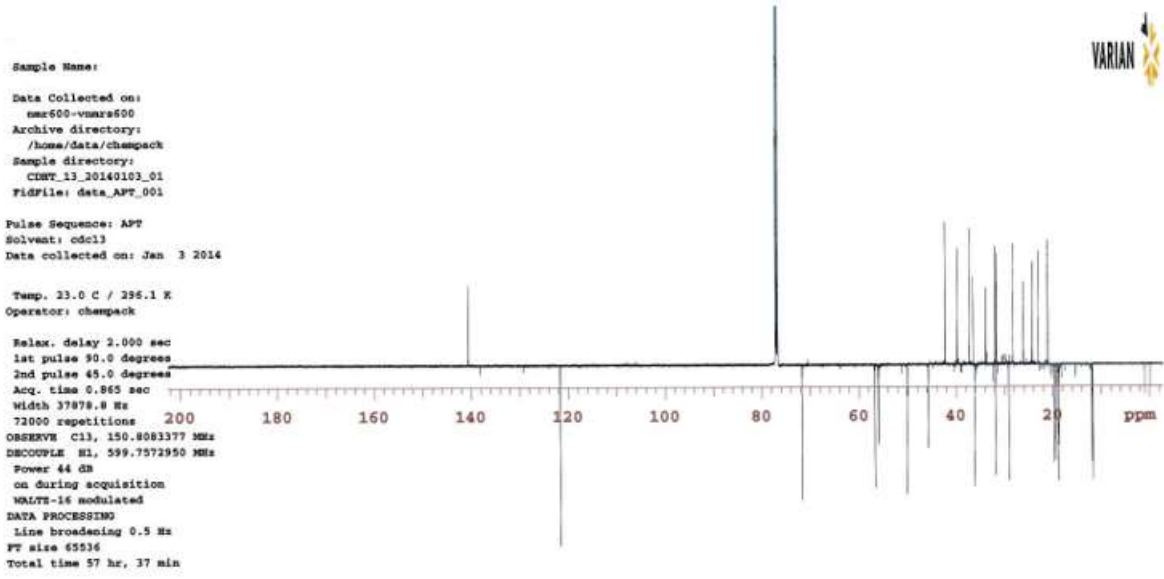
Şekil 35. β -sitosterol'ün $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (CDCl_3 , 600 MHz)



Şekil 36. β -sitosterol'ün $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (CDCl_3 , 600 MHz, 2.35-1.80 ppm arası genişletilmiş)



Şekil 37. β -sitosterol'ün $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (CDCl_3 , 600 MHz, 1.7-1.1 ppm arası genişletilmiş)



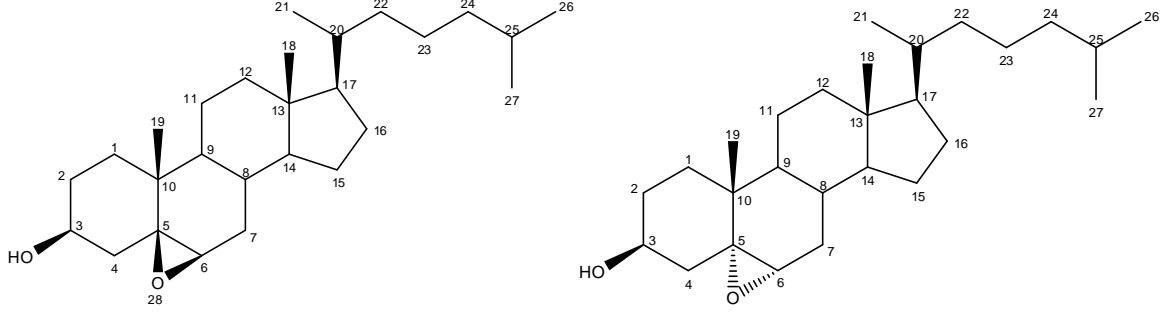
Şekil 38. β -sitosterol'ün ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3 , 125 MHz)

Fraksiyon 14 prep. İTK ile saflaştırıldı. Bu fraksiyondan saflaştırılan maddenin İTK'sı yanda yer almaktadır (Şekil 52)

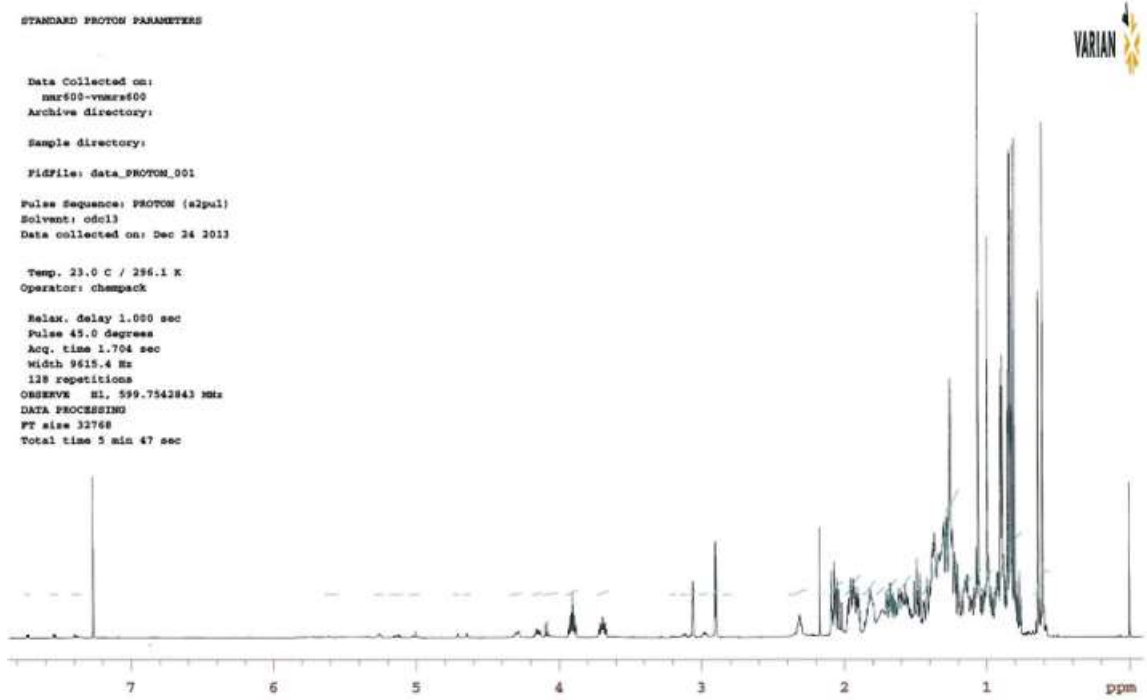


Şekil 39. Fr. 14'ün İTK'sı

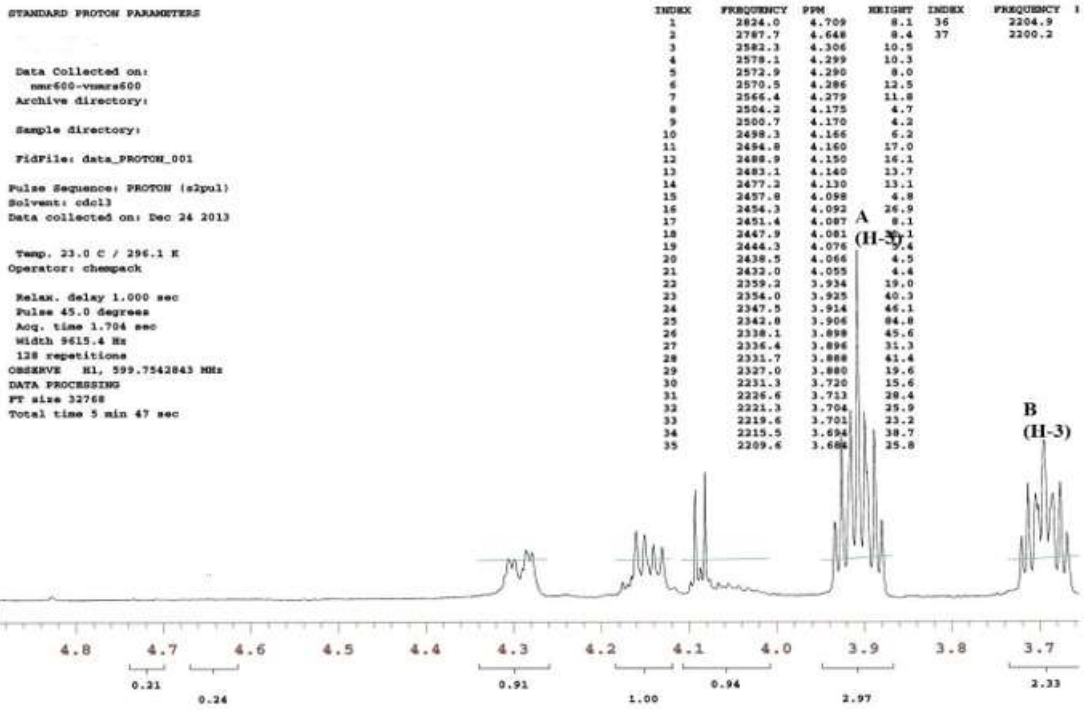
Maddenin $^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumları incelendiğinde steroid yapısındaki 5,6-epoksikolestanın iki izomerinin bir arada elde edildiği anlaşılmıştır (Şekil 53). Doğadan ilk kez elde edilen bu izomerler, daha önce kolesterolden hareketle yarı sentetik yolla elde edilmişlerdir (Carvalho vd., 2009).



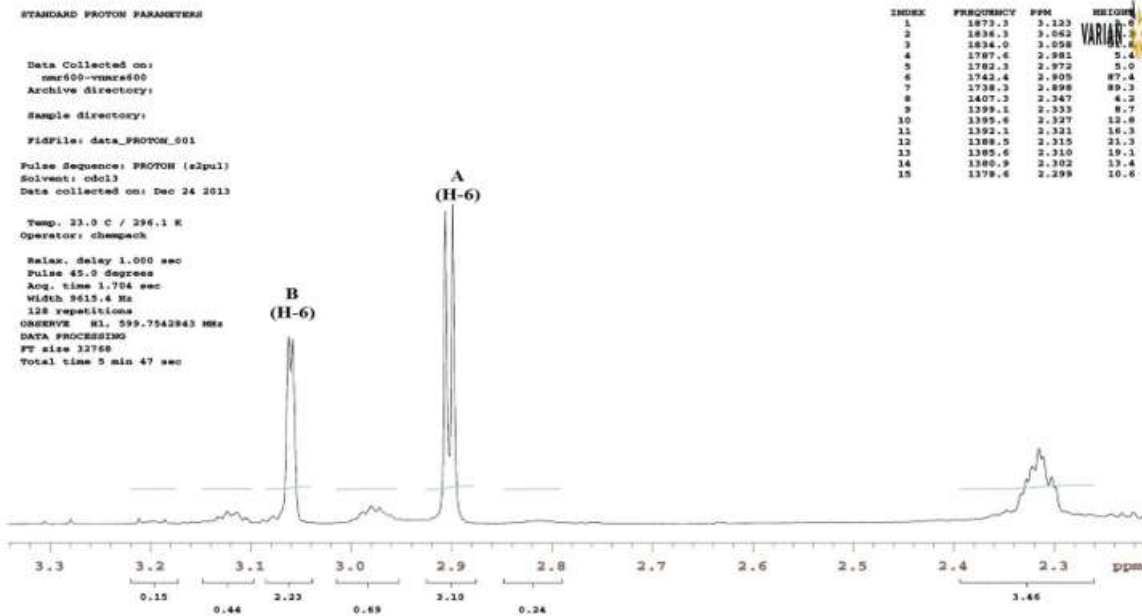
Şekil 40. $5\alpha,6\alpha$ -epoksikolestan, 3β -ol ve $5\beta,6\beta$ -epoksikolestan, 3β -ol



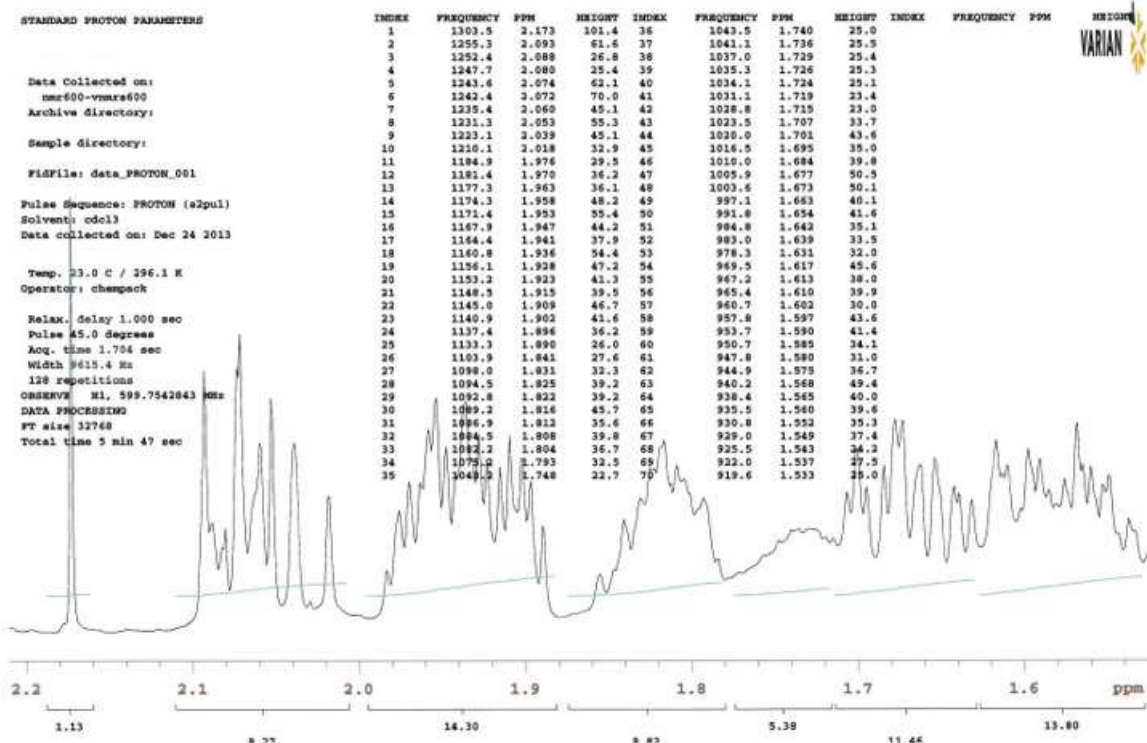
Şekil 41. 5,6,epoksikolestan- 3β -ol'ün $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (CDCl_3 , 600 MHz.)



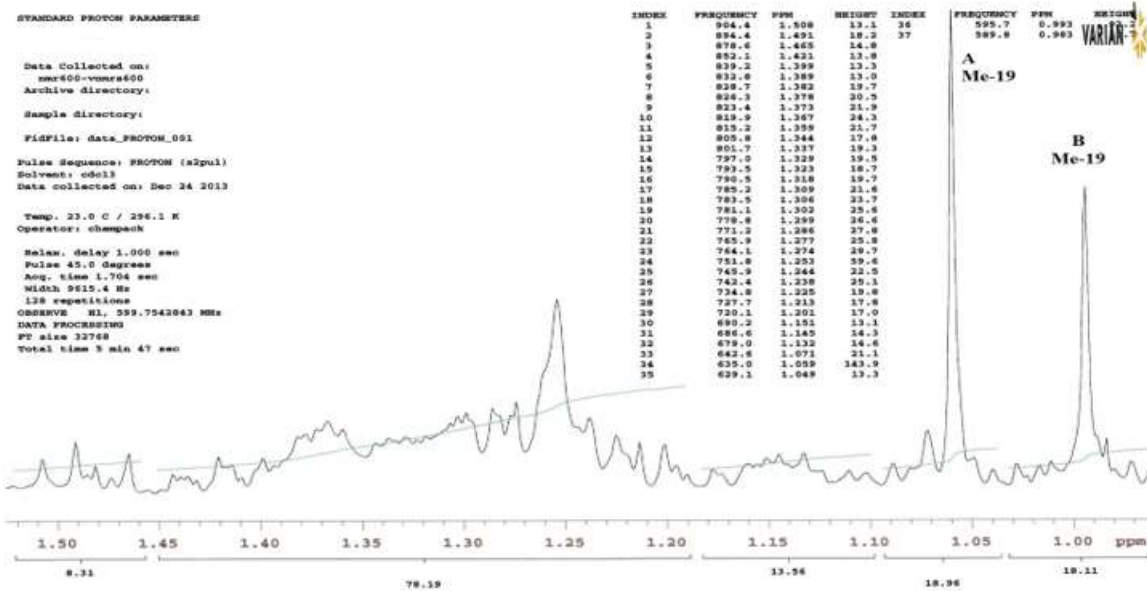
Şekil 42. 5,6,epoksikolestan-3 β -ol'ün 1H-NMR spektrumu (CDCl₃, 600 MHz, 4.8-3.6 ppm, arası açılmış)



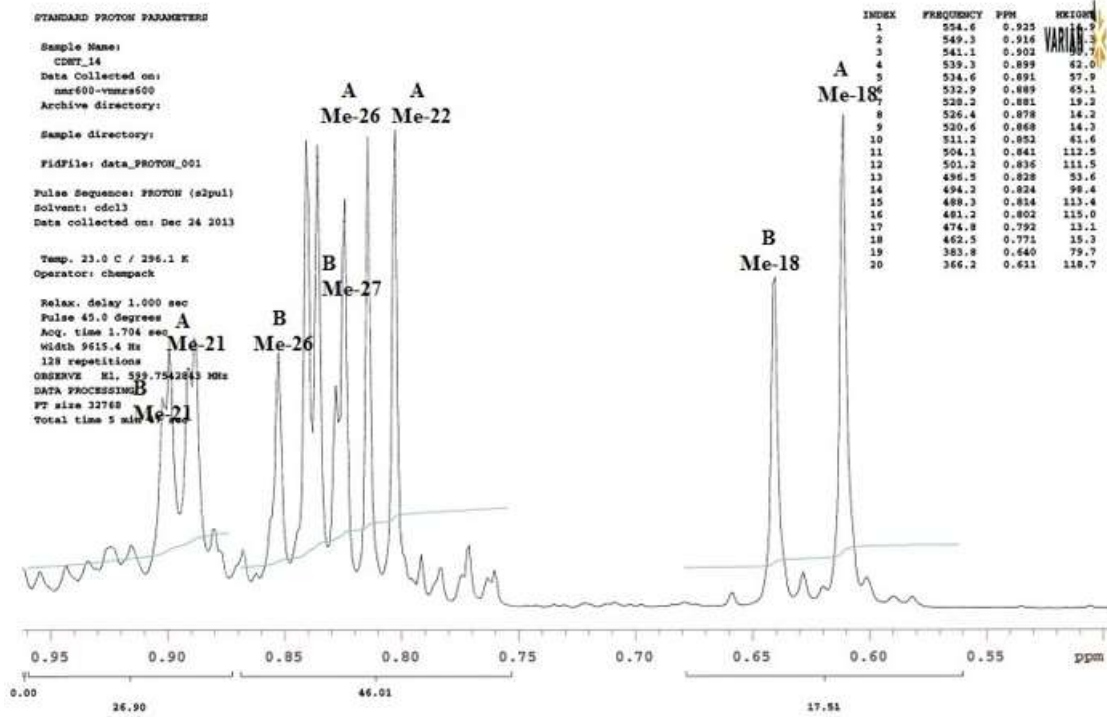
Şekil 43. 5,6,epoksikolestan-3 β -ol'ün 1H-NMR spektrumu (CDCl₃, 600 MHz, 3.3-2.3 ppm arası açılmış)



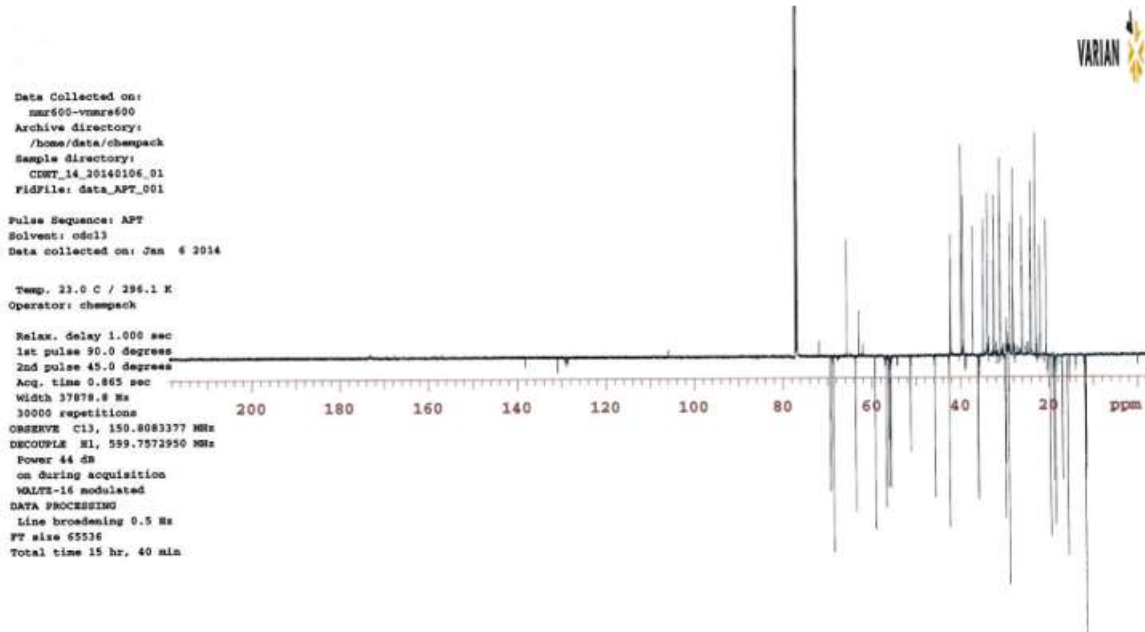
Şekil 44. 5,6,epoksikolestan-3 β -ol'ün 1H-NMR spektrumu (CDCl₃, 600 MHz, 2.3-1.6 ppm arası genişletilmiş)



Şekil 45. 5,6,epoksikolestan-3 β -ol'ün 1H-NMR spektrumu (CDCl₃, 600 MHz, 1.5-1.0 ppm arası genişletilmiş)

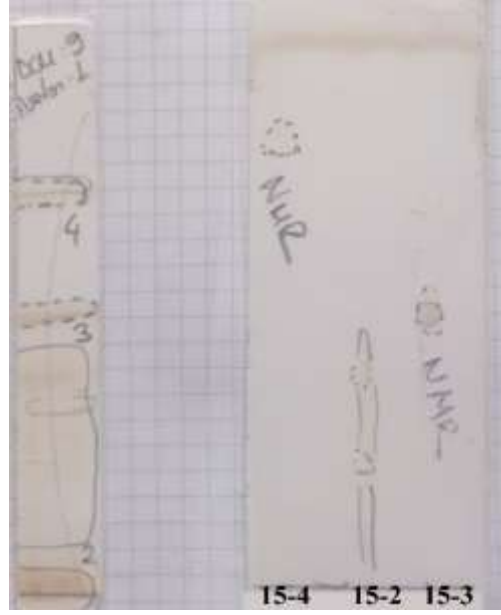


Şekil 46. 5,6,epoksikolestan-3 β -ol'ün ^1H -NMR spektrumu (CDCl_3 , 600 MHz, 0.95-0.55 ppm arası genişletilmiş)



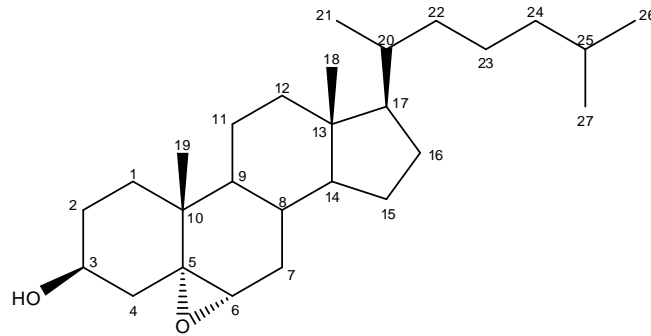
Şekil 47. 5,6,epoksikolestan-3 β -ol'ün ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3 , 125 MHz)

Fr. 15 prep İTK ile saflaştırıldı. Prep İTK'sı ve bu fraksiyondan saflaştırılan maddenin İTK'sı aşağıda yer almaktadır (Şekil 61).

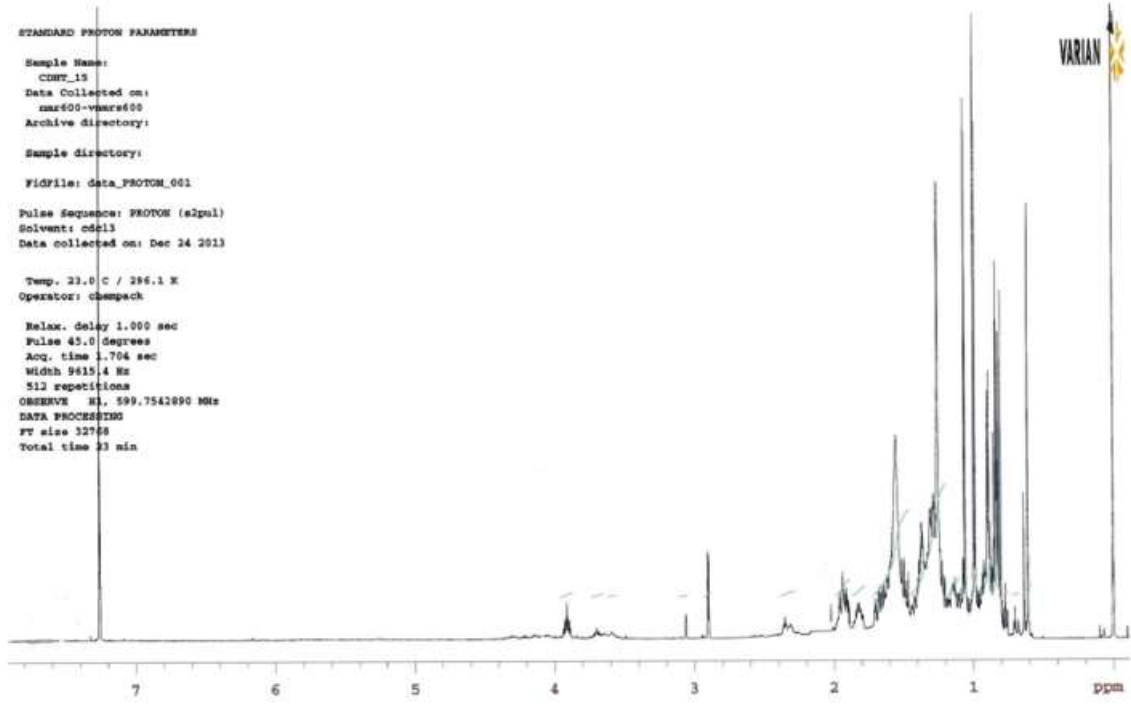


Şekil 48. Fr. 15'in prep İTK'sı

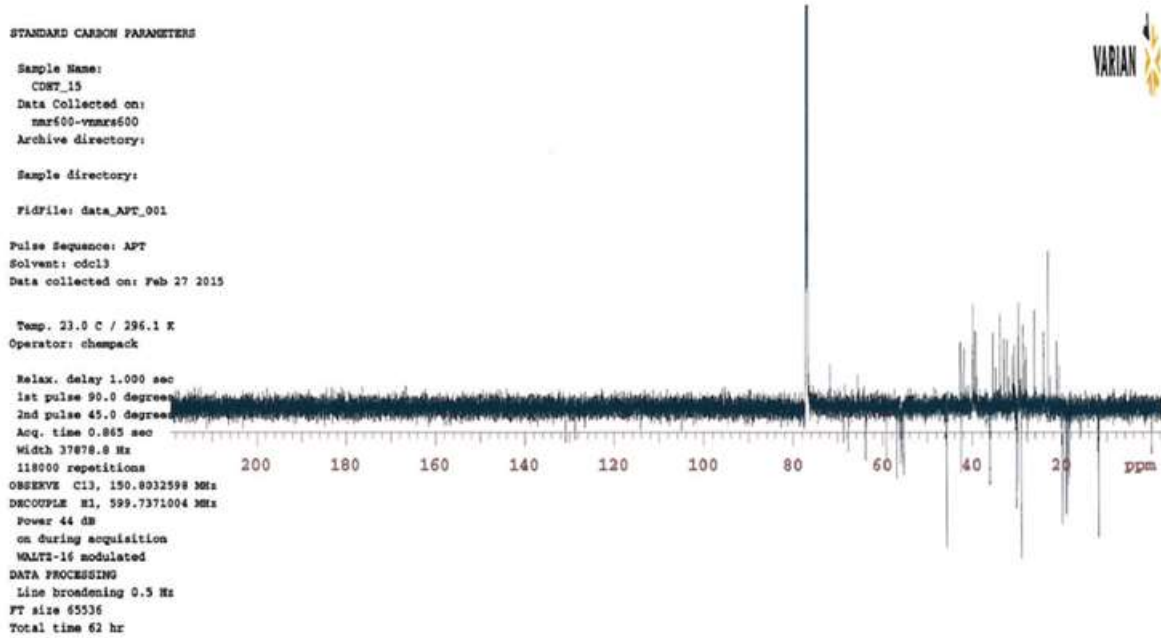
Saflaştırılan ve spektroskopik analizleri yapılan CDHT-15 kodlu maddenin, epoksikolestan iskeletine sahip bir steroid olduğu anlaşıldı. Bu maddenin aynı zamanda 3. rapor döneminde COT ekstresi fraksiyon 14'ten elde edilen CDHT-14 kodlu madde olan 5,6-epoksikolestanın α - formulu izomeri olduğu belirlendi. Beyaz renkli, amorf haldeki madde 4,4 mg olarak elde edildi. Daha önce kolesterolden hareketle yarı sentetik yolla elde edilen bu madde doğadan ilk kez bu çalışmada elde edilmiştir (Carvalho vd., 2009). Maddenin yapısı Şekil 62'de verildi ve ilgili 1H ve 13C NMR spektrumları aşağıda izlenmektedir.



Şekil 49. 5 α ,6 α - epoksikolestan-3 β -ol



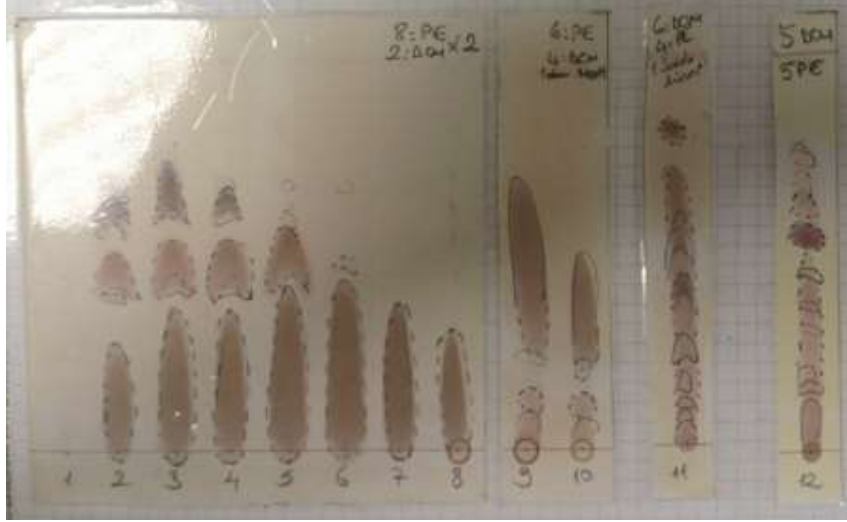
Şekil 50. 5 α ,6 α ,εpoksikolestan-3 β -ol'ün 1H-NMR spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)



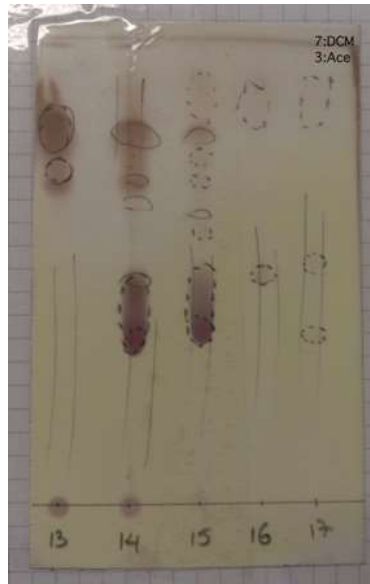
Şekil 51. 5 α ,6 α ,εpoksikolestan-3 β -ol'ün 13C-NMR (APT) spektrumu (CDCl₃, 125 MHz)

3.1.4.2.2 *Capparis ovata* Bitkisinin "Meyve" Kısımından Hazırlanan Hekzan:Diklorometan Ekstresinin Fraksiyonlandırılması ve Saflaştırılması

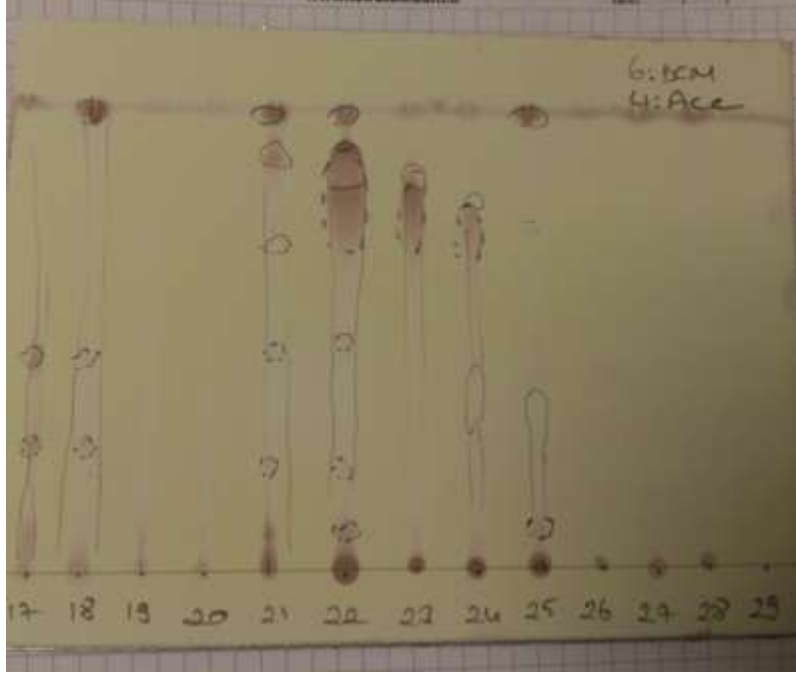
Capparis ovata Meyve ekstresi (COM) (20 g) silikajelin adsorban olarak kullanıldığı bir kolon üzerinden fraksiyonlandırıldı. Elüsyona %100 petrol eteri ile başlanarak ve polariteyi belli oranda artırarak %100 diklorometana; diklorometandan yine polarite artırılarak % 100 asetona ve ardından %100 metanole kadar devam edildi. Toplam 29 fraksiyon elde edildi. Şekil 66-67'de fraksiyonların İTK sonuçları yer almaktadır.



Şekil 52. COM1-12 fraksiyonlarının İTK'sı



Şekil 53. COM13-17 fraksiyonlarının İTK'sı



Şekil 54. COM17-29 fraksiyonlarının İTK'sı

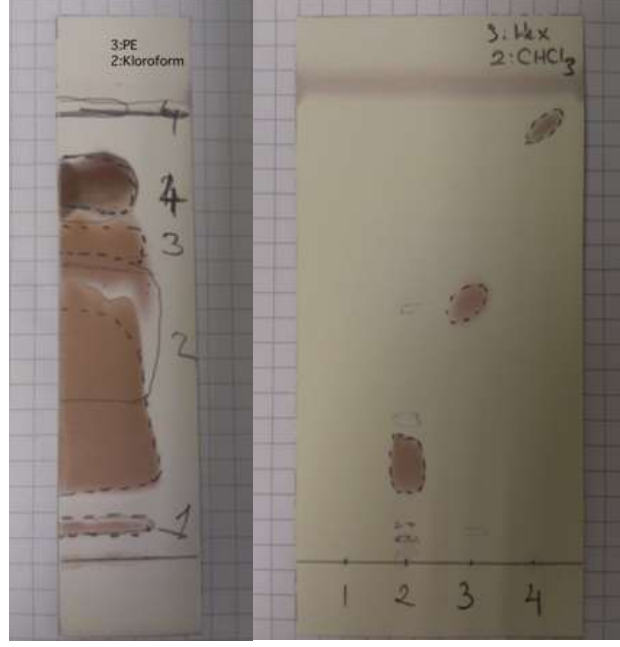
COM 3, 8, 11 nolu fraksiyonlar bilinen bazı triterpenler ve steroidler ile yan yana tatbik edilerek aynı maddeler olup olmadıklarını karşılaştırmak amacıyla İTK yapıldı.



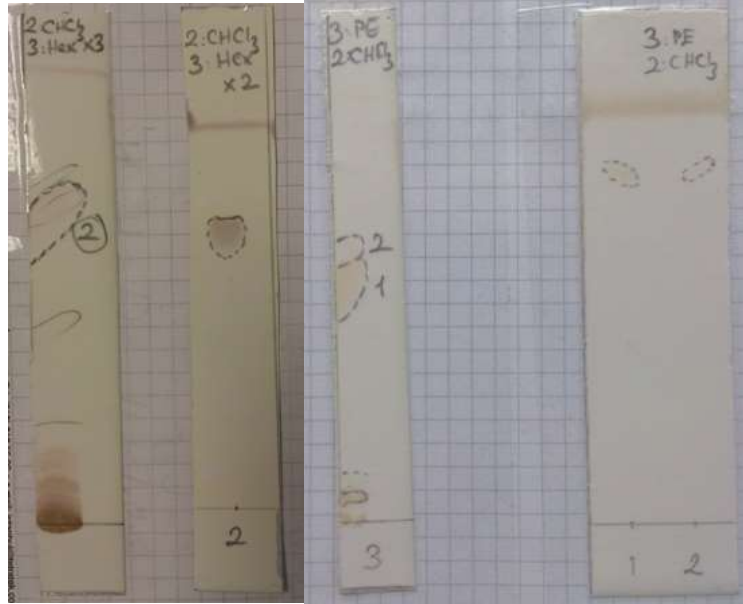
Şekil 55. COM 3, 8, 11 nolu fraksiyonlar ile triterpenler ve stigmastrolün İTK'sı

Bu fraksiyonlara preparatif ince tabaka ve kolon kromatografisi yöntemleri uygulanarak saf madde elde etme çalışmalarına başlandı. İlk olarak 3 nolu fraksiyon preparatif ince tabaka

kromatografisi (prep. İTK) ile saflaştırıldı. COM 3 nolu fraksiyonun prep İTK'sı ve bu fraksiyondan saflaştırılan maddelerin İTK'sı aşağıda görülmektedir (Şekil 69-70).



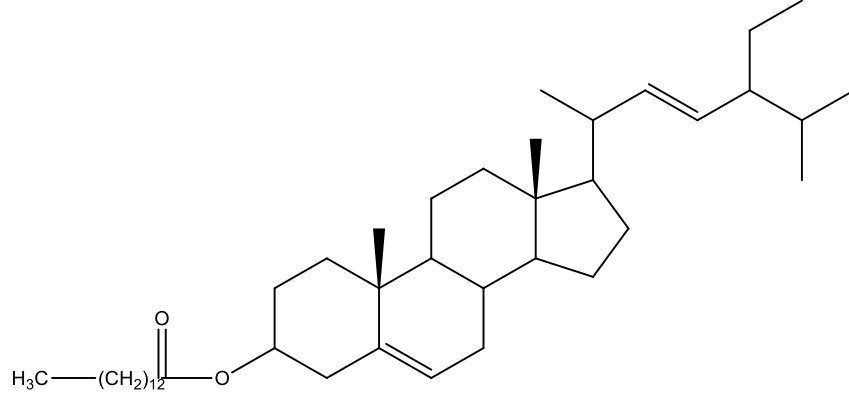
Şekil 56. COM 3 nolu fraksiyonun prep. İTK'sı



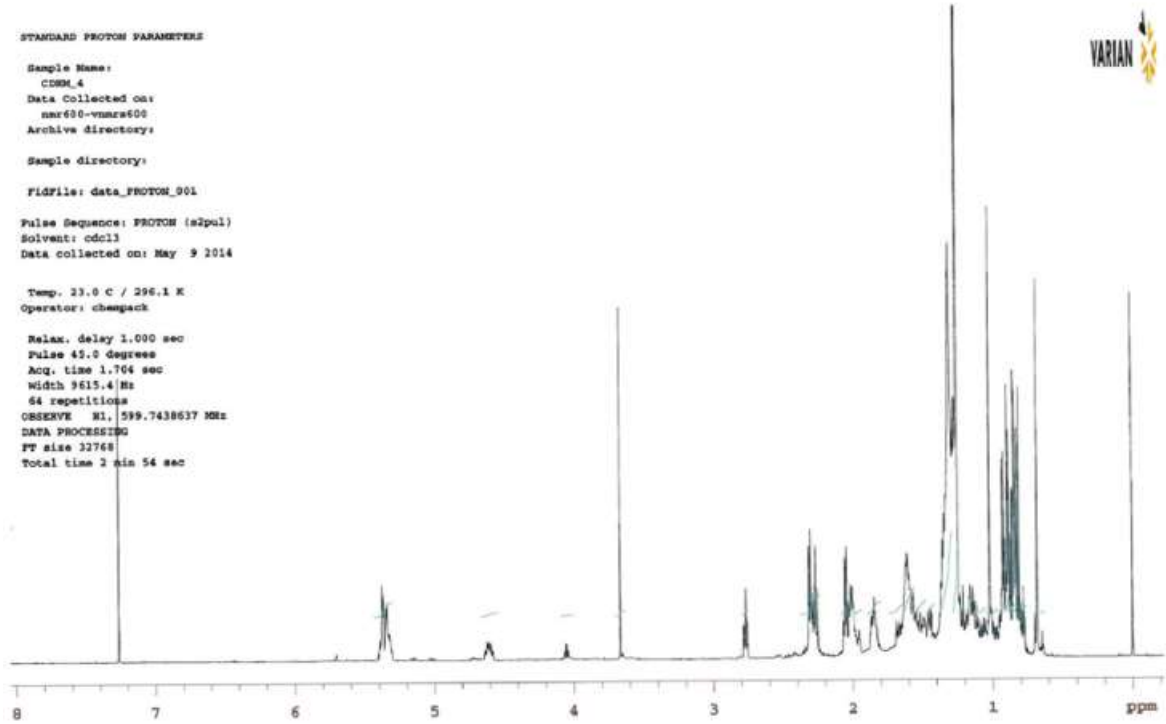
Şekil 57. COM 3-2 ve COM 3-3 nolu maddenin prep. İTK'sı

COM ekstresi fraksiyon 3'ten saflaştırılan ve spektroskopik analizleri yapılan CDHM-4'ün, yapılan literatür çalışmaları sonucunda steroid yapısındaki Stigmast-5,22-dien-3 β -miristat

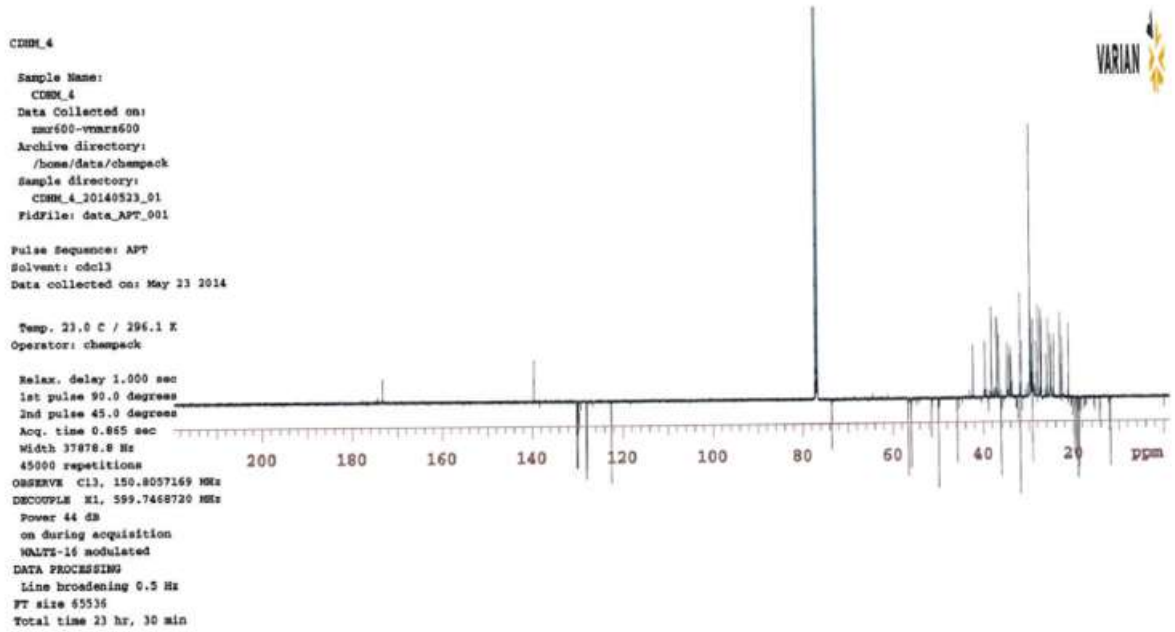
olduğu belirlendi. Beyaz renkli, amorf haldeki madde 12 mg olarak Capparis türlerinden ilk kez bu çalışmada elde edildi. Maddenin yapısı NMR ve Mass (kütle) spektrumlarına dayanarak aydınlatılmıştır ve Şekil 71-77'de verilmiştir.



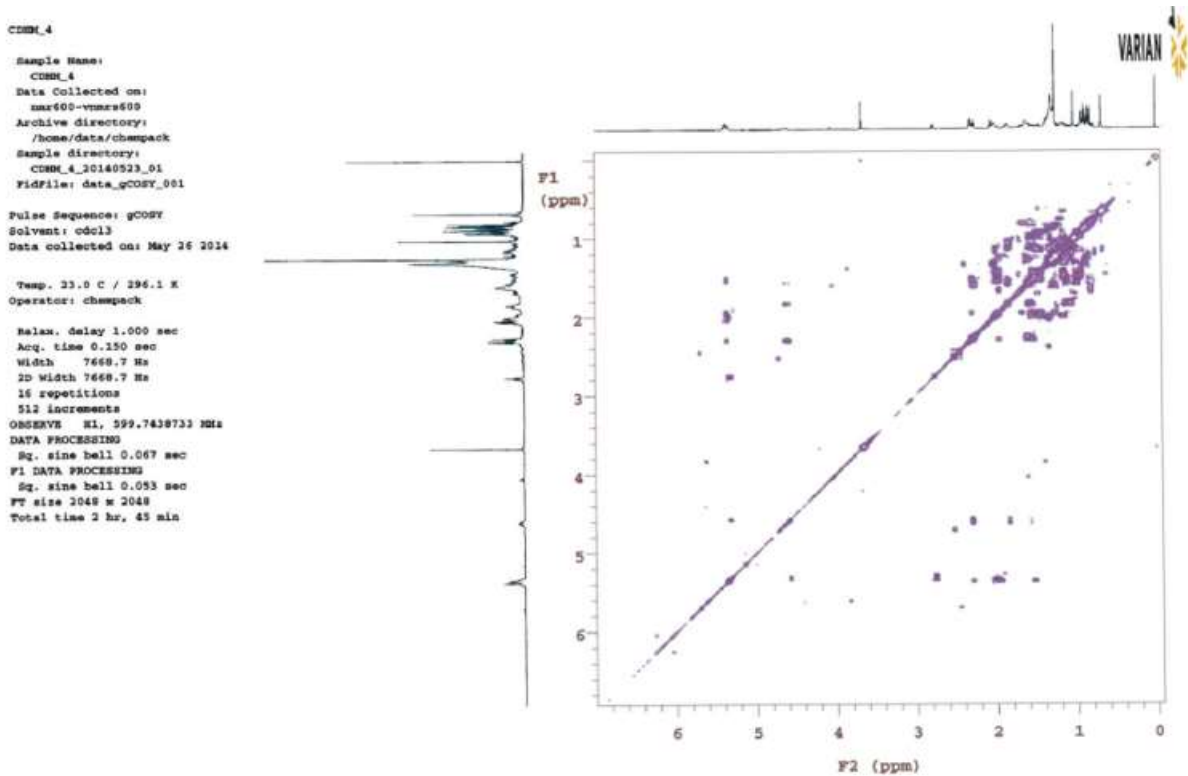
Şekil 58. Stigmast-5,22-dien-3β-ol, miristat



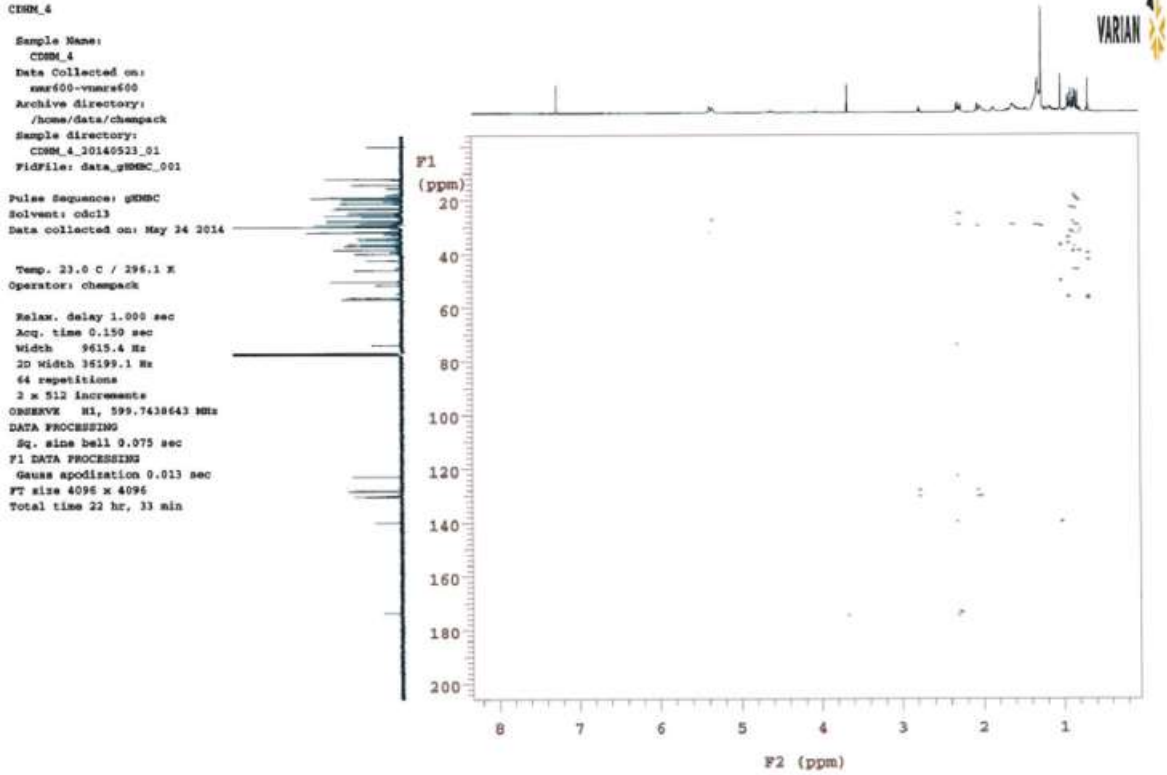
Şekil 59. Stigmast-5,22-dien-3β-miristat'ın 1H-NMR spektrumu (CDCl3, 600 MHz)



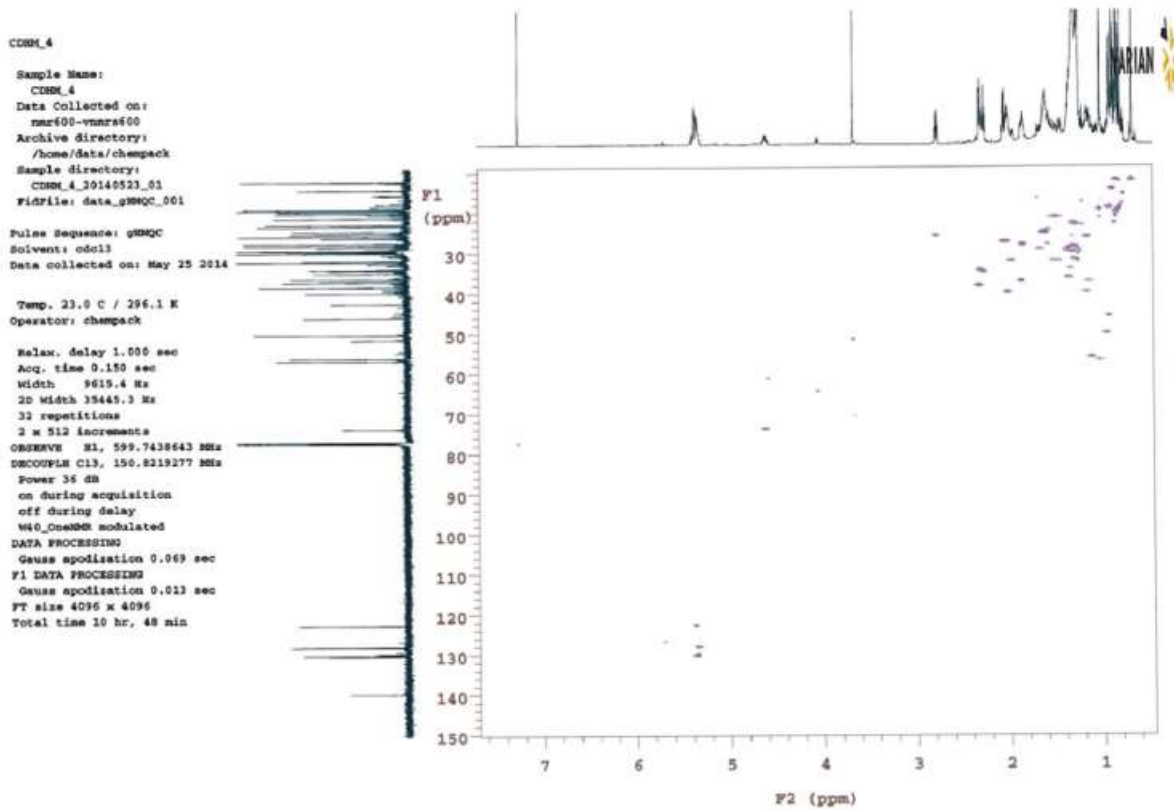
Şekil 60. Stigmast-5,22-dien-3 β -miristat'ın ^{13}C -NMR (APT) spektrumu (CDCl_3 , 125 MHz)



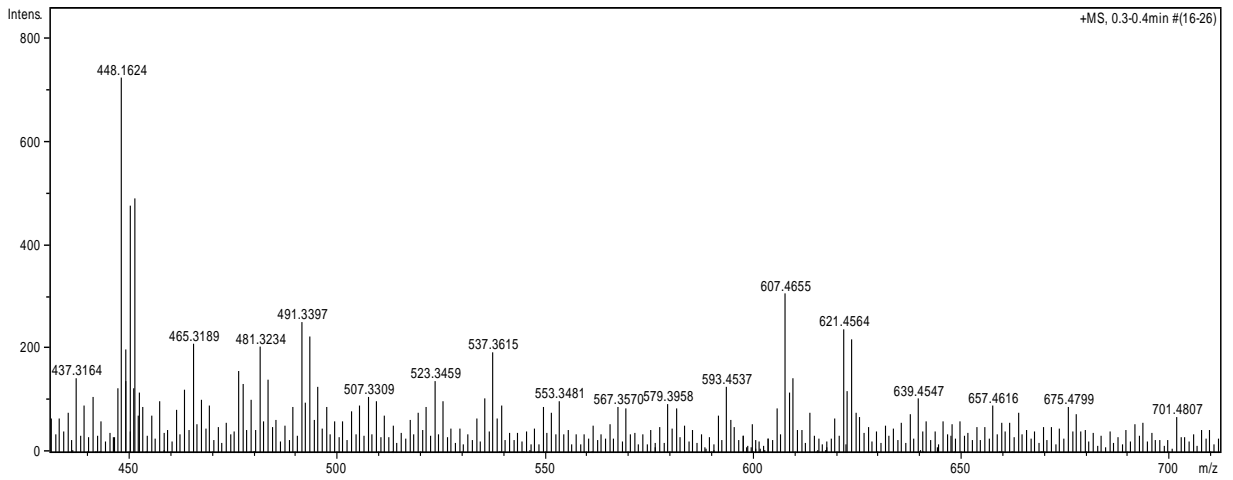
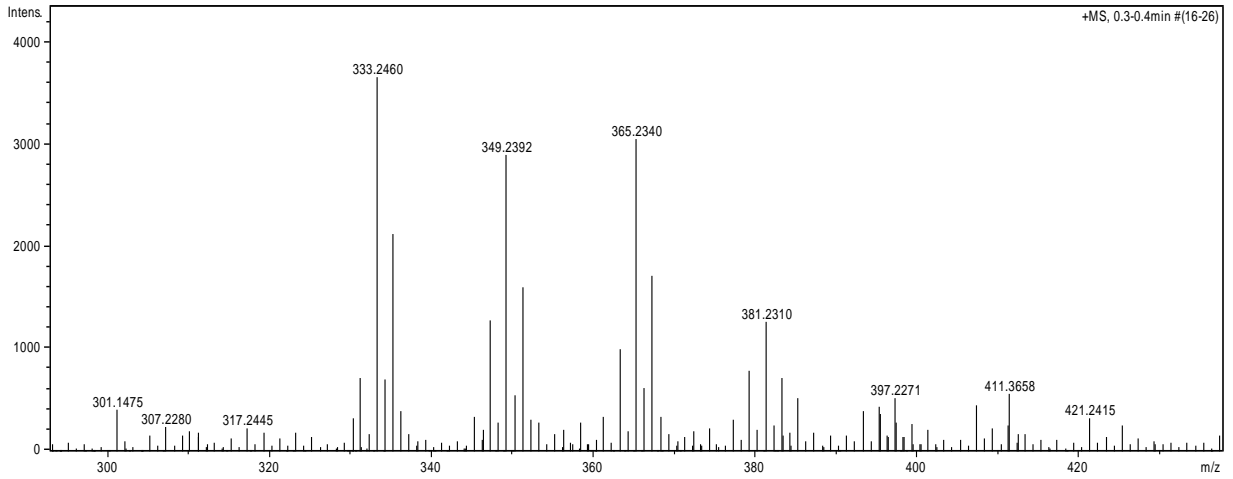
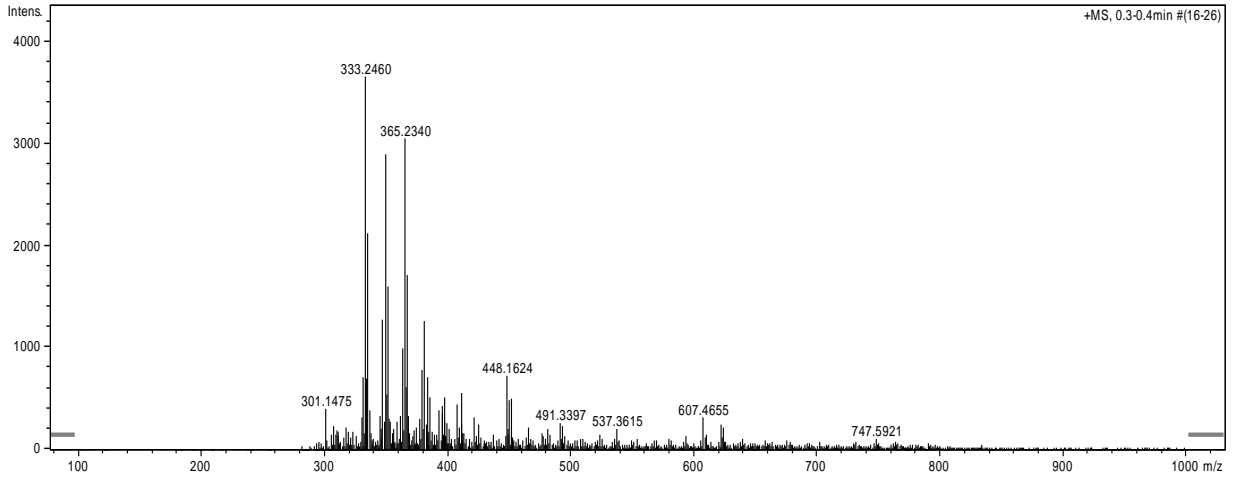
Şekil 61. Stigmast-5,22-dien-3 β -miristat'ın COSY spektrumu (CDCl_3 , 600 MHz)



Şekil 62. Stigmat-5,22-dien-3 β -miristat'ın HMBC spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)



Şekil 63. Stigmat-5,22-dien-3 β -miristat'ın HMQC spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)



Şekil 64. CDHM-4'ün kütle spektrumları

COM 2-5, 6 ve 7 fraksiyonları birleştirilerek gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile analiz edildi. GC-MS analizi sonucu COM 2-7 fraksiyonununun 14 farklı yağ asidinden oluştuğu, ayrıca bir alkol (2-methyl-2-pentanethiol) ve aldehitten (2,2-dimethyl pentanal) ibaret olduğu saptandı. Sabit yağ asitleri arasında linoleik asit % 30.9 ile ana bileşen olarak saptandı. Sonuçları Tablo 14'de verilmektedir.

Tablo 8. COM 2-7 fraksiyonununun GC-MS analiz sonucu (%).

Alıkonma zamanı	Bileşikler	COM 2-7
16.61	2-metil-2-pentanoik asit, metil ester	19.1
17.13	2,2-dimetil pentanoik asit, metil ester	7.3
23.14	Laurik asit, metil ester	0.03
27.43	Miristik asit, metil ester	0.33
31.34	Palmitik asit, metil ester	7.5
31.78	Palmitoleik asit, metil ester	1.9
32.80	9,12-Hekzadecadienoik asit, metil ester	0.13
33.18	Margarik asit, metil ester	0.03
34.96	Stearik asit, metil ester	1.9
35.26	Oleik asit, metil ester	14.6
35.38	Elaidik asit, metil ester	14.4
36.02	Linoleik asit, metil ester	30.9
37.09	Linolenik asit, metil ester	1.03
38.32	Araşidik asit, metil ester	0.4
38.60	11-Eikozenoik asit, metil ester	0.16
41.45	Behenik asit, metil ester	0.13
Toplam		99.8

Sistem: Thermo Scientific TSQ GC-MS/MS

Kolon: Thermo TR-BD MS (30 m x 0.25mmID x 0.25 µm)

Sıcaklık Programı: 50 °C-5 dak. // 5 °C/dak.// 250 °C-10 dak.

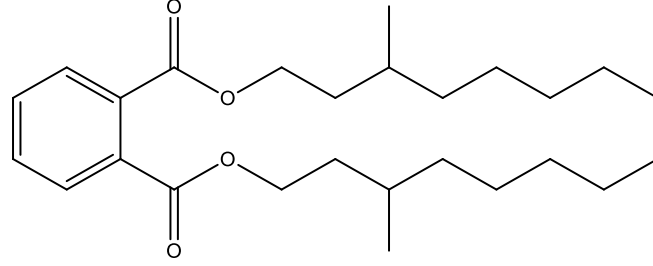
MS iletim hattı sıcaklığı: 230°C

Taşıyıcı Gaz: Helyum (Akış hızı: 1 mL/dak.)

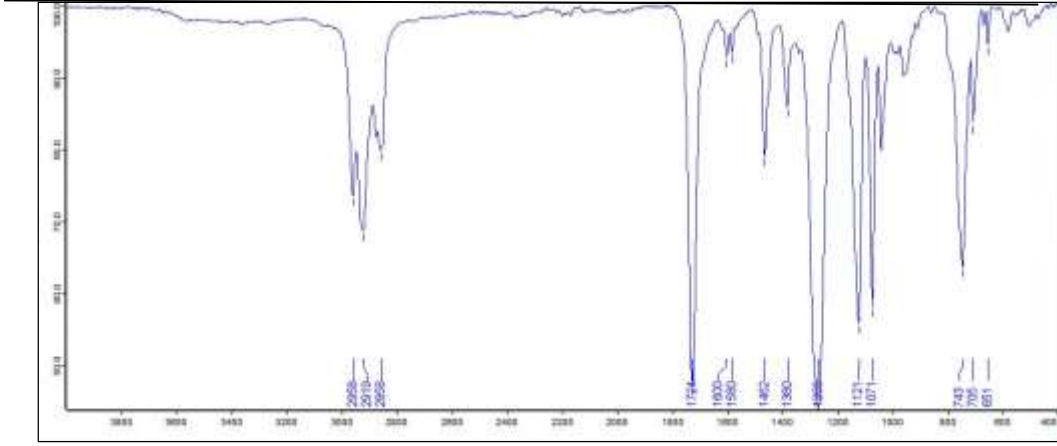
Kütle Aralığı: m/z 50-650

Enjeksiyon Hacmi: 1 µL

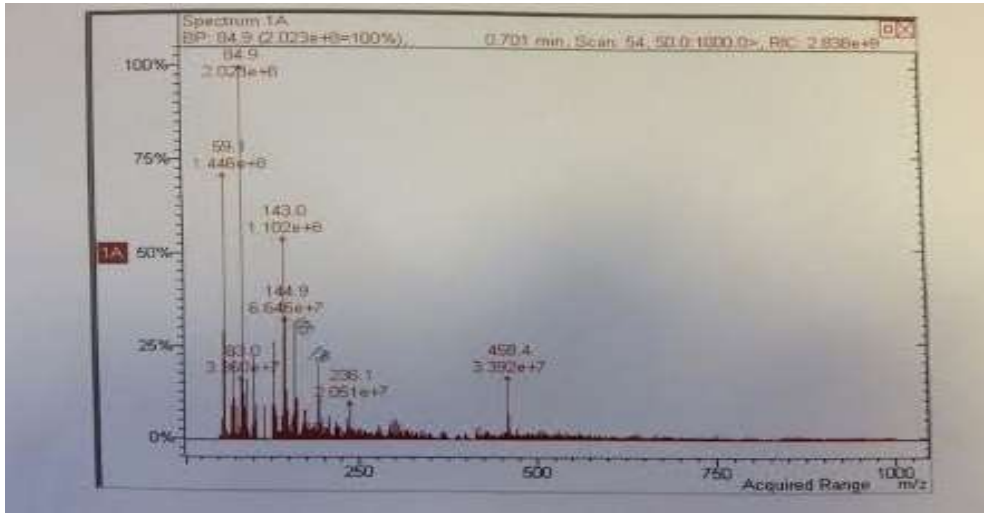
COT ekstresi fraksiyonlarından elde edilen CDHT-1 ve CDHT-5'in COM ekstresinden elde edilen CDHM-13 ile aynı maddeler oldukları tespit edildi. Spektral dataları değerlendirildiğinde maddenin aromatik halka taşıyan fatty asit esteri olduğu belirlendi (Şekil 78). Bu bileşik doğadan ilk kez elde edildi.



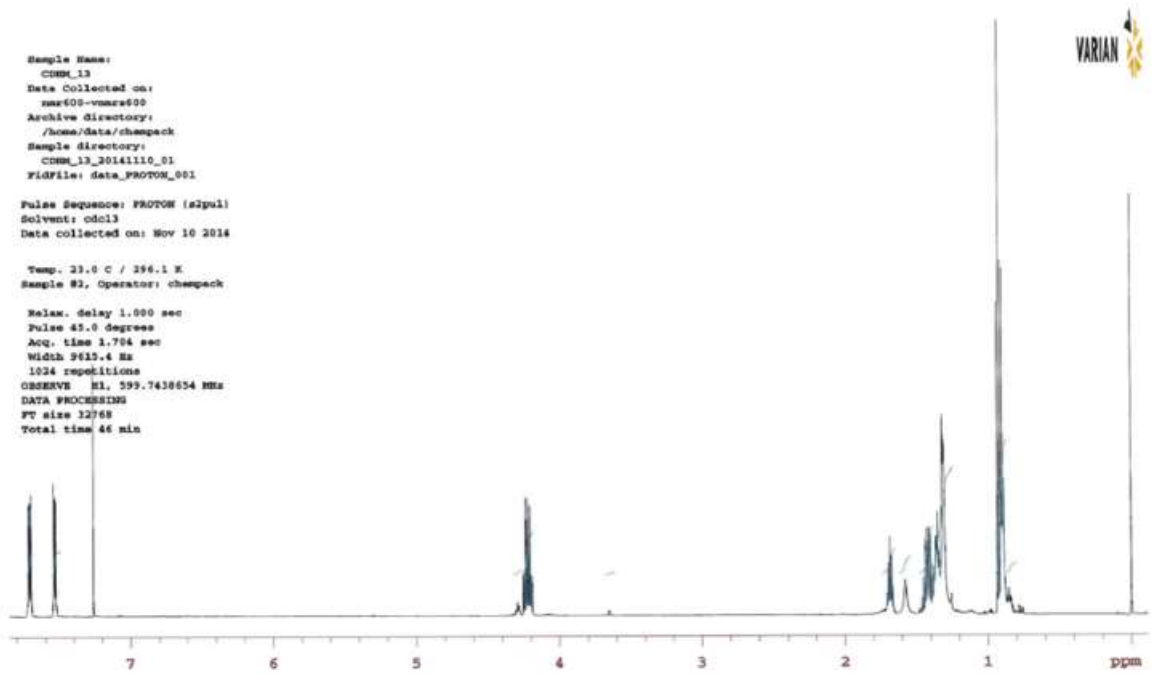
Şekil 65. bis 3 metiloktil ftalat



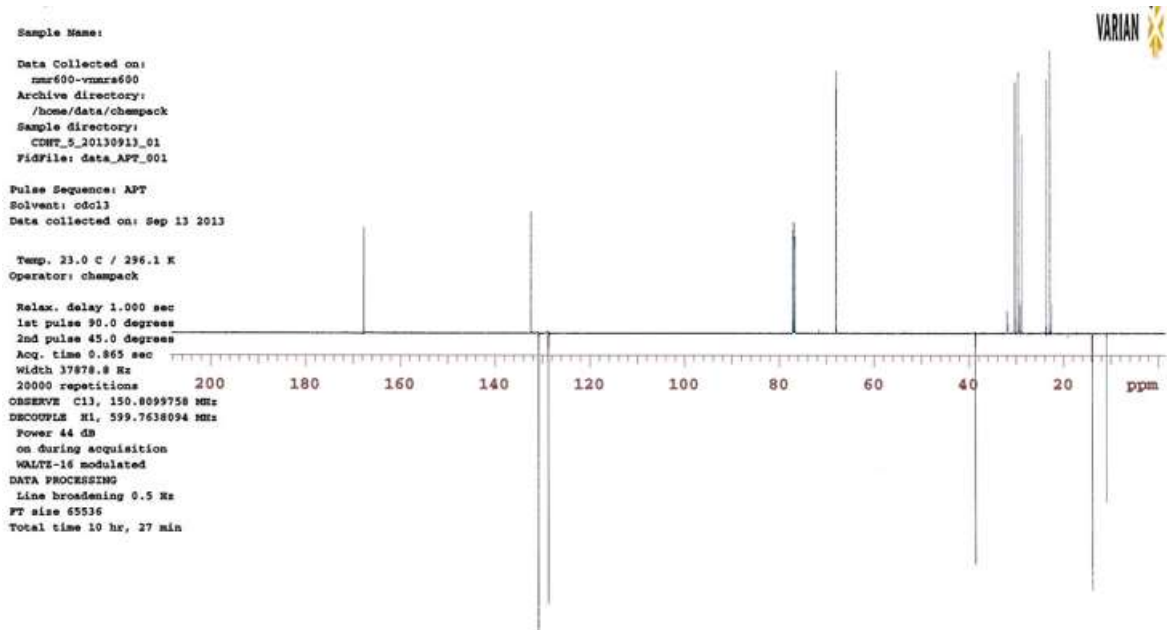
Şekil 66. CDHM-13'ün IR spektrumu



Şekil 67. CDHM-13'ün kütle spektrumu

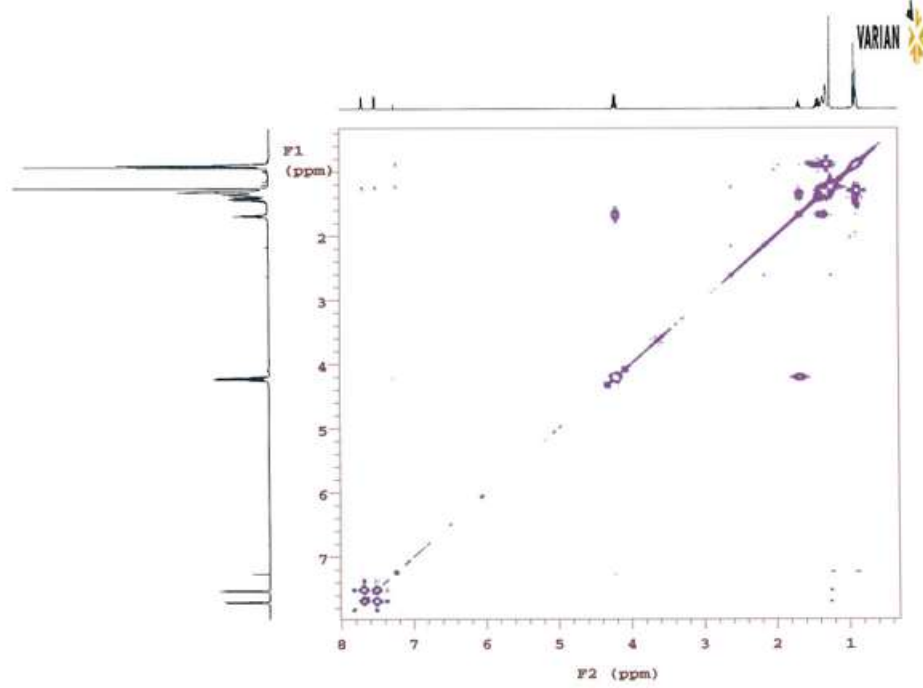


Şekil 68. CDHM 13'ün 1H-NMR spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)



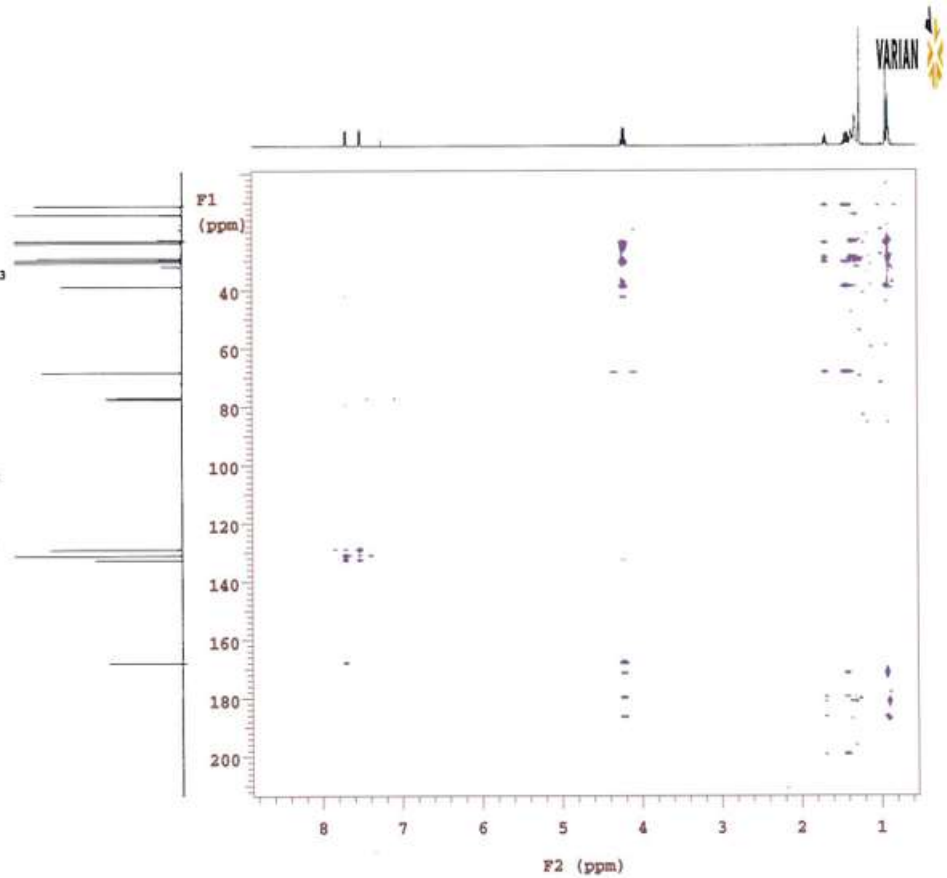
Şekil 69. CDHM 13'ün 13C-NMR (APT) spektrumu (CDCl₃, 125 MHz)

Sample Name:
 Data Collected on: nmr600-vmars600
 Archive directory: /home/data/chempack
 Sample directory: CDHT_5_20130913_01
 FidFile: data_gCOSY_001
 Pulse Sequence: gCOSY
 Solvent: cdcl3
 Data collected on: Sep 14 2013
 Temp. 23.0 C / 296.1 K
 Operator: chempack
 Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.150 sec
 Width 7622.0 Hz
 2D width 7622.0 Hz
 16 repetitions
 512 increments
 OBSERVE H1, 599.7608106 MHz
 DATA PROCESSING
 Sq. sine bell 0.067 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Sq. sine bell 0.053 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 2 hr, 45 min

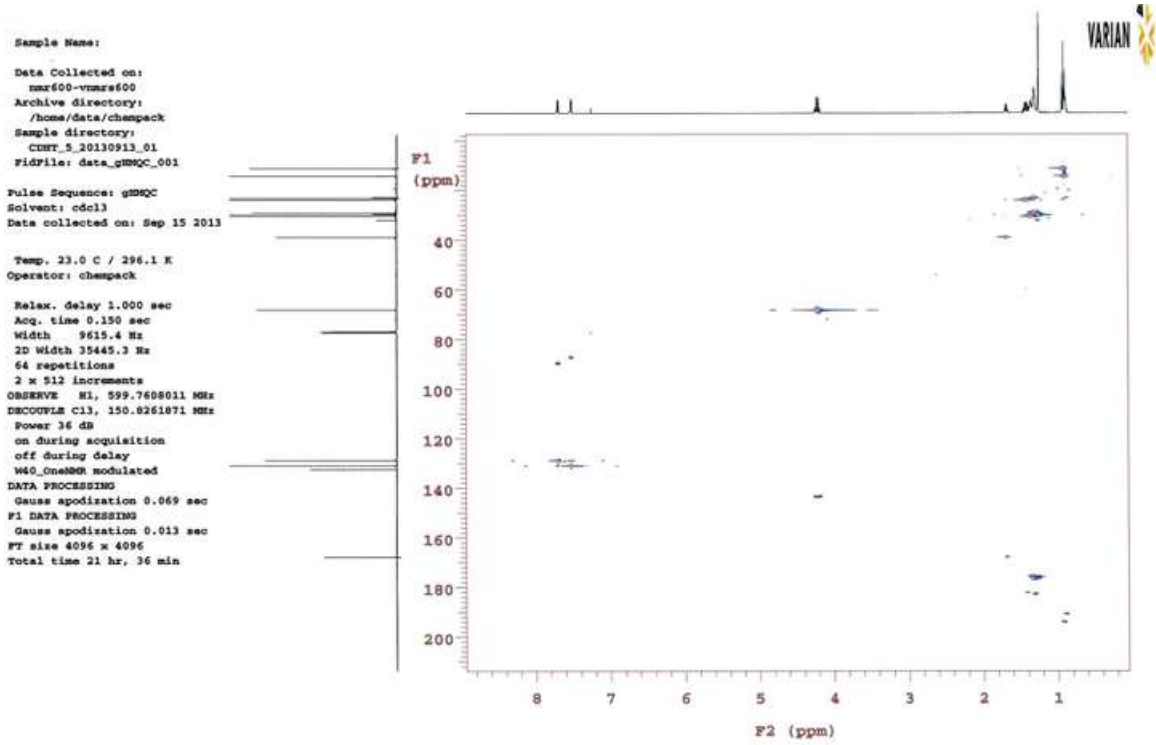


Şekil 70. CDHM 13'ün n COSY spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)

Sample Name:
 Data Collected on: nmr600-vmars600
 Archive directory: /home/data/chempack
 Sample directory: CDHT_5_20130913_01
 FidFile: data_gHMBC_001
 Pulse Sequence: gHMBC
 Solvent: cdcl3
 Data collected on: Sep 14 2013
 Temp. 23.0 C / 296.1 K
 Operator: chempack
 Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.150 sec
 Width 9619.4 Hz
 2D width 36199.1 Hz
 64 repetitions
 2 x 512 increments
 OBSERVE H1, 599.7608011 MHz
 DATA PROCESSING
 Sq. sine bell 0.075 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.013 sec
 FT size 4096 x 4096
 Total time 22 hr, 33 min



Şekil 71. CDHM 13'ün HMBC spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)



Şekil 72. CDHM 13'ün HMQC spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)

Bu proje kapsamında *Capparis ovata* bitkisinin tüm kısımlarından su ekstresi hazırlandı (MSCov), MSCov'dan da geri ekstraksiyon yolu ile MSCov-H, -D, -E ve -Bekstreleri hazırlandı.

Bu ekstrelerden MSCov-B'nin standart olarak kullanılan galantamin kadar antikolinesteraz aktivite gösterdiği belirlendi. Antikolinesteraz aktivite tayininde hiç aktivite göstermeyen MSCov-H ve -D dışındaki ekstrelerin LC-MS/MS ile içerdiği maddeler ve bunların miktarları tayin edildi. Bu analiz sonucunda MSCov'un fenolik içeriği diğer ekstrelerden daha düşük olarak tespit edildi. Test edilen tüm ekstrelerde kaempferolün ana bileşen olduğu, MSCov-B'nin kaempferol-3-O-rutinoside ve rutin hidrat bakımından çok zengin olduğu ve MSCov-E'nin de elajik asit, fumarik asit, sirinjic asit, p-kumarik asit, ferulik asit, isorhamnetin, kaempferol, penduletin ve kuersetini en yüksek miktarda içerdiği belirlendi.

MSCov-D'nin GC-MS ile yağ asidi analizi sonucunda %28.7 oranında yağ aside içerdiği belirlendi.

COM 2-7'nin GC-MS ile yağ asidi analizi sonucunda %30.9 linoleik asit içerdiği belirlendi.

CDHT ve CDHM ekstrelerinden elde edilen maddelerin yapı tayinleri başlıca NMR, kütle ve diğer spektral yöntemler kullanılarak yapıldı ve böylece *C. ovata* bitkisinin tomurcuk ve meyvelerinden izole edilen bileşiklerden 8'sinin yapısı aydınlatılmış oldu. Bu 8 bileşikten

4'ünün steroid 1'inin triterpenoid yapıya sahip olan olean-12-en-28-ol, 3 β -pentakosanoat olduğu, bir diğerinin fenolik yapıdaki bis (3-metiloktil) ftalat olduğu belirlendi. Bu çalışmada izole edilen tek alkaloit bileşik ise 1H-indol-, 2-hidroksi, 3-karboksilik asit yapısında doğadan ilk kez elde edildi.

- a) Glukokapparin
- b) Olean-12-en-28-ol, 3 β -pentakosanoat
- c) β -sitosterol
- d) 5 β ,6 β - epoksikolestan, 3 β -ol
- e) 5 α ,6 α - epoksikolestan-3 β -ol
- f) Stigmast-5,22-dien-3 β -ol, miristat
- g) Bis (3-metiloktil) ftalat
- h) 1H-indol-, 2-hidroksi, 3-karboksilik asit

3.2 Moleküler Toksikoloji (MT) Dizin Analizler

Moleküler toksikoloji çeşitli ksenobiyotik ajanların canlı organizmalar üzerinde etkileri moleküler gen ekspresyon düzeyinde inceleme çalışmalarıdır. İlaç-vücut etkileşimlerinin anlaşılması ilaç geliştirme için çok önemlidir. Olası yan etkiler için anahtar anlayışlar sunarak ilaç geliştirme programlarının her aşamasında çok önemlidir.

1980'lerin sonlarında %40 olan ilaç etkileşim toksisite oranı moleküler profil çalışmaları ile günümüzde %13'ün altına düşürülmüş durumdadır. Bu nedenle bizim çalışmamızda toksik etkiye aktif şekilde yanıt olan 13 farklı biyolojik yolakta yer alan 380 anahtar gen ve 4 adet normalizasyon (housekeeping) gen ekspresyonları çalışıldı. Bu dizinlerin dizininde literatürde yer alan genler ve Qiagen firmasının çeşitli dizinlerinde yer alan genlerden yola çıkıldı. Bu genlerin ekspresyonu olası toksikolojik yanıtları göstermekte önemli bilgi sağlar. Ayrıca, bu etkilerin mekanizmalarını anlamaya yardımcı olur.

MT dizinleri pahalı olması nedeniyle Qiagen firmasından alınmadı ve seçilen genler Bioneer firmasından "custom design" olarak ürettirildi ve kullanıldı. Dizinler kullanılmadan kendimiz tarafından de validasyonu yapıldı. Ayrıca aynı genler farklı kodla firmaya verilerek birden fazla plaka (dizin) içerisine yerleştirilerek ölçümlerin sağlıklı olması, plakalar arası varyasyon oluşması önlenildi ve ayrıca iç satnadart gibi de kullanıldı. Bu durum Şekil de görülmektedir.

Bu grup çalışmalarımızda 3 değişik doz çalışıldı. Normalde önerimizde tek doz-500 mg/kg/gün önerilmişti ancak daha anlamlı veriler elde edilmesi için bir düşük (250 mg/kg/gün) ve bir de yüksek doz (750 mg/kg/gün) çalışmaya dahil edildi. Sonuçlar 2 bağımsız tekrarın duplike ölçümleridir. Sonuçlar verilirken gen sayısı fazla olan yollar 2 veya 3 şekile bölünerek verildi. (*) ile işaretlenen genler $P < .05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren genlerdir.

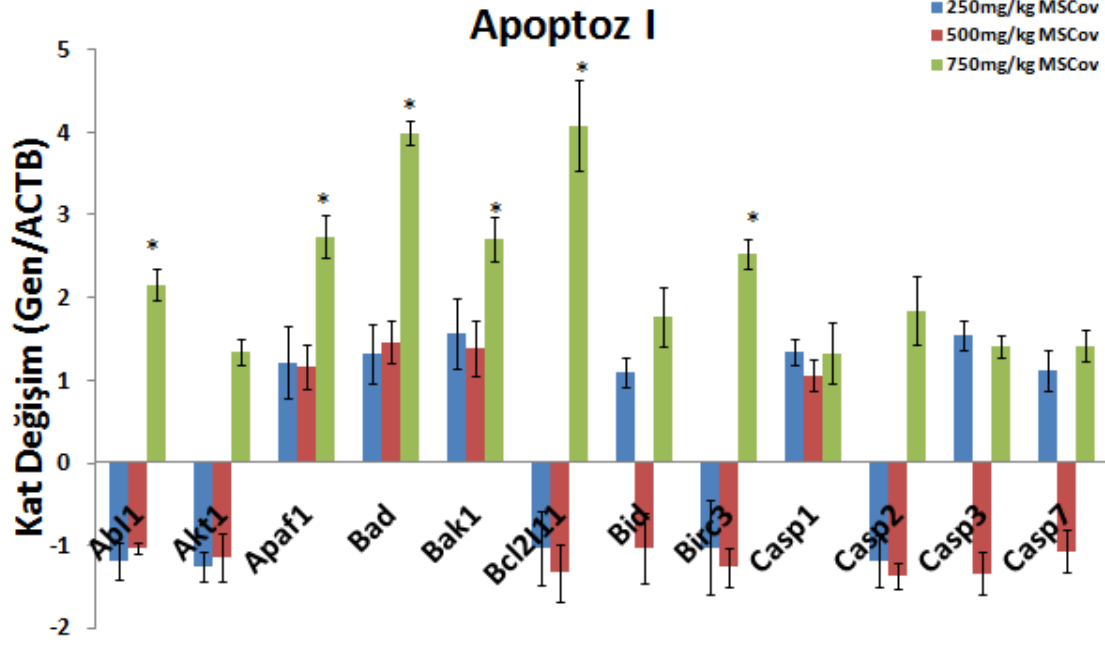
3.2.1 Apoptoz

Apoptoz farklılaşma, gelişim ve homeostaz dahil olmak üzere hücre yok etme gerektiren normal biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynar. Stres yanıtları (örneğin ısı şoku, iskemi, katlanmamış protein, ve viral enfeksiyon gibi) kötü zarar gören hücrelerin apoptoz geçirmesine neden olur. Bilinen birçok deney bileşikleri de benzer bir etkiye sahiptir. Bu amaçla aşağıdaki Tablo 15'de verilen genler araştırıldı. Genlerin 3 değişik dozda kontrole oranla ifade değişimleri Şekil 86 ve 87'de verilmektedir.

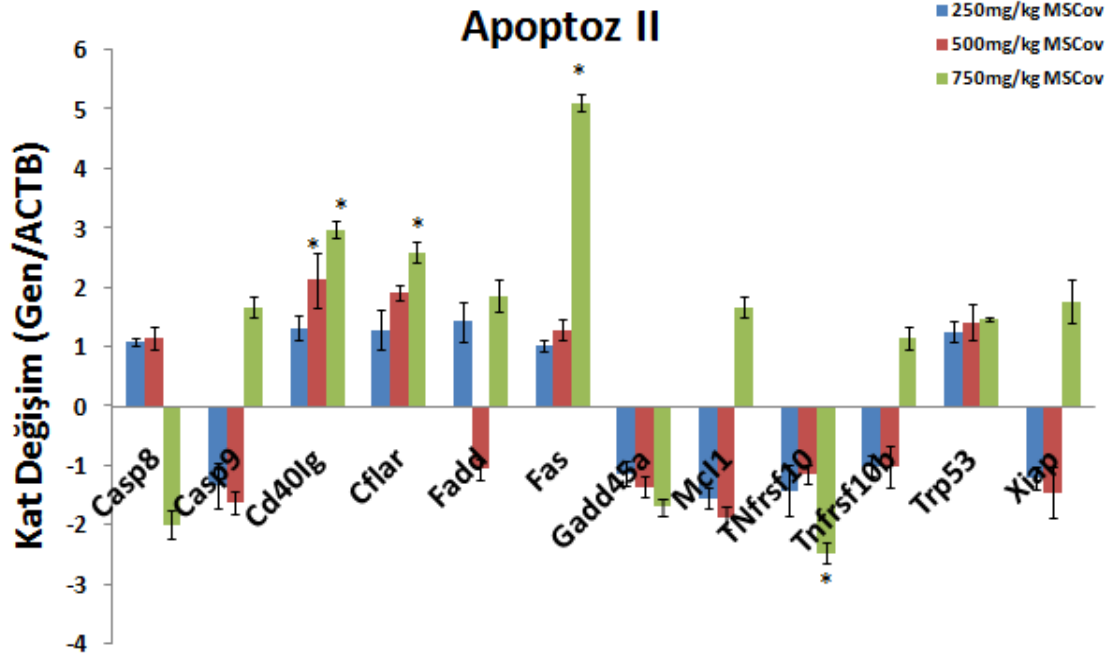
Tablo 1. MT dizininde kullanılan apoptoz ilişkili genlerin listesi

Gen Sembolü	Genin Açık İsmi	Genin Kodu
-------------	-----------------	------------

Abl1	C-abl onkogen 1, reseptör olmayan tirozin kinaz	NM_005157
Akt1	V-akt murin timoma viral onkogen homologu 1	NM_005163
Apaf1	Apoptotik peptidaz aktiveleştirici faktör 1	NM_001160
Bad	Hücre ölümü BCL2 ilişkili agonisti	NM_004322
Bak1	BCL2-antagonist/öldürücü 1	NM_001188
Bcl2l11	BCL2 gibi 11 (apoptoz kolaylaştırıcı)	NM_006538
Bid	BH3 etkileşim alanı ölüm agonisti	NM_001196
Birc3	baculoviral IAP tekrar içeren 3	NM_001165
Casp1	Kaspaz 1, apoptoz ilişkili sistein peptidaz (interlökin 1, beta, dönüştürücü)	NM_033292
Casp2	Kaspaz 2, apoptoz ilgili sistein peptidaz	NM_032982
Casp3	Kaspaz 3, apoptosis ile ilgili sistein peptidaz	NM_004346
Casp7	Kaspaz 7, apoptoz ilgili sistein peptidaz	NM_001227
Casp8	Kaspaz 8, apoptoz ilgili sistein peptidaz	NM_001228
Casp9	Kaspaz 9, apoptoz ilgili sistein peptidaz	NM_001229
CD40lg	CD40 ligandı	NM_000074
Cflar	CASP8 ve FADD gibi apoptoz regülatörü	NM_003879
Fadd	Fas (TNFRSF6) ölüm domeyni ile ilişkili	NM_003824
Fas	Fas (TNF reseptörü süper ailesi, 6)	NM_000043
Gadd45a	Büyüme tutuklayabilir ve DNA-zarar-indüklenebilir, alfa	NM_001924
Mcl1	Miyeloid hücre lösemi dizisi 1 (BCL2 bağlı)	NM_021960
TNfrsf10	Tümör nekroz faktörü (ligand) süper ailesi, üye 10	NM_003810
Tnfrsf10b	Tümör nekroz faktör reseptörü süper ailesi, üye 10b	NM_003842
Trp53	Tümör proteini p53	NM_000546
Xiap	X'e bağlı apoptoz inhibitörü	NM_001167



Şekil 1. MSCov ekstresinin apoptoz genlerine etkisi I



Şekil 2. MSCov ekstresinin apoptoz genlerine etkisi II

MSCov ekstresi çalışılan 250 mg/kg/gün dozda kontrol ile karşılaştırıldığında bu grup genlerden hiç birisine olumlu ya da olumsuz bir etki yapmazken 500 mg/kg/gün dozda ise sadece CD40lg (CD40 ligandı) geninde kontrole göre anlamlı bir artış etkisi gösterdi. Çalışılan yüksek dozda (750mg/kg/gün) ise 10 adet gende değişiklik tespit edildi. Bu genlerden dokuz

tanesinde (Abl1, Apaf1, Bad, Bak1, Bcl2l11, Birc3, Cd40lg, Cflar, Fas) kontrole göre artış tespit edilirken tek bir gende (TNfrsf10) azalış tespit edildi.

3.2.2 Nekroz

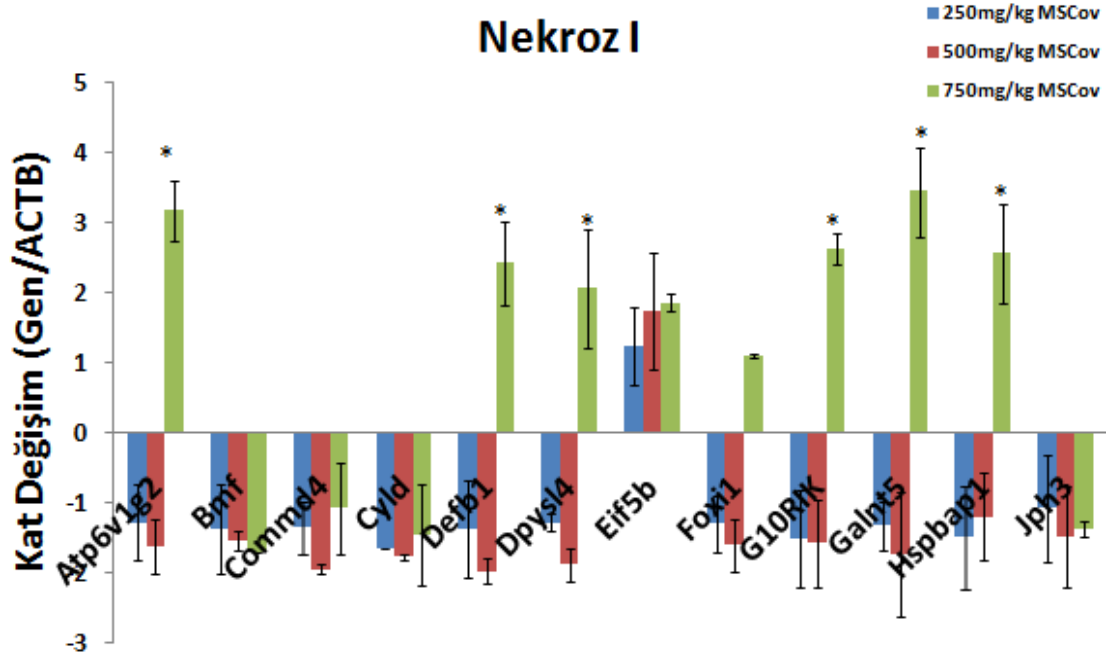
Şişme ve lizis gibi bir kaza sonucunda gerçekleşen kontrolsüz hücre ölümü olarak kabul edilen nekroz (ayrıca nekroptoz, programlanmış nekroz, onkoz veya tip III hücre ölümü olarak da bilinir) son dönem bilimsel çalışmalarla belirli ve kontrollü hücresel bir program ile gerçekleştiği tespit edilmiştir. Serin / treonin kinaz RIPK1 (RIP1) üzerinden Ölüm reseptörleri (FAS, TNFRSF1A vb) ve serin/treonin kinaz (RIPK1) sinyal yolağı ile aktivasyon neticesinde artan reaktif oksijen türleri (ROS), artan sitozolik kalsiyum konsantrasyonu ve ATP tükenmesi gibi mitokondriyal etkiler nekroza yol açar. Çalışılan genler Tablo 16'da verilmektedir.

Tablo 2. MT dizininde kullanılan nekroz ilişkili genlerin listesi

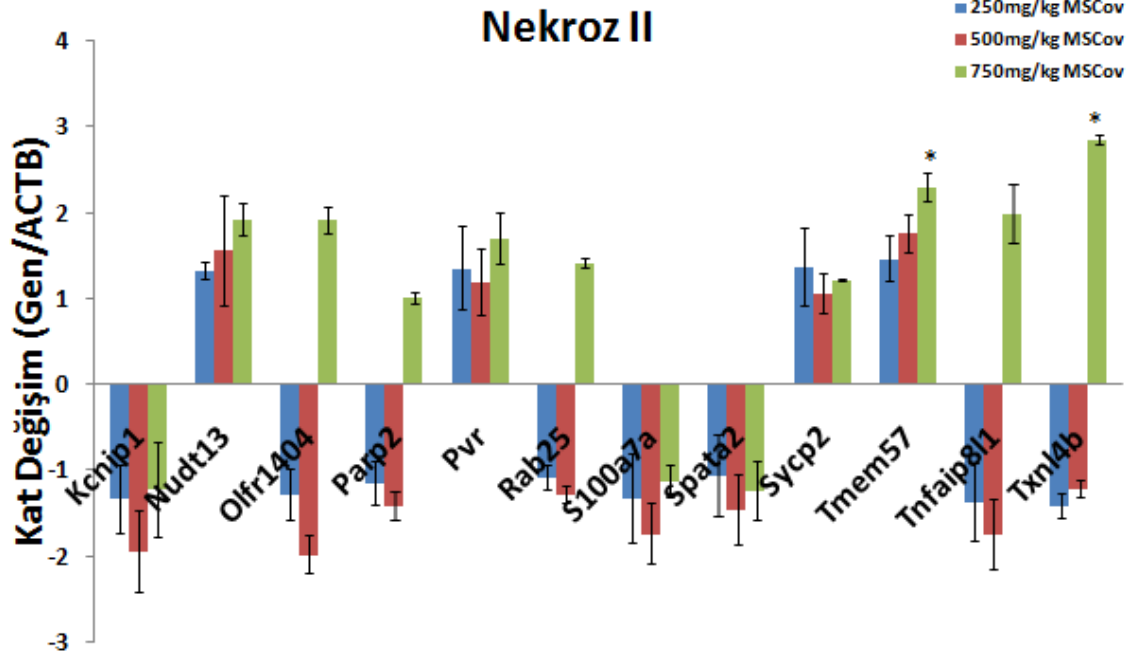
Gen Sembolü	Genin Açık İsmi	Genin Kodu
Atp6v1g2	ATPaz, H + taşıma, lizozomal 13kDa, V1 altbirim G2	NM_130463
Bmf	Bcl2 modifiye edici faktör	NM_033503
Commd4	COMM domeyni içeren 4	NM_017828
Cyld	Silindromatoz (Türban tümör sendromu)	NM_015247
Defb1	Defensin, beta 1	NM_005218
Dpysl4	Dihidroprimidinaz benzeri 4	NM_006426
Eif5b	Ökaryotik çeviri başlatma faktörü 5B	NM_015904
Foxi1	Forkhead kutu l1	NM_012188
Galnt5	UDP-N-asetil-alfa-D-galaktosamin: polypeptid N-asetilgalaktosaminiltransferaz 5 (GalNAc-T5)	NM_014568
Hspbap1	HSPB'dir (ısı şok 27kDa) ilişkili protein 1	NM_024610
Jph3	Junktofilin 3	NM_020655
Kcnip1	Kv kanal etkileşim proteini 1	NM_014592
Nudt13	Nudiks (nükleosit difosfat bağlı bir parça X) tip motif 13	NM_015901
Parp2	Poli (ADP-riboz) polimeraz 2	NM_005484
Pvr	poliovirüs reseptörü	NM_006505
Rab25	RAB25, üye RAS onkogen ailesi	NM_020387
S100a7a	S100 kalsiyum bağlayan protein A7A	NM_176823
Spata2	Spermatogenez 2 ilişkili	NM_006038
Sycp2	Sinaptonemal Kompleks Protein 2	NM_014258

Tmem57	Transmembran proteini 57	NM_018202
Tnfaip8l1	Tümör nekroz faktörü, alfa-kaynaklı protein 8-benzeri 1	NM_152362
Txnl4b	Tioredoksin benzeri 4B	NM_017853

Nekrotik yolakta yer alan ve bir şekilde bu fizyolojik olgu ile ilişkili olduğu bilinen ve Tablo X'te verilen genlerin 3 değişik MSCov dozu ile nasıl etkilendiği aşağıdaki Şekil 88 ve 89'da verilmektedir.



Şekil 3. MSCov ekstresinin nekroz genlerine etkisi I



Şekil 4. MSCov ekstresinin nekroz genlerine etkisi II

Apoptoz yolağında gözlemlendiği gibi MSCov ekstresi çalışılan 250 ve 500 mg/kg/gün dozlarda kontrol ile karşılaştırıldığında bu grup genlerden hiç birisine olumlu ya da olumsuz bir etki yapmazken, çalışılan yüksek dozda (750 mg/kg/gün) ise 8 adet gende (Atp6v1g2, Defb1, Dpysl4, G10RIK, Galnt5, Hspbp1, Tmem57 ve Txnl4b) ifade düzeylerini artırıcı yönde etki gösterdiği tespit edildi.

3.2.3 DNA Hasarı Ve Tamiri Yolakları

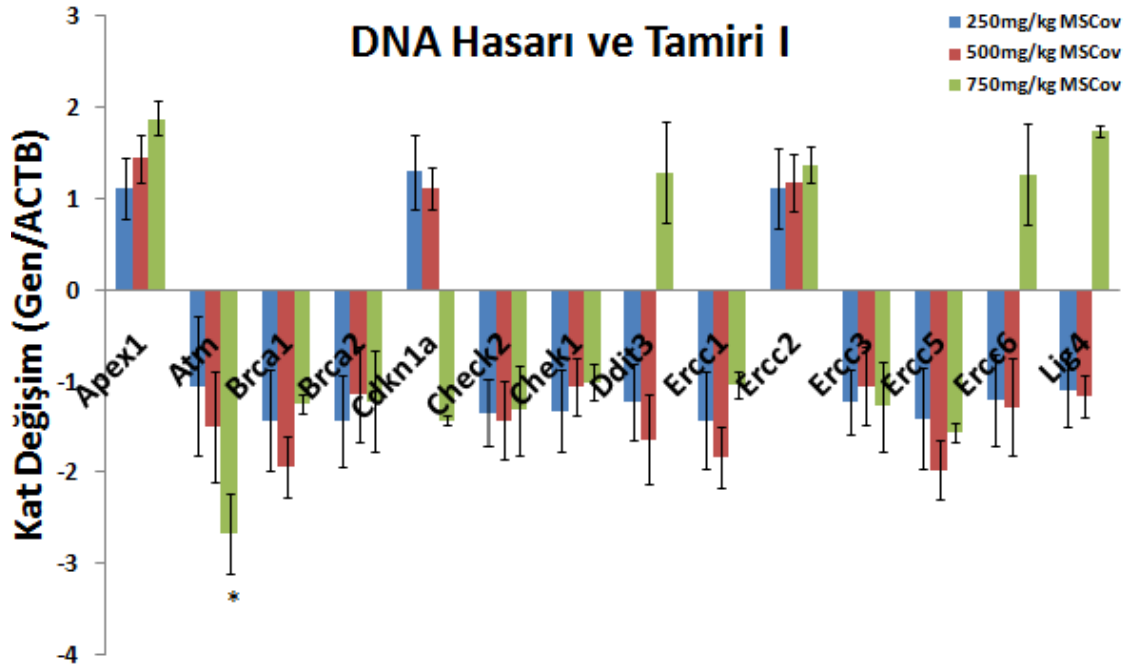
Kesip-çıkarma, nükleotid çıkarma, yanlış-eşleşme, çift zincir kırık ve diğer onarım süreçlerinde yer alan genler ele alınmıştır. Çeşitli toksik ajanlar (örneğin reaktif oksijen türleri, metilasyon ajanları, UV ışık ve diğer iyonize radyasyon gibi) ve hatta normal fizyolojik süreçler (çoğaltma ve rekombinasyon gibi) DNA'ya zarar verir. Hücreler biriken mutasyonları önlemek, genom bütünlüğünü ve istikrarını korumak için DNA hasarını onarmaları gerekir. Özellikle ATR / ATM sinyalizasyon ağı genleri ve DNA hasar yanıtın transkripsiyonel hedefleri ile ilişkili genlerdir. DNA hasarı tamirinde gerçekleşen defetkler yaşlanma ve kanser gibi olgulara neden olur. Çalışılan genlerin listesi Tablo 17'de verilmektedir.

Tablo 3. MT dizininde kullanılan DNA hasarı ve tamir yolakları ilişkili genlerin listesi

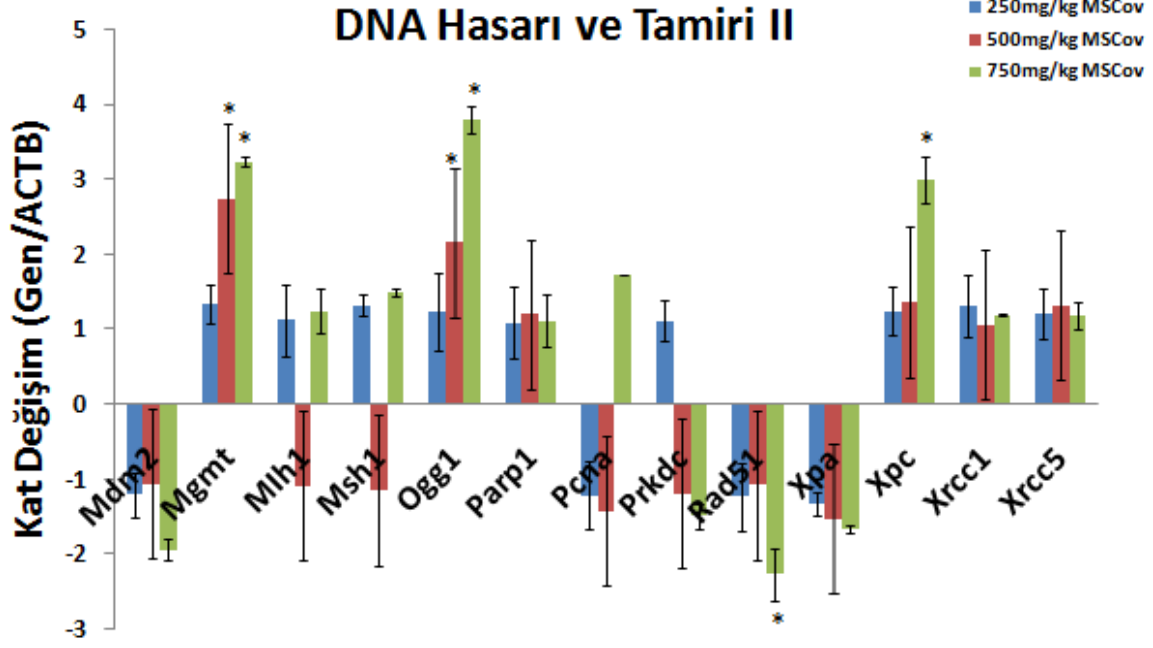
Gen Sembolü	Genin Açık İsmi	Genin Kodu
Apex1	APEX nükleaz (çok fonksiyonlu DNA onarım enzimi) 1	NM_080649
Atm	Ataksi telenjektazi mutasyona uğramış	NM_000051
Brca1	Meme kanseri 1, erken başlangıçlı	NM_007294
Brca2	Meme kanseri 2, erken başlangıçlı	NM_000059
Cdkn1a	Sikline-bağlı kinaz inhibitörü 1A (p21 CIP1)	NM_000389
Chek1	CHK1 kontrol noktası homoloğu (S. pombe)	NM_001274
Chek2	Chk2 kontrol noktası homoloğu (S. pombe)	NM_007194
Ddit3	DNA hasarı-indüklenebilir transkript 3	NM_004083
Erccl	Eksizyon onarım kemirgen onarım eksikliği çapraz tamamlayıcı, tamamlama grup 1 (çakışan antisens dizisi içerir)	NM_001983
Erccl2	Eksizyon onarım kemirgen onarım eksikliği, tamamlama grubu 2 çapraz tamamlayıcı	NM_000400
Erccl3	Eksizyon onarımı çapraz tamamlayıcı kemirgen onarım eksikliği, tamamlama grup 3 (Kseroderma Pigmentosum grup B yakışan)	NM_000122
Erccl5	Eksizyon onarım kemirgen onarım eksikliği, tamamlama grubu 5 çapraz tamamlayıcı	NM_000123
Erccl6	Eksizyon onarım kemirgen onarım eksikliği, tamamlama grubu 6 çapraz tamamlayıcı	NM_000124
Lig4	Ligaz IV DNA, ATP-bağımlı	NM_002312
Mdm2	MDM2-p53 bağlayıcı protein homologu (fare)	NM_002392
Mgmt	O-6-metilguanin-DNA metiltransferaz	NM_002412
Mlh1	MutL homolog 1, kalın bağırsak kanseri, nonpolipoz tip 2 (E. coli)	NM_000249
Msh1	MutL homolog 1, kalın bağırsak kanseri, nonpolipoz tip 2 (E. coli)	NM_000249
Ogg1	8-OxoGuanine DNA glikosilaz	NM_002542
Parpl	Poli (ADP-riboz) polimeraz 1	NM_001618
Pcna	Proliferasyon hücre nükleer antijeni	NM_182649
Prkdc	Protein kinaz, DNA ile aktive edilmiş katalitik polipeptidi	NM_006904
Rad51	RAD51 homoloğu (S. cerevisiae)	NM_002875
Xpa	Kseroderma pigmentosum, tamamlama grubu A	NM_000380
Xpc	Kseroderma pigmentosum, tamamlama grup C	NM_004628

Xrcc1	Çin hamster hücrelerinde 1 kusurlu onarım X-ışını onarımı tamamlayan	NM_006297
Xrcc5	Çin hamster hücrelerinde 5 (çift iplikli-kırık tekrar birleştirici) kusurlu onarım tamamlayan X-ışını onarım	NM_021141

Tablo 17’de verilen genlerin 3 değişik MSCov dozu ile nasıl etkilendiği aşağıdaki Şekil 90-91’de verilmektedir.



Şekil 5. MSCov ekstresinin DNA hasarı ve tamiri yolları genlerine etkisi I



Şekil 6. MSCov ekstresinin DNA hasarı ve tamiri yolları genlerine etkisi II

MSCov ekstresi çalışılan 250 mg/kg/gün dozda kontrol ile karşılaştırıldığında bu grup genlerden hiç birisine olumlu ya da olumsuz bir etki yapmazken 500 mg/kg/gün dozda ise sadece Mgmt ve Ogg1 genlerinde kontrole göre anlamlı bir artış etkisi gösterdi. Çalışılan yüksek dozda (750 mg/kg/gün) ise 5 adet gende değişiklik tespit edildi. Bu genlerden Atm ve RAD51 genlerinde kontrole göre azalış tespit edilirken Mgmt, Ogg1 ve Xpc genlerinde artış tespit edildi.

3.2.4 Mitokondriyal Enerji Metabolizması

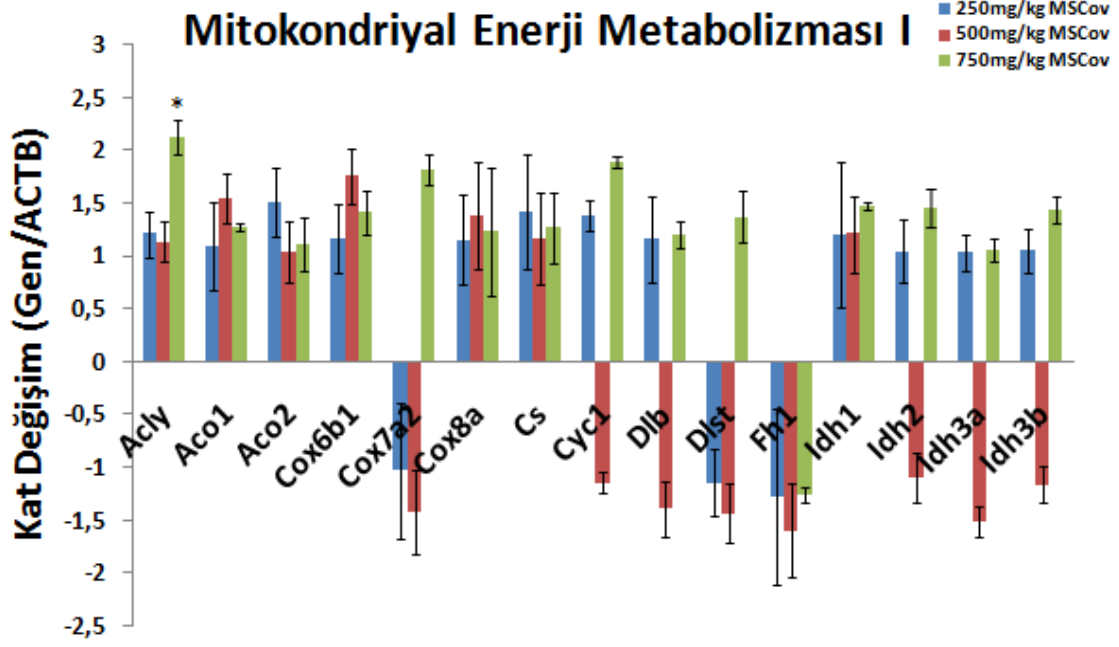
Mitokondriyal solunum da yer alan elektron taşıma zinciri ve oksidatif fosforilasyon komplekslerinin bileşenlerini kodlayan genler dahil olmak üzere mitokondriyal enerji metabolizmasının deney örneklerinde ketlenmiş ya da artırılmış olup olmadığını belirledi. Çalışılan genlerin listesi aşağıdaki Tablo 18'de verilmektedir.

Tablo 4. MT dizininde kullanılan DNA hasarı ve tamir yolları ilişkili genlerin listesi

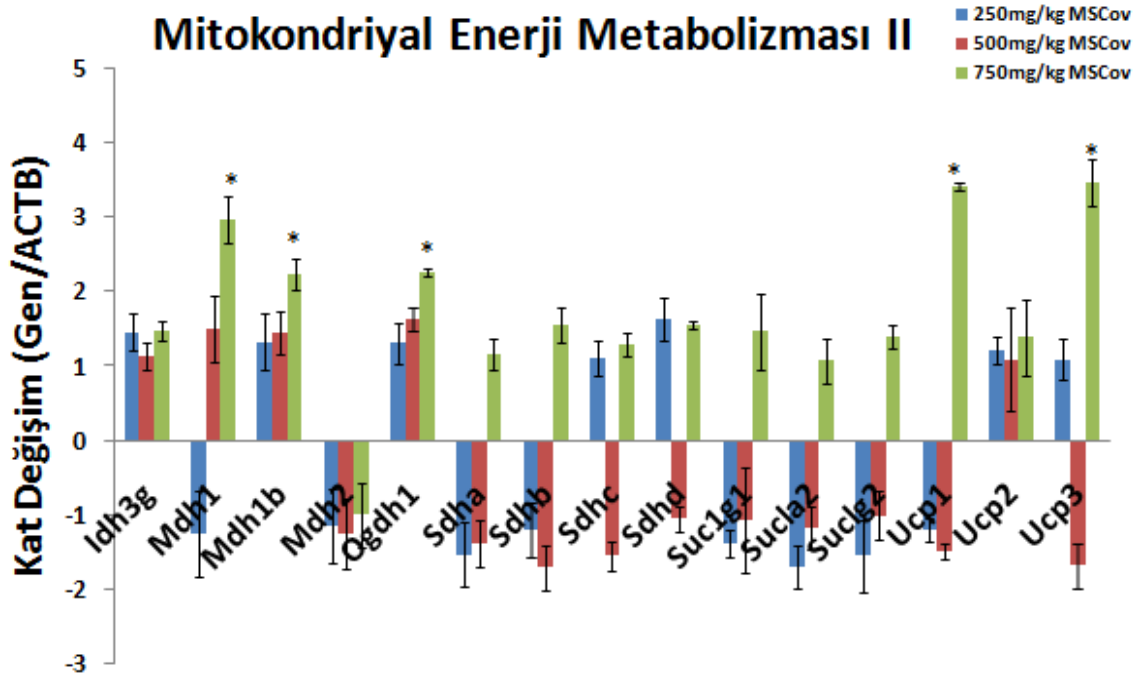
Gen Sembölü	Genin Açık İsmi	Genin Kodu
Acly	ATP sitrat liyaz	NM_001096
Aco1	Akonitaz 1, çözülebilir	NM_002197

Aco2	Akonitaz 2 mitokondriyal	NM_001098
Cox6b1	Sitokrom c oksidazı alt ünitesi VIb polipeptidi 1 (her yerde)	NM_001863
Cox8a	Sitokrom c oksidaz alt birimi VIIIA (her yerde)	NM_004074
Cs	Sitrat sentaz	NM_004077
Cyc1	Sitokrom c-1	NM_001916
Dlb	Dihidrolipoamid dehidrojenaz	NM_000108
Dlst	Dihidrolipoamid S-suksiniltransferaz (2-okso-glutarat kompleksinin E2 bileşeni)	NM_001933
Fh1	Fumarat hidrataz	NM_000143
ldh1	Izositrat dehidrojenaz 1 (NADP +), çözüdür	NM_005896
Cox7a2	Sitokrom c oksidazı alt ünitesi VIIa polipeptidi 2	
ldh2	Izositrat dehidrojenaz 2 (NADP +), mitokondriyal	NM_002168
ldh3a	Izositrat dehidrojenaz 3 (NAD +) alfa	NM_005530
ldh3b	Izositrat dehidrojenaz 3 (NAD +) beta	NM_174856
ldh3g	Izositrat dehidrojenaz 3 (NAD +) gamma	NM_174869
Mdh1	Malat dehidrojenaz 1, NAD (çözüdür)	NM_005917
Mdh1b	Malat dehidrojenaz 1B, NAD (çözüdür)	NM_001039845
Mdh2	Malat dehidrojenaz 2, NAD (mitokondriyal)	NM_005918
Ogdh1	Oksoglutarat (alfa-ketoglutarat) dehidrojenaz (lipoamit)	NM_002541
Sdha	Suksinat dehidrojenaz kompleksi, alt birim A, flavoprotein (Fp)	NM_004168
Sdhb	Suksinat dehidrojenaz kompleksi, alt birim B, demir sülfür (Ip)	NM_003000
Sdhc	Süksinat dehidrojenaz kompleksi, alt birim C1, integral zar proteini, 15kDa	NM_003001
Sdhd	Süksinat dehidrojenaz kompleksi, alt birim D, integral zar proteini	NM_003002
Suclg1	Süksinat-CoA ligaz, alfa alt birimi	NM_003849
Sucla2	Süksinat-CoA ligaz, ADP-oluşturucu, beta alt-birimi	NM_003850
Suclg2	Suksinat-CoA ligaz, GSYİH oluşturan, beta alt birimi	NM_003848
Ucp1	Eşleme bozucu protein 1 (mitokondriyal, proton taşıyıcı)	NM_021833
Ucp2	Eşleme bozucu proteini 2 (mitokondriyal proton taşıyıcı)	NM_003355
Ucp3	Eşleme bozucu protein 3 (mitokondriyal, proton taşıyıcı)	NM_003356

Tablo 18’de verilen genlerin 3 değişik MSCov dozu ile nasıl etkilendiği aşağıdaki Şekil 92-93’de verilmektedir.



Şekil 7. MSCov ekstresinin mitokondriyal enerji metabolizması genlerine etkisi I



Şekil 8. MSCov ekstresinin mitokondriyal enerji metabolizması genlerine etkisi II

Yukarıdaki yolaklarda olduğu gibi MSCov ekstresi çalışılan 250 ve 500 mg/kg/gün dozda kontrol ile karşılaştırıldığında bu grup genlerden hiç birisine olumlu ya da olumsuz bir etki yapmadığı tespit edildi. Çalışılan yüksek dozda (750 mg/kg/gün) ise 6 adet (Aclı, Mdh1, Mdh1b, Ogdh1, Ucp1, ve Ucp3) gende artış şeklinde değişiklik tespit edildi.

3.2.5 Yağ Asit Metabolizması

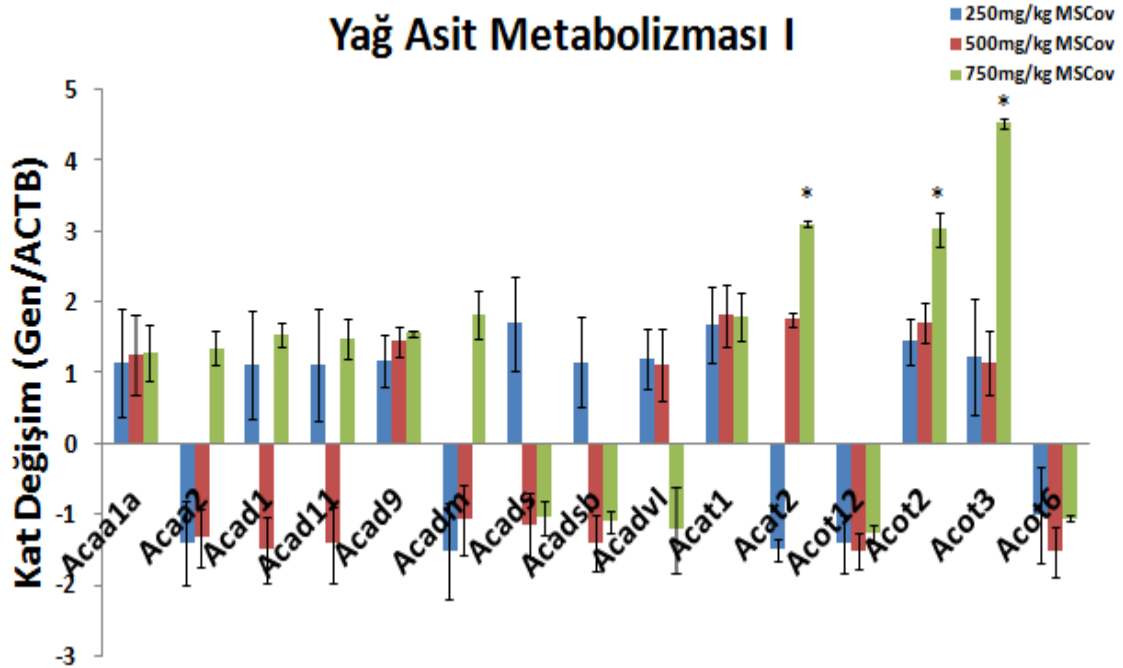
Yağ asit metabolizması ve düzenlenmesinde yer alan enzimatik genler dahil 30 anahtar genin ifadesi incelenmiştir. Hücreler, özellikle iskelet kası ve adipoz doku hücreleri, öncelikle triaçilgliserol olarak enerji depolarlar ve gerektiğinde mitokondriye oksidasyonu için gliserol ve yağ asitlerine yıkarlar. Bu yağ asit metabolizmasına katılan genlerin ekspresyonunda ki değişiklikler çeşitli metabolik sendromlar ile ilişkilendirilir. Bu sendromların yanı sıra diyabet, obezite ve kalp-damar hastalıkları gibi diğer yaygın sağlık sorunları dahil olmak üzere birden çok hastalık için risk faktörleridir. Çalışılan genlerin listesi aşağıdaki Tablo 19'da verilmektedir.

Tablo 5. MT dizininde kullanılan Yağ sit metabolizmasında yer alan genlerin listesi

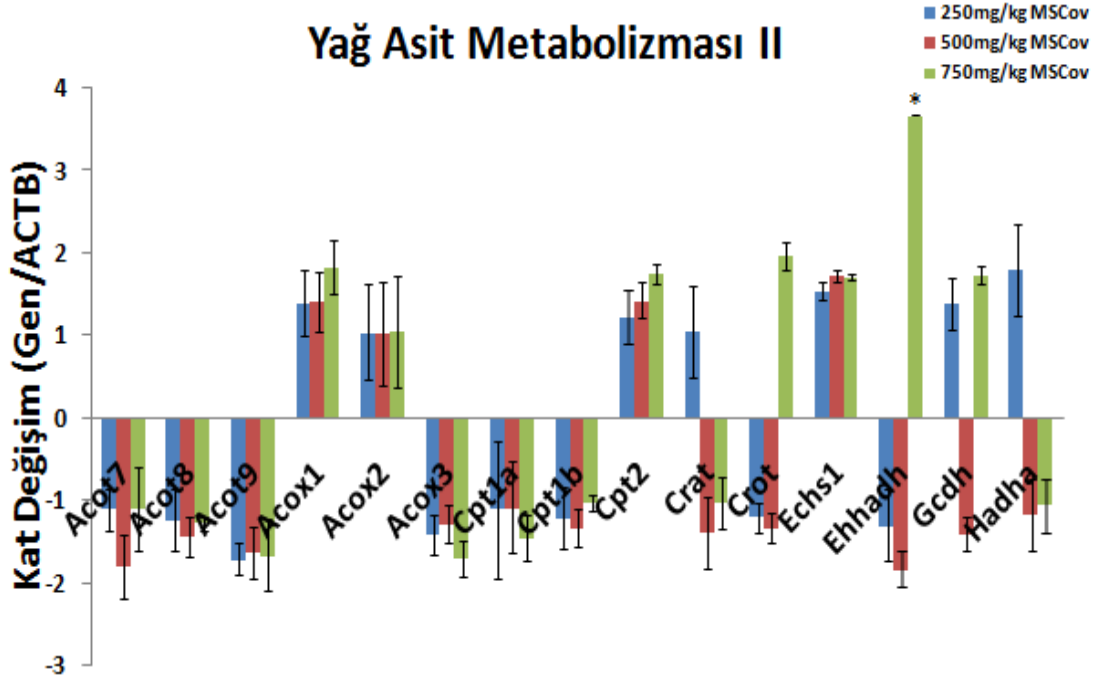
Gen Sembolü	Genin Açık İsmi	Genin Kodu
Acaa1	Asetil-KoA asiltransferaz 1	NM_001607
Acaa2	Asetil-KoA asiltransferaz 2	NM_006111
Acadl	Açıl-KoA dehidrojenaz, uzun zincirli	NM_001608
Acad11	Açıl-KoA dehidrojenaz aile üyesi 11	NM_032169
Acad9	Açıl-KoA dehidrojenaz aile üyesi 9	NM_014049
Acadm	Asil-KoA dehidrojenaz, C-4, C-12 düz zincirli	NM_000016
Acads	Asil-KoA dehidrojenaz, C-2, C-3 kısa zincirli	NM_000017
Acadsb	Açıl-KoA dehidrojenaz, kısa / dallı zincirli	NM_001609
Acadvl	Asil-KoA dehidrojenaz, çok uzun zincirli	NM_000018
Acat1	Asetil-KoA asetil 1	NM_000019
Acat2	Asetil-KoA asetil 2	NM_005891
Acot12	Asil-KoA 12 tiyoesteraz	NM_130767
Acot2	Açıl-KoA 2 tiyoesteraz	NM_006821
Acot6	Açıl-KoA 6 tiyoesteraz	NM_001037162
Acot7	Açıl-KoA 7 tiyoesteraz	NM_181866
Acot8	Açıl-KoA 8 tiyoesteraz	NM_005469

Acot9	Asil-KoA 9 tiyoesteraz	NM_001033583
Acox1	Asil-KoA oksidaz 1, palmitoil	NM_004035
Acox2	Asil-KoA oksidaz 2, dallı zincirli	NM_003500
Acox3	Asil-KoA oksidaz 3, Pristanoil	NM_003501
Cpt1a	Karnitin palmitoil 1A (karaciğer)	NM_001876
Cpt1b	Karnitin palmitoil 1B (kas)	NM_004377
Cpt2	Karnitin 2 palmitoil	NM_000098
Crat	Karnitin O-asetiltransferaz	NM_000755
Crot	Karnitin O-octanoyltransferase	NM_021151
Echs1	Enoil KoA hidrataz, kısa zincirli, 1, mitokondriyal	NM_004092
Ehhadh	Enoil-KoA, / 3-hidroksi açıl KoA dehidrogenaz hidrataz	NM_001966
Gcdh	Glutaril-KoA dehidrogenaz	NM_000159
Hadha	Hidroksiasil-KoA dehidrogenaz / 3-ketoasil-KoA / enoil-KoA hidratazı (üç işlevli protein) tiyolaz, alfa alt birimi	NM_000182

Yağ asit metabolizmasında yer alan genlerin 3 değişik MSCov dozu ile nasıl etkilendiği aşağıdaki Şekil 94-95'de verilmektedir.



Şekil 9. MSCov ekstresinin yağ asit metabolizması genlerine etkisi I



Şekil 10. MSCov ekstresinin yağ asit metabolizması genlerine etkisi II

MSCov ekstresi çalışılan 250 mg/kg/gün dozda kontrol ile karşılaştırıldığında bu grup genlerden hiç birisine olumlu ya da olumsuz bir etki yapmazken çalışılan yüksek dozda (750 mg/kg/gün) ise sadece 4 adet genin (Acat3, Acot3, Acox3 ve Ehhadh) ifade düzeylerinde kontrole göre artış tespit edildi.

3.2.6 Oksidatif Stres Ve Antioksidan Tepki

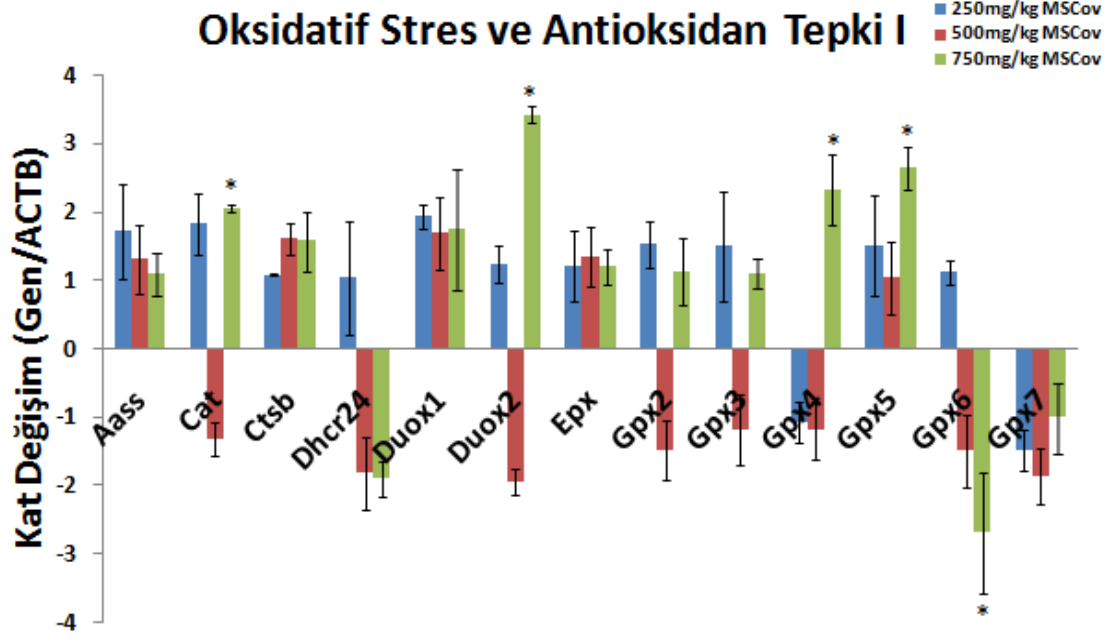
Oksidatif stres ile ilgili genler; peroksidazlar [glutasyon peroksidaz (GPx) ve peroxiredoxins (TPX)], süperoksit dismutazlar (SOD) ve süperoksit metabolizmasında rol oynayan oksidatif stres duyarlı genlerdir. Bu yolakta oluşan defeklerin bir çok hastalığın etiyolojisinde rol aldığı bilinmektedir. Çalışılan genlerin listesi aşağıdaki Tablo 20'de verilmektedir.

Tablo 6. MT dizininde kullanılan oksidatif stres ve antioksidan tepki ilişkili genlerin listesi

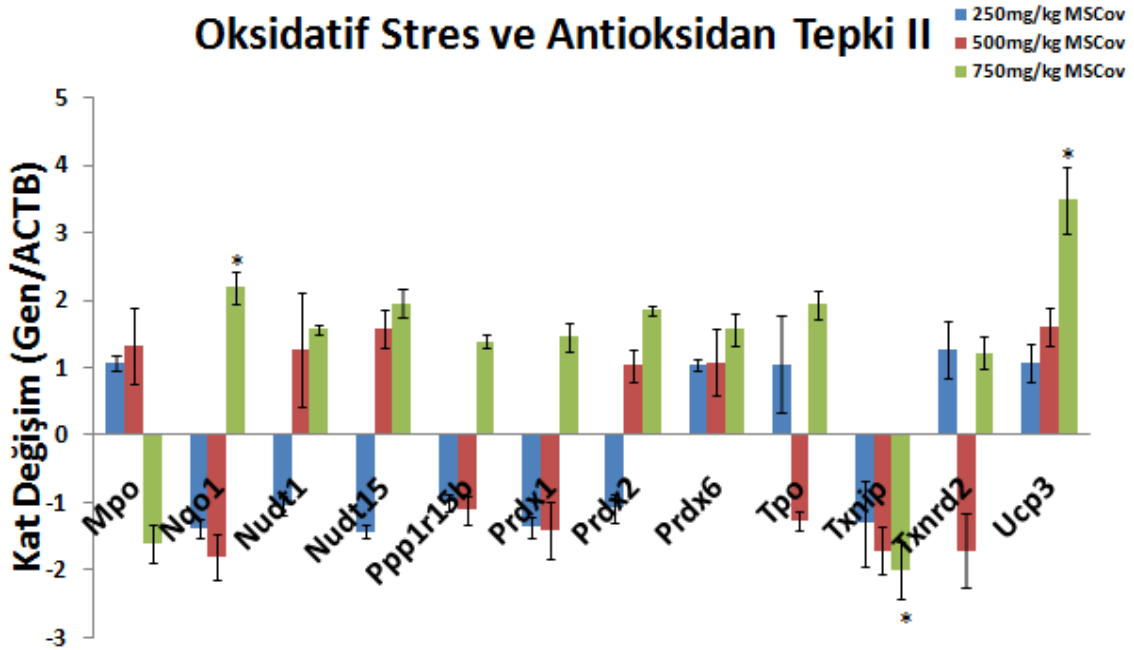
Gen Sembölü	Genin Açık İsmi	Genin Kodu
Aass	Aminoadipat-semialdehit sentaz	NM_005763
Cat	Katalaz	NM_001752

Ctsb	Katepsin B	NM_001908
Dhcr24	24-dehidrokolesterol redüktaz	NM_014762
Duox1	Çift oksidaz 1	NM_175940
Duox2	Çift oksidaz 2	NM_014080
Epx	Eozinofil peroksidaz	NM_000502
Gpx2	Glutasyon peroksidaz 2 (mide-bağırsak)	NM_002083
Gpx3	Glutasyon peroksidaz 3 (plazma)	NM_002084
Gpx4	Glutasyon peroksidaz 4 (fosfolipid hidroksiperoksidaz)	NM_002085
Gpx5	Glutasyon peroksidaz 5 (epididim androjen ilişkili protein)	NM_001509
Gpx6	Glutasyon peroksidaz 6 (koku)	NM_182701
Gpx7	Glutasyon peroksidaz 7	NM_015696
Mpo	Miyeloperoksidaz	NM_000250
Nqo1	NAD(P)H dehidrojenaz, kinon 1	NM_000903
Nudt1	Nudix (nükleosit difosfat bağlı bir parça X) tipi motif 1	NM_002452
Nudt15	Nudix (nükleosit difosfat bağlı bir parça X) tipi motif 15	NM_018283
Ppp1r15b	Protein fosfataz 1, düzenleme (inhibitörü) alt birimi 15B	NM_032833
Prdx1	Peroksiredoksin 1	NM_002574
Prdx2	Peroksiredoksin 2	NM_005809
Prdx6	Peroksiredoksin 6	NM_004905
Tpo	Tiroid peroksidaz	NM_000547
Txnip	Tioredoksin etkileşimli protein	NM_006472
Txnrd2	Tioredoksin redüktaz 2	NM_006440
Ucp3	Eşleşme bozucu protein 3 (mitokondrial, proton taşıyıcı)	NM_003356

Oksidatif stres ve antioksidan tepki ilişkili genlerin 3 değişik MSCov dozu ile nasıl etkilendiği aşağıdaki Şekil 96-97'de verilmektedir.



Şekil 11. MSCov ekstresinin oksidatif stres ve antioksidan tepki genlerine etkisi I



Şekil 12. MSCov ekstresinin oksidatif stres ve antioksidan tepki genlerine etkisi II

Yukarıdaki yolaklarda olduğu gibi MSCov ekstresi çalışılan 250 ve 500 mg/kg/gün dozda kontrol ile karşılaştırıldığında bu grup genlerden hiç birisine olumlu ya da olumsuz bir etki yapıldığı tespit edildi. Çalışılan yüksek dozda (750 mg/kg/gün) ise 8 adet (gende değişiklik

tespit edildi. Bu genlerden Cat, Dusx2, Gpx4, Gpx5, Nqo1 ve Ucp3 genlerinde kontrole göre artış gözlenirken Gpx6 ve Txnrd2 genlerinde azalış tespit edildi.

3.2.7 Isı Şok Tepkisi

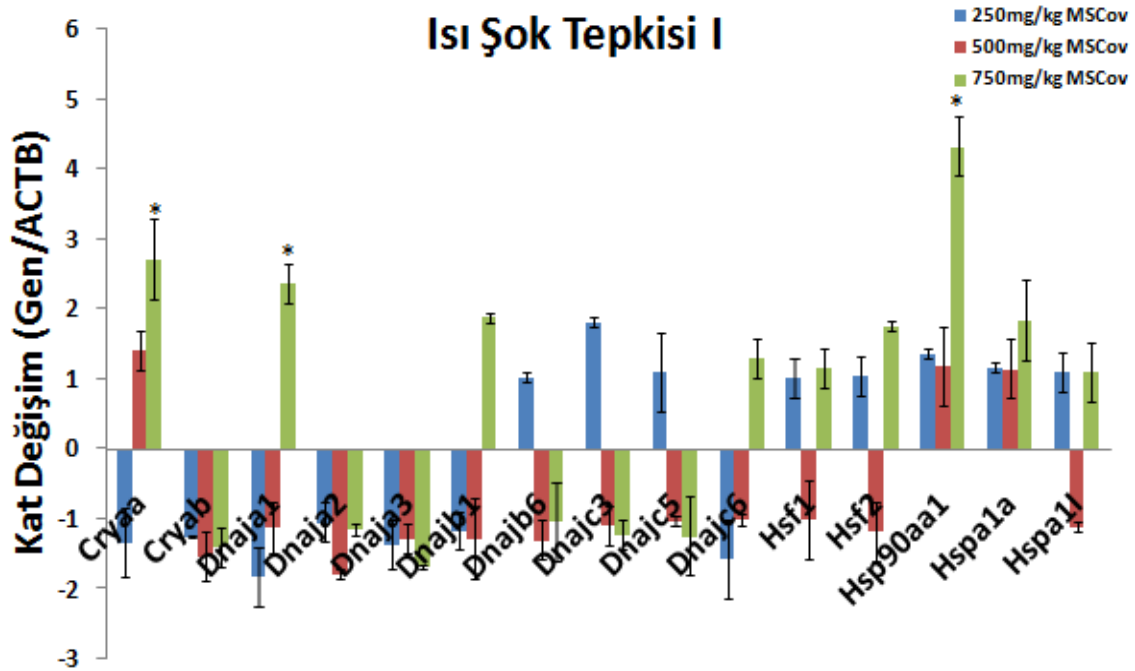
Protein katlanmasını düzenleyen ısı şok protein genleri (HSP'ler veya moleküler şaperonlar) hücrel ağların önemli bileşenleridir. HSP'ler yeni sentezlenen proteinlerin katlanmasına yardımcı olmaları ya da yanlış katlanmış proteinlerin yıkımına yol açmaları ile oldukça önemlidirler. Çalışılan genlerin listesi aşağıdaki Tablo 21'de verilmektedir.

Tablo 7. MT dizininde kullanılan ısı şok tepki ilişkili genlerin listesi

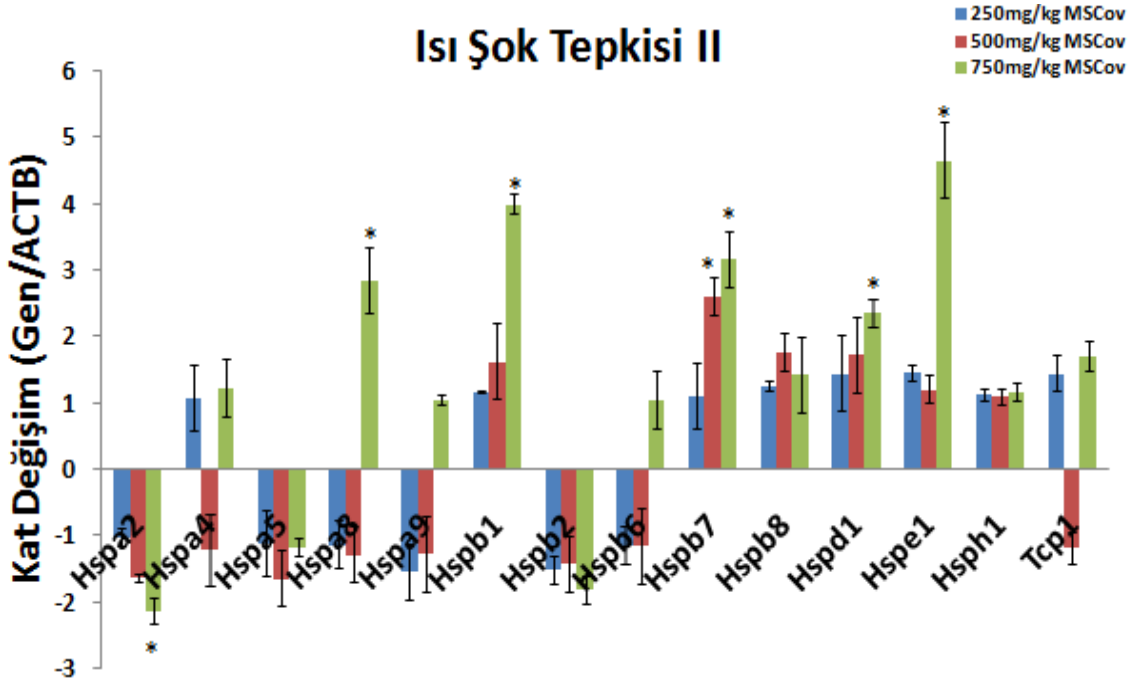
Gen Sembolü	Genin Açık İsmi	Genin Kodu
Cryaa	Kristalin, alfa A	NM_000394
Cryab	Kristalin, alfa B	NM_001885
Dnaja1	DnaJ (Hsp40) homolog, altfamilya A, üyesi 1	NM_001539
Dnaja2	DnaJ (Hsp40) homolog, altfamilya A, üyesi 2	NM_005880
Dnaja3	DnaJ (Hsp40) homolog, altfamilya A, üyesi 3	NM_005147
Dnajib1	DnaJ (Hsp40) homolog, altfamilya B, üyesi 1	NM_006145
Dnajib6	DnaJ (Hsp40) homolog, altfamilya B, üyesi 6	NM_005494
Dnajc3	DnaJ (Hsp40) homolog, altfamilya C üyesi 3	NM_006260
Dnajc5	DnaJ (Hsp40) homolog, altfamilya C üyesi 5	NM_025219
Dnajc6	DnaJ (Hsp40) homolog, altfamilya C üyesi 6	NM_014787
Hsf1	Isı şok transkripsiyon faktör 1	NM_005526
Hsf2	Isı şok transkripsiyon faktörü 2	NM_004506
Hsp90aa1	Isı şok proteini 90kDa alfa (sitozolik), A sınıfı üye 1	NM_001017963
Hspa1a	Isı şoku proteini 70kDa 1A	NM_005345
Hspa1l	Isı şoku proteini 70kDa 1-benzeri	NM_005527
Hspa2	Isı şoku proteini 70kDa 2	NM_021979
Hspa4	Isı şoku proteini 70kDa 4	NM_002154
Hspa5	Isı şoku proteini 70kDa 5 (glukoz-düzenlenmiş protein, 78kDa)	NM_005347
Hspa8	Isı şoku proteini 70kDa 8	NM_006597
Hspa9	Isı şoku proteini 70kDa 9 (mortalin)	NM_004134

Hspb1	Isı şoku proteini 27kDa 1	NM_001540
Hspb2	Isı şoku proteini 27kDa 2	NM_001541
Hspb6	Isı şoku proteini, alfa-kristalin ilişkili, B6	NM_144617
Hspb8	Isı şoku proteini 22 kDa 8	NM_014365
Hspd1	Isı şoku 60kDa protein 1 (şaperonin)	NM_002156
Hspe1	Isı şoku 10kDa protein 1 (10 şaperonin)	NM_002157
Hsph1	Isı şoku 105kDa/110kDa protein 1	NM_006644
Tcp1	T-kompleksi 1	NM_030752

Oksidatif stres ve antioksidan tepki ilişkili genlerin 3 değişik MSCov dozu ile nasıl etkilendiği aşağıdaki Şekil 98-99'da verilmektedir.



Şekil 13. MSCov ekstresinin ısı şok tepkisi genlerine etkisi I



Şekil 14. MSCov ekstresinin ısı şok tepkisi genlerine etkisi II

Yukarıdaki yollarda olduğu gibi MSCov ekstresi çalışılan 250 mg/kg/gün dozda kontrol ile karşılaştırıldığında ısı şok tepki ilişkili genlerden hiç birisine olumlu ya da olumsuz bir etki yapmadığı tespit edilirken 500 mg/kg/gün dozda sadece tek bir genin (hspb7) ifade düzeyi kontrole oranla anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. Çalışılan yüksek dozda (750 mg/kg/gün) ise 9 adet gende değişiklik tespit edildi. Bu genlerden Crya, Dnaja1, Hsp90aa1, Hspa8, Hspb1, Hspb7 Hspd1 ve Hspe1 genlerinde kontrole göre artış gözlenirken sadece Hspa4 geninde azalış tespit edildi.

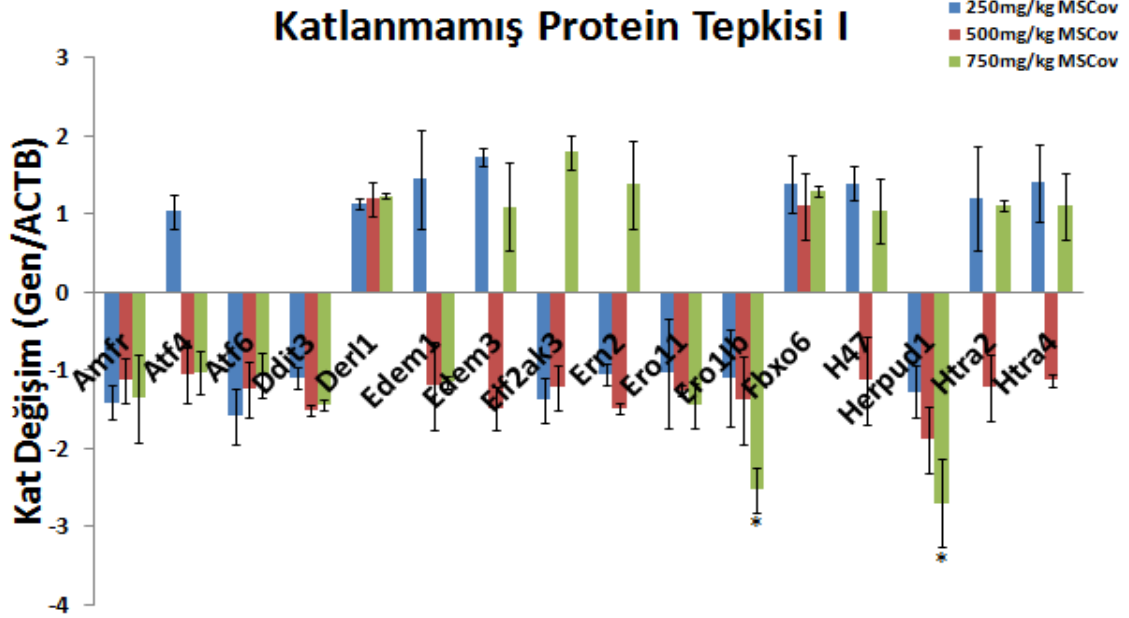
3.2.8 Katlanmamış Protein Stresi

Yanlış katlanmış veya katlanamamış ve endoplazmik retikulumda (ER) biriken protein birikimine yanıt 31 önemli genin ifade düzeyleri saptanmıştır. Katlanmamış proteinlere bağlanan şaperonlar ER protein sentezini inhibe eder ve bir protein kinaz kaskadını başlatırlar, ER protein translokasyonu tersine döner ve ER-özel ubikuitinasyon enzimleri aktive olurlar. Çeşitli ajanlar ve bu yolağa etki ederek olumsuz etkiler oluşturur. Çalışılan genlerin listesi aşağıdaki Tablo 22'de verilmektedir.

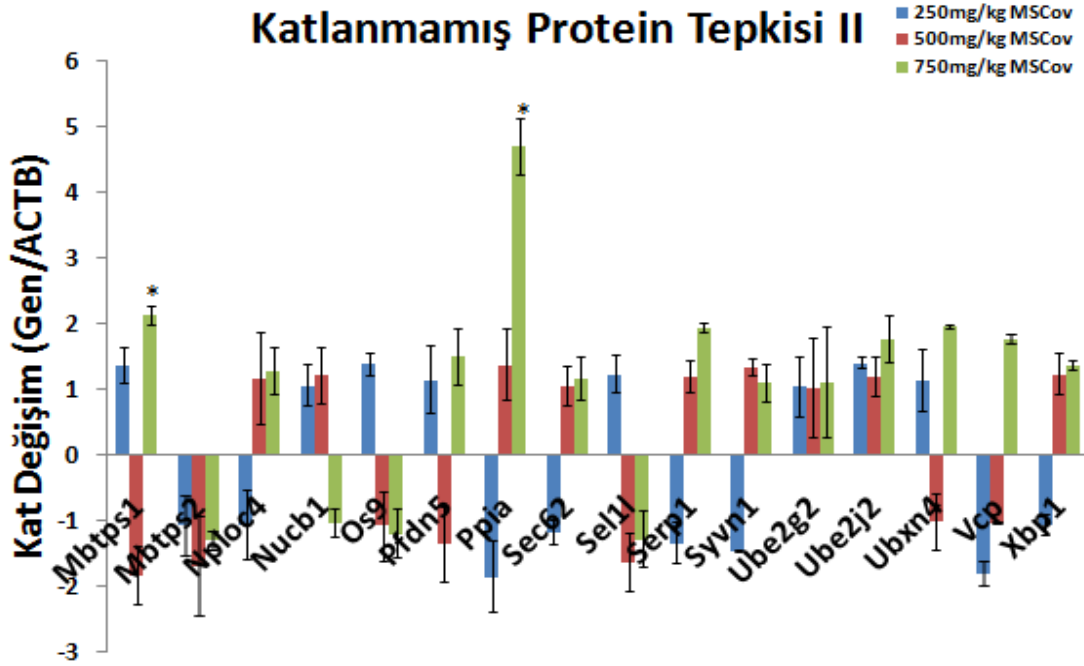
Tablo 8. MT dizininde kullanılan katlanmamış protein stresinde rol alan genlerin listesi

Gen Sembolü	Genin Açık İsmi	Genin Kodu
Amfr	Otokrin hareket faktör reseptörü	NM_001144
Atf4	Etkinleştirici transkripsiyon faktörü 4 (vergi duyarlı artırıcı eleman B67)	NM_001675
Atf6	Etkinleştirici transkripsiyon faktörü 6	NM_007348
Ddit3	DNA hasarı-indüklenebilir transkript 3	NM_004083
Der1	Der1 benzeri etki ailesi, üye 1	NM_024295
Edem1	ER bozunma güçlendirici, mannosidaz alfa-1 gibi	NM_014674
Edem3	ER bozulması arttırıcı, mannosidaz alfa-3 gibi	NM_025191
Eif2ak3	Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2-a kinaz 3	NM_004836
Ern2	Endoplazmik retikulumdan çekirdeğe sinyal 2	NM_033266
Ero11	ERO1 benzeri (<i>S. cerevisiae</i>)	NM_014584
Ero1lb	ERO1 benzeri β (<i>S. cerevisiae</i>)	NM_019891
Fbxo6	F-kutusu proteini 6	NM_018438
Herpud1	Homosistein indüklenebilir, endoplazmik retikulum stres indüklenebilir, ubikuitin benzeri domeyni üye 1	NM_014685
Htra2	HtrA serin peptidaz 2	NM_013247
Htra4	HtrA serin peptidaz 4	NM_153692
Mbtps1	Zara bağlı transkripsiyon faktör peptidaz, bölge 1	NM_003791
Mbtps2	Zara bağlı transkripsiyon faktör peptidaz, bölge 2	NM_015884
Nploc4	Nükleer protein lokalizasyonu 4 homoloğu (<i>S. cerevisiae</i>)	NM_017921
Nucb1	Nükleobindin 1	NM_006184
Os9	Osteosarkom 9 güçlendirilmiş, endoplazmik retikulum lektin	NM_006812
Pfdn5	Prefoldin alt birimi 5	NM_002624
Ppia	Peptidil-prolil izomerazı A (siklofilin A)	NM_021130
Sec62	SEC62 homoloğu (<i>S. cerevisiae</i>)	NM_003262
Sel1l	Lin-12-benzeri (<i>C. elegans</i>) Sel-1 baskılayıcı	NM_005065
Serp1	Stres ilişkili endoplazmik retikulum protein 1	NM_014445
Syvn1	Sinoviyal apoptoz inhibitörü 1, sinoviolin	NM_172230
Ube2g2	Ubikuitin-konjuge edici enzim E2G 2	NM_182688
Ube2j2	Ubikuitin-bağlayıcı enzim E2, J2	NM_194458
Ubxn4	UBX domeyn proteini 4	NM_014607
Vcp	Valosin içeren protein	NM_007126
Xbp1	X-kutusu bağlayıcı protein 1	NM_005080

Katlanmamış protein stresinde rol alan genlerin 3 değişik MSCov dozu ile nasıl etkilendiği aşağıdaki Şekil 100-101'de verilmektedir.



Şekil 15. MSCov ekstresinin katlanmamış protein tepkisi genlerine etkisi I



Şekil 16. MSCov ekstresinin katlanmamış protein tepkisi genlerine etkisi II

Yukarıdaki yolaklarda olduğu gibi MSCov ekstresi çalışılan 250 ve 500 mg/kg/gün dozlarda kontrol ile karşılaştırıldığında katlanmamış protein stresi ile ilişkili genlerden hiç birisine olumlu ya da olumsuz bir etki yapmadığı tespit edildi. Çalışılan yüksek dozda (750 mg/kg/gün) ise 2 adet gende (Fbxo6 veHerpud1) kontrole göre azalış gözlenirken değişiklik 2 adet gende de (Mbtps1 ve Ppia) genlerinde artış tespit edildi.

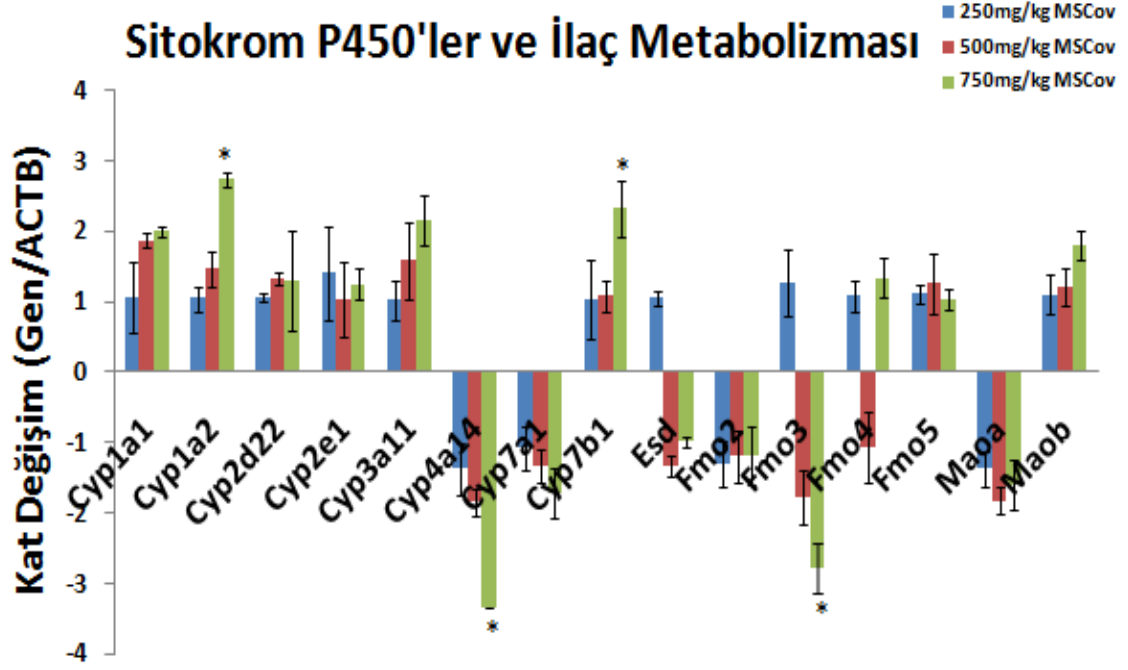
3.2.9 Sitokrom P450 Ve İlaç Metabolizması

İlaç metabolizması genleri de kanser, entoksikasyon, bağımlılık, ve metabolik hastalıklar gibi birçok hastalık durumlarında rol oynar. Ayrıca, bizim çalışmamızda olduğu gibi komplementer ve tamamlayıcı ajanların ilaç ve diyet etkileşimlerinin saptanmasında da çok önemlidirler. Faz I metabolizması (özellikle P450 ailesi) ve faz II metabolizması (örn. transferaz ve hidrolaz gibi) için önemli olan enzimleri kodlayan genler bazı transporterlarla birlikte incelenmiştir. Çalışılan genlerin listesi aşağıdaki Tablo 23'te verilmektedir.

Tablo 9. MT dizininde kullanılan ilaç metabolizması ilişkili rol alan genlerin listesi

Gen Sembölü	Genin Açık İsmi	Genin Kodu
Cyp1a1	Sitokrom P450, aile 1, alt familyası A, polipeptit 1	NM_000499
Cyp1a2	Sitokrom P450, aile 1, alt familyası A, polipeptit 2	NM_000761
Cyp2d22	Sitokrom P450, aile 2, alt familyası D, polipeptit 22	NM_001163472.1
Cyp2e1	Sitokrom P450, aile 2, alt familyası E, polipeptit 1	NM_000773
Cyp3a11	Sitokrom P450, aile 3, alt familyası A, polipeptit 11	NM_007818
Cyp4a14	Sitokrom P450, aile 4, alt familyası A, polipeptit 14	NM_07822
Cyp7a1	Sitokrom P450, aile 7, alt familyası A, polipeptit 1	NM_000780
Cyp7b1	Sitokrom P450, aile 7, alt familyası B, polipeptit 1	NM_004820
Esd	Esteraz D	NM_001984
Fmo2	Flavin içeren monooksijenaz 2 (işlevsel olmayan)	NM_001460
Fmo3	Flavin içeren monooksijenaz 3	NM_006894
Fmo4	Flavin içeren monooksijenaz 4	NM_002022
Fmo5	Flavin içeren monooksijenaz 5	NM_001461
Maoa	Monoamin oksidaz A	NM_000240
Maob	Monoamin oksidaz B	NM_000898

Katlanmamış protein stresinde rol alan genlerin 3 değişik MSCov dozu ile nasıl etkilendiği aşağıdaki Şekil 102'de verilmektedir.



Şekil 17 . MSCov ekstresinin sitokrom P450ler ve ilaç metabolizması genlerine etkisi

Yukarıdaki yollarda olduğu gibi MSCov ekstresi çalışılan 250 ve 500 mg/kg/gün dozlarda kontrol ile karşılaştırıldığında sitokrom P450 ve ilaç metabolizması ile ilişkili genlerden hiç birisine olumlu ya da olumsuz bir etki yapmadığı tespit edildi. Çalışılan yüksek dozda (750 mg/kg/gün) ise 2 adet gende (Cyp1a2 ve Cyp7b1) kontrole göre artış gözlenirken 2 adet gende de (Cyp7a1 ve Fmo4) genlerinde azalış tespit edildi.

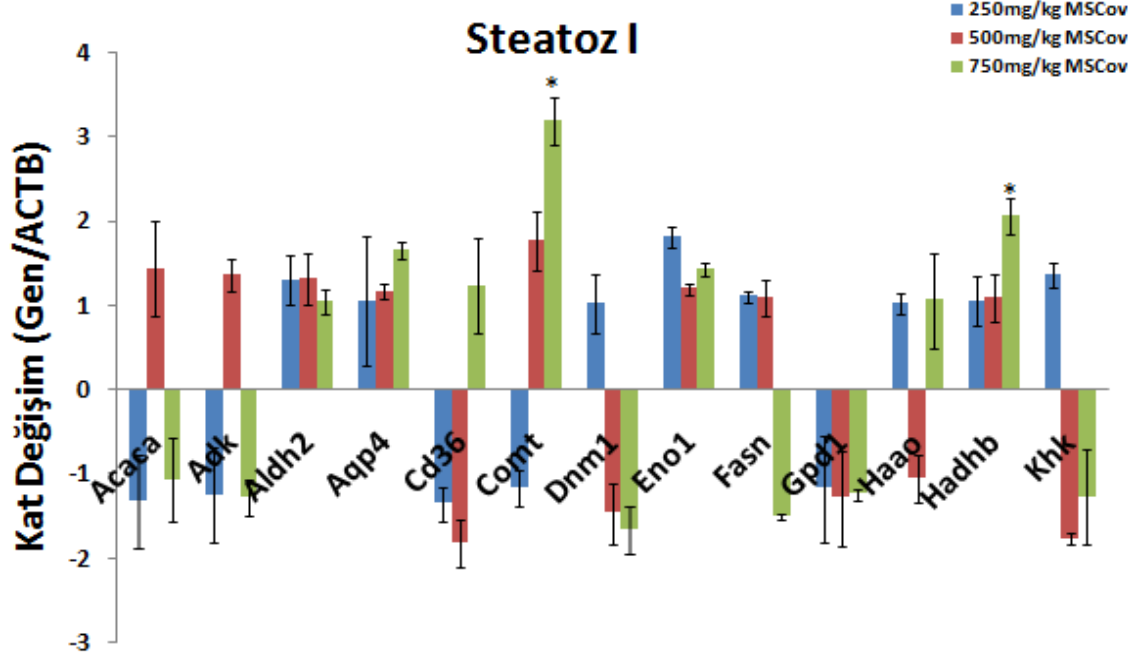
3.2.10 Steatoz

Steatoz bilinenin aksine tüm dokularda gerçekleşebilir. Yağ sit metabolizmasında gerçekleşen bozulmalar neticesinde hücre içerisinde lipid birikimi anlamına gelen steatoz alkol gibi bazı ajanların etki yolağları arasındadır. Bu nedenle lipid yapım, yıkım ve transportunda yer alan ve steatoz ile ilgili olduğu gösterilen 31 gen ifadesi incelenmiştir. Çalışılan genlerin listesi aşağıdaki Tablo 24'te verilmektedir.

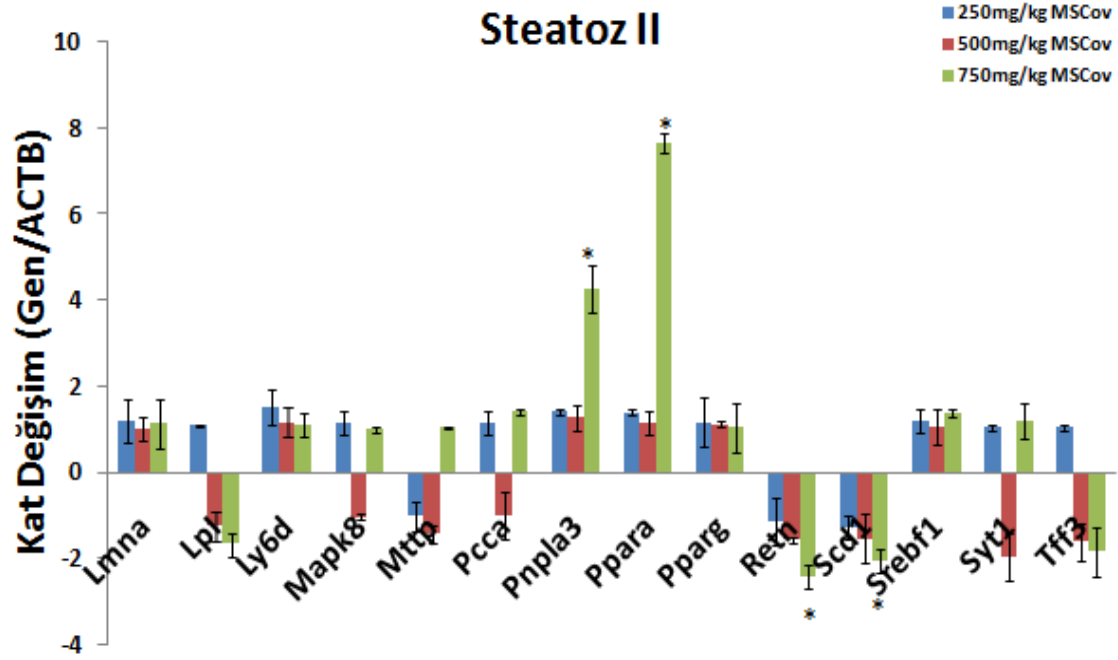
Tablo 10. MT dizininde kullanılan ilaç metabolizması ilişkili rol alan genlerin listesi

Gen Sembolü	Genin Açık İsmi	Genin Kodu
Acaca	Asetil-KoA karboksilaz alfa	NM_198834
Adk	Adenosin kinaz	NM_001123
Aldh2	Aldehit dehidrogenaz 2 aile (mitokondrial)	NM_000690
Aqp4	aquaporin 4	NM_001650
Cd36	CD36 molekülü (trombospondin reseptörü)	NM_000072
Comt	Katekol-O-metiltransferaz	NM_000754
Dnm1	Dynamine 1	NM_004408
Eno1	Enolaz 1, (alfa)	NM_001428
Fasn	Yağ asidi sentaz	NM_004104
Gpd1	Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz 1 (çözünür)	NM_005276
Hao	3-3,4-dioksijenaz hydroxyanthranilate	NM_012205
Hadhb	Hidroksiasil-KoA dehidrogenaz/3-ketoasil-KoA tiyolaz/enoil-KoA hidrataz (üç işlevli protein), beta alt birimi	NM_000183
Khk	Ketoheksokinaz (fruktokinaz)	NM_000221
Lmna	Lamin A / C	NM_005572
Lpl	Lipoprotein lipaz	NM_000237
Ly6d	Lenfosit antijen 6 kompleksi, lokus D	NM_003695
Mapk8	Mitojenin aktive ettiği protein kinaz 8	NM_002750
Mttp	Mikrozomal trigliserid transfer protein	NM_000253
Pcca	Propiyonil KoA karboksilaz, alfa polipeptidi	NM_000282
Pnpla3	Patatin benzeri 3 fosfolipaz domeyni içeren 3	NM_025225
Ppara	Peroxisom proliferatör ile aktive edilen reseptör alfa	NM_005036
Retn	resistin	NM_020415
Scd1	Stearoyil-KoA desaturaz (delta-9-desaturaz)	NM_005063
Srebf1	Sterol düzenleyici element bağlanıcı transkripsiyon faktörü 1	NM_004176
Syt1	Sinaptotagmin I	NM_005639
Tff3	Yonca faktörü 3 (bağırsak)	NM_003226

Katlanmamış protein stresinde rol alan genlerin 3 değişik MSCov dozu ile nasıl etkilendiği aşağıdaki Şekil 103 ve 104'te verilmektedir.



Şekil 18. MSCov ekstresinin steatoz genlerine etkisi I



Şekil 19. MSCov ekstresinin steatoz genlerine etkisi II

Yukarıdaki yolaklarda olduğu gibi MSCov ekstresi çalışılan 250 ve 500 mg/kg/gün dozlarda kontrol ile karşılaştırıldığında sitokrom steatoz ile ilişkili genlerden hiç birisine olumlu ya da olumsuz bir etki yapmadığı tespit edildi. Çalışılan yüksek dozda (750 mg/kg/gün) ise 4 adet gende (Comt, Hadhb, Pnpla3 ve Ppara) kontrole göre artış gözlemlendi. Bu yolakta yüksek doz MSCov hiçbir gene negatif etki göstermedi.

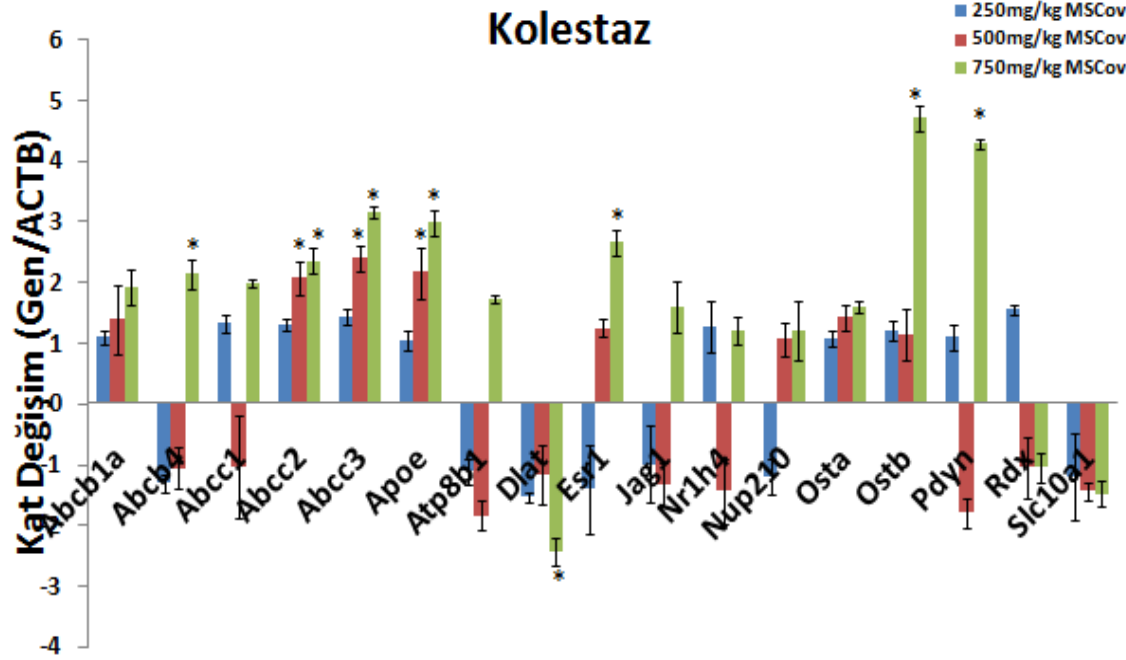
3.2.11 Kolestaz

Kolestaz karaciğer toksisite belirlemelerinde önemli olgulardan birisidir. Safra sentezi, yıkımı ve salgılanmasında rol alan 19 anahtar gen bu çalışmada etki belirlenmesi için değerlendirilmiştir. Kolestaz bir çok ilaç ve benzeri ajanların oluşturduğu bir durum olması nedeni ile toksikolojik incelemeye dahil edilmiştir. Çalışılan genlerin listesi aşağıdaki Tablo 25'te verilmektedir.

Tablo 11. MT dizininde kullanılan ilaç metabolizması ilişkili rol alan genlerin listesi

Gen Sembolü	Genin Açık İsmi	Genin Kodu
Abcb1a	ATP-bağlayıcı kaset, alt aile B (MDR/TAP), üye 1	NM_000927
Abcb4	ATP-bağlayıcı kaset, alt aile B (MDR/TAP), üye 4	NM_000443
Abcc1	ATP-bağlayıcı Kaset, alt aile C (CFTR/MRP), üyesi 1 ATP-bağlayıcı	NM_004996
Abcc2	ATP-bağlayıcı Kaset, alt aile C (CFTR/MRP), üyesi 2 ATP-bağlayıcı	NM_000392
Abcc3	ATP-bağlayıcı Kaset, alt aile C (CFTR/MRP), üyesi 3 ATP-bağlayıcı	NM_003786
ApoE	apolipoprotein E	NM_000041
Atp8b1	ATPaz, aminofosfolipid taşıyıcı, sınıf I, tip 8B, üye 1	NM_005603
Dlat	Dihidrolipoamid S-asetiltransferaz	NM_001931
Esr1	Estrojen reseptörü 1	NM_000125
Jag1	Jagged 1	NM_000214
Nr1h4	Nükleer reseptör alt ailesi 1, grup H, üye 4	NM_005123
Nup210	Nükleoporin 210kDa	NM_024923
Osta	Organik çözünen taşıyıcı alfa	NM_152672
Ostb	Organik çözünen taşıyıcı, beta	NM_178859
Pdyn	Prodinorfin	NM_024411
Rdx	Radiksin	NM_002906
Slc10a1	Çözünen taşıyıcı ailesi 10 (sodyum/safra asidi ortak taşıyıcı ailesi), üye 1	NM_003049

Kolestazda rol alan genlerin 3 değişik MSCov dozu ile nasıl etkilendiği aşağıdaki Şekil 105'te verilmektedir.



Şekil 20. MSCov ekstresinin kolestaz genlerine etkisi

İncelenen moleküler toksikoloji dizininde MSCov ekstresinin 500 mg/kg/gün dozda en çok etkilediği yolak kolestaz olduğu tespit edildi. Yukarıdaki yolaklarda olduğu gibi MSCov ekstresi çalışılan düşük dozda (250 mg/kg/gün) kontrol ile karşılaştırıldığında kolestaz ilişkili genlerden hiç birisine olumlu ya da olumsuz bir etki yapmadığı tespit edildi. 500 mg/kg/gün dozda ise 3 adet kolestaz ilişkili gen (Abcc2, Abcc3 ve ApoE) kontrole göre artış gösterdi. Çalışılan yüksek dozda (750 mg/kg/gün) ise yukarıdaki 3 adet gene ilave Abcb4, Esr1, Ostb ve Pdyn genlerinde de kontrole göre artış gözlemlendi. Bu yolda yüksek doz MSCov sadece Dlat genine negatif etki gösterdiği tespit edildi.

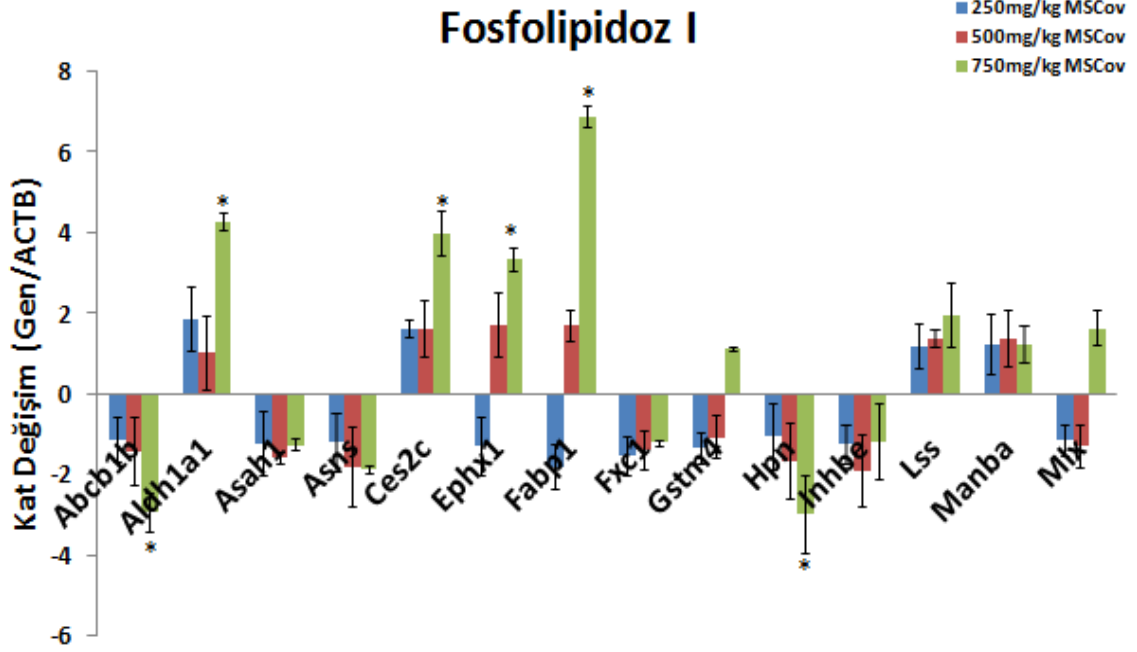
3.2.12 Fosfolipidoz

Fosfolipidozis hücre içinde aşırı fosfolipid birikmesipatolojik durumudur. Bazı katyonik amfifilik bileşikler fosfolipidozis neden potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle MSCov içerisinde bu şekilde etki eden aktif ajanların varlığı yada etkili olup olmadığını sınamak amacıyla fosfolipidoz mekanizmasına katılan 30 adet önemli gen bu çalışmada incelenmiştir. Çalışılan genlerin listesi aşağıdaki Tablo 28'de verilmektedir.

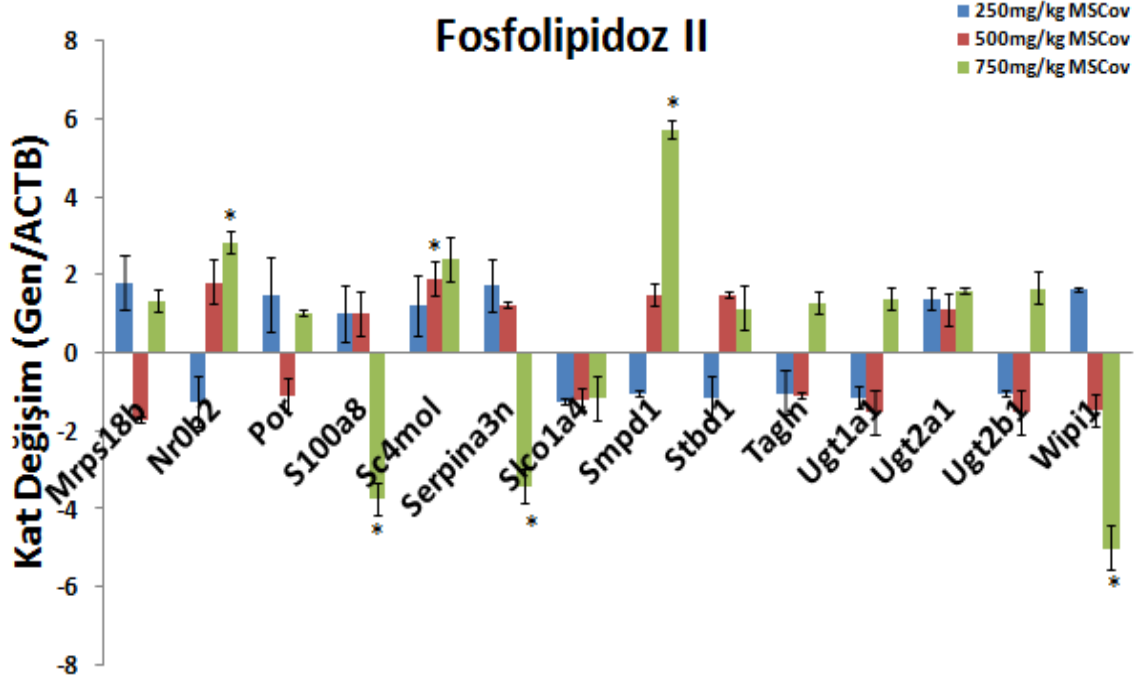
Tablo 12. MT dizininde kullanılan ilaç metabolizması ilişkili rol alan genlerin listesi

Gen Sembolü	Genin Açık İsmi	Genin Kodu
Abcb1b	ATP-bağlayıcı kaset, alt aile B (MDR/TAP), üye 1B	NM_11075
Aldh1a1	Aldehit dehidrogenaz aile 1, üye A1	NM_000689
Asah1	N-açilsfingozin amidohidrolaz (asit seramidaz) 1	NM_004315
Asns	Asparajin sentetaz (glutamin-hidrolize edici	NM_183356
Ces2c	Karboksilesteraz 2	NM_198061
Ephx1	Epoksit hidrolazı 1, mikrozomal (ksenobiyotik)	NM_000120
Fabp1	Yağ asidi bağlayıcı protein 1, karaciğer	NM_001443
Fxc1	Kırılma kallus 1 homolog (sıçan)	NM_012192
Gstm4	Glutation S-transferaz mu 4	NM_000850
Hpn	Hepsin	NM_002151
Inhbe	inhibin, beta E	NM_031479
Lss	Lanosterol sintaz (2,3-oksidoskualen-lanosterol siklaz)	NM_002340
Manba	Mannosidaz, beta A, lizozomal	NM_005908
Mlx	MAX benzeri protein X	NM_198205
Mrps18b	Mitokondriyal ribozomal protein S18B	NM_014046
Nr0b2	Nükleer reseptör alt ailesi 0, B grubu, üye 2	NM_021969
Por	P450 (sitokrom) Oksidoredüktaz	NM_000941
S100a8	S100 kalsiyum bağlayıcı protein A8	NM_002964
Sc4mol	Sterol-C4-metil oksidaz benzeri	NM_006745
Serpina3n	Serpin peptidaz inhibitörü, klad A (alfa-1 antiproteinaz antitripsin), üye 3	NM_001085
Slco1a2	Çözünen taşıyıcı organik anyon taşıyıcı ailesi, üye 1A2	NM_021094
Smpd1	Sfingomiyelin fosfodiesteraz 1, asit lizozomal	NM_000543
Stbd1	Nişasta bağlayıcı domeyn 1	NM_003943
Tagln	Transjelin	NM_003186
Ugt1a1	UDP glukuronosiltransferaz 1 aile, polipeptit A1	NM_000463
Ugt2a1	UDP ukuronosiltransferaz 2 aile, polipeptit A1, karmaşık odağı	NM_006798
Ugt2b1	UDP ukuronosiltransferaz 2 aile, polipeptit B1	NM_021139
Wipi1	WD tekrar domeyni, fosfoinositid etkileşici 1	NM_017983

Fosfolipidozda rol alan genlerin 3 değişik MSCov dozu ile nasıl etkilendiği aşağıdaki şekil 106-107'de verilmektedir.



şekil 21. MSCov ekstresinin fosfolipidoz genlerine etkisi I



şekil 22. MSCov ekstresinin fosfolipidoz genlerine etkisi II

Yukarıdaki yolalarda olduğu gibi MSCov ekstresi çalışılan 250 ve 500 mg/kg/gün dozlarda fosfolipidoz ilişkili genlerden hiç birisine olumlu ya da olumsuz bir etki yapmadığı tespit edildi. Çalışılan yüksek dozda (750 mg/kg/gün) ise 7 adet gende (Aldh1a1, Ces2c, Epx, Fabp1, Nrob2, Sc4mol ve Smpd1) kontrole göre artış gözlemlendi. Bu yolakta yüksek doz MSCov Abcb1b, Inhbe, S100a8, Slco1a4 ve Wipi1 genlerine kontrole göre azaltıcı etki gösterdiği tespit edildi.

3.2.13 İmmüntoksisite

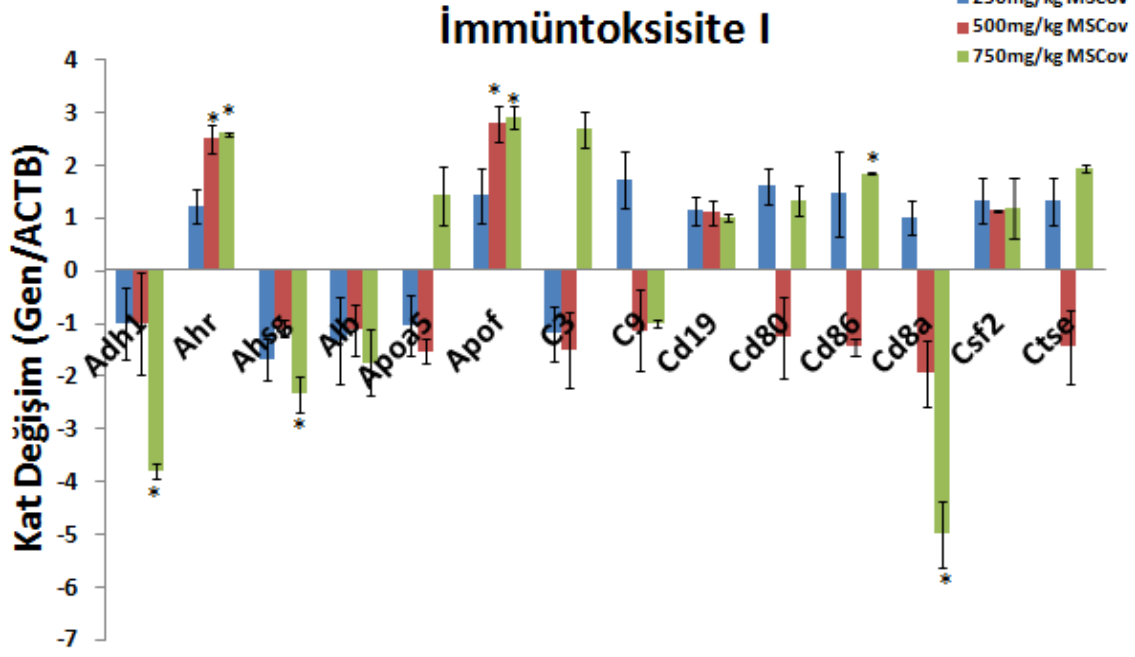
İmmünotoksisite bağışıklık sistemi işleyişi üzerinde olumsuz etki olarak tanımlanabilir. İşleyişi değiştirilmiş bağışıklık sistemi kanser dahil bir çok patofizyolojik değişikliklere neden olabilir. Bağışık sisteminin kendi karmaşıklığı yanı sıra çeşitli ajanlar bağışıklık fonksiyonu üzerinde çok karmaşık etkilere neden olabilirler ve bu nedenle belirlenmesi oldukça zordur. Bu sebeple, bu karmaşık mekanizmalarda genellikle rol aldığı düşünülen 44 anahtar gen (en fazla sayıda gen) bu çalışmada incelenmiştir. . Çalışılan genlerin listesi aşağıdaki Tablo 27’de verilmektedir.

Tablo 13. MT dizininde kullanılan immüntoksisite ilişkili genlerin listesi

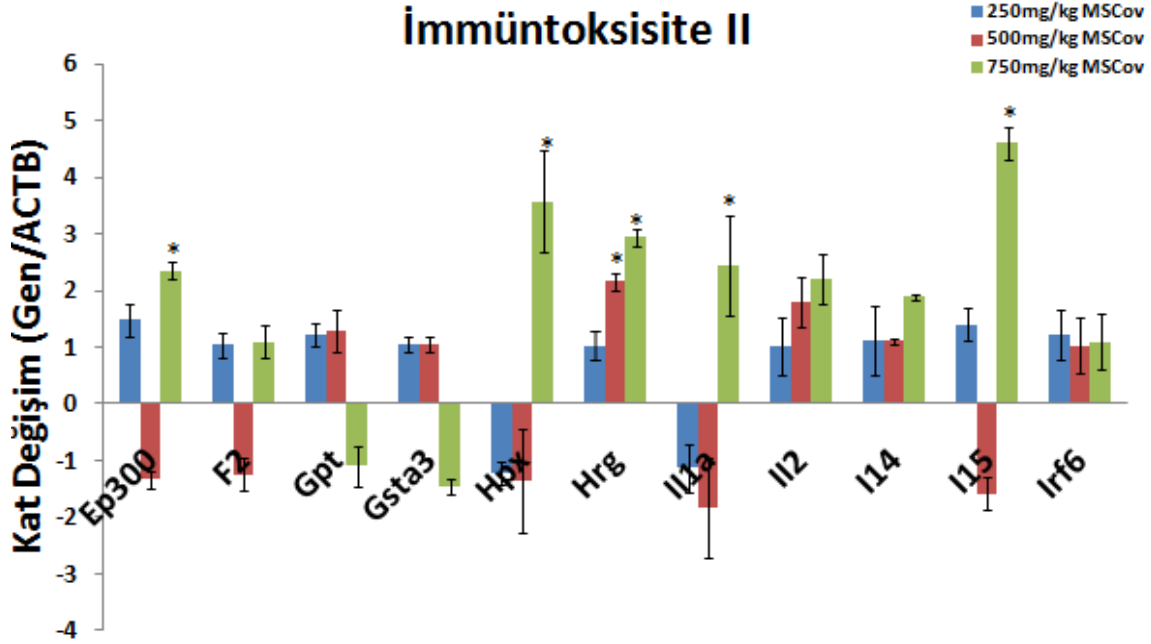
Gen Sembolü	Genin Açık İsmi	Genin Kodu
Adh1	Alkol dehidrogenaz 1C (sınıf I), gama polipeptit	NM_000669
Ahr	Aril hidrokarbon reseptörü	NM_001621
Ahsg	Alfa-2-HS-glikoprotein	NM_001622
Alb	Albümin	NM_000477
Apoa5	Apolipoprotein A-V	NM_052968
Apof	Apolipoprotein F	NM_001638
C3	Kompleman bileşen 3	NM_000064
C9	Kompleman bileşen 9	NM_001737
Cd19	CD19 molekülü	NM_001770
Cd80	CD80 molekülü	NM_005191
Cd86	CD86 molekülü	NM_006889
Cd8a	CD8a molekülü	NM_001768
Ctse	Katepsin D	NM_001910
Ep300	E1A bağlayıcı protein p300	NM_001429
F2	Pıhtılaşma faktörü II (trombin)	NM_000506
Gpt	Glutamik-piruvat transaminaz (alanin aminotransferaz)	NM_005309

Gsta3	Glutasyon S-transferaz alfa 3	NM_000847
Hpx	Hemopeksin	NM_000613
Hrg	Histidin bakımından zengin glikoprotein	NM_000412
Il1a	İnterlökin 1, alfa	NM_000575
Il2	İnterlökin 2	NM_000586
Il4	İnterlökin 4	NM_000589
Il5	İnterlökin 5 (koloni uyarıcı faktör, eosinofil)	NM_000879
Il6	İnterleukin-6 (interferon beta 2)	NM_000600
Itgax	İntegrin alfa X kompleman bileşen 3 reseptör alt-birimi 4)	NM_000887
Klf1	Kruppel benzeri faktör 1 (eritroid)	NM_006563
Lyz2	Lizozim	NM_000239
Metap2	Metionil aminopeptidaz 2	NM_006838
Mki67	Monoklonal antikor Ki-67 tarafından tanımlanan Antijen	NM_002417
Nr5a2	Nükleer reseptör alt ailesi 5, Grup A, elemanı 2	NM_003822
Pon1	Paraoksonaz 1	NM_000446
Pou3f3	POU sınıfı 3 homeobaks 3	NM_006236
Ptgs2	Prostaglandin endoperoksit sentaz-2 (prostaglandin G/H sentaz ve siklooksijenaz)	NM_000963
Ptpnc	Protein tirozin fosfataz, reseptör tipi, C	NM_002838
Trim10	10 içeren Üçlü motifi	NM_006778
Ubqln2	Ubikuilin 2	NM_013444

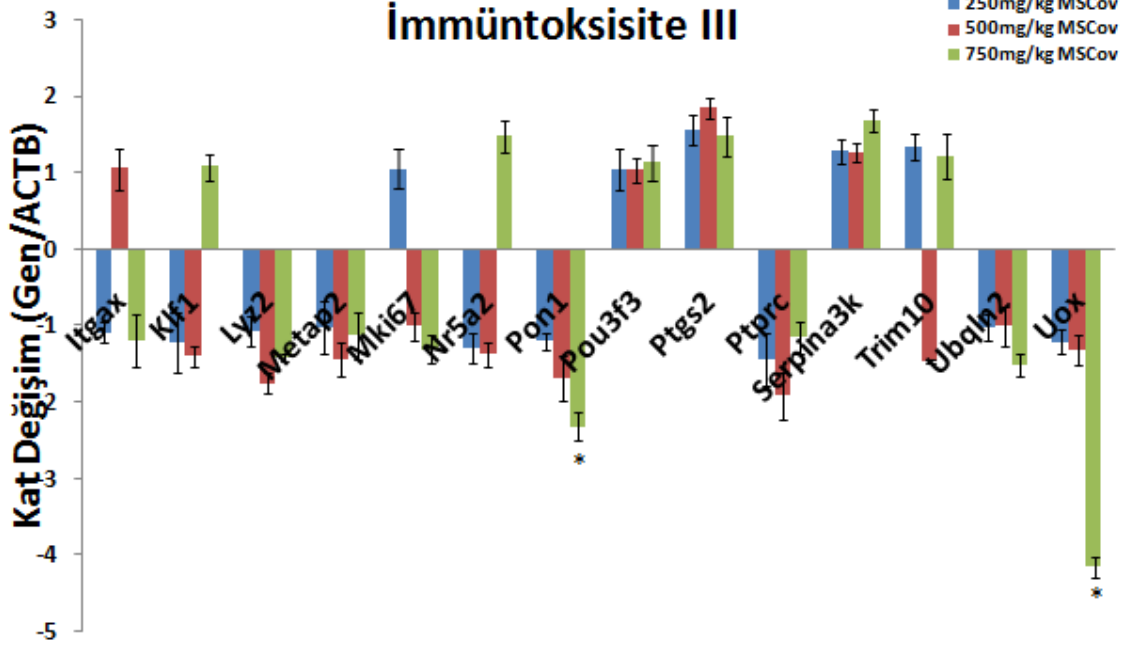
İmmünotoksisitede rol alan genlerin 3 değişik MSCov dozu ile nasıl etkilendiği aşağıdaki Şekil 108-110'da verilmektedir.



Şekil 23. MSCov ekstresinin immüntoksisite genlerine etkisi I



Şekil 24. MSCov ekstresinin immüntoksisite genlerine etkisi II



Şekil 25. MSCov ekstresinin immüntoksisite genlerine etkisi III

Yukarıdaki yolaklarda olduğu gibi MSCov ekstresi çalışılan 250 mg/kg/gün dozda immüntoksisite ilişkili genlerden hiç birisine olumlu ya da olumsuz bir etki yapmadığı tespit edildi. MSCov 500 mg/kg/gün dozda ise 3 adet gene (Ahr, Apof ve Hrg) kontrole göre ifade düzeylerini artırıcı şekilde etki ettiği gözlemlendi. Çalışılan yüksek dozda (750 mg/kg/gün) ise verilen 3 gene ilaveten 5 adet gende (Cd86, Ep300, Hpx, Il1a, ve Il5) kontrole göre artış gözlemlendi. Bu yolakta yüksek doz MSCov Adh1, Cd8a ve Ahsg genlerine kontrole göre azaltıcı etki gösterdiği tespit edildi.

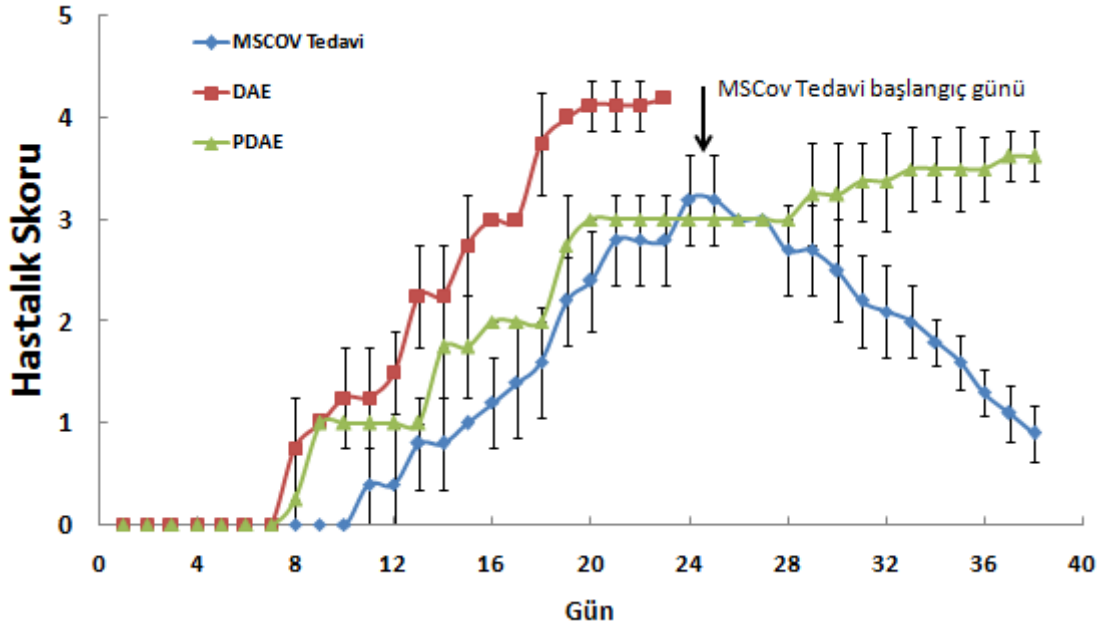
Moleküler etki saptayıcı dizin analizleri için 'Custom design' dizinler oluşturulup 384 gen laboratuvarımızda bulunan 96 örneklik blok cihazında (Bioneer) taranmıştır. Analiz sonuçlarından elde edilen değerlendirmeye göre öncelikle 250mg/kg dozda çalışılan hiçbir genin ifade düzeyinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Bunun yanısıra, 500 mg/kg dozda ise sadece 10 genin ekspresyon düzeyinde anlamlı değişim gözlenmiştir. Daha yüksek doz olan 750mg/kg'da ise yaklaşık 110 genin ekspresyon düzeyinde anlamlı farklılık görülmüştür. Buradan yola çıkarak bundan sonraki deneylerimizde 500mg/kg dozunun kullanılmasına karar verilmiştir.

Verilerin analizler qiagen firmasının ücretsiz olarak sağladığı RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis v3.4 ile web üzerinden çevirim içi gerçekleştirilmiştir.

3.3 Deneysel Alerjik Ensefalomyelit (DAE) Çalışmaları

3.3.1 Hayvanlarda DAE Oluşturulması

Hayvanlarda deneysel hayvan modeli oluşturmak için %95 saflıktaki Miyelin Oligodendrosit Glikoprotein 35-55 aminoasit peptit (MOG35-55), Mycobacterium tuberculosis (ısı inaktive edilmiş) ve Freund Adjuvan kullanıldı. Freund adjuvant ile emülsifiye edilmiş 250 µg MOG 35-55 ve 400 µg ısı inaktive edilmiş Mycobacterium tuberculosis karışımı, her hayvanın deri altına enjekte edildi. Bu işlemden hemen sonra ve 48 saat sonra 400 ng pertussis toksin karın boşluğuna enjekte edildi. Hayvanlarda hastalık oluşuktan sonra hayvanlar hasta kontrol grubu (DAE) ve tedavi grupları olarak ayrıldı. Skorlama grafiği Şekil X de verilmiştir. Bu grafik 3 yıl içerisinde 4 kez tekrar edilen deneylerin ortalama ± standart sapma verilerini içermektedir.



Şekil 26. DAE (hasta), PDAE (paralel hasta) ve MSCov Tedavi grubu farelerde gözlenen klinik skorlar.

3.3.2 MS Dizin Analizleri

Başlangıçta anlamlı sayıda örnekte (8) çok sayıda genin (84 adet MS patojenezinde rol oynadığı tespit edilmiş gen) ifade düzeyini analiz etmek ve taramak için hazır diziler kullanılmıştır. Böylelikle, öncelikle değişiklik gösteren genler kolaylıkla saptandı ve daha sonraki basamakta detaylı çalışılmak için veri elde edildi. Bu dizinler pahalı olmasına rağmen projenin ve analizlerin önemi ve sıhhati açısından Qiagen firmasından satın alındı ve kullanıldı. Çünkü bu analizler takip eden tüm çalışmalarımızı tanımlaması açısından son derece önemliydi.

3.3.2.1 MS dizi ile analiz edilen genler: (Detay isimleri, Tablo 28'de verilmektedir).

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

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

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

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

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

İnflamasyon Tepki: C1s, Ccl12, Ccl3 (Mip-1a), Ccl7 (Mcp-3), Ccr1, Ccr5, Cd40 (Tnfrsf5), Cd44, Cxcl10 (Inp10), Cxcl11 (I-TAC/IP-9), Cxcl9 (Mig), Fn1, Hif1a, Il10, Il13, Il1b, Il2ra, Itgb2, Nfkb1, Stat3, Tgfb1, Tnf, Tnfrsf1b.

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

Genel Apoptoz: Il10, Mapk1 (Erk2), Tnfrsf1b, Il6st (Gp130), Hdac1, Raf1, Apc, App, Ccl12, Cd28, FasL (Tnfsf6), Ifng, Il1b, Il2ra, Il6, Itgb2, Mmp9 (Gelatinase B), Nfkb1, Tgfb1, Tnfrsf1a, Adm, Cd44, Lta (Tnfb), Mal, Vegfa.

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

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

Reseptörler: Ccr1, Ccr5, Cd28, Cd4, Cd40 (Tnfrsf5), Cd44, Cxcr3, Ednra, Epha1, H2-Eb1, Icam1, Il2ra, Il6st (Gp130), Itgb2, Nr2f1, Tnfrsf1a, Tnfrsf1b.

Transkripsiyon Faktörleri: Egr1, Foxp3, Hdac1, Hif1a, Jun, Myc, Nfkb1, Nr2f1, Stat3.

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

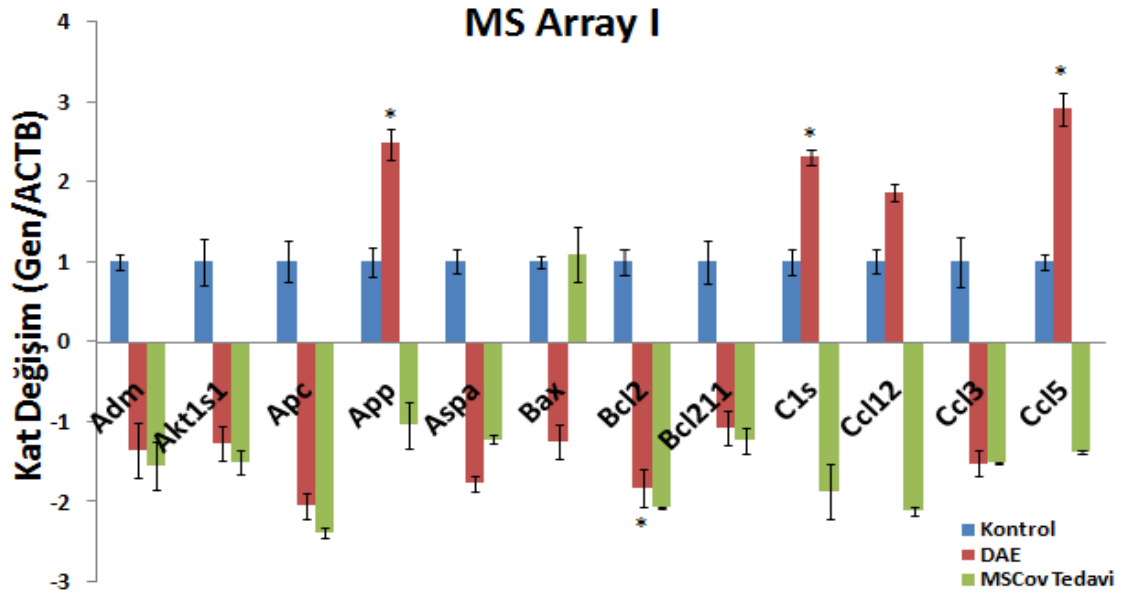
Tablo 14. MS PCR Dizi (array) Gen Tablosu

Gen Sembolü	Genin Açık İsmi	Genin Kodu
ADM	Adrenomedullin	NM_009627
AKT1S1	AKT1 substrat 1 (prolin zengin)	NM_026270
APC	Adenomatöz poliposis koli	NM_007462
APP	Amiloid beta (A4) öncü proteini	NM_007471
ASPA	Aspartoçilaz	NM_023113
BAX	Bcl2 ilişkili X proteini	NM_007527
BCL2	B-hücresi lösemi/lenfoma 2	NM_009741
BCL2L1	Bcl2 benzeri 1	NM_009743
C1S	Kompleman bileşenin 1, s alt bileşeni	NM_144938
CCL12	Kemokin (C-C motifi) ligandı 12	NM_011331
CCL3	Kemokin (C-C motifi) ligandı 3	NM_011337
CCL5	Kemokin (C-C motifi) ligandı 5	NM_013653
CCL7	Kemokin (C-C motifi) ligand 7	NM_013654
CCR1	Kemokin (C-C motifi) reseptörü 1	NM_009912
CCR5	Kemokin (C-C motifi) reseptörü 5	NM_009917
CD28	CD28 antijeni	NM_007642
CD4	CD4 antijeni	NM_013488
CD40	CD40 antijeni	NM_011611
CD44	CD44 antijeni	NM_009851
CD9	CD9 antijeni	NM_007657
CSF1	Koloni uyarıcı faktör 1 (makrofaj)	NM_007778
CXCL10	Kemokin (C-X-C motifi) ligandı 10	NM_021274
CXCL11	Kemokin (C-X-C motifi) ligandı 11	NM_019494
CXCL9	Kemokin (C-X-C motifi) ligandı 9	NM_008599
CXCR3	Kemokin (C-X-C motifi) reseptörü 3	NM_009910
EDC4	mRNA 4 Dekapaj güçlendirici	NM_181594
EDNRA	Endotelin reseptör tip A	NM_010332
EGR1	Erken büyüme yanıtı 1	NM_007913
EPHA1	Eph reseptör A1	NM_023580
ERBB3	V-erb-B2 eritroblastik lösemi, viral onkogen homologu 3 (kuş)	NM_010153
EZR	Ezrin	NM_009510
FASL	Fas ligand (TNF süper ailesi, 6)	NM_010177

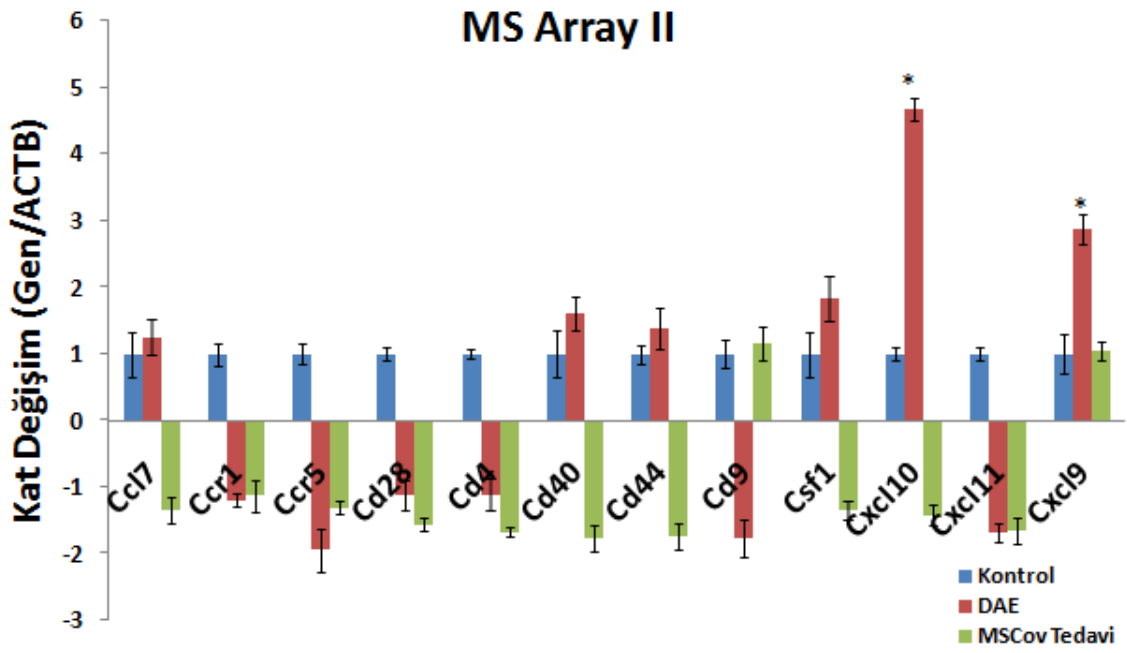
FN1	Fibronektin 1	NM_010233
FOXP3	Forkhead kutu P3	NM_054039
GFAP	Glial fibriller asidik protein	NM_010277
GNAI2	Guanin nükleotid bağlayıcı protein (G proteini), alfa 2 inhibe edici	NM_008138
GPX1	Glutasyon peroksidaz 1	NM_008160
GRB2	Büyüme faktörü reseptör protein 2 bağlanmış	NM_008163
H2-EB1	Doku 2, sınıf II antijen E beta	NM_010382
HDAC1	Histon deasetilaz 1	NM_008228
HEXB	Heksosaminidaz B	NM_010422
HIF1A	Hipoksi indüklenebilir faktör 1, alfa alt birimi	NM_010431
ICAM1	Adezyon molekülü 1	NM_010493
IFNG	Interferon gamma	NM_008337
IL10	İnterlökin 10	NM_010548
IL13	İnterleukin 13	NM_008355
IL18	İnterlökin 18	NM_008360
IL1B	İnterlökin 1 beta	NM_008361
IL2RA	interlökin 2 reseptörü, alfa zinciri	NM_008367
IL6	İnterlökin 6	NM_031168
IL6ST	İnterlökin 6 sinyal dönüştürücü	NM_010560
ITGB2	İntegrin beta 2	NM_008404
JAK1	Janus kinaz 1	NM_146145
JAK2	Janus kinaz 2	NM_008413
JUN	Jun onkogen	NM_010591
LTA	Lenfotoksin A	NM_010735
MAG	Miyelin bağlantılı glikoprotein	NM_010758
MAL	Miyelin ve lenfosit proteini, T-hücresi farklılaşması proteini	NM_010762
MAP2K1	Mitojenin aktive ettiği protein kinaz kinaz 1	NM_008927
MAPK1	Mitojenin aktive ettiği protein kinaz 1	NM_011949
MBP	Miyelin bazik protein	NM_010777
MMP9	Matrix metalopeptidaz 9	NM_013599
MYC	Myelocytomatosis onkogen	NM_010849
NFKB1	B-hücreleri 1, p 105 kappa hafif polipeptid gen arttırıcı Nükleer faktör	NM_008689
NR2F1	Nükleer reseptör alt ailesi 2, F grubu, üye 1	NM_010151

NTF3	Nörotropin 3	NM_008742
PHGDH	3-fosfogliserat dehidrojenaz	NM_016966
PLP1	Proteolipid protein (miyelin) 1	NM_011123
PMP22	Periferel miyelin proteini 22	NM_008885
PTPN11	Protein tirozin fosfataz, reseptör-dışı türü 11	NM_011202
RAF1	V-raf-lösemi, viral onkogen 1	NM_029780
RANGAP1	RAN GTPaz aktive edici protein 1	NM_011241
SOD1	Süperoksit dismutaz 1, çözülebilir	NM_011434
STAT3	Sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü 3	NM_011486
TGFB1	Transforme edici büyüme faktörü beta 1	NM_011577
TGFB2	Transforme edici büyüme faktörü, beta 2	NM_009367
TNF	Tümör nekroz faktörü	NM_013693
TNFRSF1A	Tümör nekroz faktör reseptörü süper ailesi, 1a	NM_011609
TNFRSF1B	Tümör nekroz faktör reseptörü süper ailesi, 1b	NM_011610
TOP1	Topoizomeraz (DNA) I	NM_009408
TUBB4	Tübülin, p 4	NM_009451
VCAM1	Vasküler hücre yapışma molekülü 1	NM_011693
VEGFA	Vasküler endotelial büyüme faktörü A	NM_009505
YWHAH	Tirozin 3-monooksijenaz/triptofan 5-monooksijenaz aktivasyon proteini, eta polipeptit	NM_011738
GUSB	Glukuronidaz, beta	NM_010368
HPRT	Hipoksantin guanin fosforibozil transferaz	NM_013556
HSP90AB1	Isı şok proteini 90 alfa (sitozolik), B sınıfı elemanı 1	NM_008302
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz	NM_002046
ACTB	Aktin, beta	NM_001101

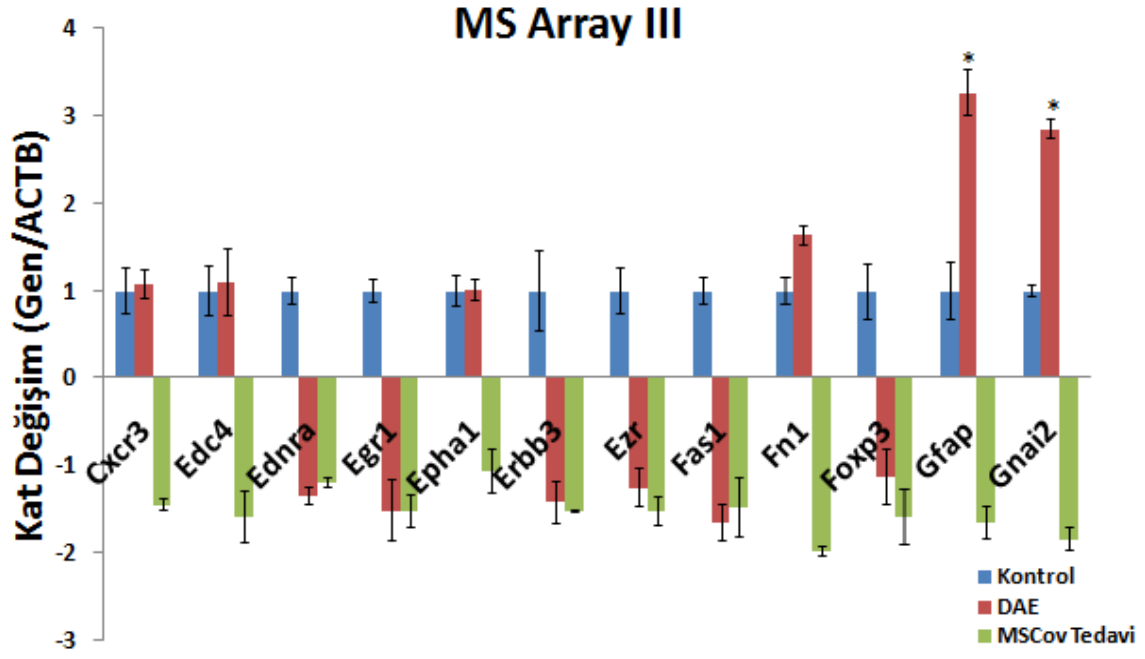
MS dizi analiz çalışmaları için her gruptan (Kontrol, DAE, PDAE, MSCov Tedavi) 8'er örnek triplike olarak çalışıldı. Çalışmalar sonucunda her grubun ortalamaları alındı ve analiz yapıldı. Verilerin analizleri qiagen firmasının ücretsiz olarak sağladığı RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis v3.4 ile web üzerinden çevirim içi gerçekleştirildi. Gen ekspresyon düzeyleri house keeping gen olan ACTB (β aktin) kullanılarak normalize edildi. (*) ile işaretlenen genler $P < .05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren genlerdir. MS dizi analiz sonuçları Şekil 112-118'de sunulmaktadır.



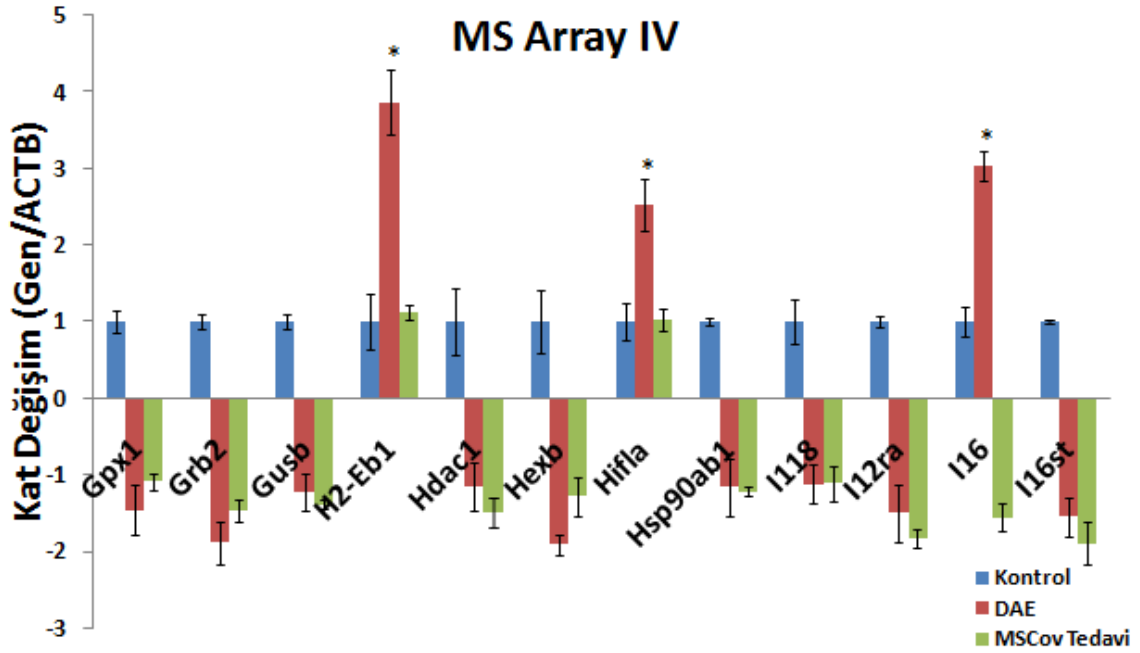
Şekil 27. MS dizin genleri ekspresyon düzeyleri I



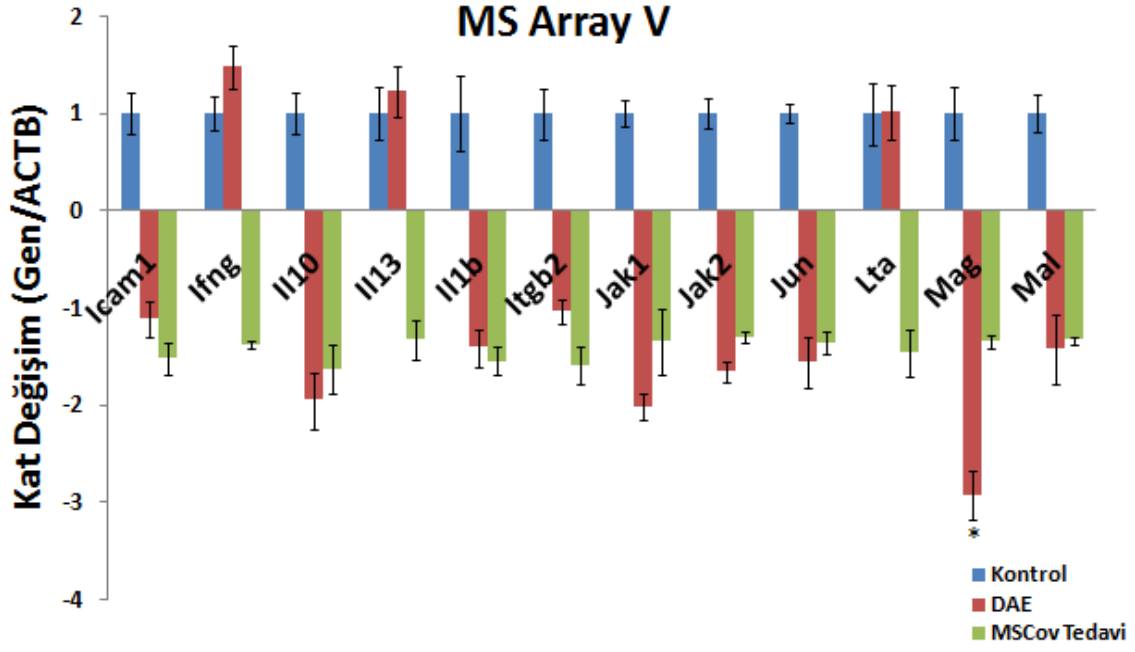
Şekil 28. MS dizin genleri ekspresyon düzeyleri II



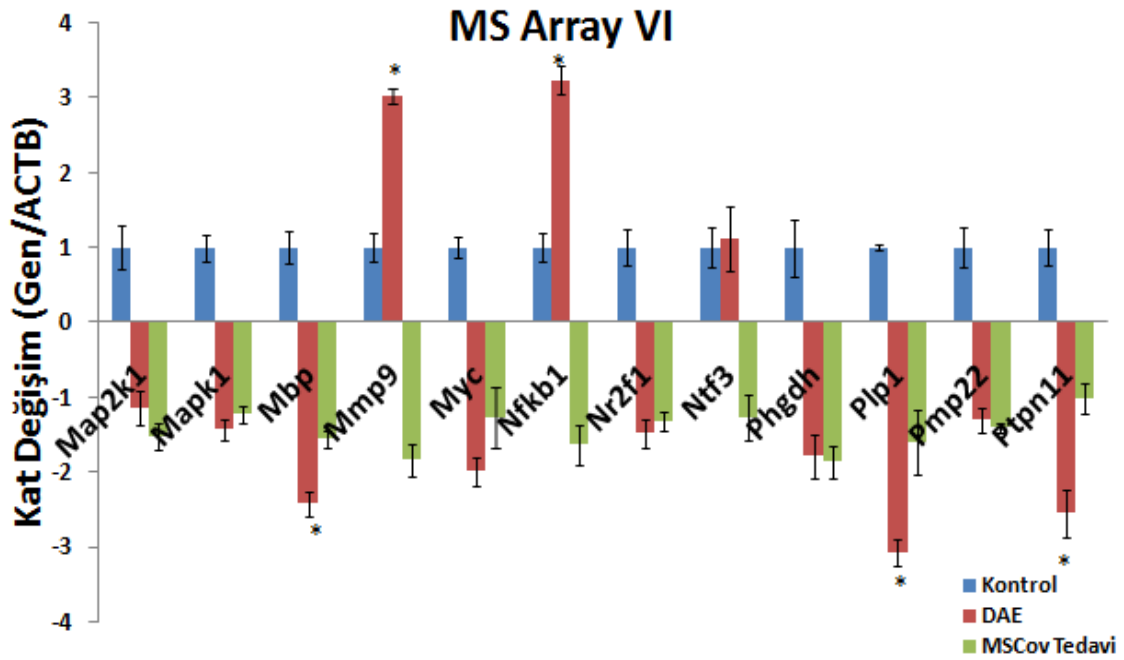
Şekil 29. MS dizin genleri ekspresyon düzeyleri III



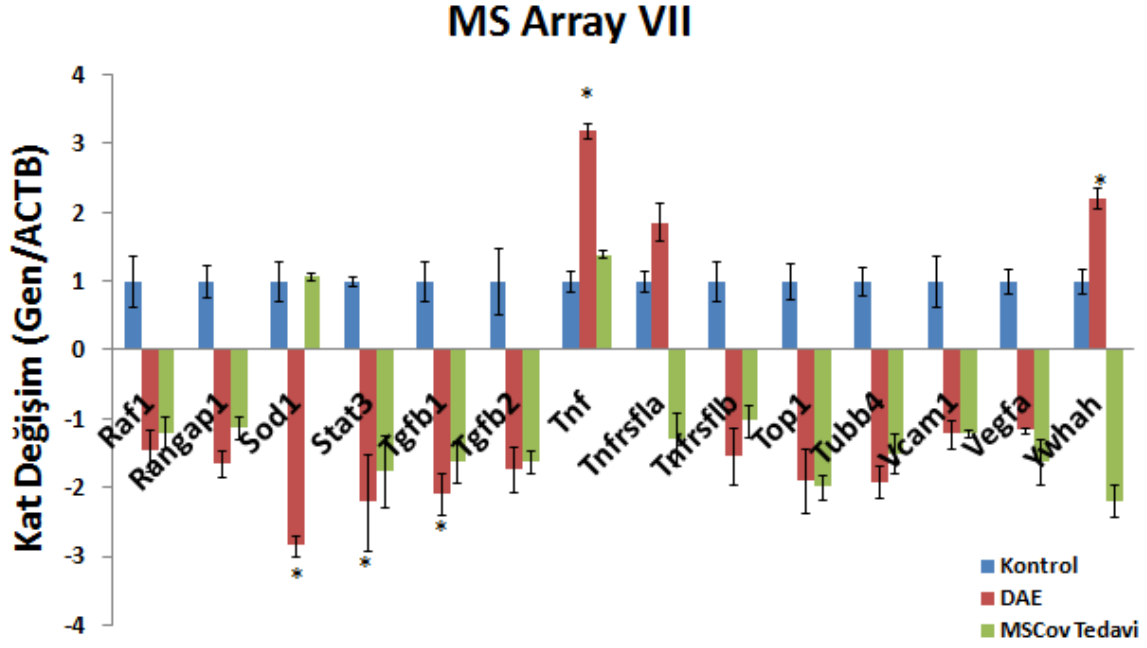
Şekil 30. MS dizin genleri ekspresyon düzeyleri IV



Şekil 31. MS dizin genleri ekspresyon düzeyleri V



Şekil 32. MS dizin genleri ekspresyon düzeyleri VI



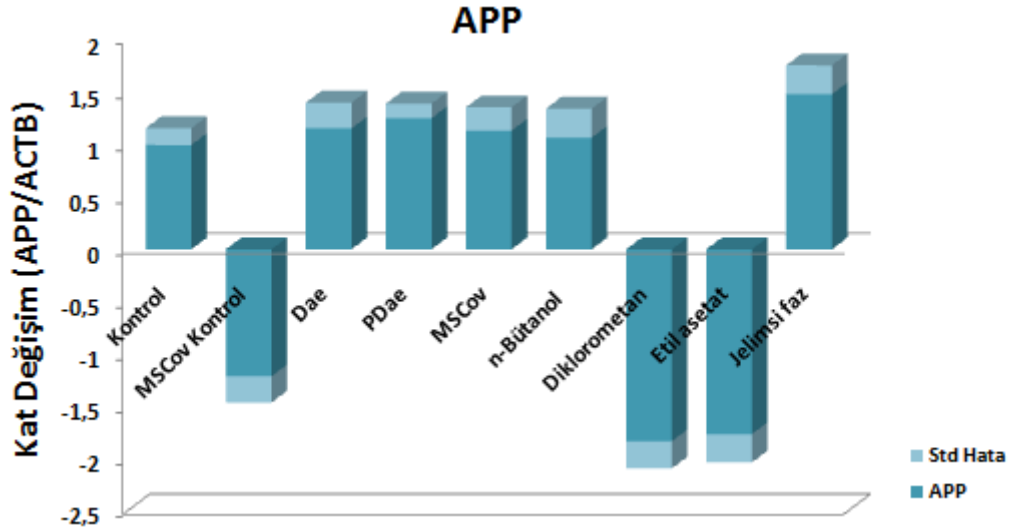
Şekil 33. MS dizin genleri ekspresyon düzeyleri VII

MS dizin çalışmaları ile ekspresyon düzeylerinde anlamlılık görülen ve ortalama olarak anlamlı anlamlı olmasa da tekrar çalışmalarda zaman zaman farklılık gösteren ve anlamlı olmaya yakın olan genler belirlendi ve takip eden çalışmalarda bu yönde devam ettirildi. Bu genler; APP, C1S, CCL5, CD4, CXCL9, CXCL10, GFAP, GNAI, H2-EB1, HIF1A, IL6, MBP, MAG, MMP9, NFKB, PLP, PTPN11, STAT, SOD, TGFB1, TNF, YVHAH'tır.

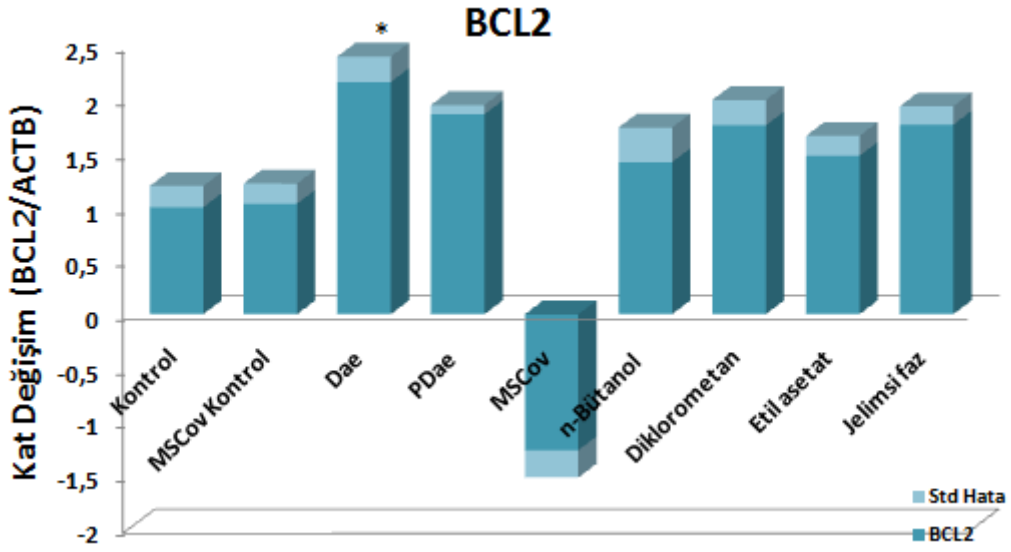
3.3.3 mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi: Gerçek Zamanlı PZR

Çalışılan her bir gen için öncelikle kendimizin dizayn ettiği "custom design" primerler saptandı ve Genescript firmasına sentezlettirildi. amplifikasyon analizi ile standart kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve erime eğrisi analizleri yapıldı. Daha sonra bu değerler kullanılarak her bir gen için mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol, MSCov kontrol, DAE oluşturulmuş örnekler, PDAE örnekleri ve MSCov ile tedavi uygulanan örnekler, n-Bütanol, Etil asetat, Diklorometan ve jelimsi faz örneklerinde saptandı.

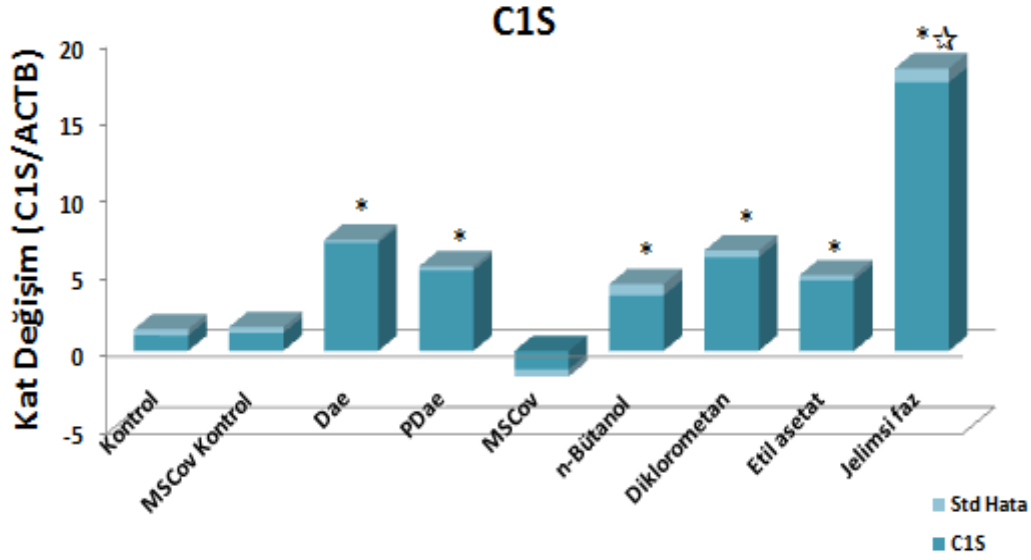
Sonuçlar 4 tekrarın triplike ölçümlerinin ortalamaları alınarak verildi. Yukarıda belirtilen MS dizin analizleri ile tanımlanan genler tek tek çalışıldı. Sonuçlar Şekil 119-141'de verilmektedir.



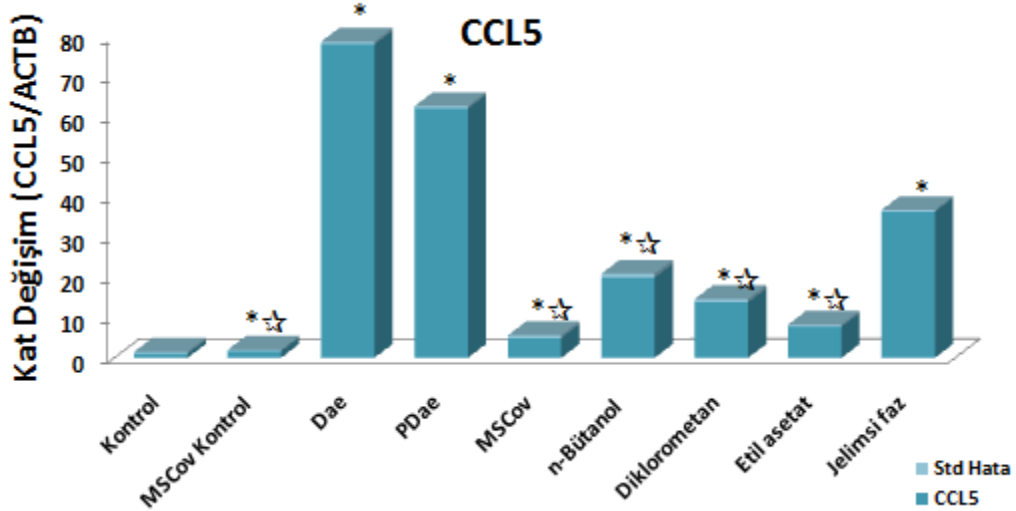
Şekil 34. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında APP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



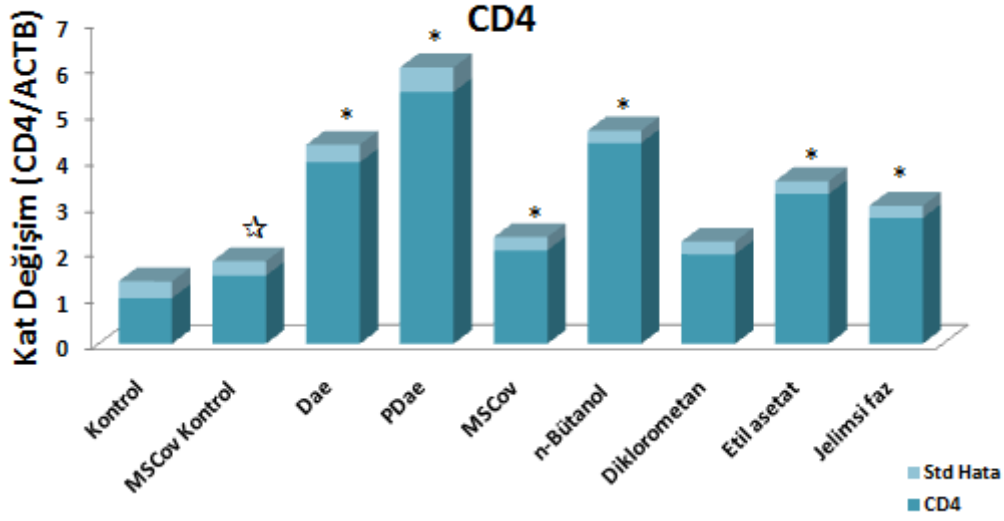
Şekil 35. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında BCL2 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (☆) $P < .05$ düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



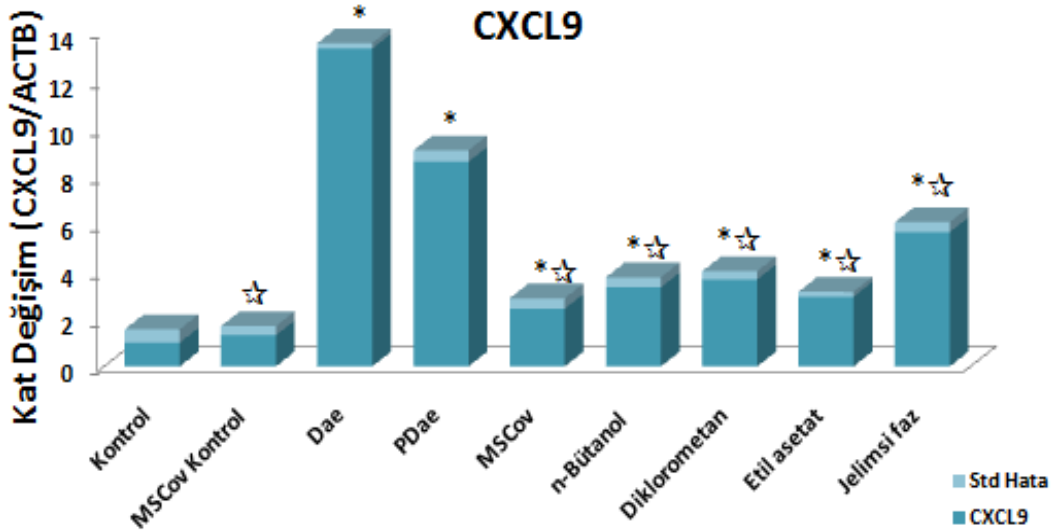
Şekil 36. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında C1S mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) $P < .05$ düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



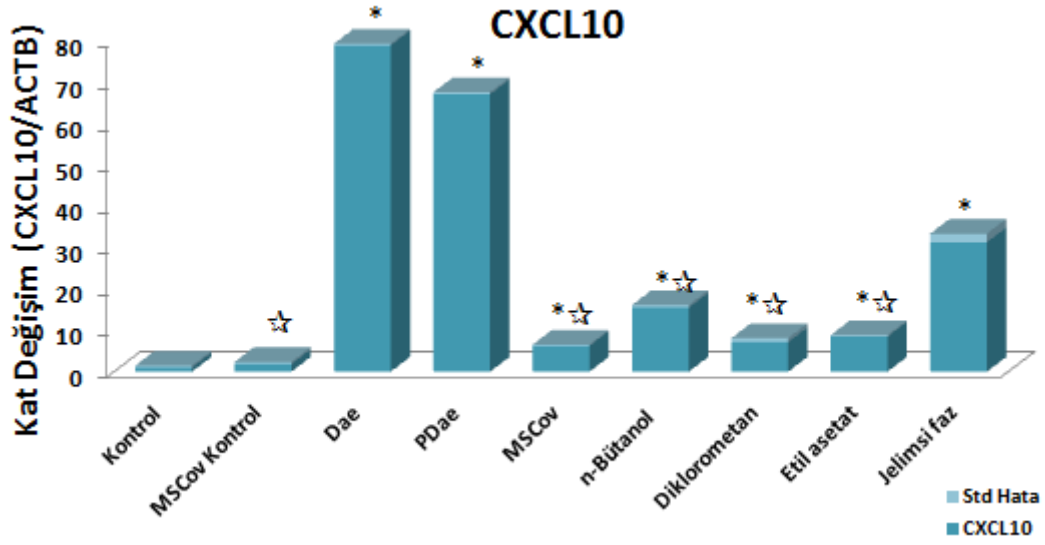
Şekil 37. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) $P < .05$ düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



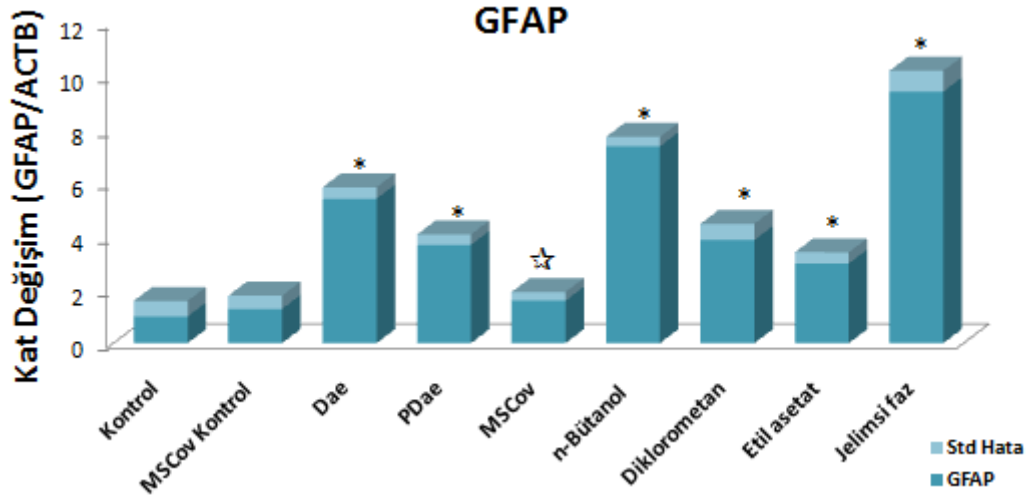
Şekil 38. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında CD4 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) P < .05 düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



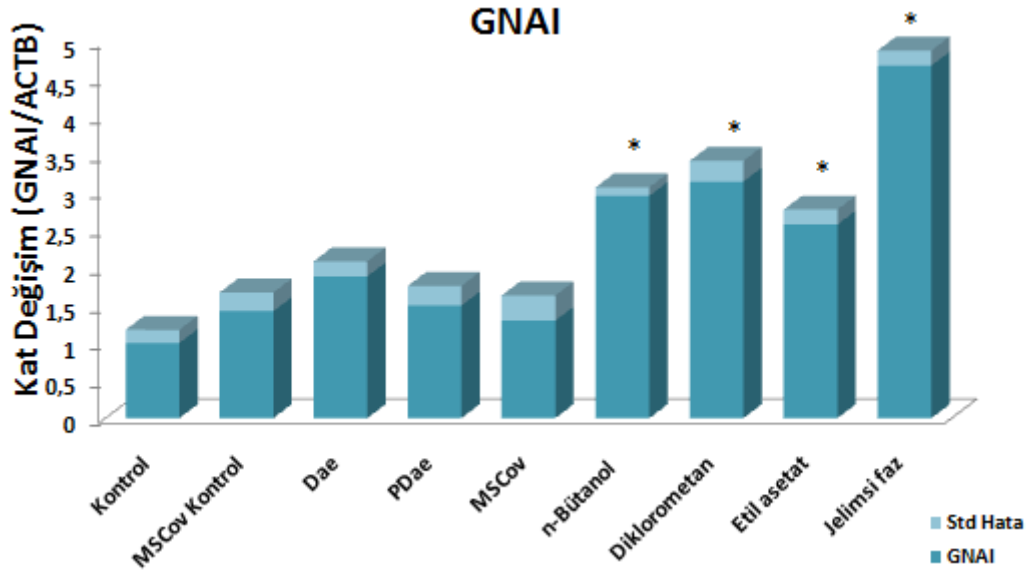
Şekil 39. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) P < .05 düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



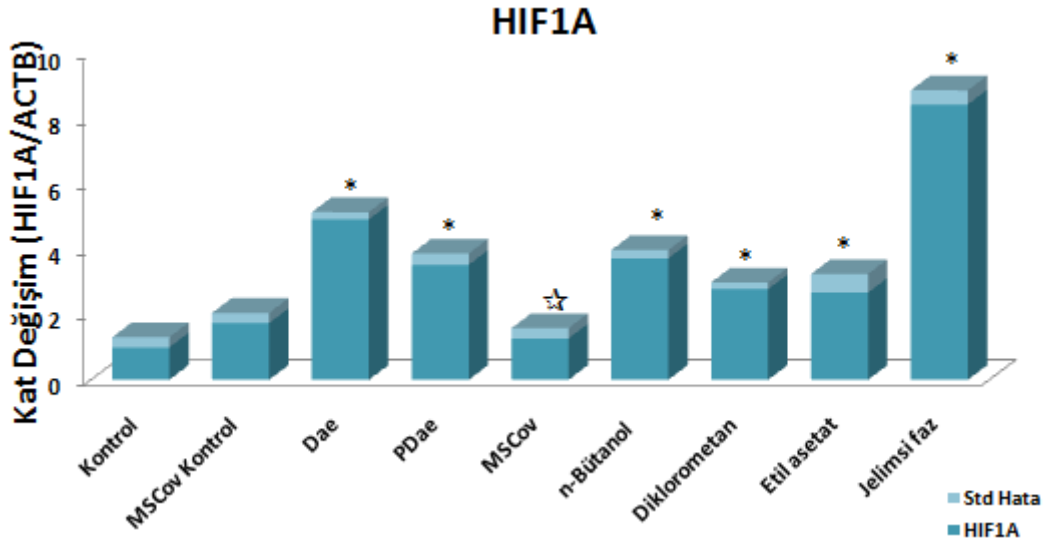
Şekil 40. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) $P < .05$ düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



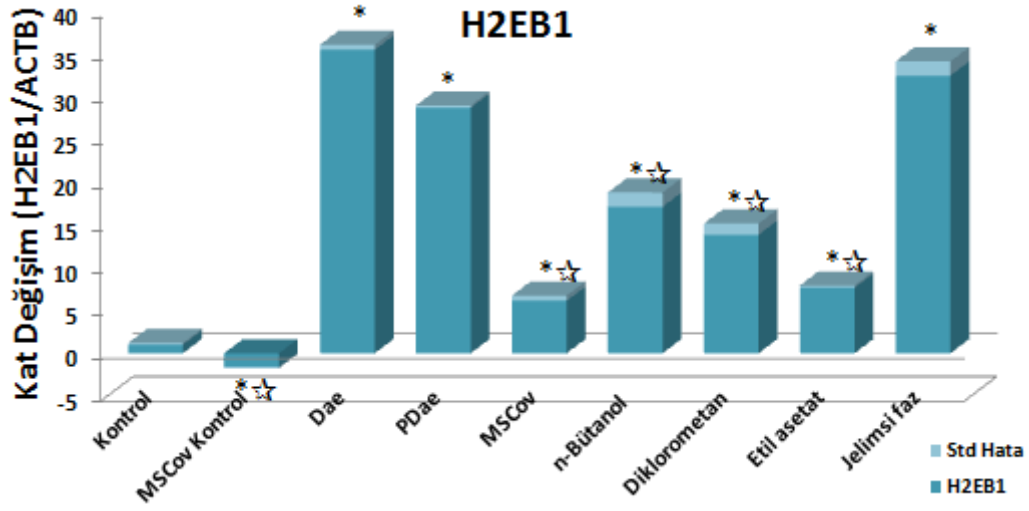
Şekil 41. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında GFAP mRNA seviyesine olan etkisi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) $P < .05$ düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



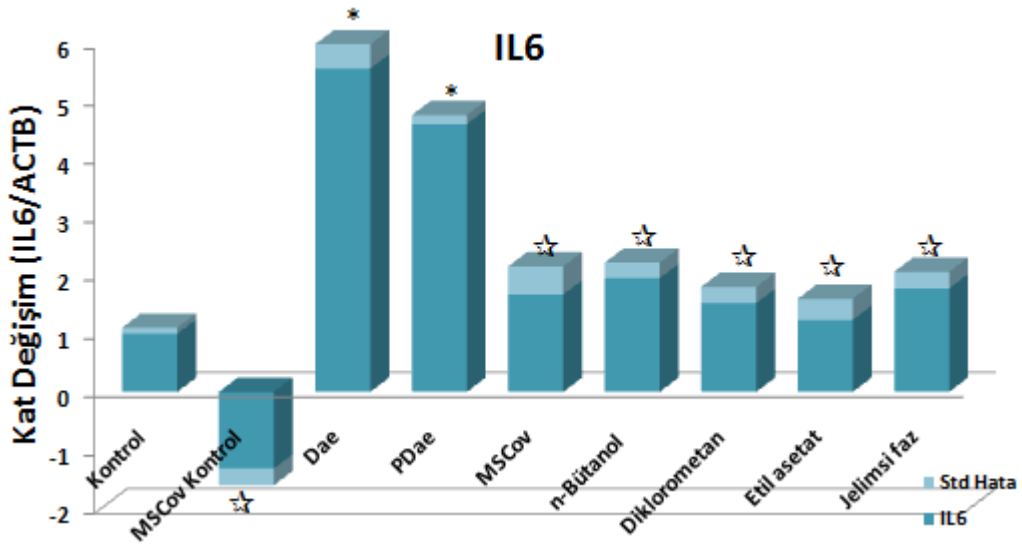
Şekil 42. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında GNAI mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



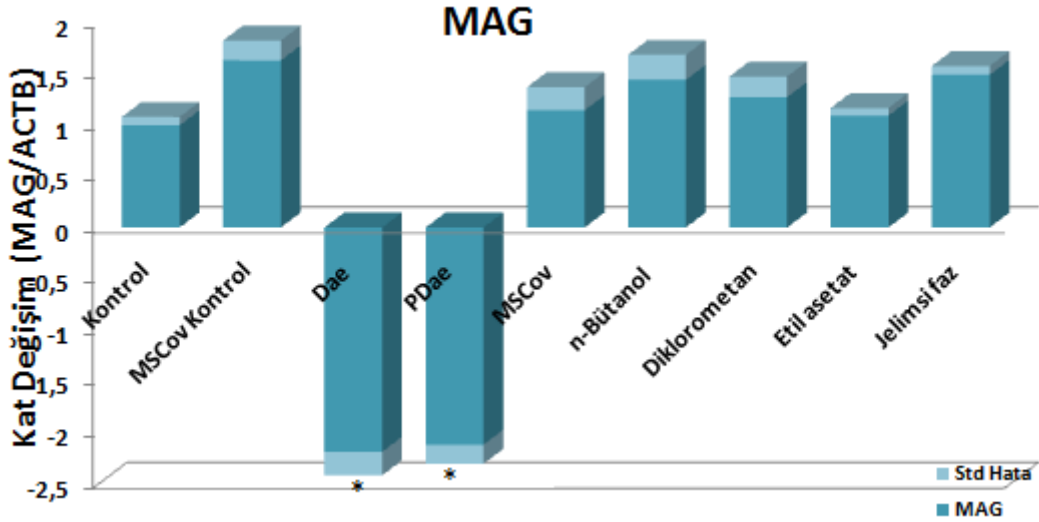
Şekil 43. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) $P < .05$ düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



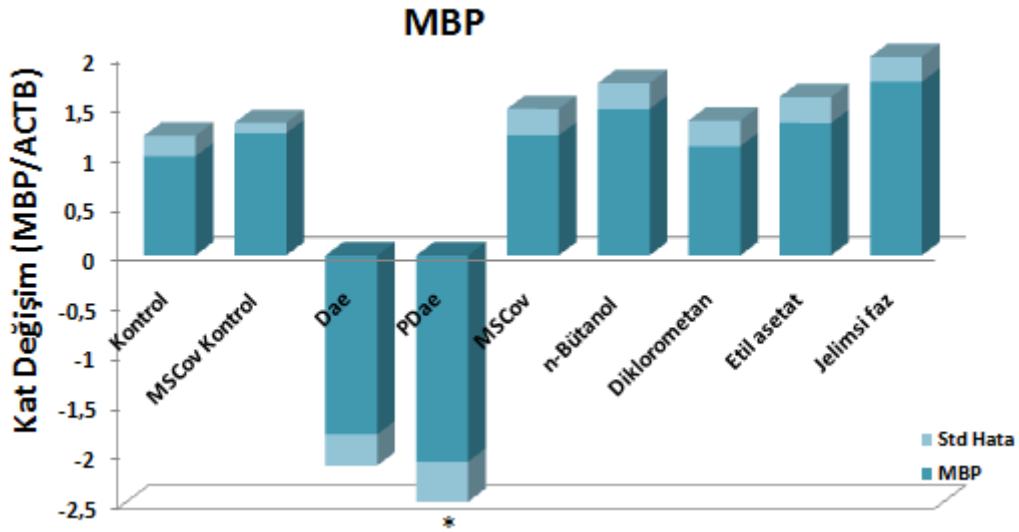
Şekil 44. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında H2EB1 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) P < .05 düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



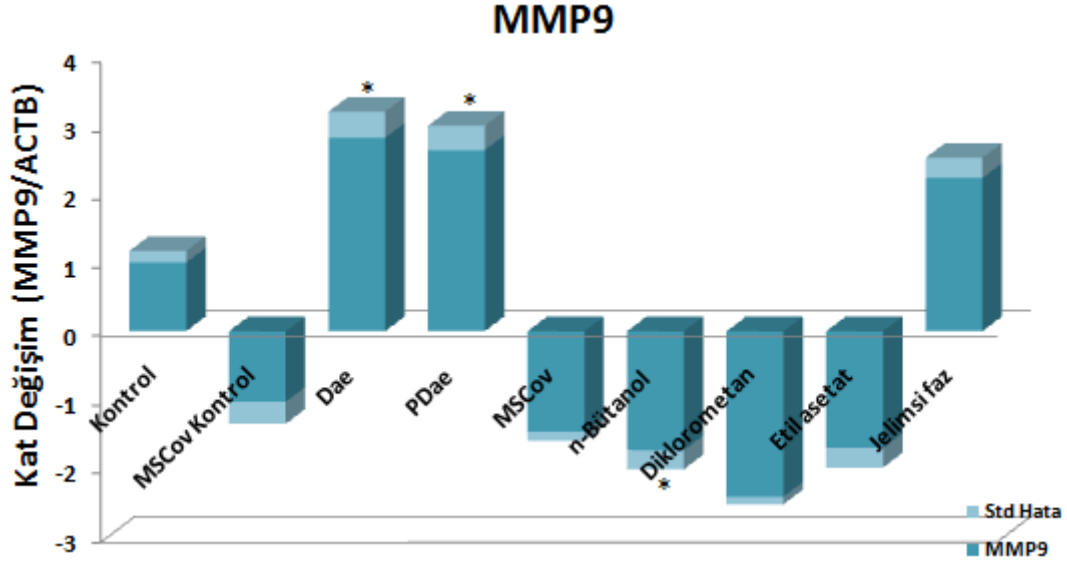
Şekil 45. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında IL6 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) P < .05 düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



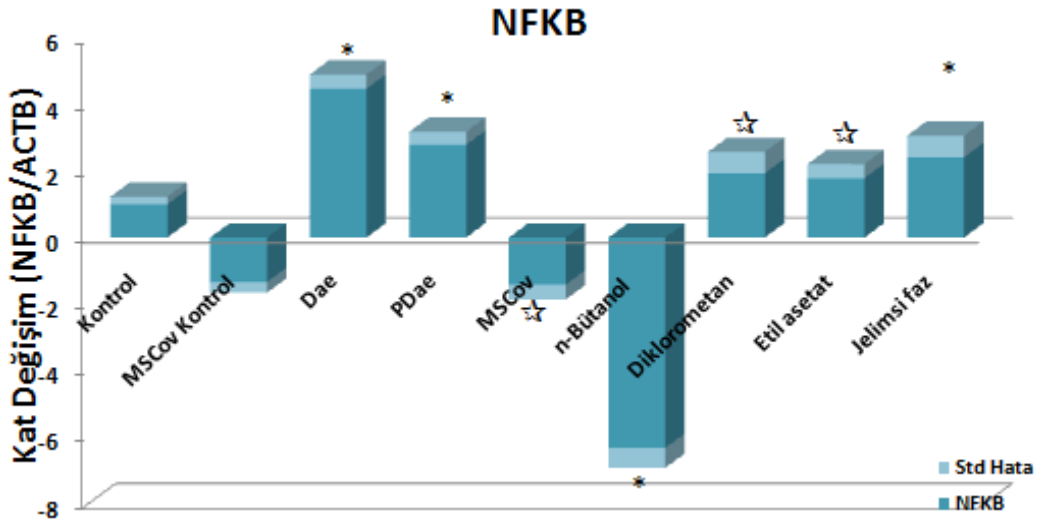
Şekil 46. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında MAG mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı



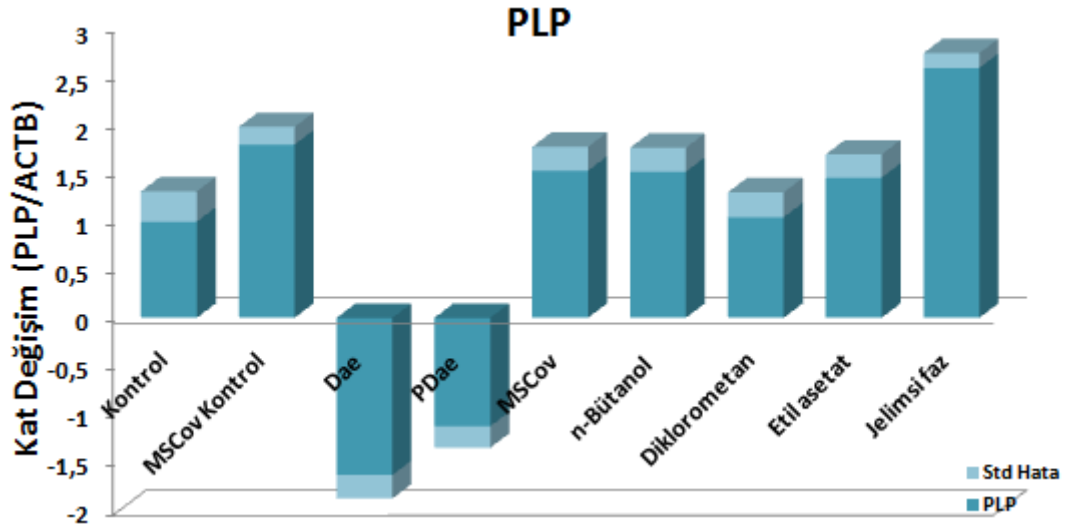
Şekil 47. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında MBP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



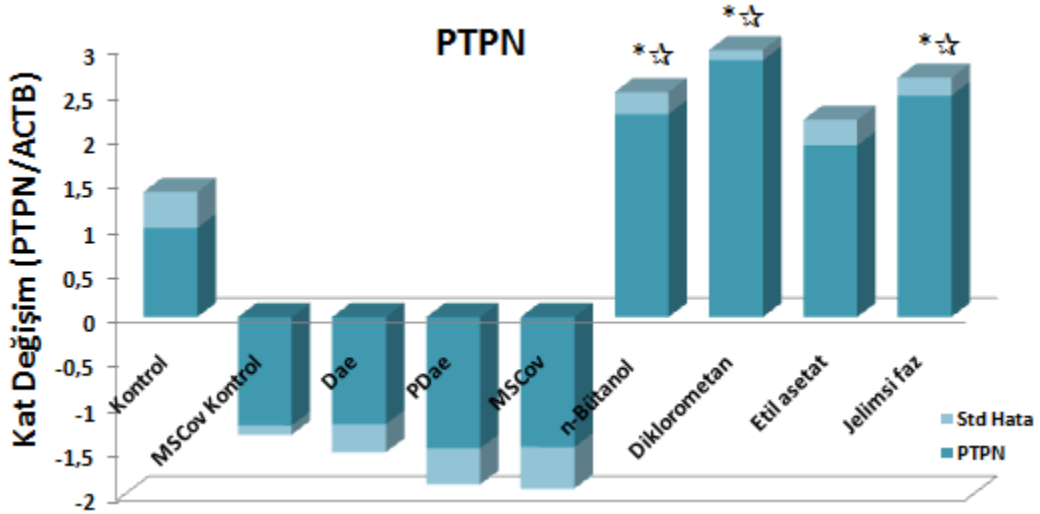
Şekil 48. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



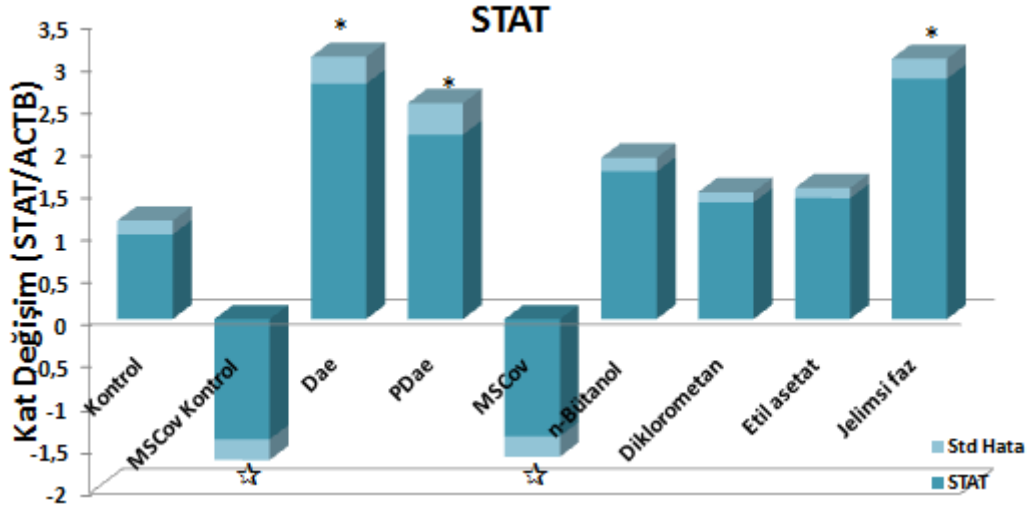
Şekil 49. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında NFKB mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) $P < .05$ düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



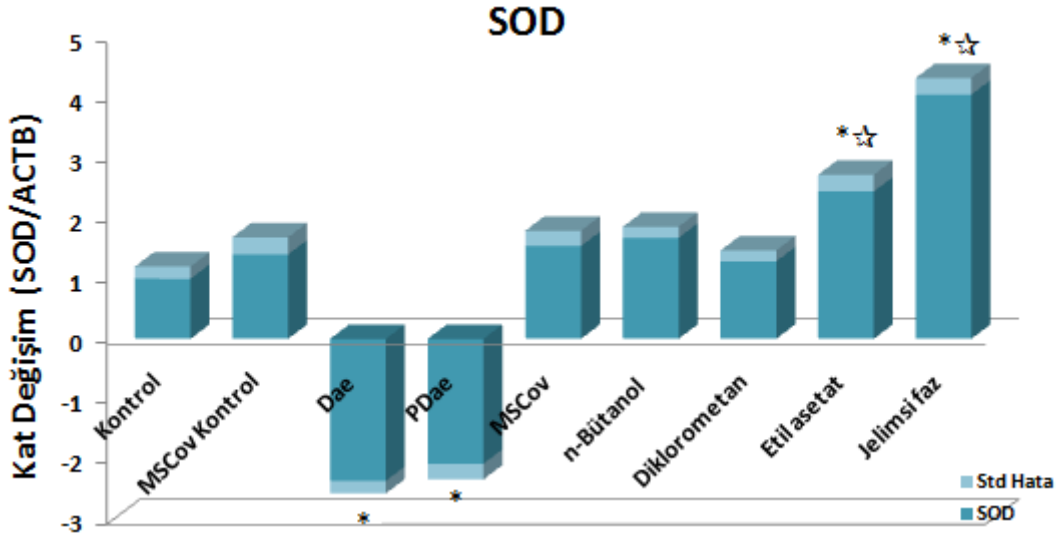
Şekil 50. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında PLP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



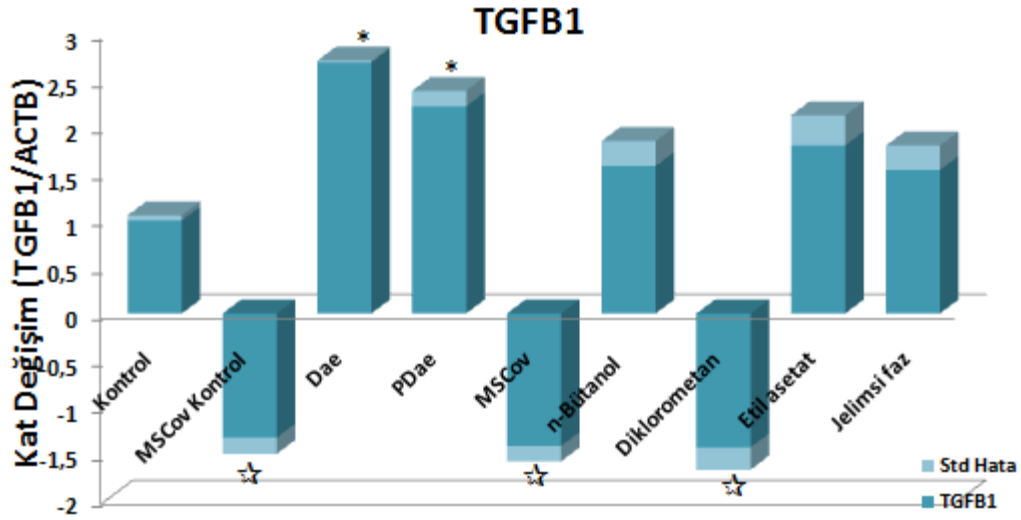
Şekil 51. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında PTPN mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) P < .05 düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



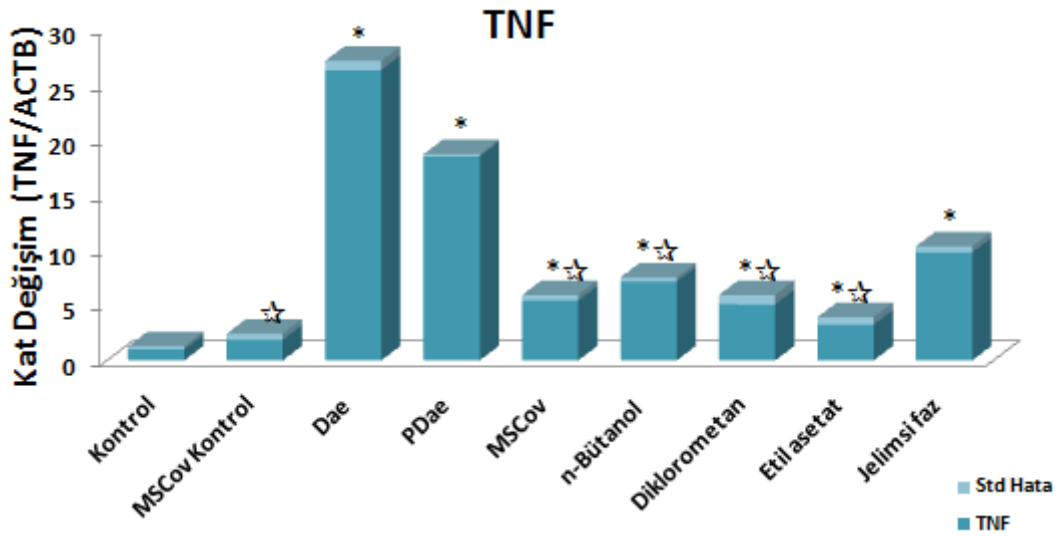
Şekil 52. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında STAT mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) $P < .05$ düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



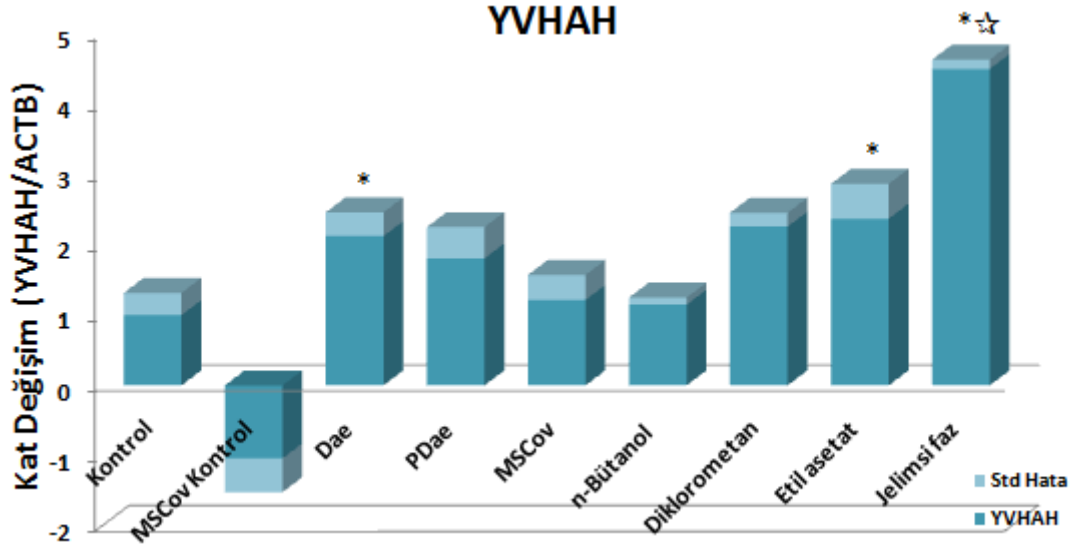
Şekil 53. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında SOD mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



Şekil 54. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında TGFB1 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) P < .05 düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



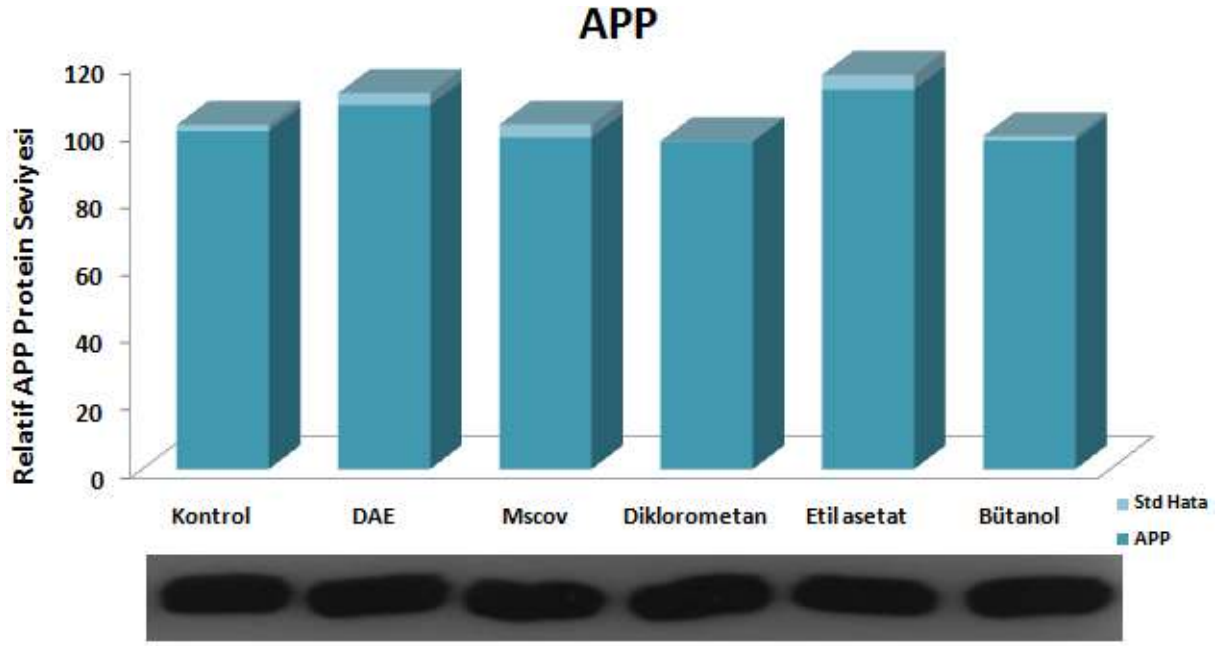
Şekil 55. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında TNF mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) P < .05 düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



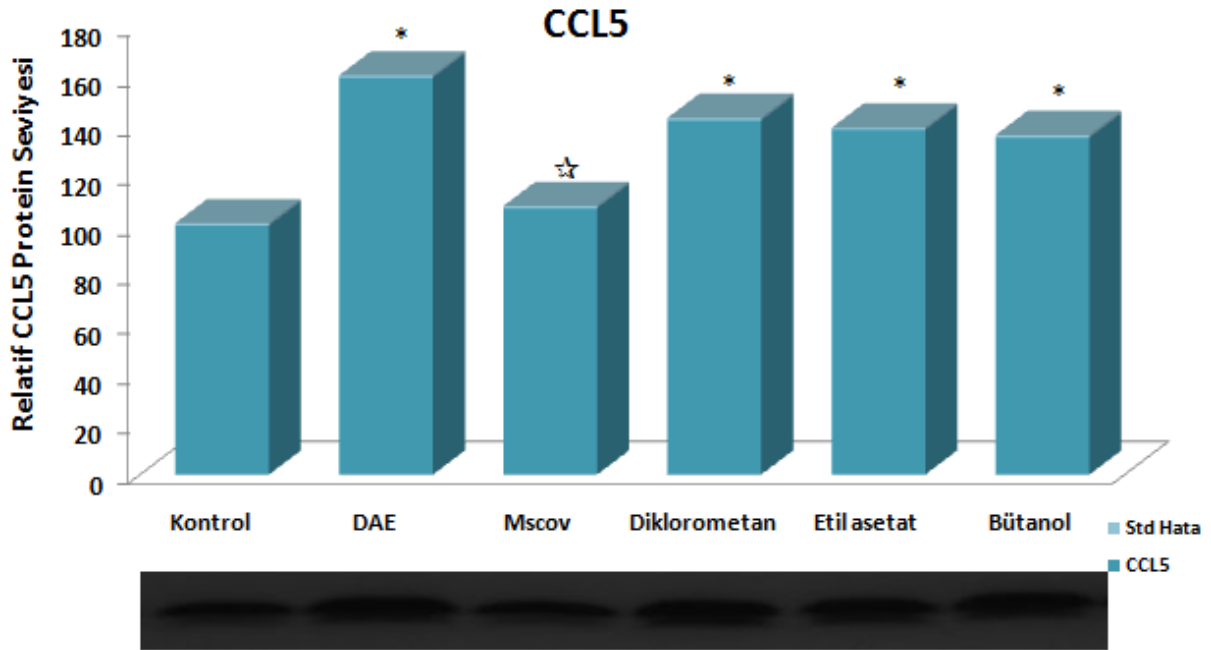
Şekil 56. MSCov ekstresinin ve n-bütanol, diklorometan, etil asetat, jelimsi faz fraksiyonlarının DAE oluşturulan fare beyin dokularında YVHAH mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) $P < .05$ düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

3.3.4 Protein Düzeyinde Ekspresyonların Tespit Edilmesi

Transkript düzeyinde anlamlı değişiklik gösteren genlerin bazıları aynı zamanda protein düzeyinde Western blot tekniği uygulanarak analiz edildi. Burada karşılaşılan en önemli sorun hayvanlardan elde edilen dokuların oldukça küçük olması ve dokuların yarısının histolojik ve immünohistokimyasal analizler için kullanılmasından kaynaklanan doku yetersizliği oldu. Bu nednele, RNA izolasyonunda kullanılan dokuların, izolasyon aşamasının ilk evresinde çöktürülerek elde edilen protein fraksiyonu solubilize (çözünürlleştirilerek) edilerek protein eldesi için kullanıldı. Maalesef bu noktada her ne kadar proje bütçesinde oldukça yüksek rakam gibi görünen proje bütçesi, projenin toplam kapsamı ile karşılaştırılınca zengin bir bütçe olmadığı için bu işlem için ayrı kit kullanılmadı. Bu nednele protein izolasyonlarında önemli ölçüde kayıplar yaşandı. Bu nedenle de burada çok örnek analizi yapılamadı. Önemli olan genler çalışıldı. Sonuçlar Şekil 142-151'de verilmektedir.

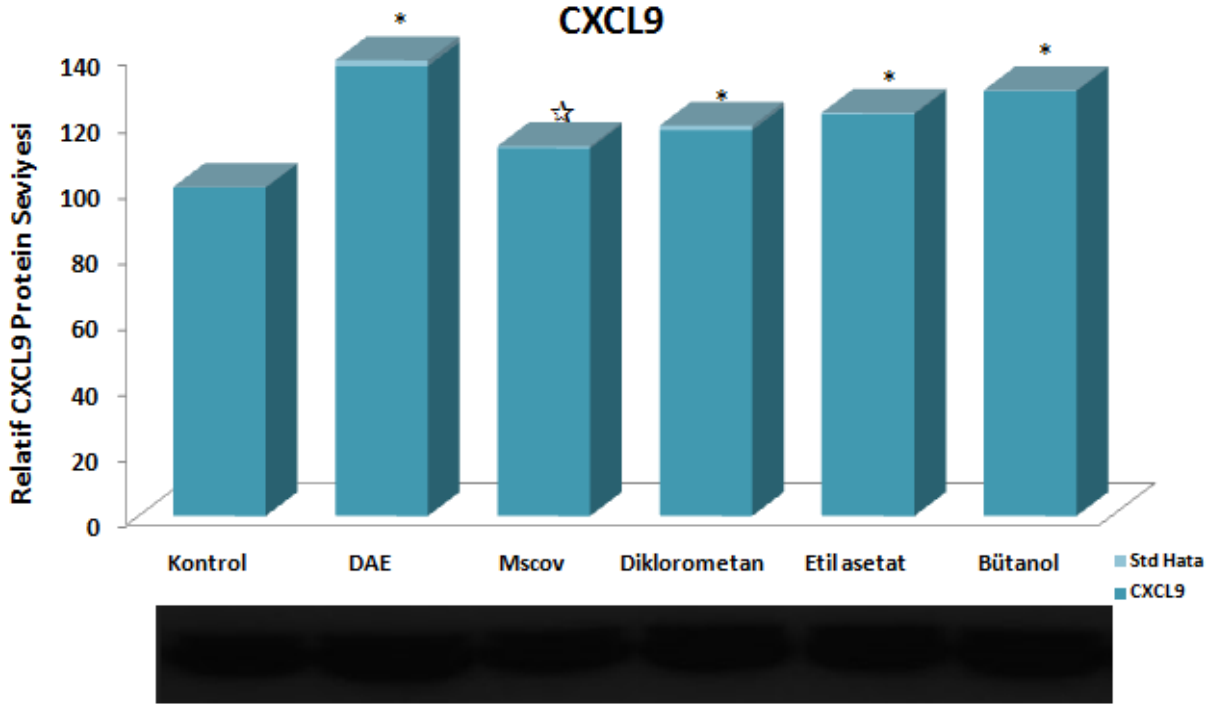


Şekil 57. APP protein ekspresyon düzeyi ve blot görüntüsü. Sonuçlar ACTB proteini ile normalize edilmiştir. Veriler üç kez tekrarlanan densitometrik analizden ortalama değerlerdir; Kontrol değeri 100 olarak alınmıştır

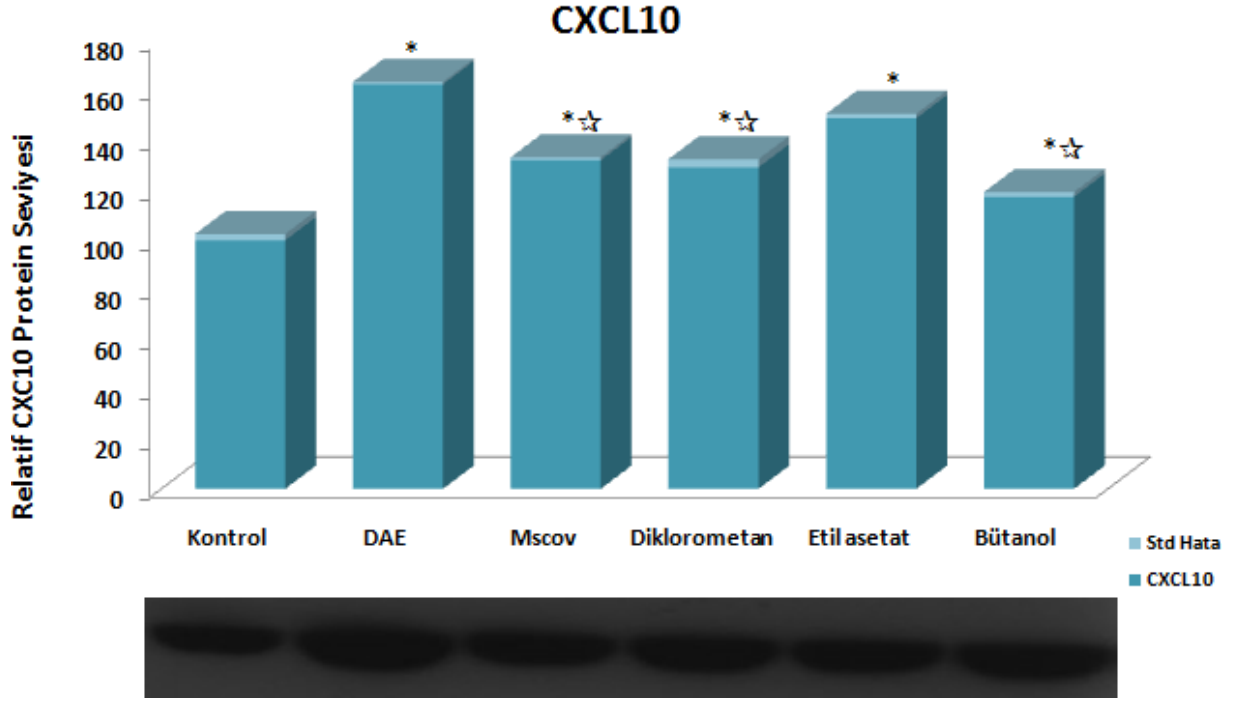


Şekil 58. CCL5 protein ekspresyon düzeyi ve blot görüntüsü. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiştir. Veriler üç kez tekrarlanan densitometrik analizden ortalama değerlerdir; Kontrol değeri 100% alınmıştır. (*) $P < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık

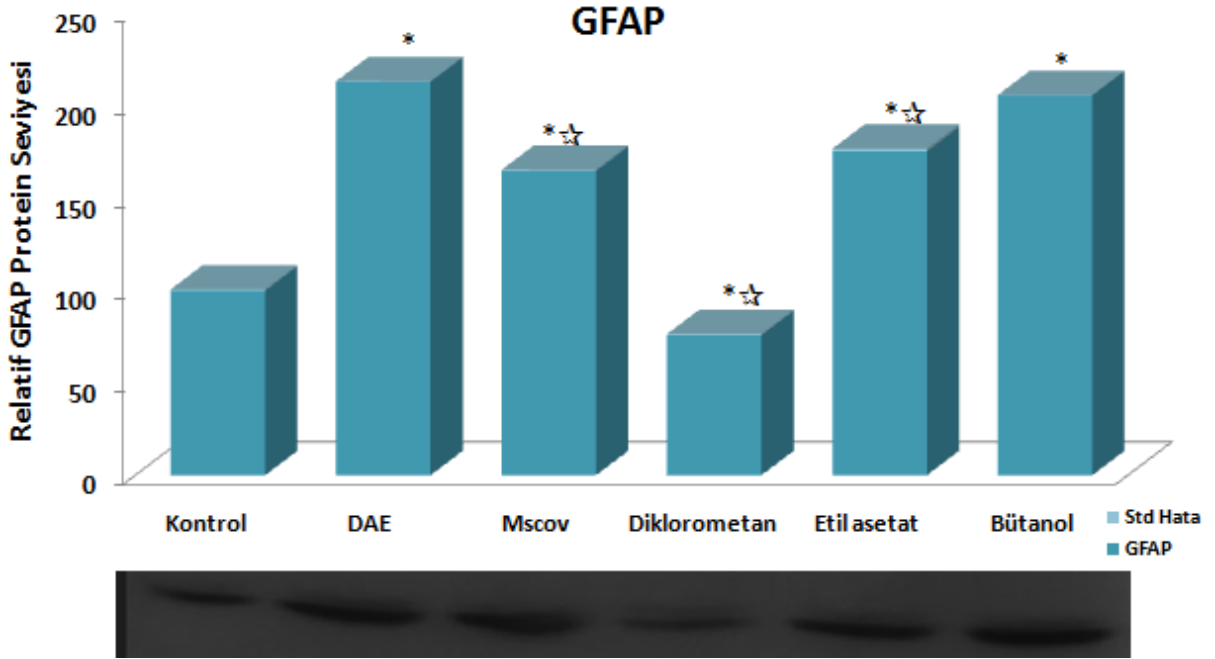
gösteren örneklerdir. (☆) P < .05 düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



Şekil 59. CXCL9 protein ekspresyon düzeyi ve blot görüntüsü. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiştir. Veriler üç kez tekrarlanan densitometrik analizin ortalama değerleridir; Kontrol değeri 100% alınmıştır. (*) P < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) P < .05 düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

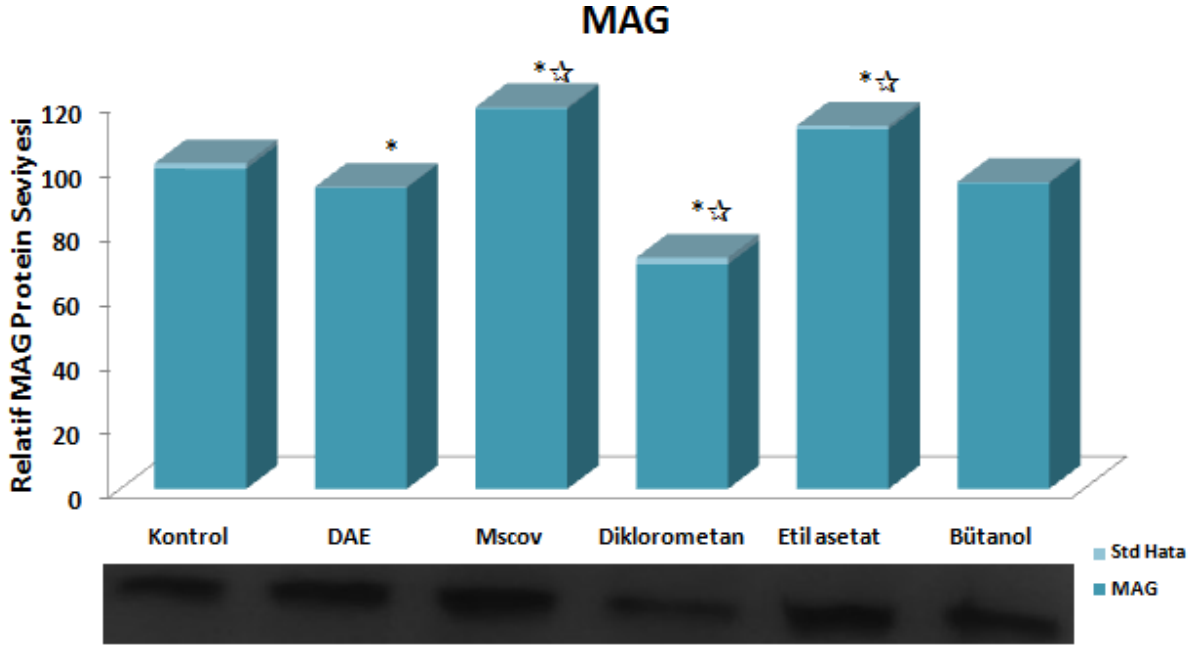


Şekil 60. CXCL10 protein ekspresyon düzeyi ve blot görüntüsü. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiştir. Veriler üç kez tekrarlanan densitometrik analizinin ortalama değerleridir; Kontrol değeri 100% alınmıştır. (*) $P < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) $P < .05$ düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

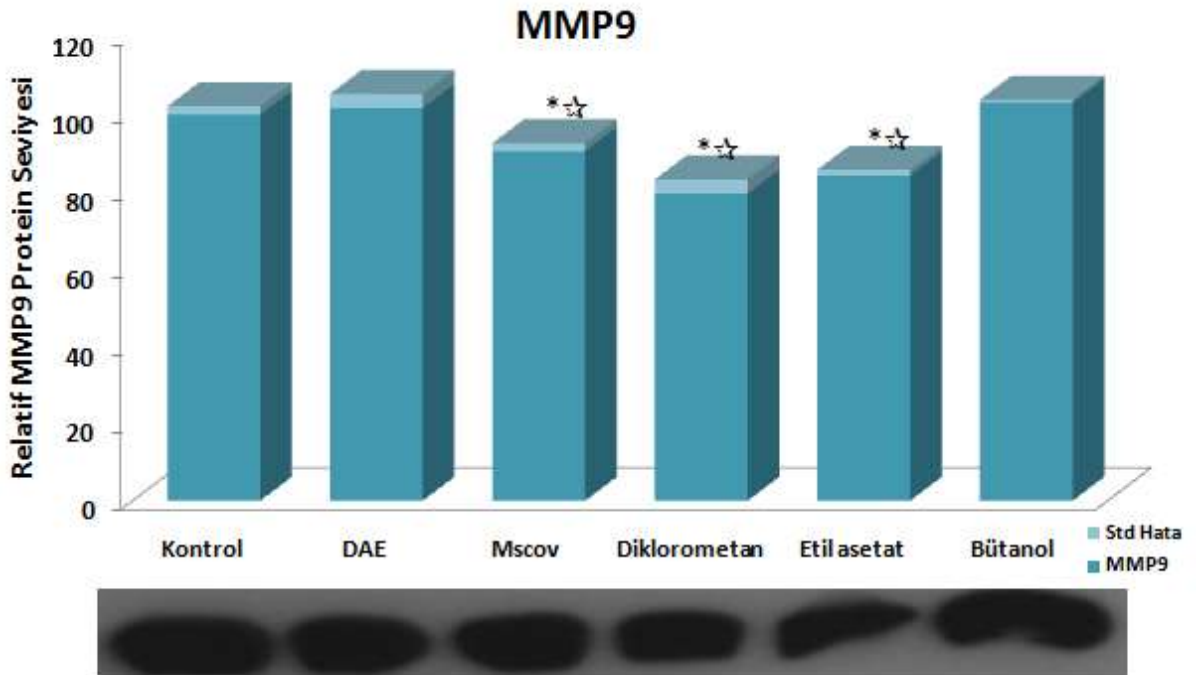


Şekil 61. GFAP protein ekspresyon düzeyi ve blot görüntüsü. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiştir. Veriler üç kez tekrarlanan densitometrik analizinin ortalama değerleridir; Kontrol

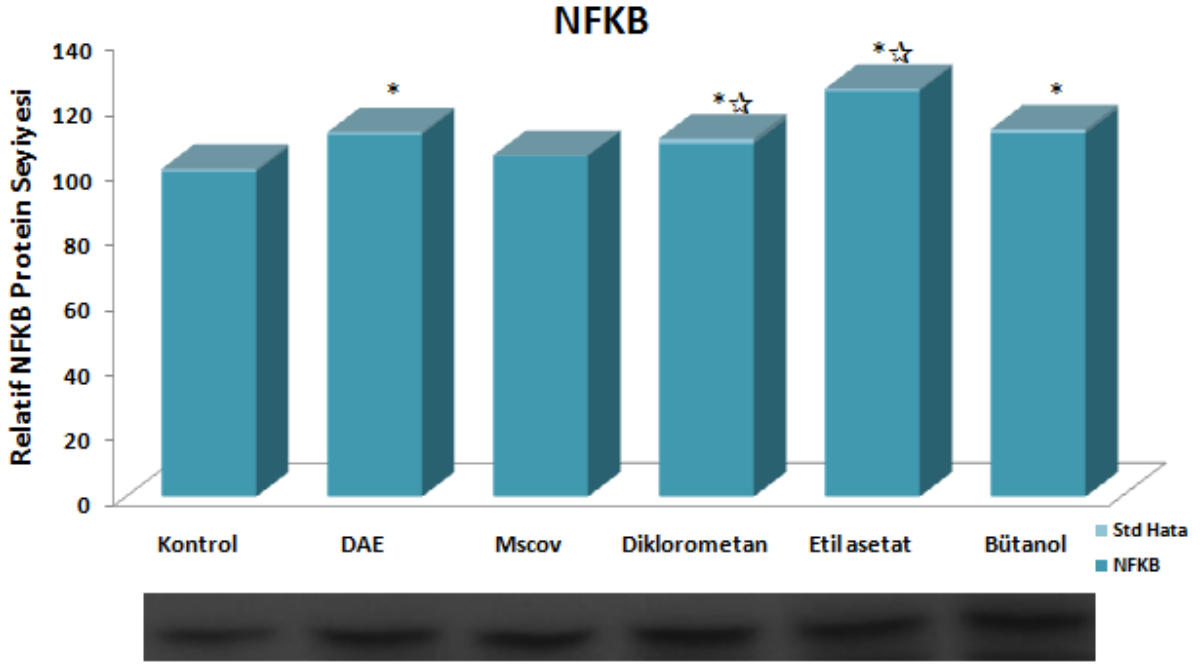
değeri 100% alınmıştır. (*) P < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) P < .05 düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



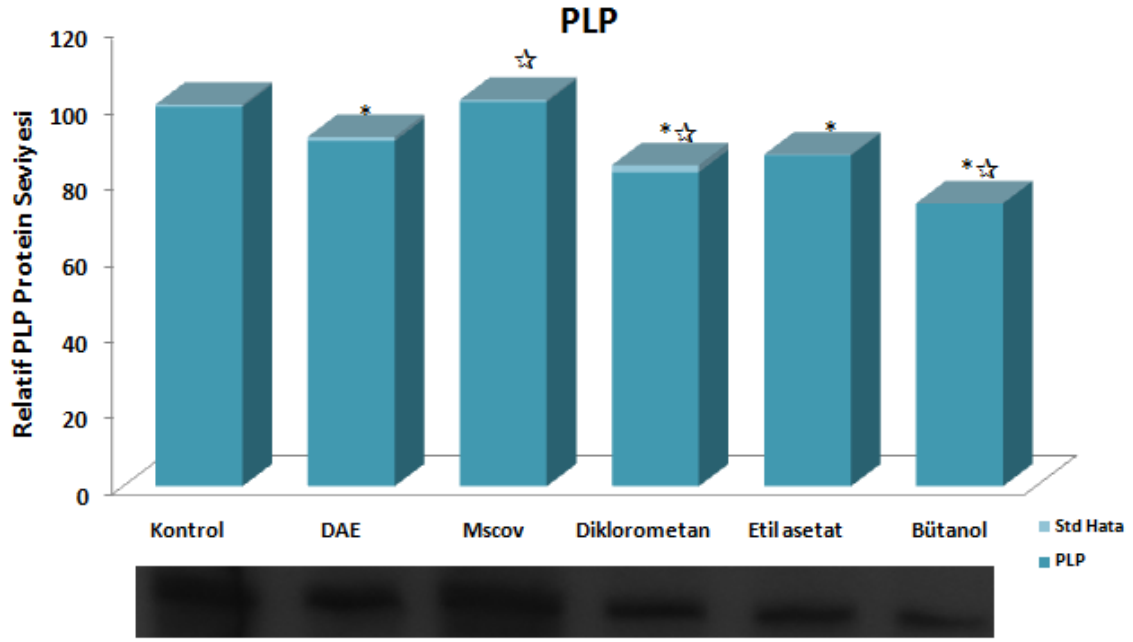
Şekil 62. MAG protein ekspresyon düzeyi ve blot görüntüsü. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiştir. Veriler üç kez tekrarlanan densitometrik analizden ortalama değerlerdir; Kontrol değeri 100% alınmıştır. (*) P < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) P < .05 düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



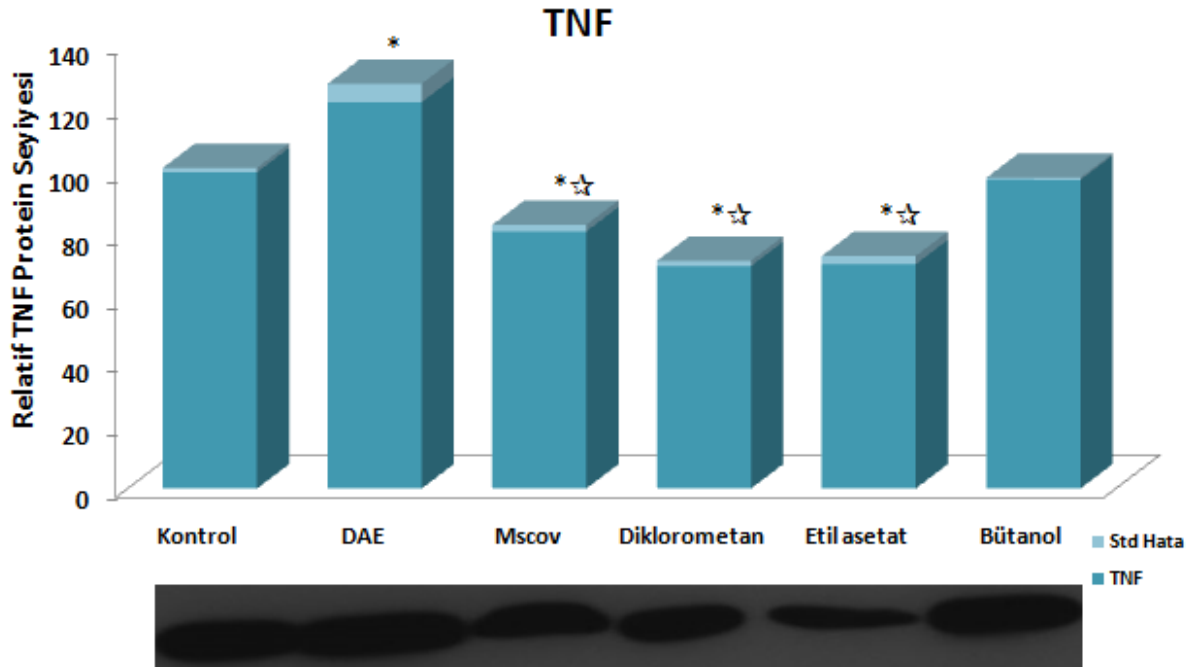
Şekil 63. MMP9 protein ekspresyon düzeyi ve blot görüntüsü. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiştir. Veriler üç kez tekrarlanan densitometrik analizinin ortalama değerleridir; Kontrol değeri 100% alınmıştır. (*) P < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) P < .05 düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



Şekil 64. NFKB protein ekspresyon düzeyi ve blot görüntüsü. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiştir. Veriler üç kez tekrarlanan densitometrik analizinin ortalama değerleridir; Kontrol değeri 100% alınmıştır. (*) P < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) P < .05 düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



Şekil 65. PLP protein ekspresyon düzeyi ve blot görüntüsü. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiştir. Veriler üç kez tekrarlanan densitometrik analizden ortalama değerlerdir; Kontrol değeri 100% alınmıştır. (*) $P < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) $P < .05$ düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



Şekil 66. TNF protein ekspresyon düzeyi ve blot görüntüsü. Sonuçlar ACTB ile normalize edilmiştir. Veriler üç kez tekrarlanan densitometrik analizden ortalama değerlerdir; Kontrol

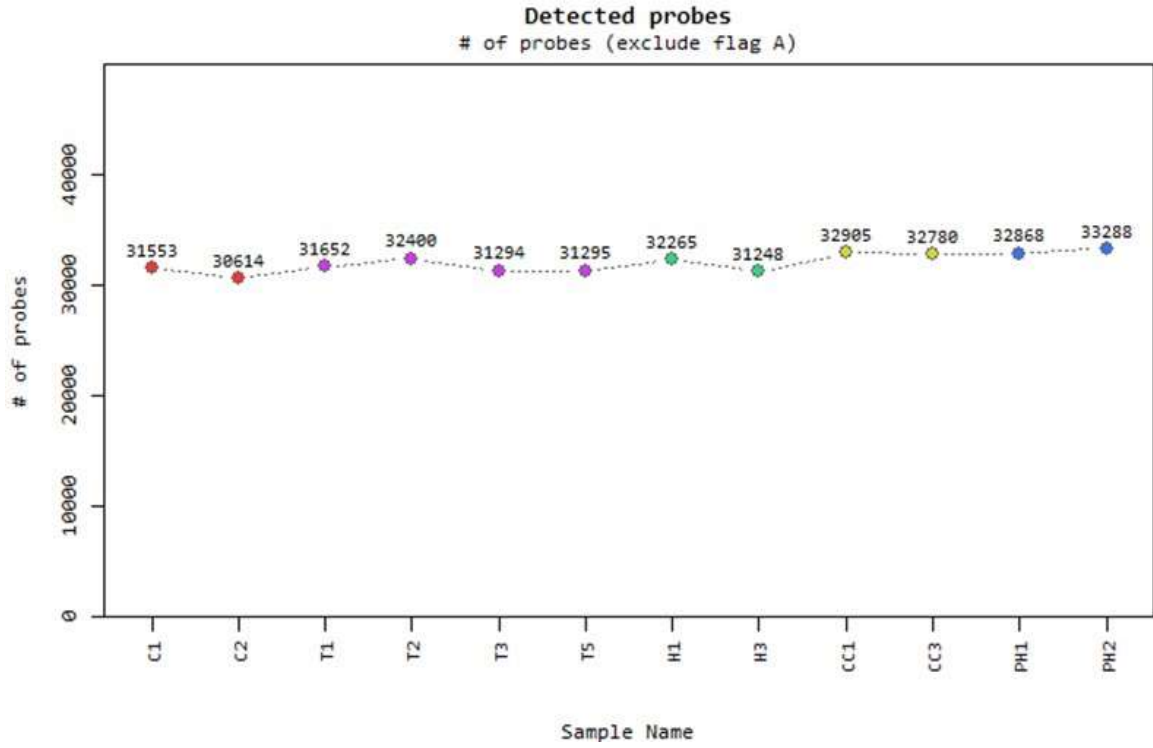
değeri 100% alınmıştır. (*) $P < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (☆) $P < .05$ düzeyinde DAE grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

3.3.5 Tüm Genom Trankriptom Analizleri

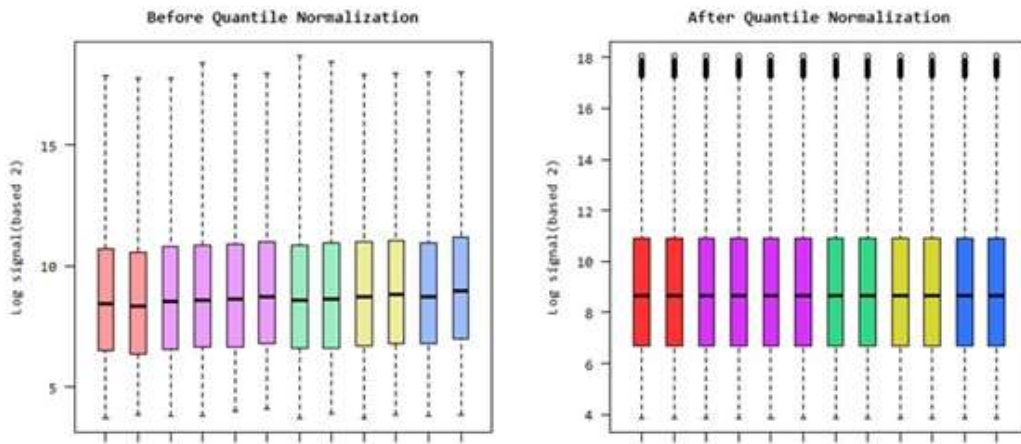
Deney protokollerin uygulamaları sonucu hayvanlarda tüm genomda transkriptom değişimlerini tayin etmek ve uygulamalar arası değişkenlikleri daha geniş bir yalpegede araştırmak için Done Genetik firmasından hizmet alınarak bu işlemler gerçekleştirildi.

Çalışma kapsamında; bütçe yetersiliğinden (proje önerisi yapıldığında 1.75 TL düzeyinde olan dolar kuru analizlerin yaptırıldığı dönem 2,90'lar seviyesinde idi. Buna rağmen artış talebimiz uygun görülmedi. Bu bir serzeniş değıdir, realiteyi belirtmek ve neden başta 24 örnek ile plananan deneyler sadece 12 örnek ile gerçekleştirildi onu anlatmak için değınilidi). Beş farklı gruptan [Kontrol (c1, c2); Hasta (DEA1, DEA2); MSCov Kontrol (MSCov1, MSCov2); Paralel Hasta (PDEA1, PDEA2, PDEA3) ve Tedavi (DEA-MScov1, DEA-MScov2, PDEA-MScov3)] toplam 12 adet RNA şirkete kurubuz ile gönderilerek analizleri yaptırıldı. Bu örneklerin cRNA dönüşümleri yapılarak Agilent platformunda 60 bin probe kullanılarak, "SurePrint G3 Mouse Gene Expression 8x60K" ile tüm genom ekspresyon profili çıkarılmıştır. Çalışmada aynı örnek grubuna dahil olan örnekler aynı kodla adlandırılıp, teknik replika olarak değerlendirilmiştir.

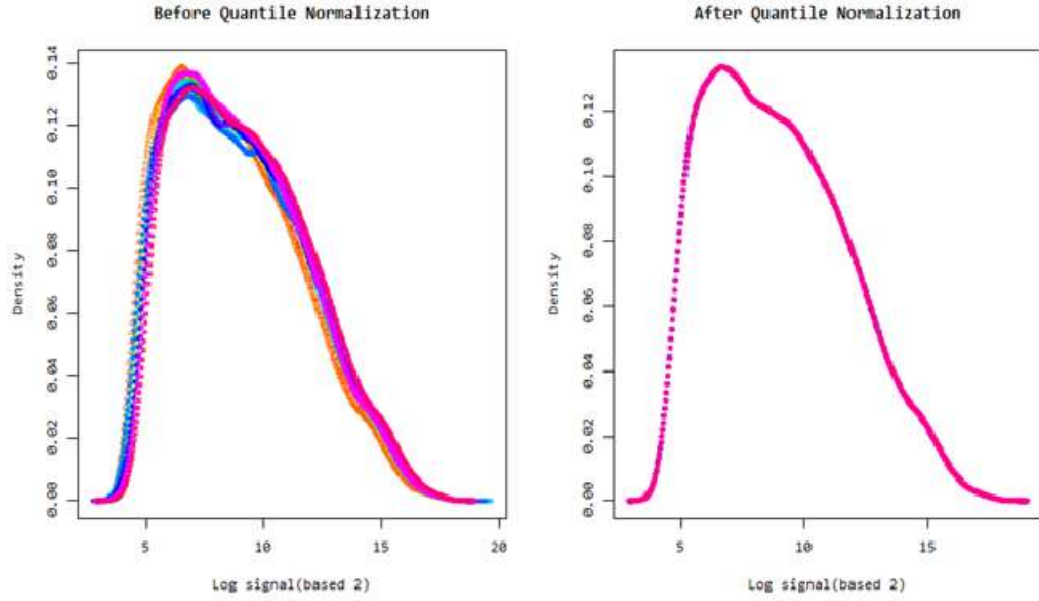
Ham mikrodizin verisi Agilent Feature Extraction v11.0.1.1 programı yardımı ile elektronik verilere dönüştürülmüştür. Mikroarray verilerinin kalite kontrol amaçlı oluşturulan sinyal yoğunluk grafikleri aşağıda gösterilmiştir. Yapılacak karşılaştırmalı analizler için her örneğin verisinden arkaplan gürültüsü uzaklaştırılmış ve tüm örneklerin verisi yüzdilik (quantile) normalizasyona tabi tutulmuştur. İstatistiksel analizler R 3.1.2 (www.r-project.org) programı ile yapılmıştır (Şekil 152-154)



Şekil 67. Her bir örnekte tespit edilen probe sayısı

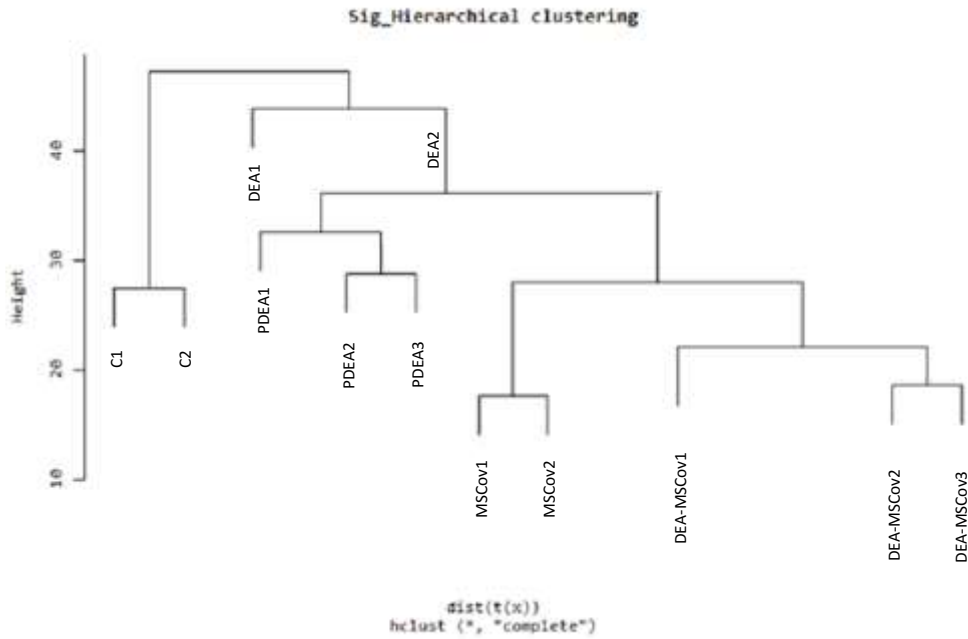


Şekil 68. Normalizasyonun “Box Plot” Gösterimi



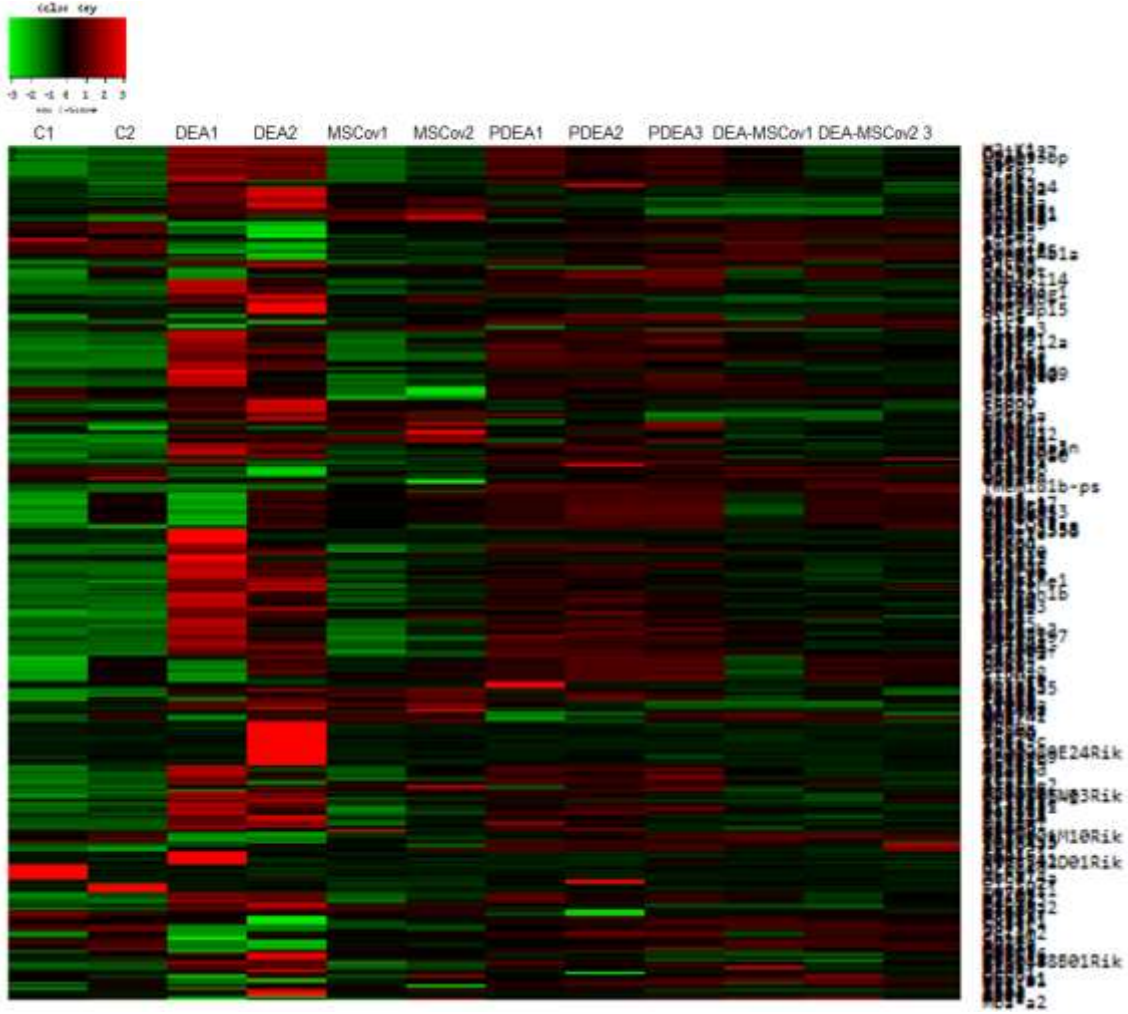
Şekil 69. Normalizasyonun “Density Plot” Gösterimi

Normalize edilen veriler (hangi grupta oldukları göz önüne alınmadan) örneklerin tüm genom gen ekspresyon profilleri arasında yapılan hiyerarşik kümeleme analizi sonucu aşağıdadır. Hiyerarşik kümeleme ‘Hierarchical’ yaklaşımı kullanılarak oluşturulmuştur. Uzaklık birimi olarak “Euclidean” seçilmiştir. Ayrıca teknik replika olarak çalışılan örneklerden elde edilen probe ışımalarının ortalama verileri hesaplanarak elde edilen grup verisinin hiyerarşik kümeleme sonucu ise aşağıda verilmektedir (Şekil 155).



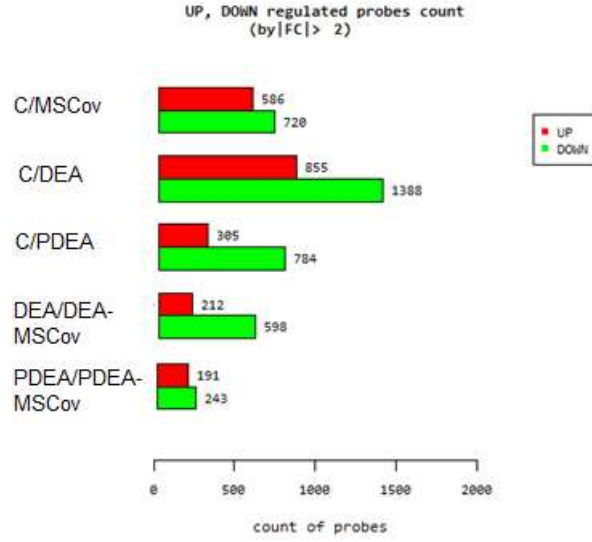
Şekil 70. Gruplar baz alınarak yapılan Kümeleme Analizi

Kümeleme analizinde görüldüğü gibi moleküler çalışmalarda da tespit edildiği gibi DEA hasta ile paralel hasta (PDEA) hayvanlar arasında farklılıklar mevcuttur. Hastalar tüm gruplardan oldukça farklı gen ifadesi göstermektedirler. Tedavi edilen (DEA-MSCOV) hayvanlar arasında da farklılık vardır, PDAE hayvanlar arasında olduğu gibi. Bu grup içi farklılıklar normaldir çünkü genetik farklılıklar ve diğer faktörler bu değişikliklere etki edebilir. Biz ortalama değerleri dikkate aldığımız için farklılıklar bu kadar dikkat çekmemektedir (Şekil 156).



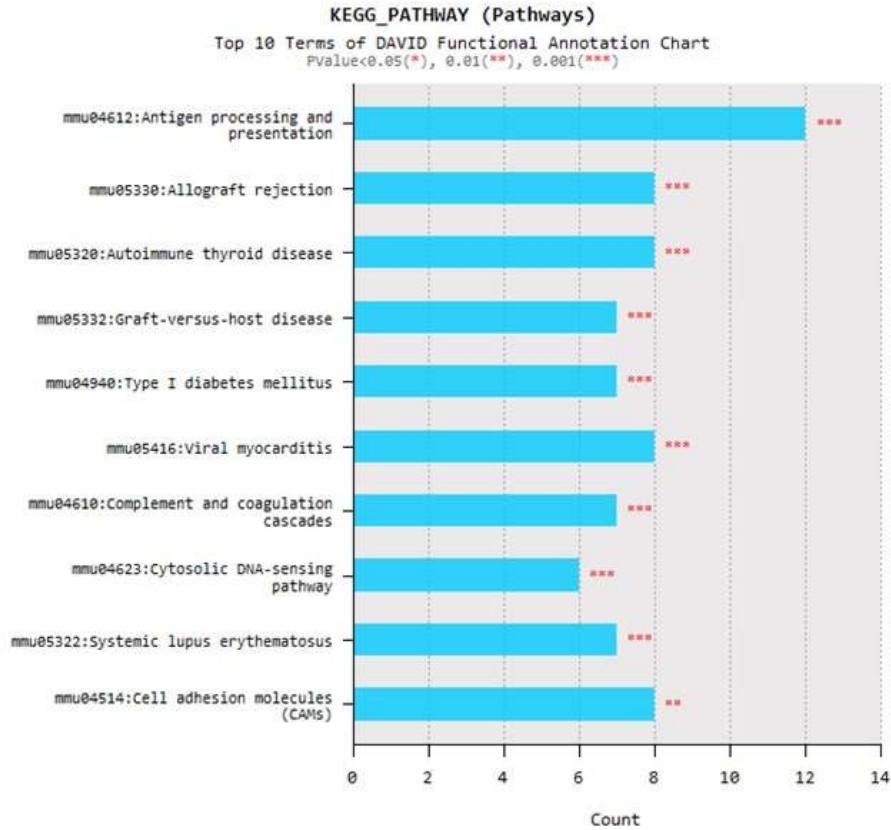
Şekil 71.. Kümeleme Analizi (Probelu Gösterim)

Çalışmalara 55.681 adet probe'la başlandı ve probe'lar ekspresyon seviyelerine, arka planına, sinyal yoğunluğuna göre filtrelendi. Log based transformasyon ve quantile normalizasyon uygulandıktan sonra LPE testinin ardından FC (Fold Change) Analizi yapılarak 2 den büyük kat değişimleri her bir probe için artış ve azalış olarak belirtildi. Gruplar arası anlamlı değişim gözlenen prob sayıları Şekil 157'de verilmektedir.

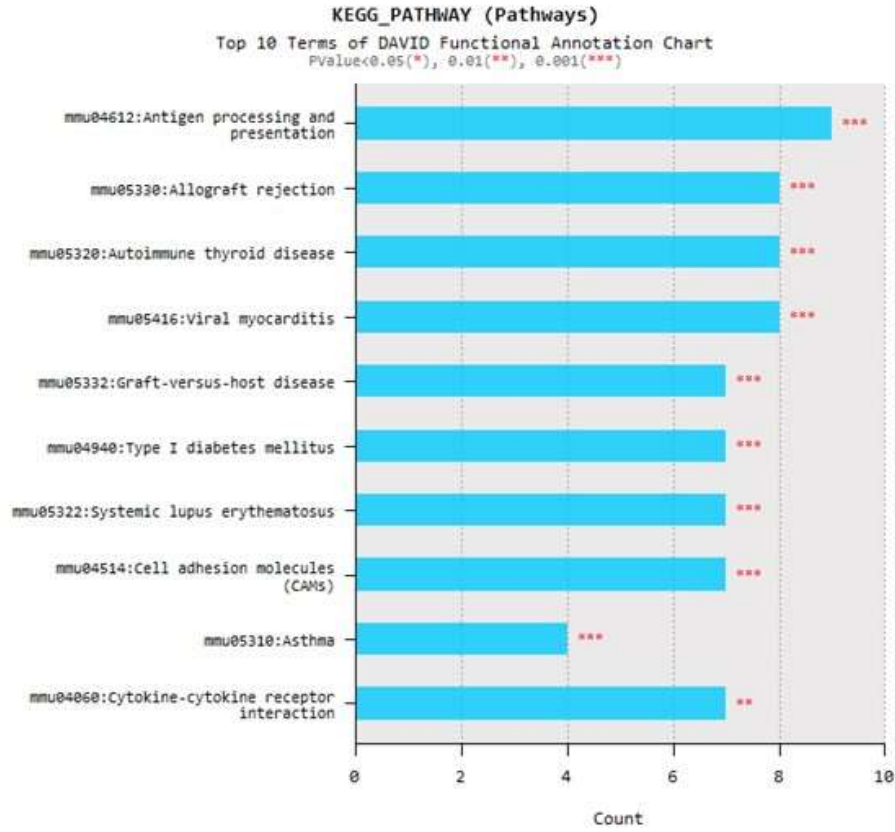


Şekil 72. Gruplar arasında yukarı ve aşağı regüle edilen probe sayıları (FC>=2)

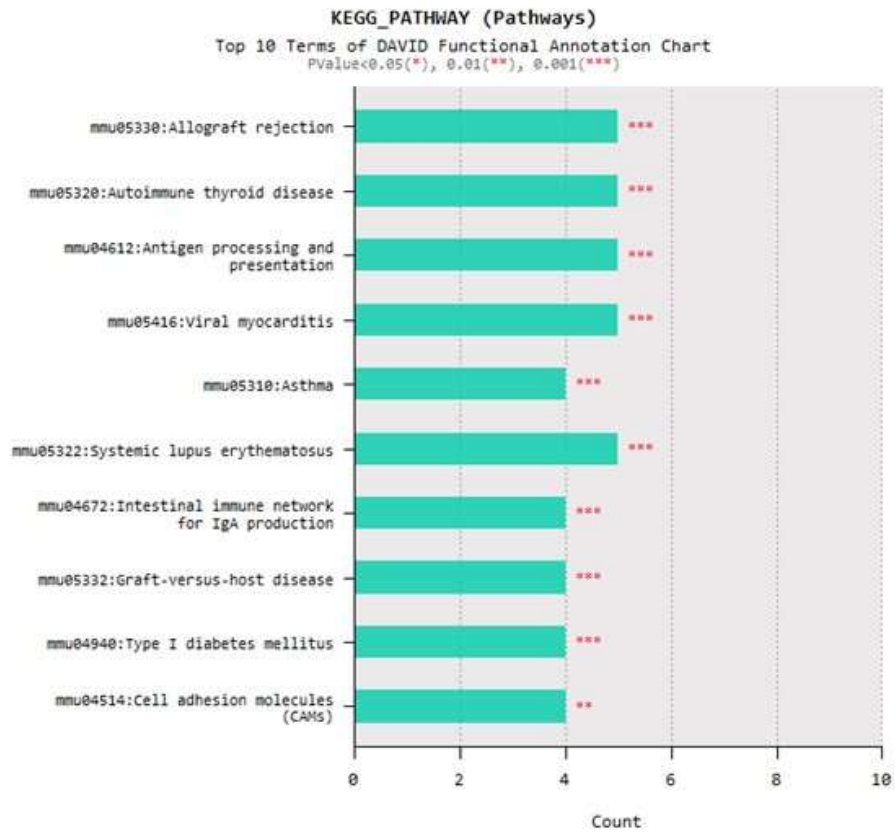
Fonksiyonel analizlerde DAVID aracı kullanılarak Figür 11'deki veritabanlarından faydalanılmış ve gen ontoloji analizi sonuçları aşağıdaki Şekil 157-161 de verilmektedir.



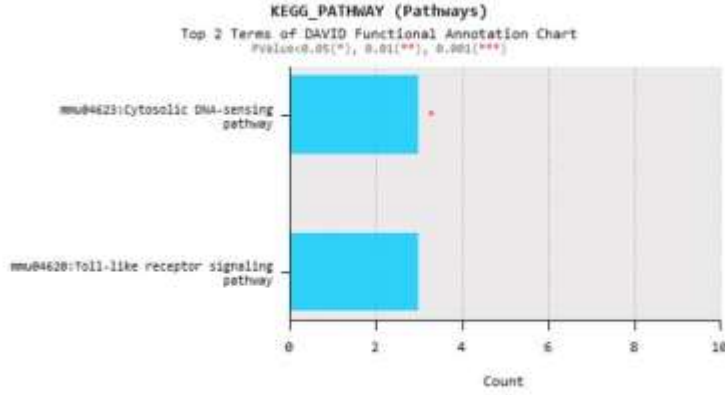
Şekil 73. Kontrol ve DEA hayvanlarda karşılaştırmalı KEGG yolaz analiz sonuçları



Şekil 74. Kontrol ve PDEA hayvanlarda karşılaştırmalı KEGG yolaz analiz sonuçları



Şekil 75. Kontrol ve MSCov hayvanlarda karşılaştırmalı KEGG yolaz analiz sonuçları



Şekil 76. DEA ve DEA-MSConv hayvanlarda karşılaştırmalı KEGG yolaz analiz sonuçları

Bu yolların incelendiğinde MS modeli oluşturulan hayvanlarda ifade değişimi gözlenen yollar genellikle bağışıklık ve enflamatuar ilhili yollar olduğu görülmektedir. Bu değişimler MSCov uygulaması ile önemli oranda kontrol ifadelerine benzer şekilde değiştirildiği gözlemlendi.

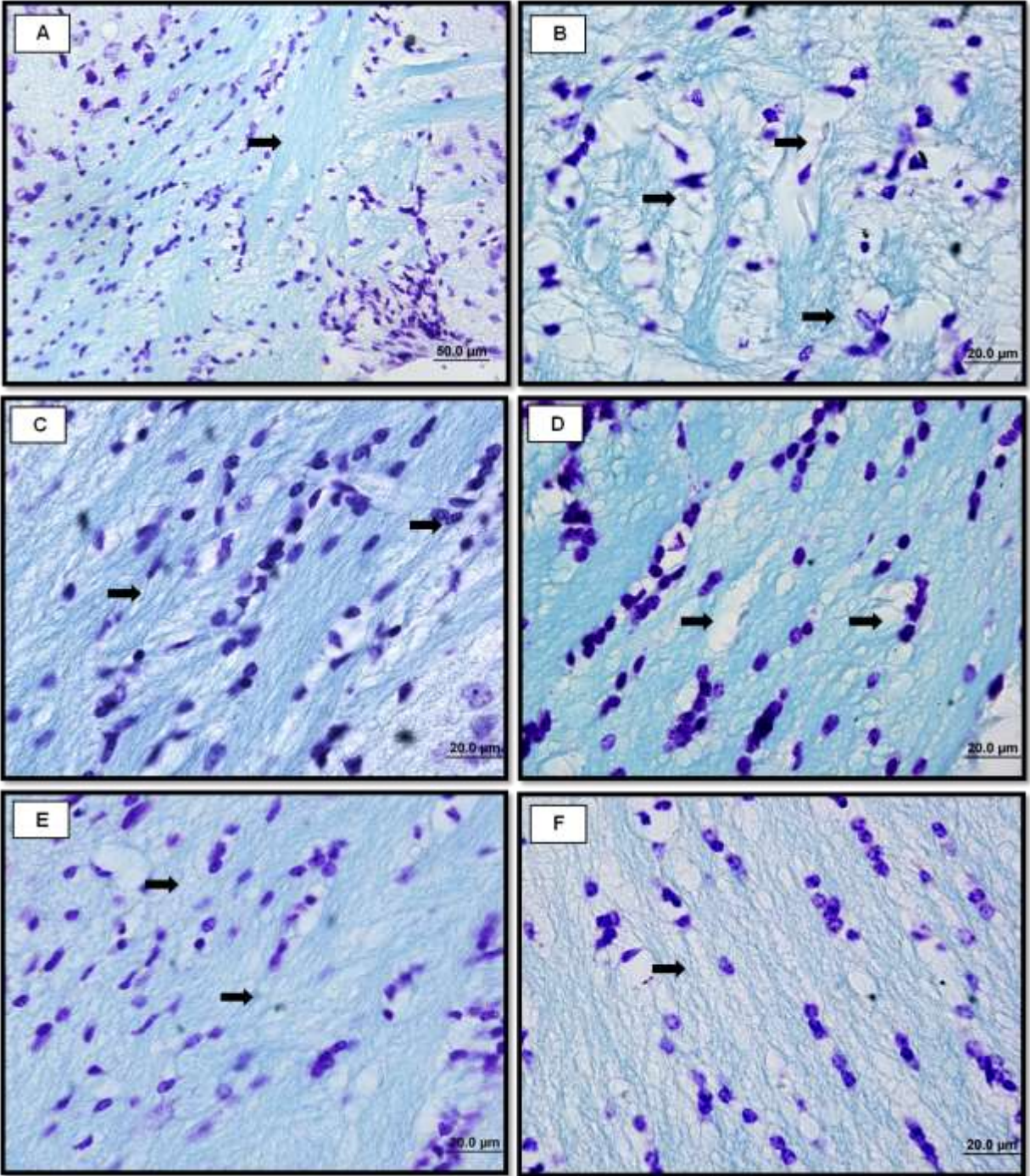
Bu veriler ile biyoenformatik analizler hala yapılmaktadır. Tartışma bölümünde kendi gerçekleştirdiğimiz ilave analizlerden örnekler verilmektedir.

3.3.6 Beyin Dokularında Histolojik Analizler

DAE oluşturulan hayvanlardan beyin dokuları alındığında metot bölümünde belirtildiği gibi yarımkürenin birisi moleküler çalışmalar için ayrılırken diğer yarımküre ve spinal kord da %10 luk formaldehit ile saklanarak histokimyasal analizler için kullanıldı.

3.3.6.1.1 "Luxol Fast Blue" Histokimyasal Boyası

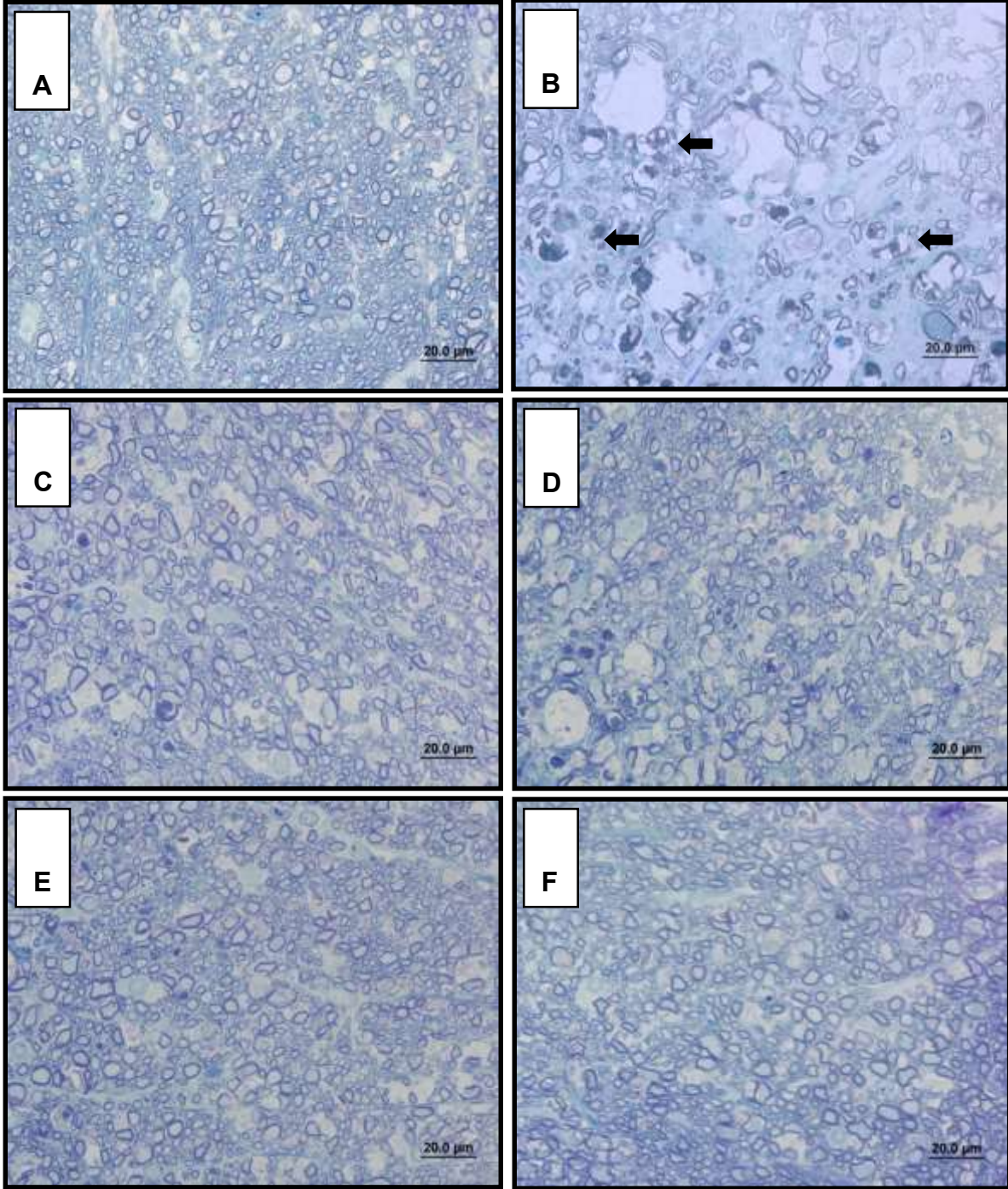
Luxol fast blue histokimyasal boyaması ile yapılan boyamalarda kontrol grubunda miyelinli sinir fibrillerinin normal yapı ve görünümüne sahip olduğu ancak DAE grubundaki deneklere ait beyin kesitlerinin boyalı preparatlarında miyelinli fibrillerde dejenerasyon, bazı alanlarda fibriller organizasyonun düzenliliğinde bozulma gözlenmiştir. Şekilde MSCov tedavi (C) ile işaretli grupta miyelinizasyonun ve fibriller organizasyonun iyi korunduğu gözlenmiştir (Şekil 162).



Şekil 77.: Beyin dokusuna ait kesitlerin Luxol fast blue ile boyanması; kontrol grubu (A), DAE grubu (B), MSCov tedavi grubu (C), diklorometan grubu (D), etil asetat grubu (E) n-bütanol grubu (F). Şekilde kontrol grubunda miyelinli sinir liflerinin normal yapılarını korudukları izlenmektedir, (B) EAE grubunda ise; miyelin kılıfa ait değişiklikler okla işaretli olarak izlenmektedir. (C)MSCov tedavi grubunda ise miyelin kılıfla ilgili değişikliklerin azaldığı, miyelinizasyonun ve fibriller organizasyonun iyi korunduğu gözlenmiştir diklorometan grubu (D), etil asetat grubu (E) ve n-bütanol grubunda (F) ise MSCov tedavi grubuna benzer morfoloji gözlenmiştir.

3.3.6.1.2 Toluidin Boyası

Medulla spinalis dokusuna ait yarı ince kesitlerin Toluidin mavi ile boyanmasında kontrol grubundaki deneklere ait miyelinli sinir liflerinde akson ve miyelin kılıfın normal yapılarını korudukları izlenmektedir, DAE grubunda ise miyelin kılıfta dejenerasyon izlenirken; MSCov tedavi grubunda miyelin kılıfla ilgili değişikliklerin azaldığı, diklorometangrubu, etil asetat grubu ve n-bütanol grubunda ise miyelinli sinir fibrillerdeki dejenerasyonların gerilediği gözlenmiştir (Şekil X163.



Şekil 78. Medulla spinalis dokusuna ait yarı ince kesitlerin Toluidin mavi ile boyanması; kontrol grubu (A), DAE grubu (B), MSCov tedavi grubu (C), diklorometan grubu (D), etil asetat grubu (E) n-bütanol grubu (F). Şekilde kontrol grubunda miyelinli sinir liflerinde akson ve miyelin kılıfın normal yapılarını korudukları izlenmektedir, (B) DAE grubunda ise; miyelin kılıfa ait değişiklikler okla işaretli olarak izlenmektedir. (C)MSCov tedavi grubunda ise miyelin kılıfı ilgili değişikliklerin azaldığı, diklorometan grubu (D), etil asetat grubu (E) ve n-bütanol grubunda (F) ise MSCov tedavi grubuna benzer morfoloji gözlenmiştir.

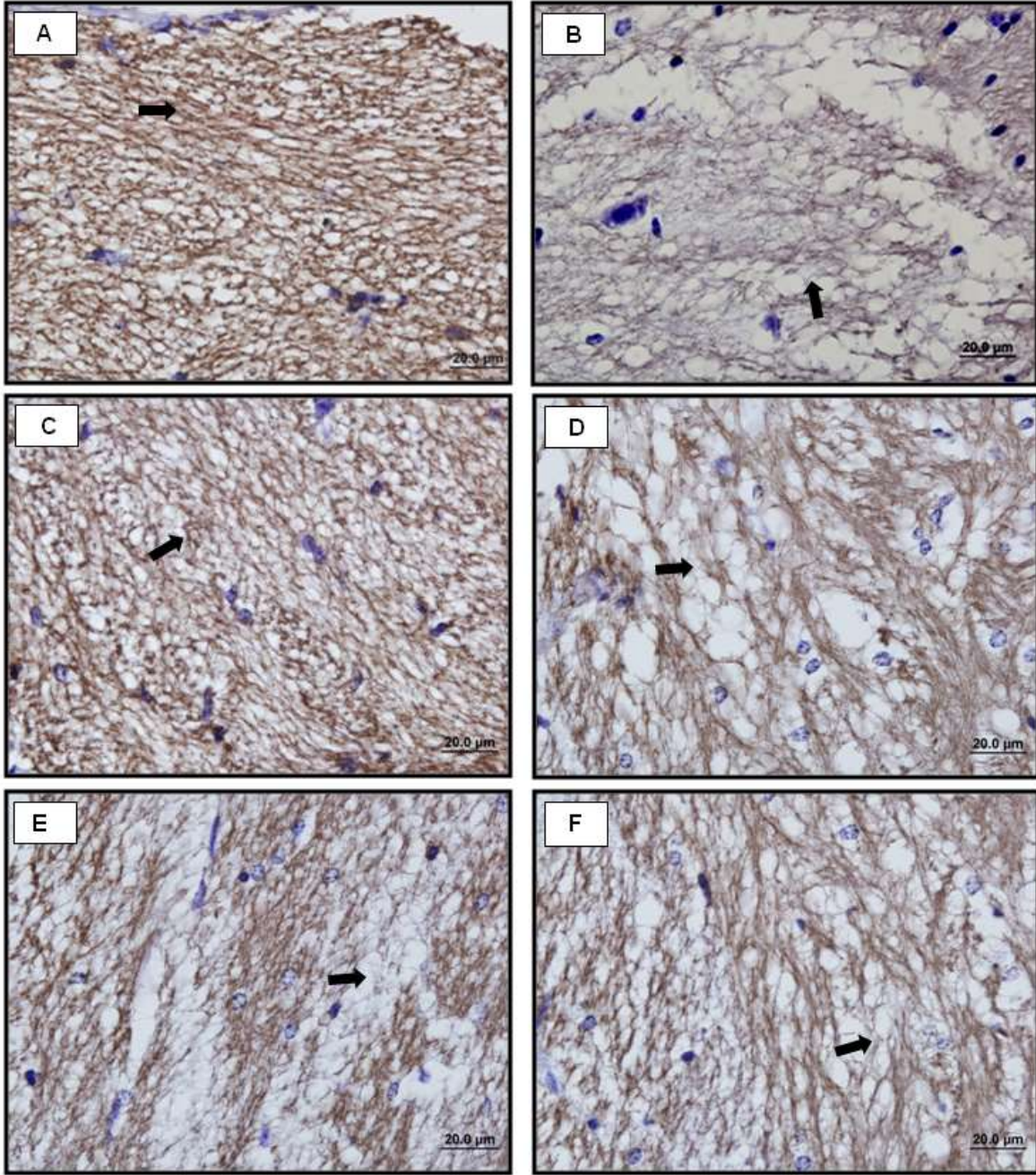
3.3.6.1.3 Miyelin Basic Protein (MBP) ve Miyelin İlişkili Glikoprotein (MAG) immünreaktivitesi;

Gruplar arasındaki histomorfolojik farklılıklar skorlanarak değerlendirildi. Skorlama için onluk büyütmede birbiriyle örtüşmeyen alanlar rastgele yöntemle seçildi. İmmünpozitif boyanmanın derecesi, yoğunluk ve dağılım açısından 0'dan 3'e kadar olan bir gösterge çizelgesi kullanılarak semikantitatif skorlama ile değerlendirildi. İmmünreaktivite yok ise 0, hafif ise 1, orta ise 2 ve belirgin olması durumunda 3 puan verildi (Tablo 29) (Tuzun vd., 2011).

Tablo 15. MBP ve MAG İmmünreaktivitesinin skorlanması

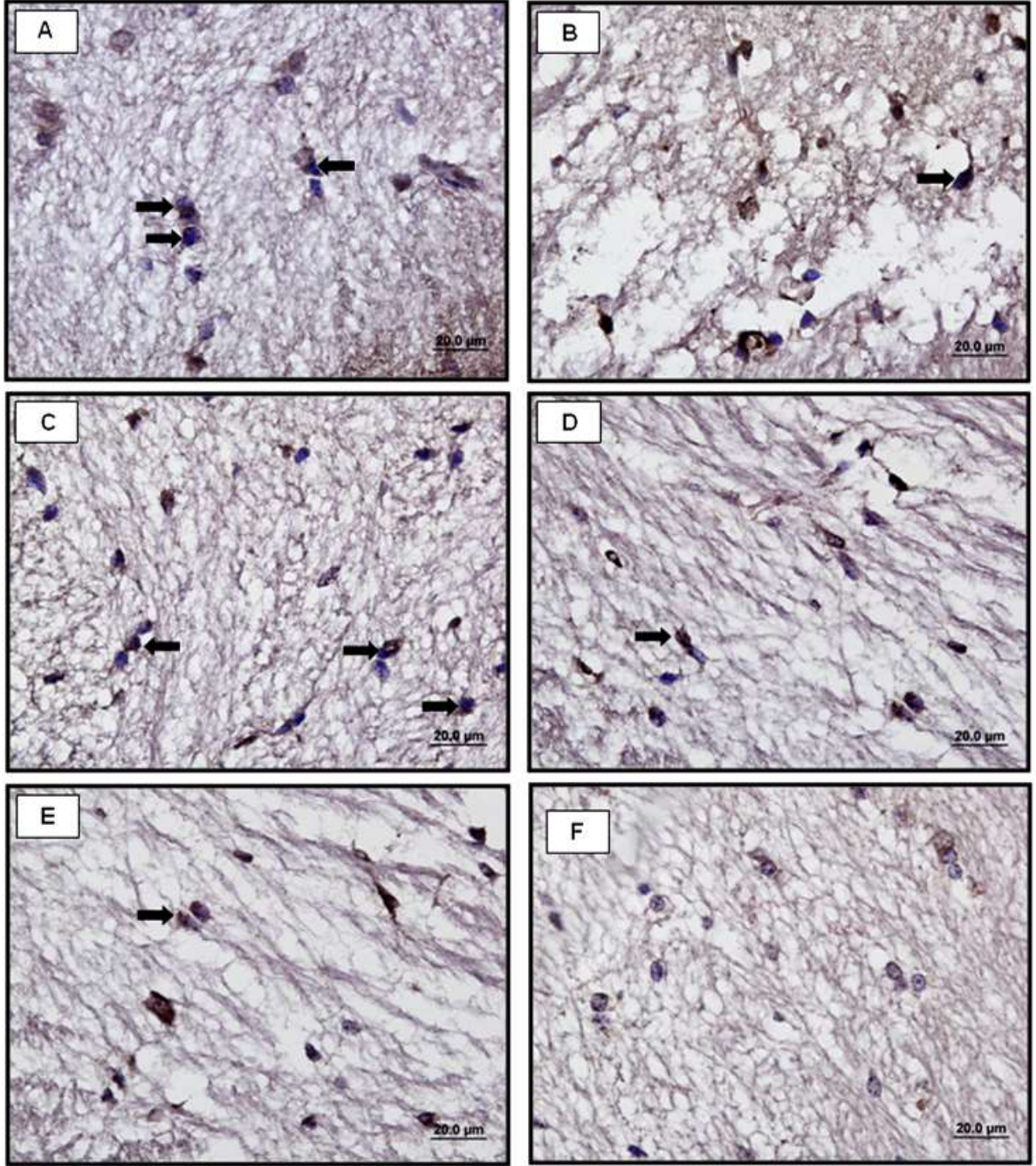
	MBP		MAG	
	Ortalama	S. Sapma	Ortalama	S. Sapma
Kontrol	2,67	0,52	2,67	0,52
DAE	1,00	0,00	1,00	0,00
MSCov	2,17	0,41	1,93	0,41
DMSO	2,43	0,52	2,00	0,00
Diklorometan	1,33	0,52	1,00	0,00
Etil Asetat	1,33	0,52	1,33	0,52
n-Bütanol	1,33	0,52	1,33	0,52
Jelimsi faz	1,67	0,52	1,67	0,52

Her iki antikora ait immünohistokimyasal boyamalar değerlendirildiğinde; kontrol grubunda beyinde periventriküler alanda yer alan beyaz cevherde olağan görünen MBP ve MAG immünreaktivitesinin, DAE gruplarında azaldığı gözlemlendi. Tedavi gruplarında ise MBP ve MAG immünreaktivitesinin DAE grubuna göre farklı derecelerde artış gösterdiği görüldü. Tedavi grupları değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak değerlendirilmeye birlikte, özellikle "MSCov tedavi grubunda periventriküler alan değerlendirildiğinde, MBP ve MAG immünpozitifliğin hem miyelinli fibrillerde hem de oligodendroglialarda daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 164-165)



Şekil 79. Beyin dokusuna ait periventriküler alandaki beyaz cevherden alınan kesitlerin anti-MBP antikoruna ile immünohistokimyasal boyanmasına ait resimler; kontrol grubu (A), DAE grubu (B), MSCov tedavi grubu (C), diklorometan grubu (D), etil asetat grubu (E) ve n-bütanol grubu (F). Şekilde periventriküler alandan alınan beyaz cevhere ait kesitlerde, kontrol grubunda miyelinli sinir liflerinde akson ve miyelin kılıfın normal yapılarını korudukları, oligodendrositlerin anti-MBP antikoruna ile kuvvetli immünpozitif boyandıkları izlenmektedir, (B) DAE grubunda ise; anti-MBP antikoruna ile oligodendrositlerin immünpozitif boyanmasının azaldığı okla işaretli olarak izlenmektedir.(C) MSCov tedavi grubunda ise miyelin kılıfı ile ilgili değişikliklerin azaldığı ve oligodendrositlerin, diklorometan grubu (D), etil asetat grubu (E) ve n-bütanol grubunda (F)

ise anti-MBP antikoru immünpozitifliğin DAE grubuna göre arttığı ancak MSCov tedavi grubu kadar güçlü olmadığı gözlenmektedir.



Şekil 80. Beyin dokusuna ait periventriküler alandaki beyaz cevherden alınan kesitlerin anti-MAG antikoru ile immünohistokimyasal boyanmasına ait resimler; kontrol grubu (A), DAE grubu (B), MSCov tedavi grubu (C), diklorometan grubu (D), etil asetat grubu (E) ve n-bütanol grubu (F) Şekilde periventriküler alandan alınan beyaz cevhere ait kesitlerde, kontrol grubunda miyelinli sinir liflerinde akson ve miyelin kılıfın normal yapılarını korudukları ve anti-MAG immünpozitif boyanan hücreler izlenmektedir, (B) DAE grubunda ise; anti-MAG antikoru ile

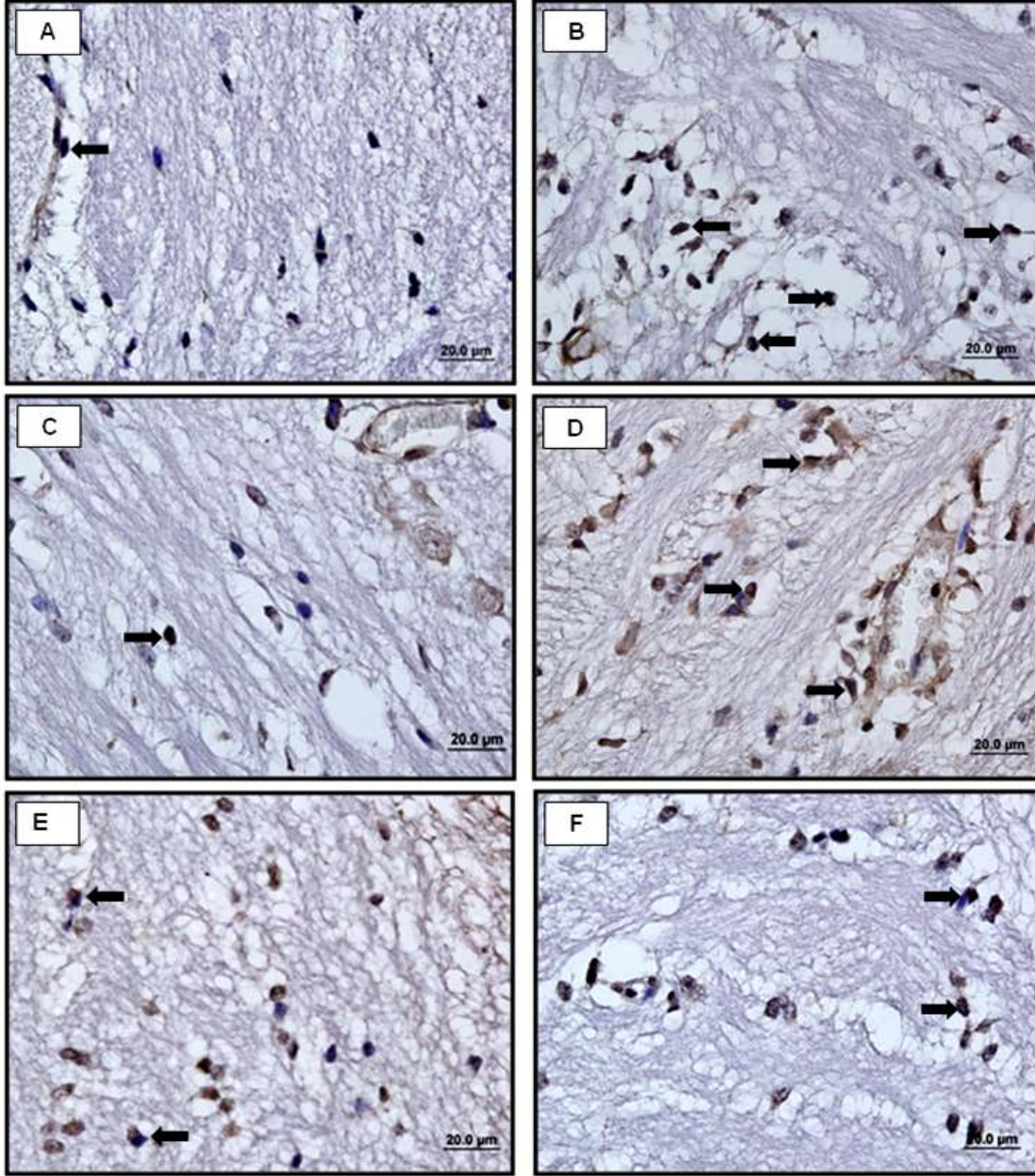
immünpozitif boyanmasının azaldığı okla işaretli olarak izlenmektedir.(C) MSCov tedavi grubunda ise miyelin kılıfla ilgili değişikliklerin azaldığı, diklorometan grubu (D), etil asetat grubu (E) ve n-bütanol grubunda (F) ise anti-MAG antikoru immünpozitifliğin DAE grubuna göre arttığı ancak MSCov tedavi grubu kadar güçlü olmadığı gözlenmektedir.

3.3.6.1.4 CD45 (Protein tyrosine phosphatase, receptor type C) İmmünreaktivitesi

CD45 antikoru a ait immünohistokimyasal boyamalar değerlendirildiğinde; kontrol grubunda beyinde periventriküler alanda yer alan beyaz cevherde olağan görünen CD45 immünreaktivitesinin, DAE gruplarında arttığı gözlemlendi. Tedavi gruplarında ise CD45 immünreaktivitesinin DAE grubuna göre farklı derecelerde azalma gösterdiği görüldü. Tedavi grupları değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak değerlendirilmemekle birlikte, özellikle “MSCov tedavi grubunda periventriküler alan değerlendirildiğinde, CD45 immünpozitifliğin daha az olduğu gözlemlendi (Tablo 30 ve Şekil 166).

Tablo 16. CD45 immünreaktivitesinin gruplara göre skorlanması

CD45		
	Ortalama	S. Sapma
Kontrol	0,33	0,52
DAE	3,00	0,00
MSCov tedavi	1,17	0,41
DMSO	2,70	0,50
Diklorometan	2,67	0,52
Etil Asetat	2,33	0,52
n-bütanol	2,33	0,52



Şekil 81. Beyin dokusuna ait periventriküler alandaki beyaz cevherden alınan kesitlerin anti-CD45 antikoruna ile immünohistokimyasal boyanmasına ait resimler; kontrol grubu (A), DAE grubu (B), MSCov tedavi grubu (C), diklorometan grubu (D), etil asetat grubu (E) ve n-bütanol grubu (F). Şekilde periventriküler alandan alınan beyaz cevhere ait kesitlerde anti-CD45 immünpozitif boyanan hücrelerin (B) DAE grubunda arttığı gözlemlendi. (C) MSCov tedavi grubunda periventriküler alan değerlendirildiğinde, CD45 immünpozitifliğin daha az olduğu gözlemlendi. Oklar CD45 immün pozitif hücreleri göstermektedir.

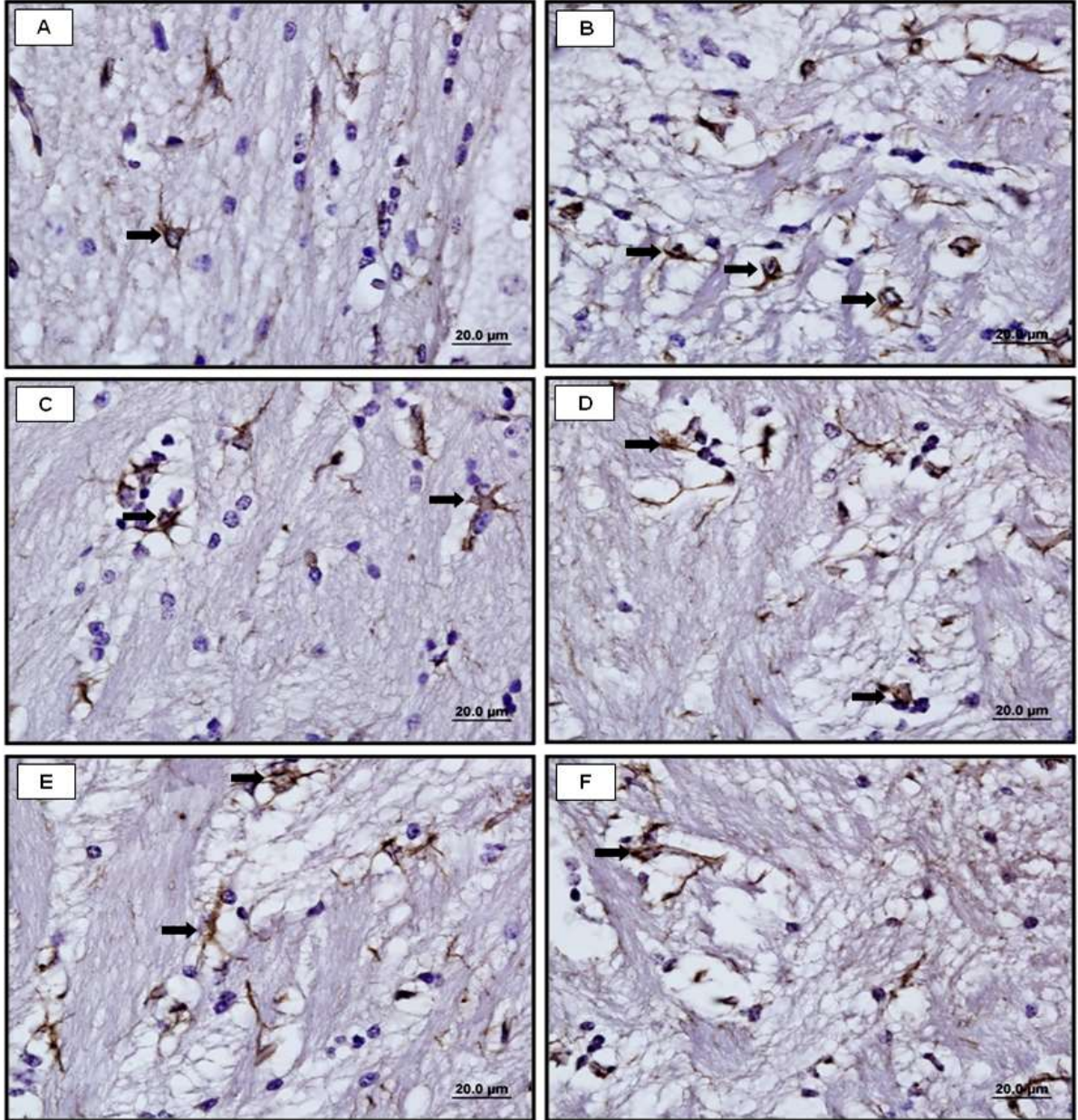
3.3.6.1.5 GFAP (Glial fibriller asidik protein) İmmünreaktivitesi;

Gruplar arasındaki histomorfolojik farklılıklar skorlanarak değerlendirildi. Skorlama için onluk büyütmede birbiriyle örtüşmeyen alanlar rastgele yöntemle seçildi. İmmünpozitif boyanmanın derecesi, yoğunluk ve dağılım açısından 0'den 3'e kadar olan bir gösterge çizelgesi kullanılarak semikantitatif skorlama ile değerlendirildi. İmmünreaktivite yok ise 0, hafif ise 1, orta ise 2 ve belirgin olması durumunda 3 puan verildi (Tuzun vd., 2011). Ortalama skorlar Tablo 31'de verilmektedir.

Tablo 17. GFAP immünreaktivitesinin skorlanması

GFAP		
	Ortalama	S. Sapma
Kontrol	0,33	0,52
DAE	3,00	0,00
MSCov tedavi	1,33	0,52
DMSO	2,70	0,50
Diklorometan	2,67	0,52
Etil Asetat	2,33	0,52
n-bütanol	2,33	0,52

GFAP antikoruna ait immünohistokimyasal boyamalar değerlendirildiğinde; kontrol grubunda beyinde periventriküler alanda yer alan beyaz cevherde olağan görünen GFAP immünreaktivitesinin, DAE gruplarında arttığı gözlemlendi. Tedavi gruplarında ise GFAP immünreaktivitesinin DAE grubuna göre farklı derecelerde azalma gösterdiği görüldü. Tedavi grupları değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak değerlendirilmemekle birlikte, özellikle "MSCov tedavi grubunda periventriküler alan değerlendirildiğinde, GFAP immünpozitifliğin daha az olduğu gözlemlendi (Şekil 167)



Şekil 82. Beyin dokusuna ait periventriküler alandaki beyaz cevherden alınan kesitlerin anti-GFAP antikoruna ile immünohistokimyasal boyanmasına ait resimler; kontrol grubu (A), DAE grubu (B), MSCov tedavi grubu (C), diklorometan grubu (D), etil asetat grubu (E) ve n-bütanol grubu (F). Şekilde periventriküler alandan alınan beyaz cevhere ait kesitlerde anti-GFAP immünopozitif boyanan hücrelerin (B) DAE grubunda arttığı gözlemlendi. (C) MSCov tedavi grubunda periventriküler alan değerlendirildiğinde, GFAP immünopozitifliğin daha az olduğu gözlemlendi. Oklar anti-GFAP immünopozitifliği göstermektedir.

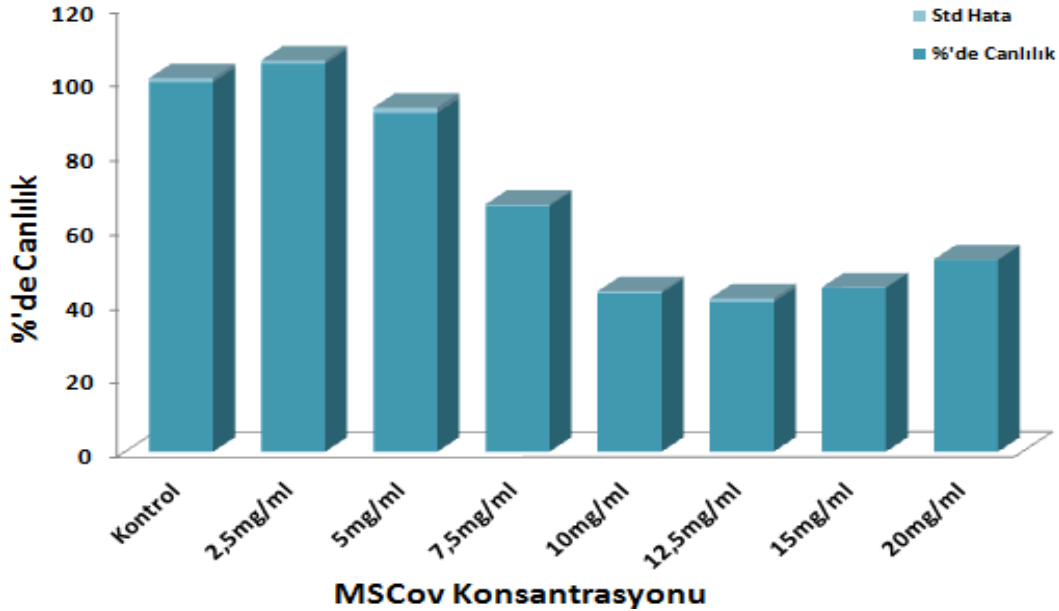
3.4 Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmalarımızda proje önerisinde bulunmamasına rağmen zaman içerisinde projenin akışı içerisinde elde edilen saf bileşiklerin hayvan deneyleri için yeterli olmaması nedeniyle, SBAG Yürütme Komitesi bilgisi ve oluruyla insan nöroblast hücreleri (SH-SY5Y) eklendi ve kullanıldı. Bu amaçla, öncelikle hücrelerin hayvan modelinde elde edilen sonuçlarla paralelliği MSCov ekstresi denenerek test edildi ve daha sonra elde edilen bileşikler hücre kültüründe çalışıldı. Hücreler uygun ortam ve şartlar sağlanarak büyütüldü ve ilk olarak sitotoksosite deneyleri yapıldı. Her madde için uygun dozlar belirlendikten sonra hücrelere uygulandı ve RNA izolasyonu yapıldıktan sonra, belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri tayin edildi. Bu bölüm çalışmalarda tüm sonuçlar, aksi belirtilmedikçe, 3 bağımsız tekrarın triplike ölçümlerin ortalama \pm standard sapma şeklinde verilmektedir.

3.4.1 SH-SY5Y Hücrelerinde MSCov Ekstresi Çalışmaları

3.4.1.1 MSCov Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda MSCov ekstresi suda çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya (1×10^3 /kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda MSCov ekstresinin hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 168)



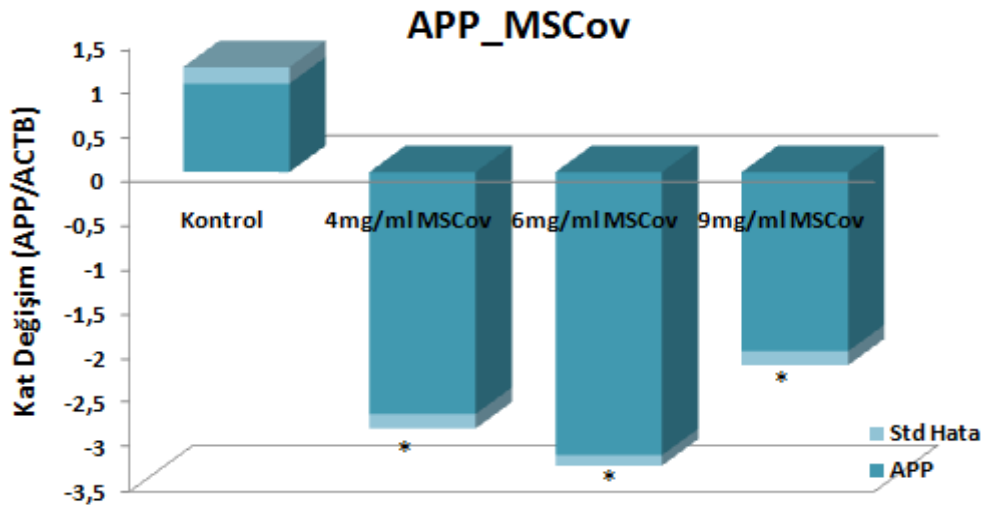
Şekil 1. MSCov ekstresinin hücre canlılığına etkisi.

Her ne kadar hücre çalışmaları ile NOEL ve LOEL gibi değerlerin saptanması mümkün değilse de ilerleyen çalışmalar için toksik olmayan doz, en az toksik olan doz ve toksik olan doz

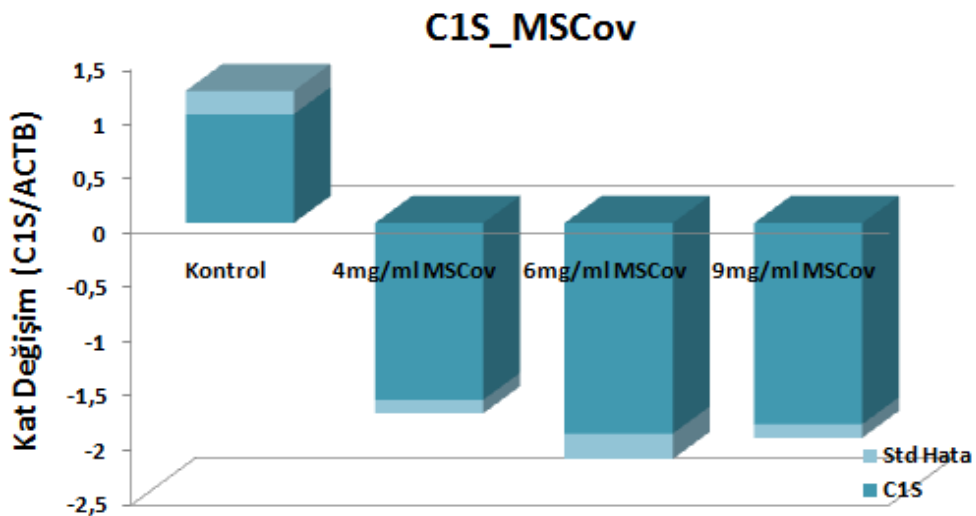
saptanmaya ve kullanılmaya çalışıldı. Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 4mg/ml, 6mg/ml ve 9mg/ml MSCov konsantrasyonunun kullanılmasına karar verildi.

3.4.1.2 MSCov Ekstresinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi

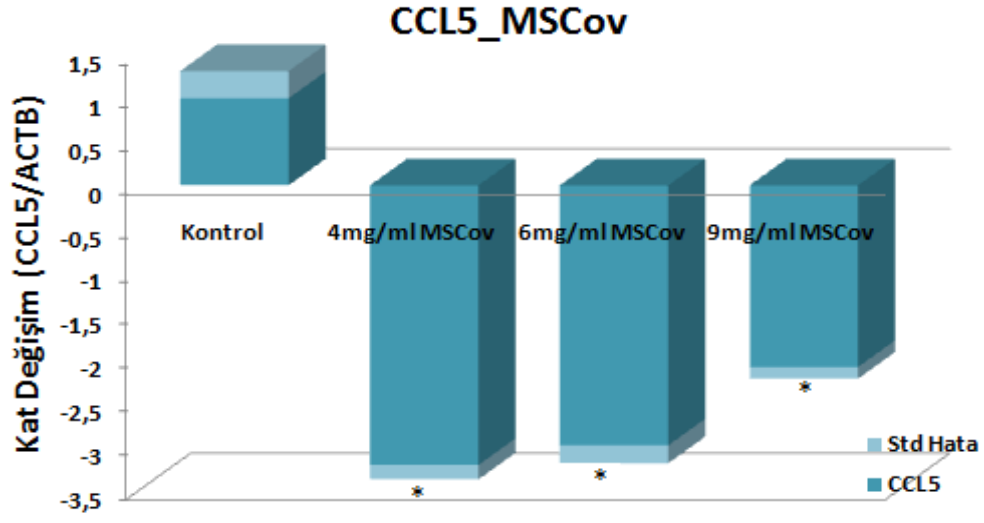
Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücelere bu belirlenen dolarda MSCov ekstresi uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar ile belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir (Şekil 169-185).



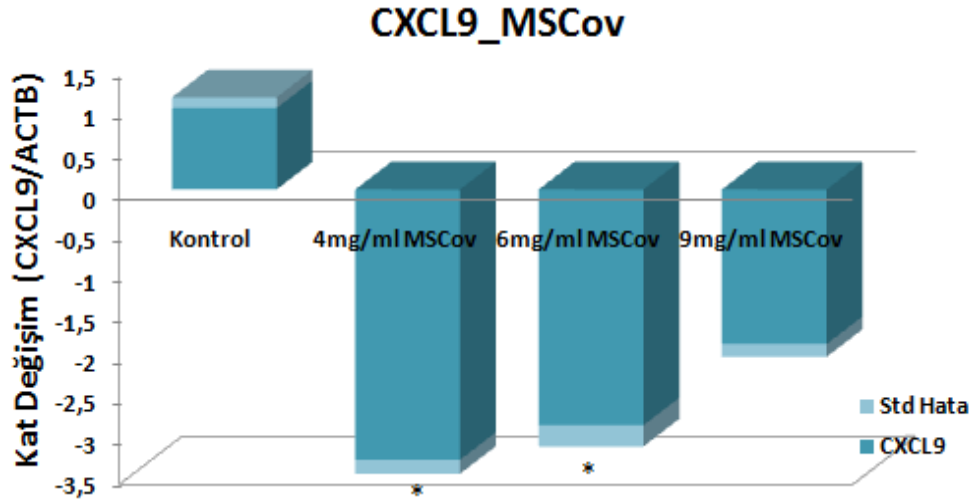
Şekil 2. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) APP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) ile işaretlenen genler P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren genlerdir.



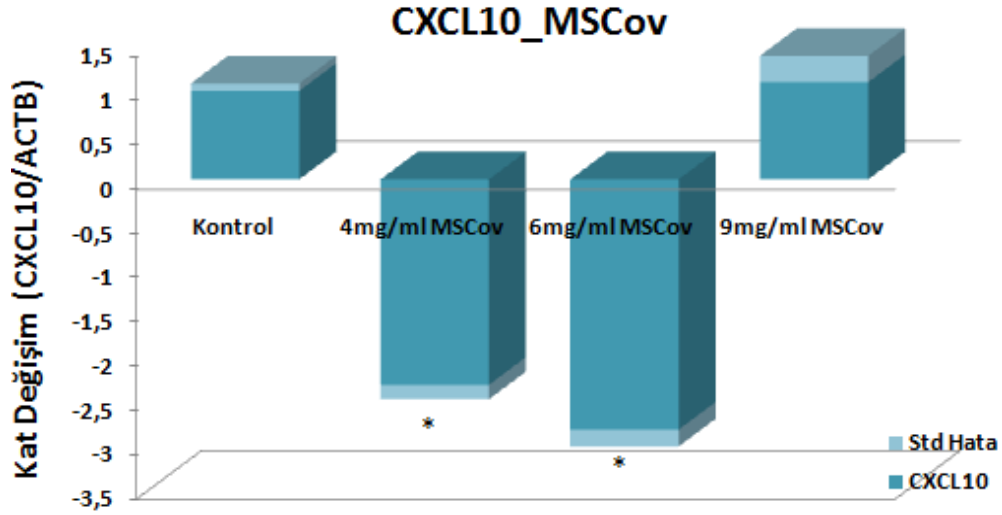
Şekil 3. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) C1S mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



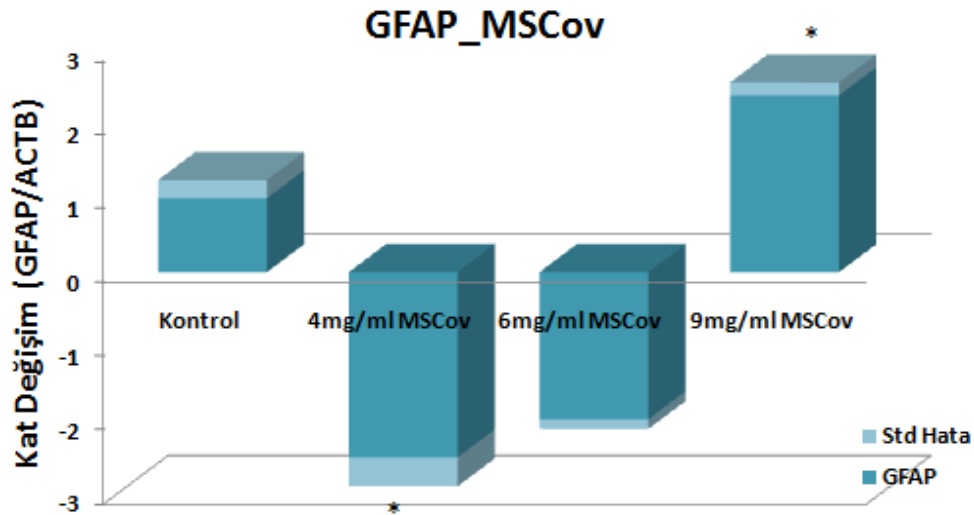
Şekil 4. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



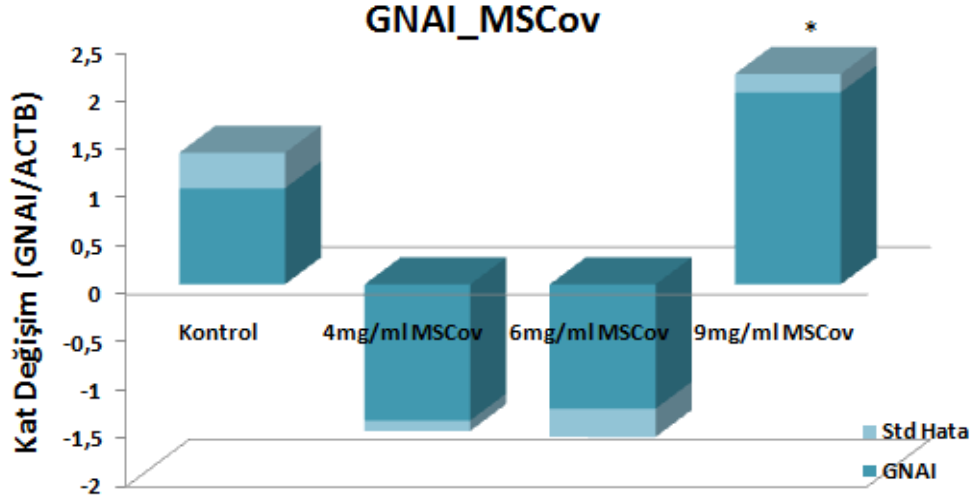
Şekil 5. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



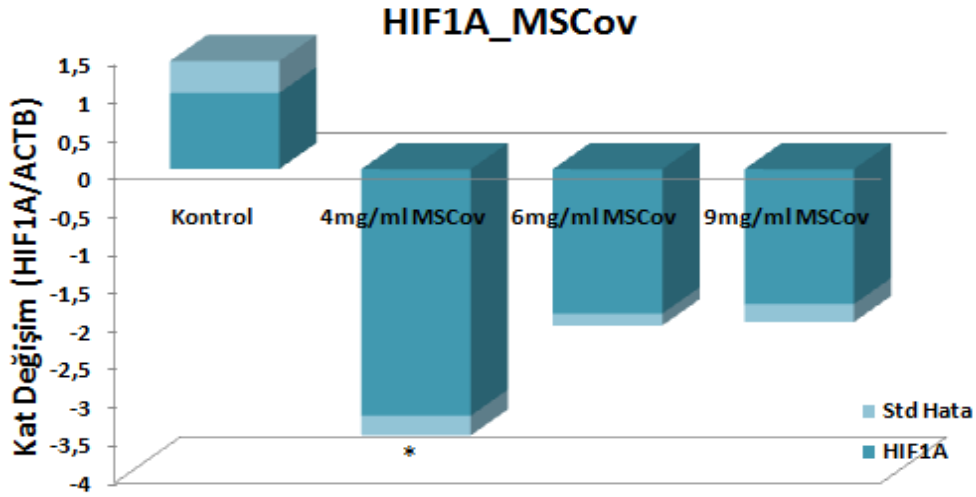
Şekil 6. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



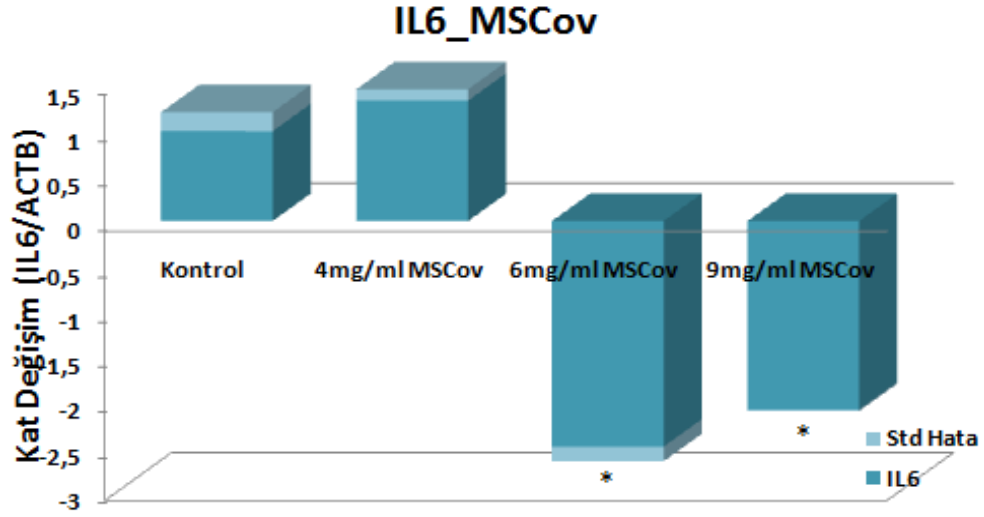
Şekil 7. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GFAP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



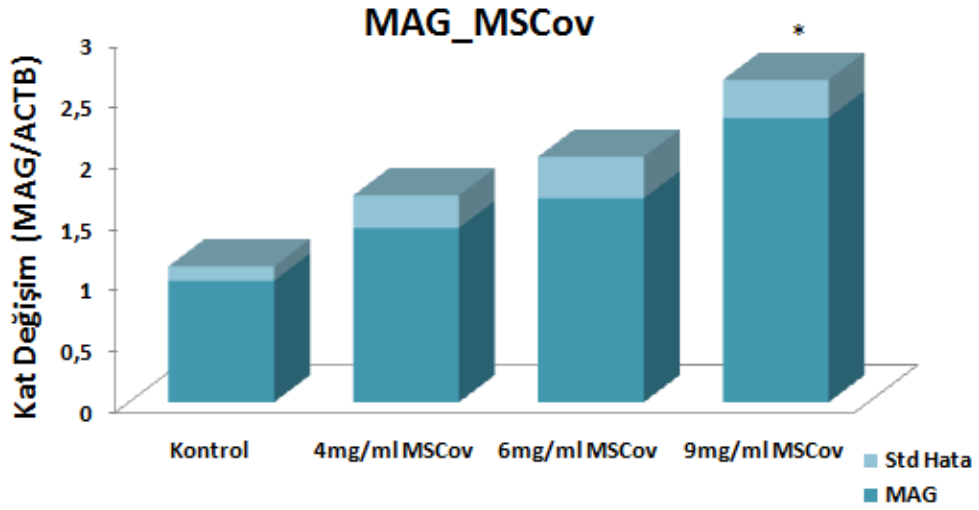
Şekil 8. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GNAI mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



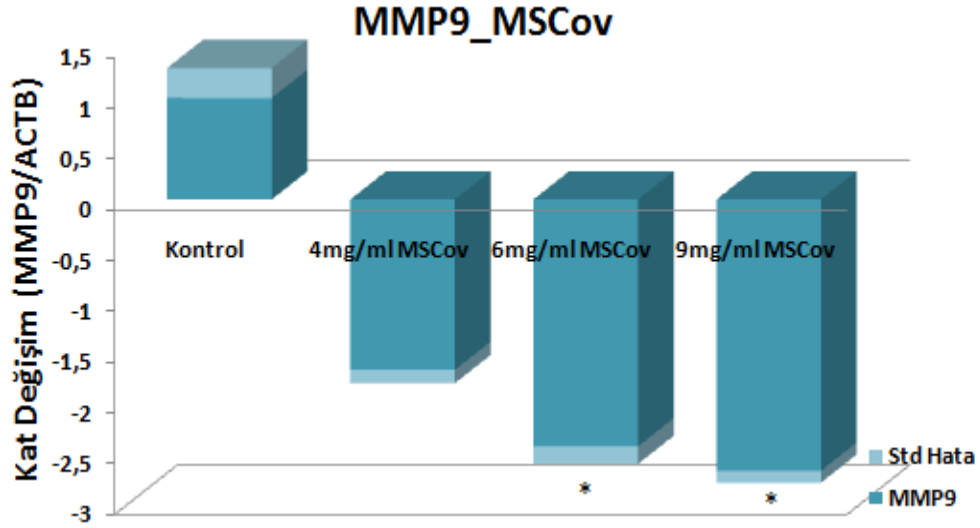
Şekil 9. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



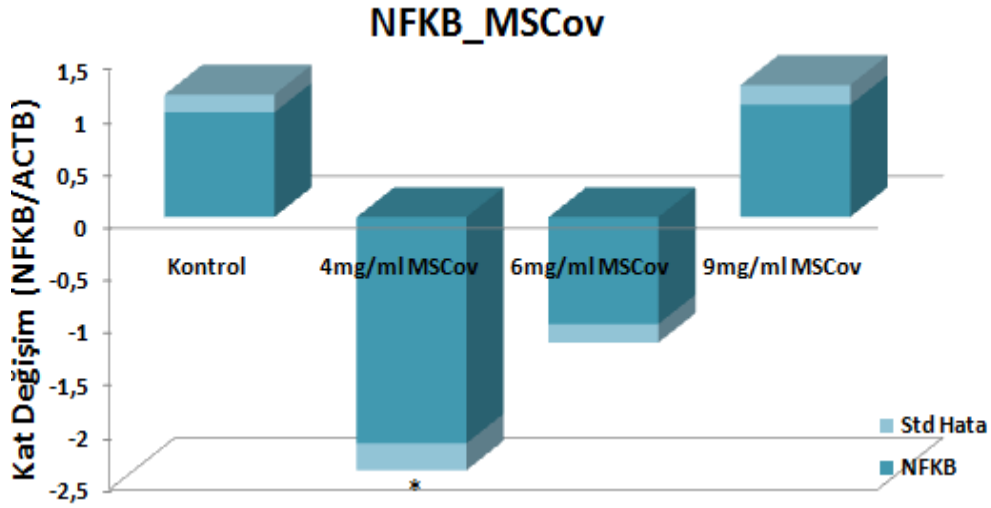
Şekil 10. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) IL6 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



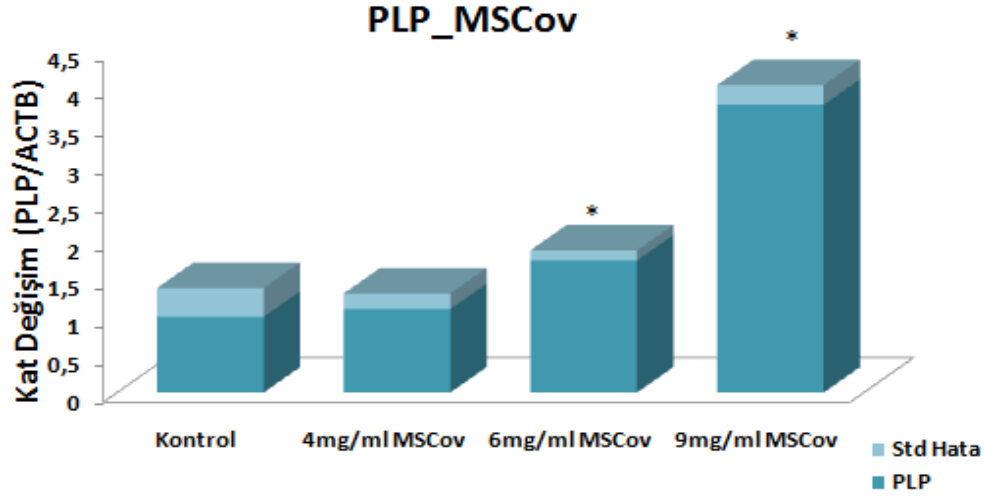
Şekil 11. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MAG mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



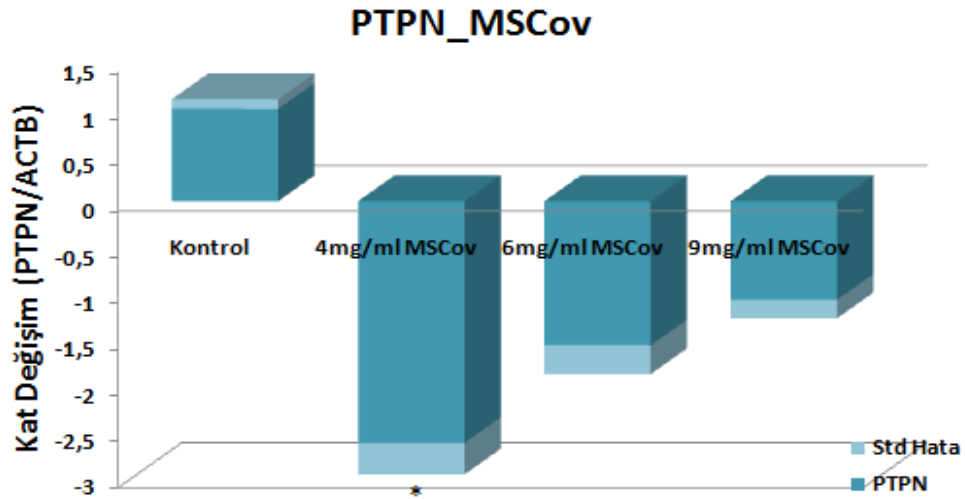
Şekil 12. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



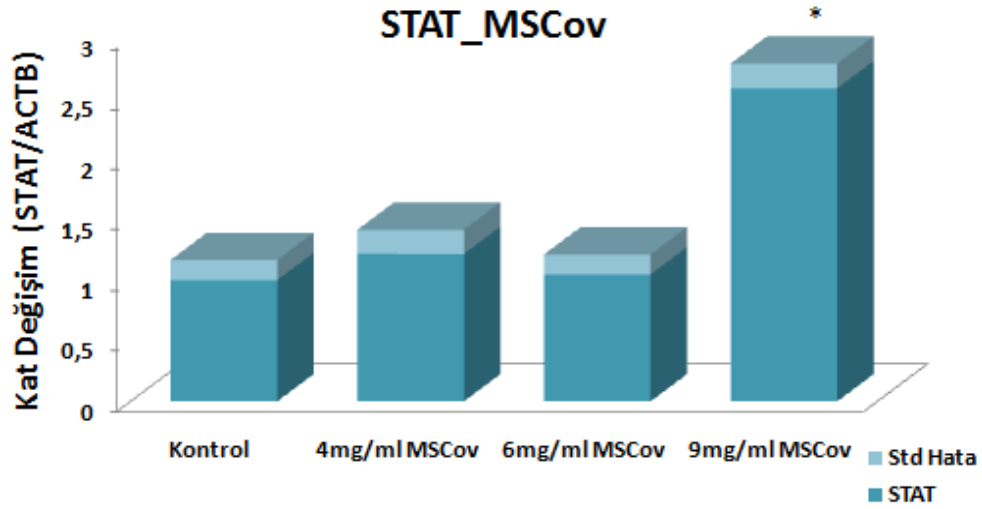
Şekil 13. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) NFKB mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



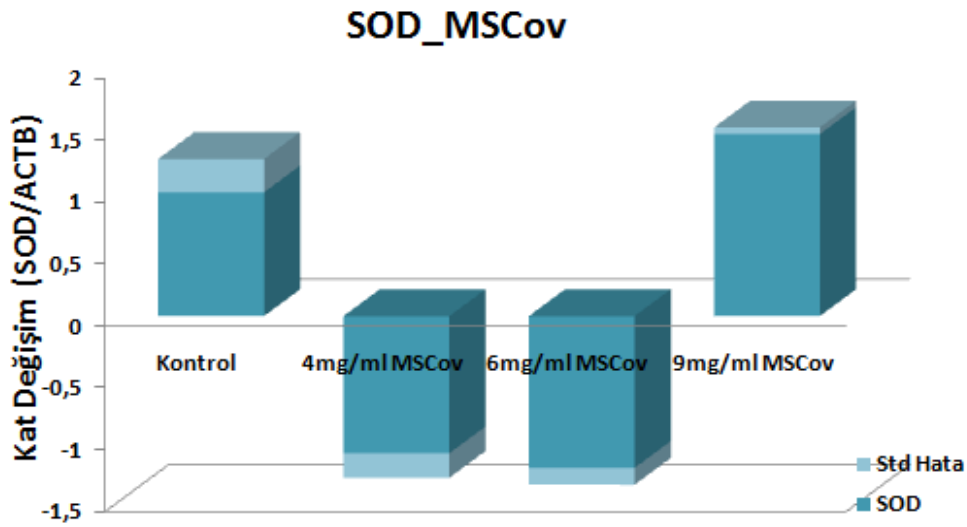
Şekil 14. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PLP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



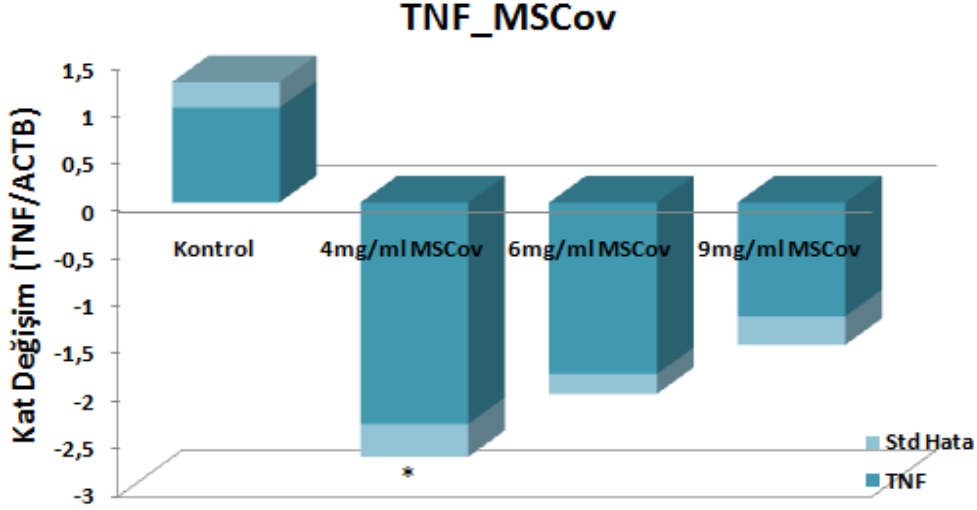
Şekil 15. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PTPN mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



Şekil 16. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) STAT mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



Şekil 17. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) SOD mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.

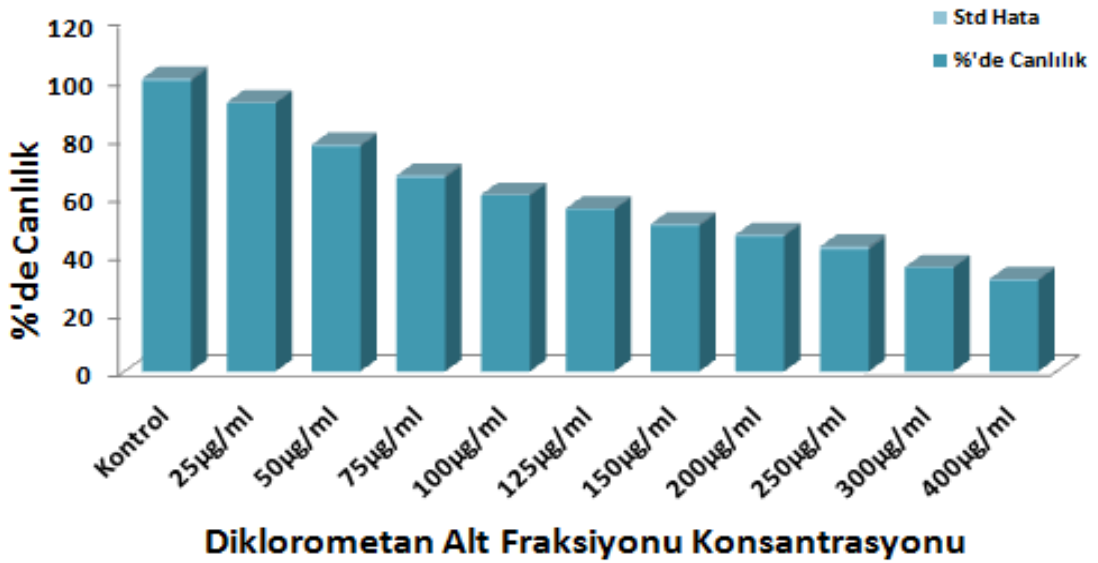


Şekil 18. MSCov ekstresinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) TNF mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

3.4.2 SH-SY5Y Hücrelerinde Diklorometan Alt Fraksiyonu Çalışmaları

3.4.2.1 Diklorometan Sitotoksisite Çalışması

Sitotoksisite testi için değişik konsantrasyonda Diklorometan alt fraksiyonu %20 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya (1x10³/kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda Diklorometan alt fraksiyonunun hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 186).

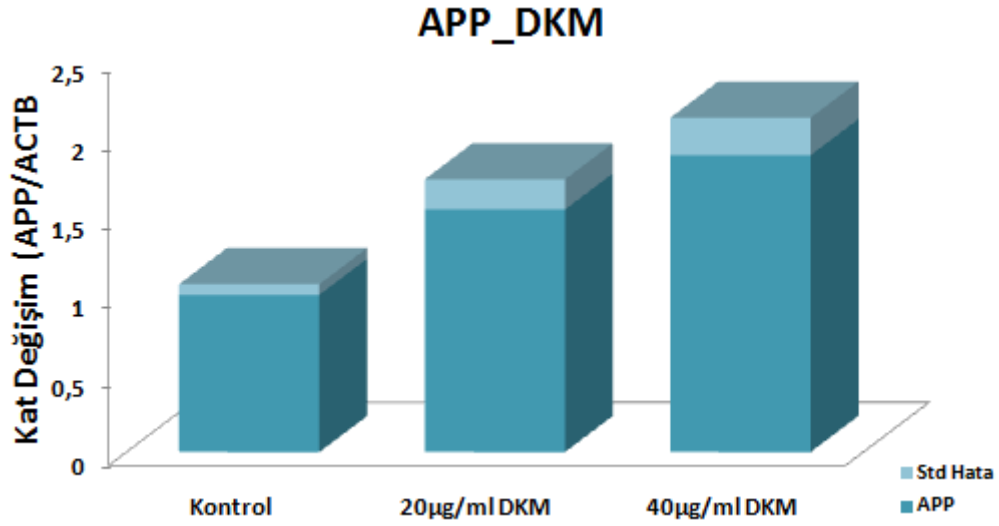


Şekil 19. Diklorometan alt fraksiyonunun hücre canlılığına etkisi.

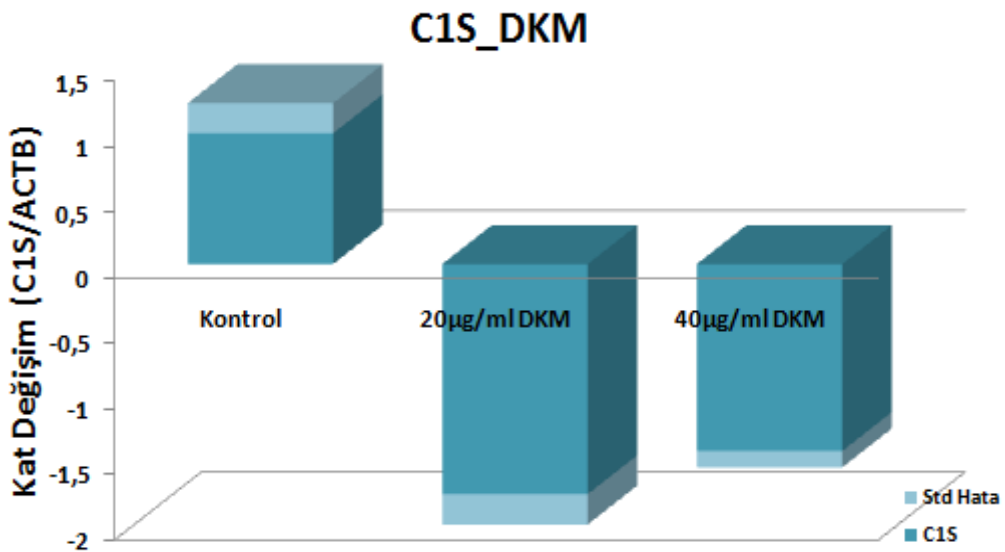
Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 20µg/ml ve 40µg/ml Diklorometan konsantrasyonunun kullanılmasına karar verildi.

3.4.2.2 Diklorometan Alt Fraksiyonunun SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi

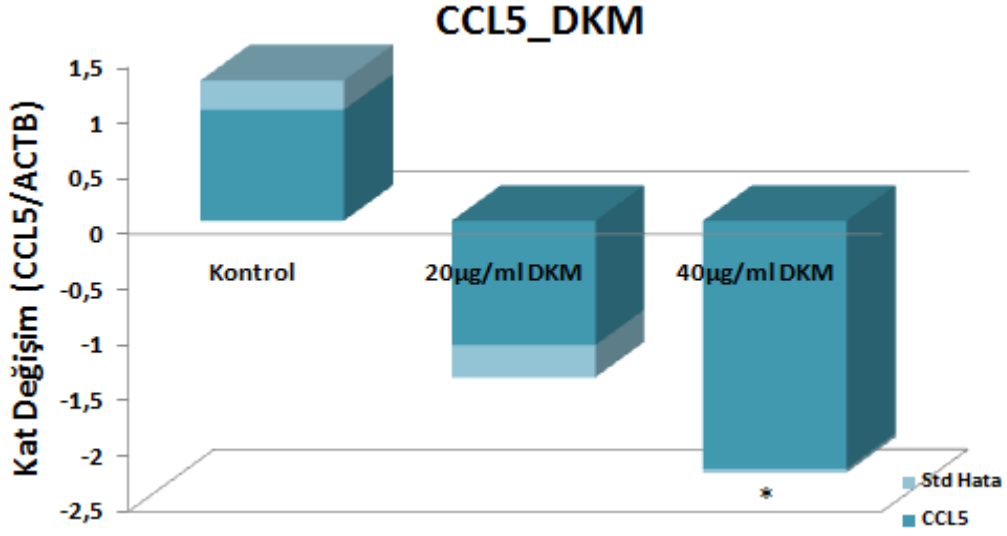
Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücrelere bu belirlenen dolarda Diklorometan alt fraksiyonu uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir (Şekil 187-203).



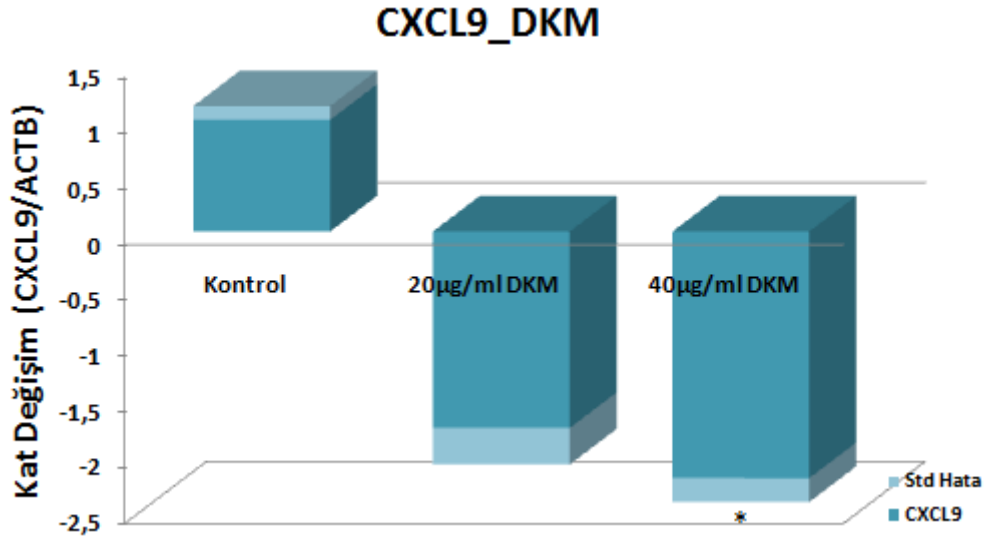
Şekil 20. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) APP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



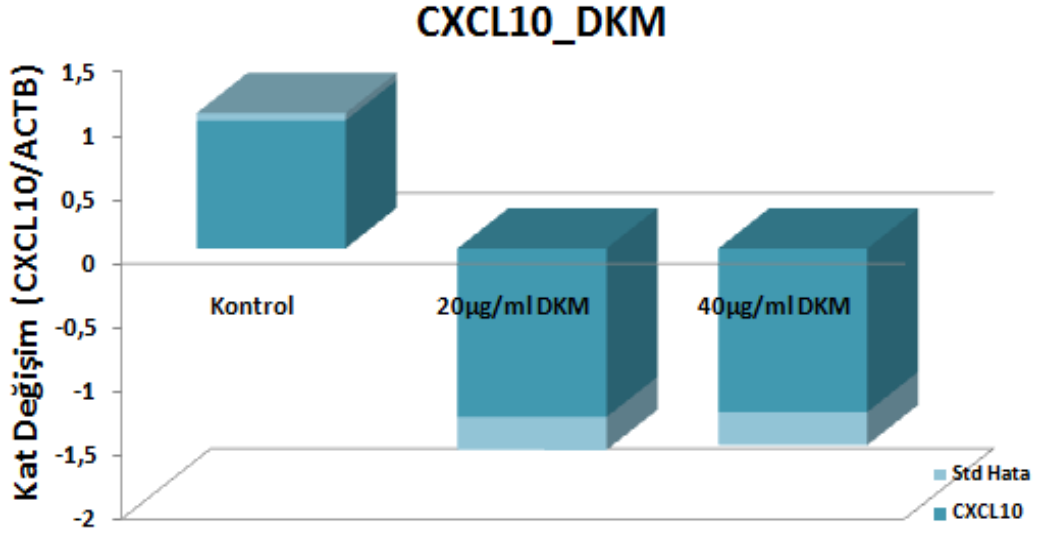
Şekil 21. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) C1S mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



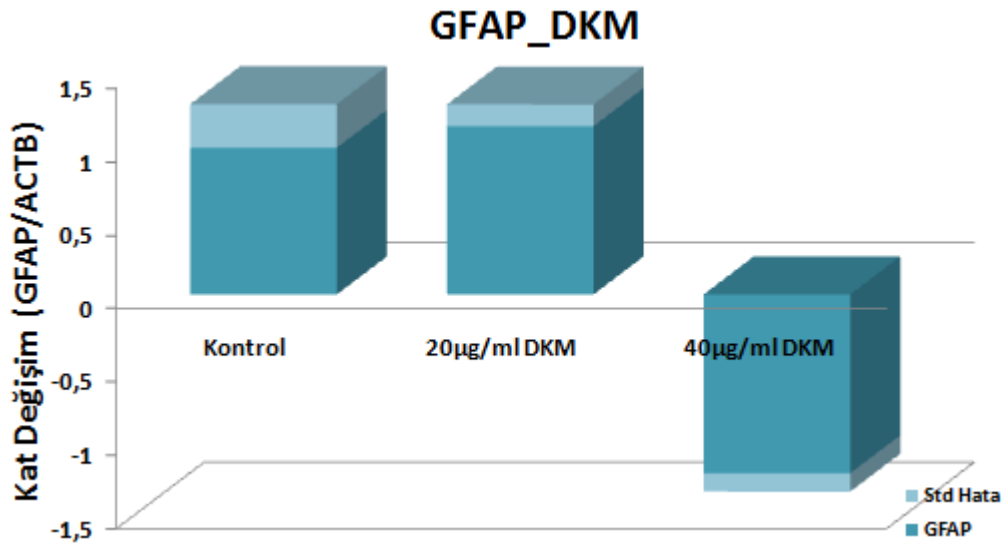
Şekil 22. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



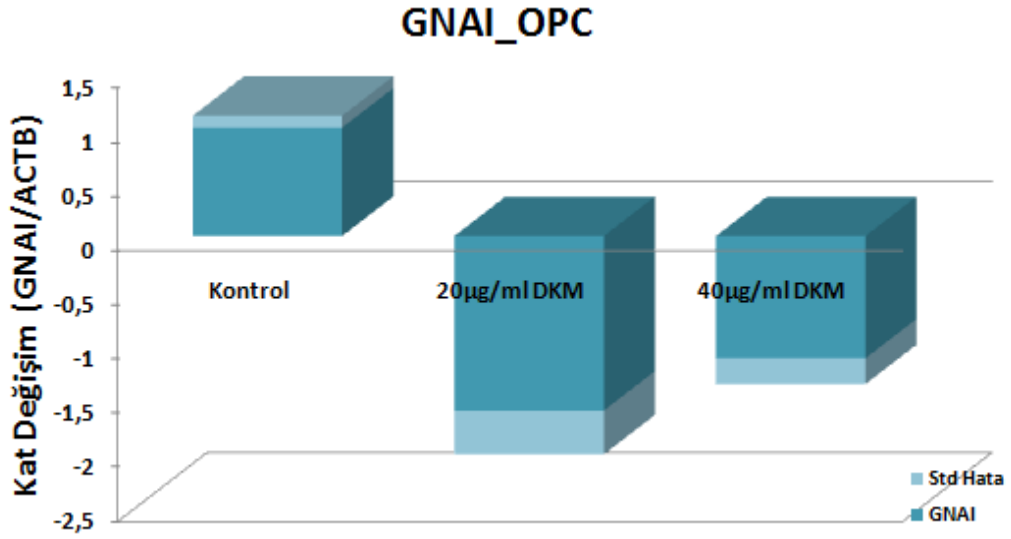
Şekil 23. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



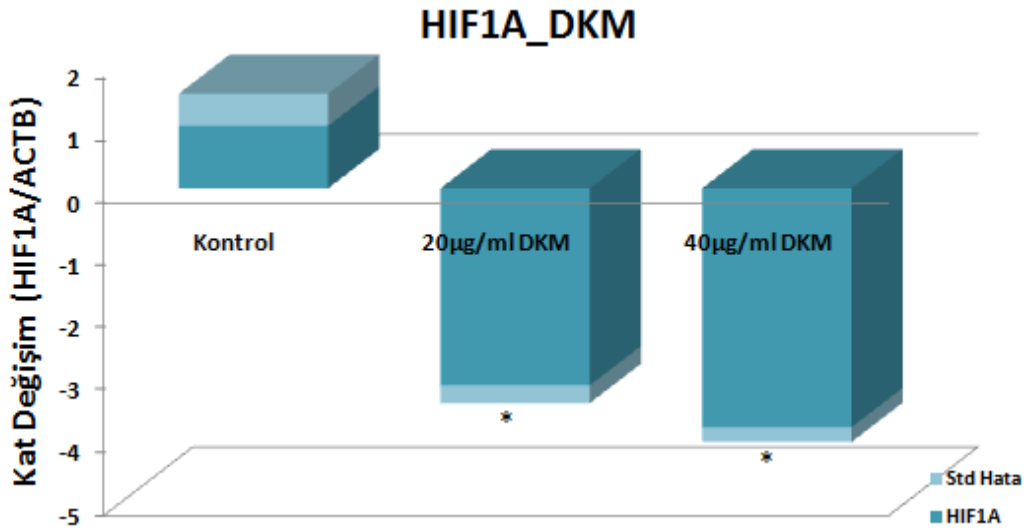
Şekil 24. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



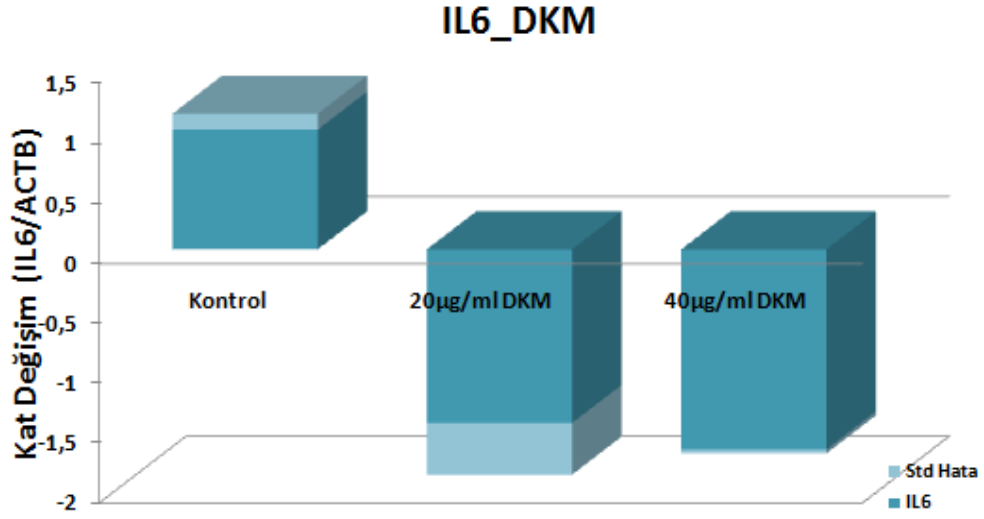
Şekil 25. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GFAP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



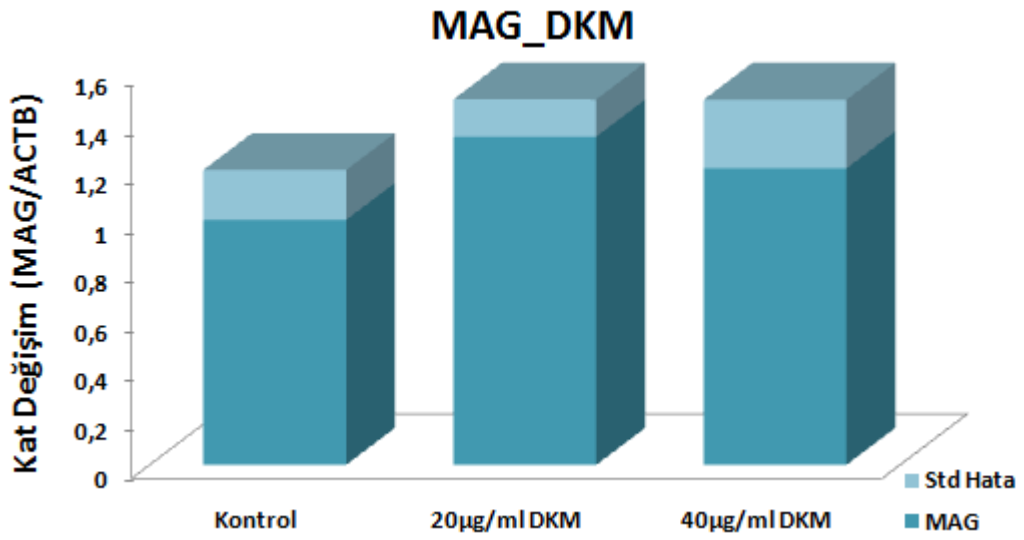
Şekil 26. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GNAI mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



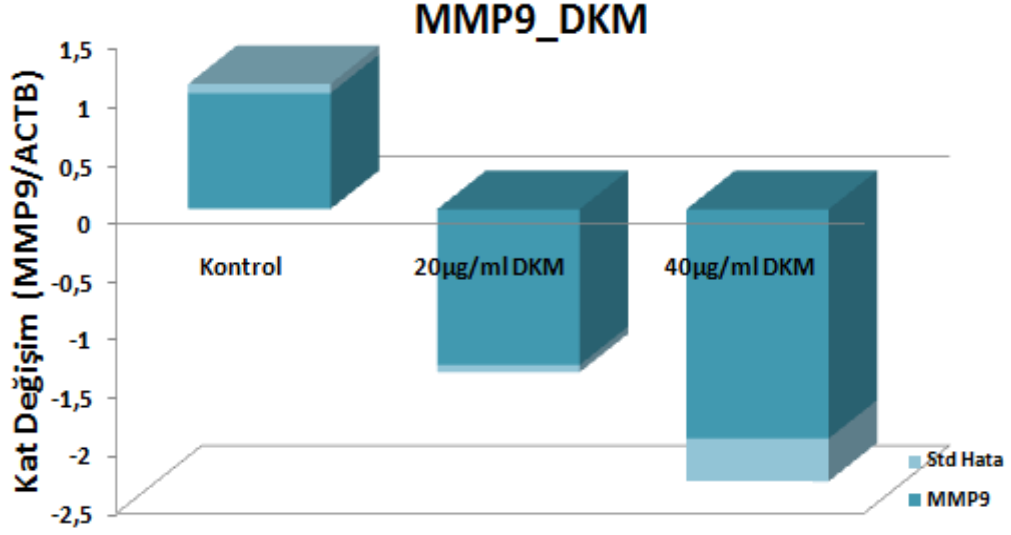
Şekil 27. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



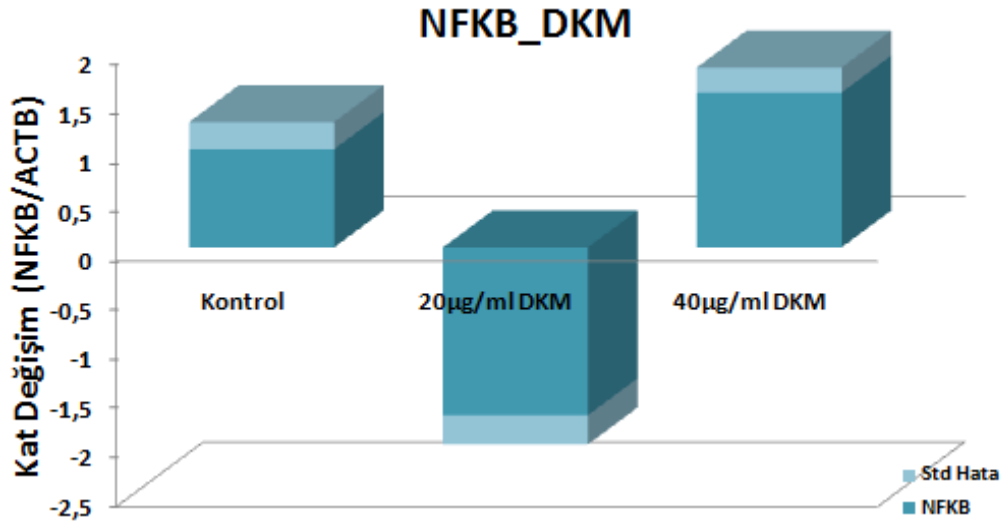
Şekil 28. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) IL6 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



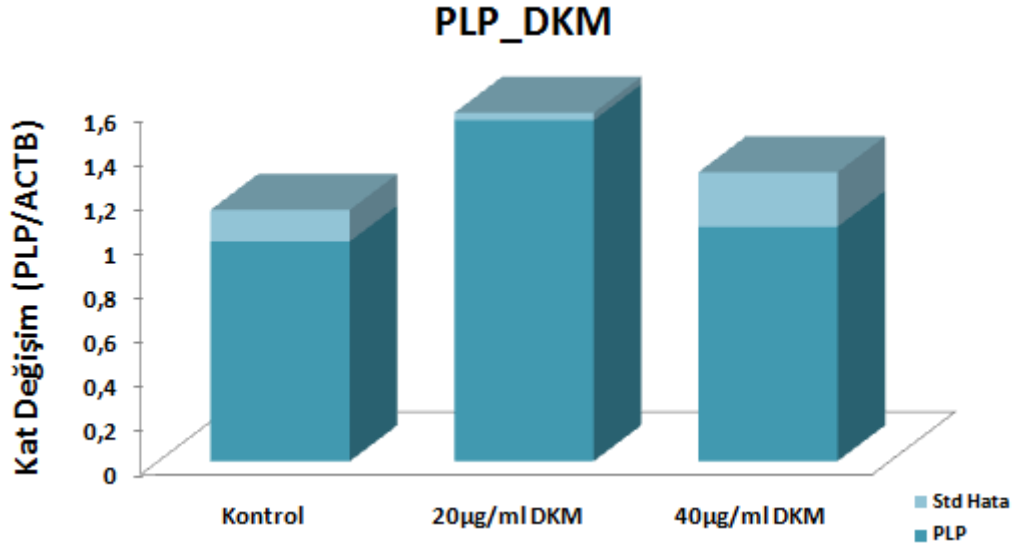
Şekil 29. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MAG mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



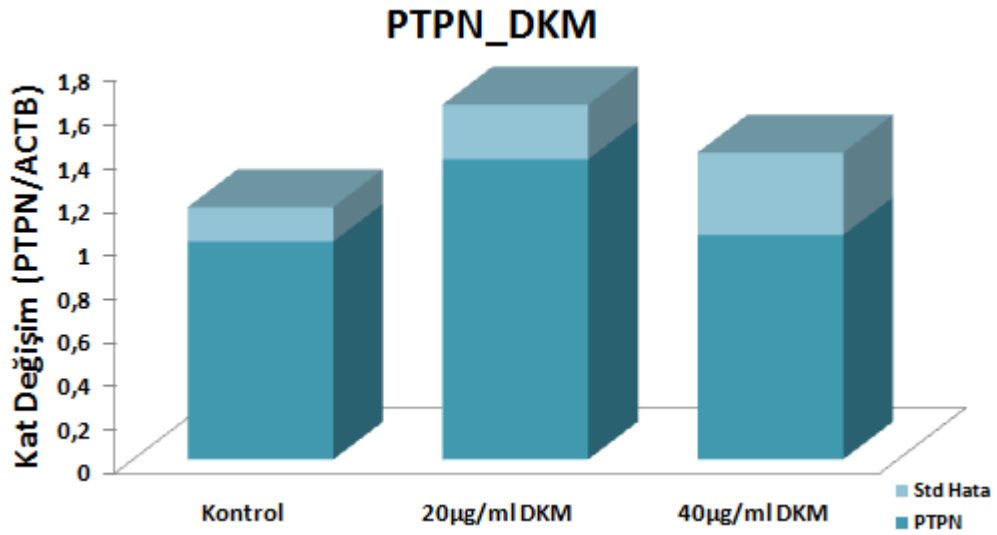
Şekil 30. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



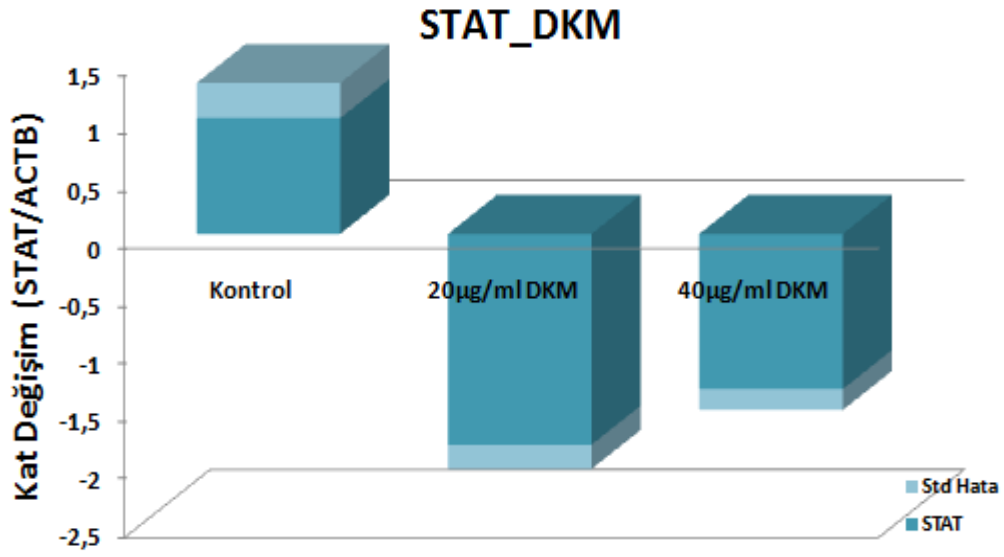
Şekil 31. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) NFKB mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



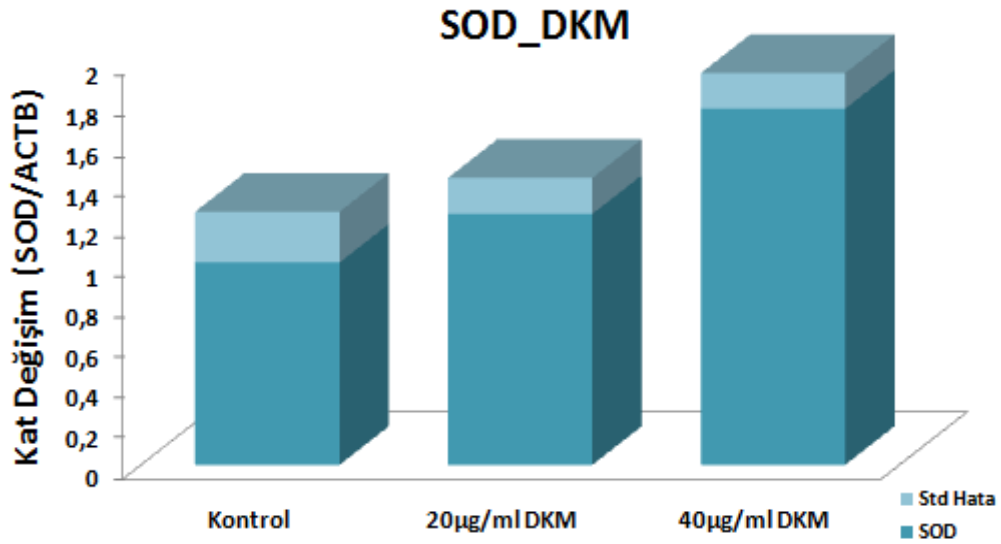
Şekil 32. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PLP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



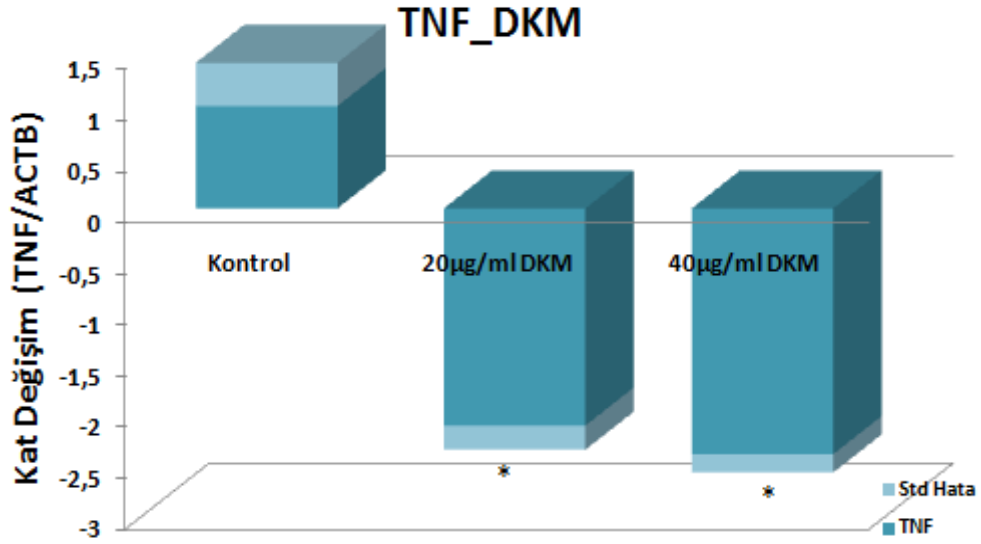
Şekil 33. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PTPN mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



Şekil 34. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) STAT mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



Şekil 35. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) SOD mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.

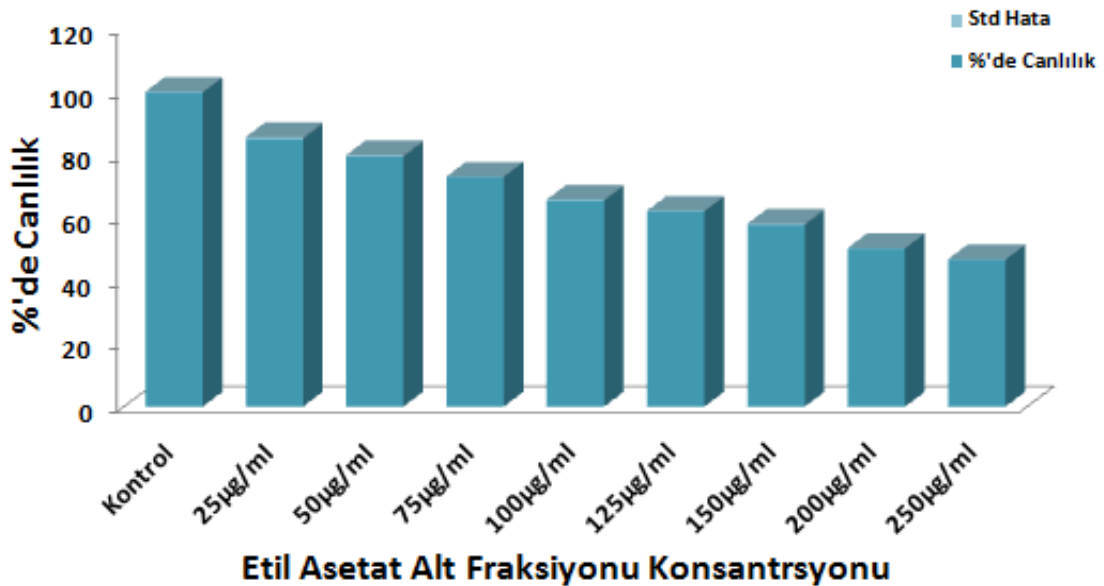


Şekil 36. Diklorometan alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) TNF mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

3.4.3 SH-SY5Y Hücrelerinde Etil Asetat Alt Fraksiyonu Çalışmaları

3.4.3.1 Etil Asetat Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda Etil Asetat alt fraksiyonu %20 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya (1x10³/kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda Etil Asetat alt fraksiyonunun hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 204).

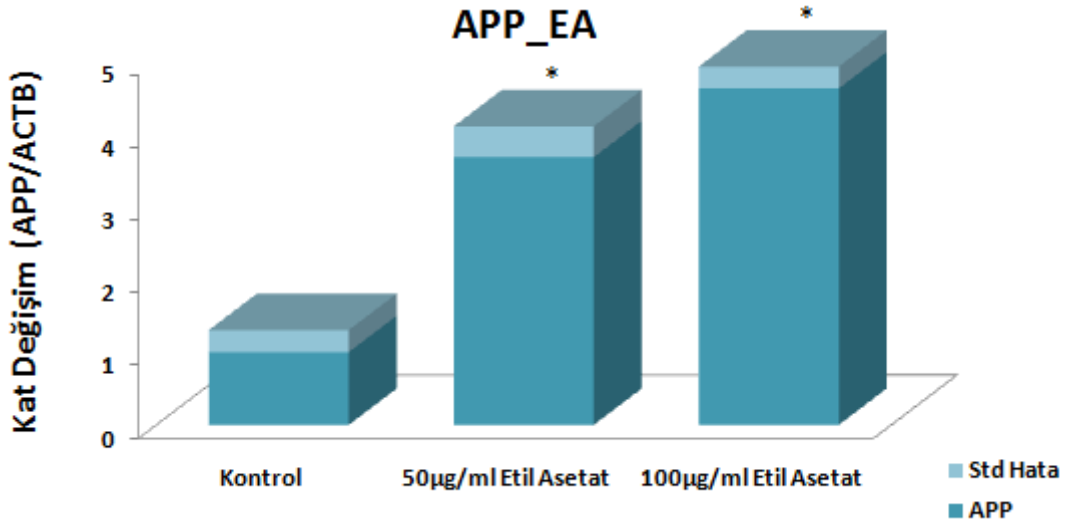


Şekil 37. Etil Asetat alt fraksiyonunun hücre canlılığına etkisi.

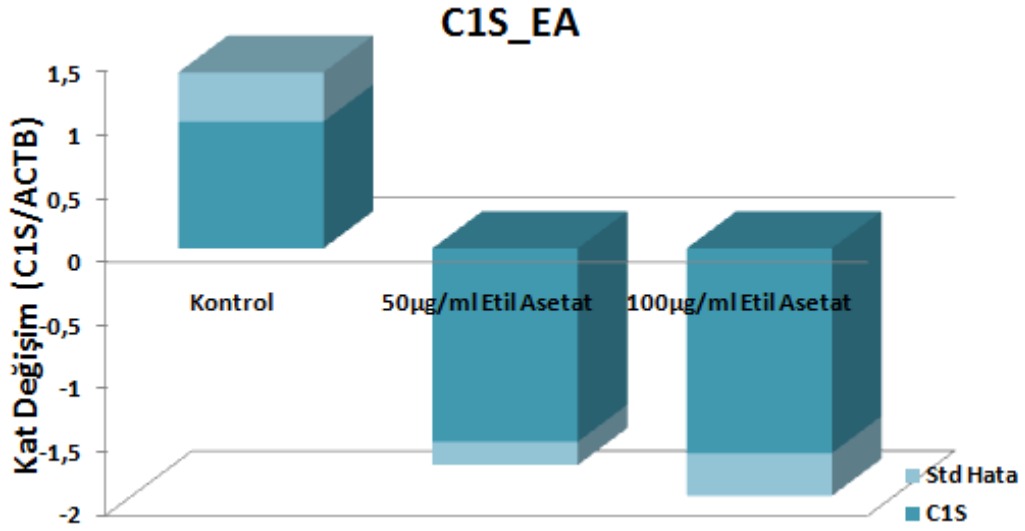
Bu sitotoksisite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 50µg/ml ve 100µg/ml Etil asetat konsatrasyonunun kullanılmasına karar verildi.

3.4.3.2 Etil Asetat Alt Fraksiyonunun SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi

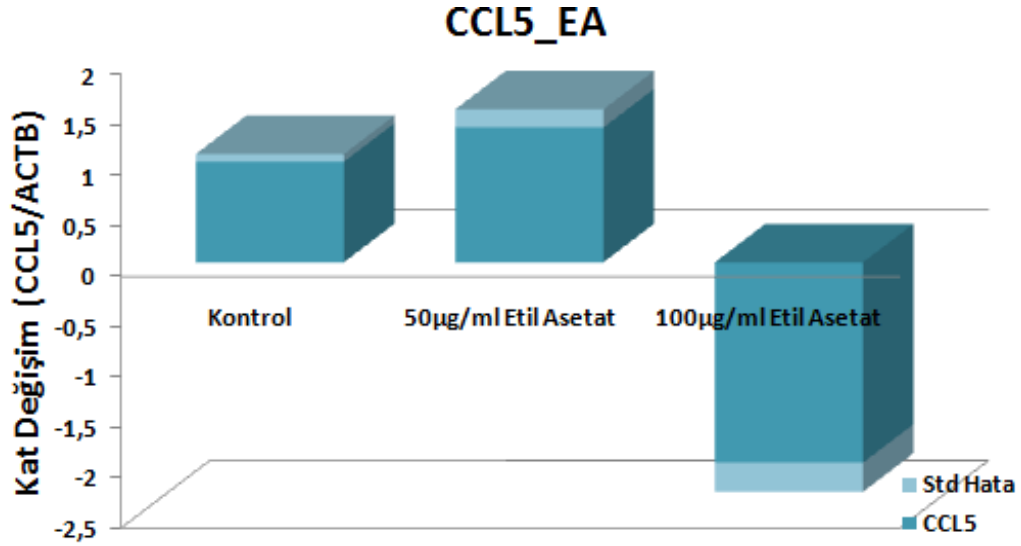
Sitotoksisite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücelere bu belirlenen dolarda Etil asetat alt fraksiyonu uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir (Şekil 205-221).



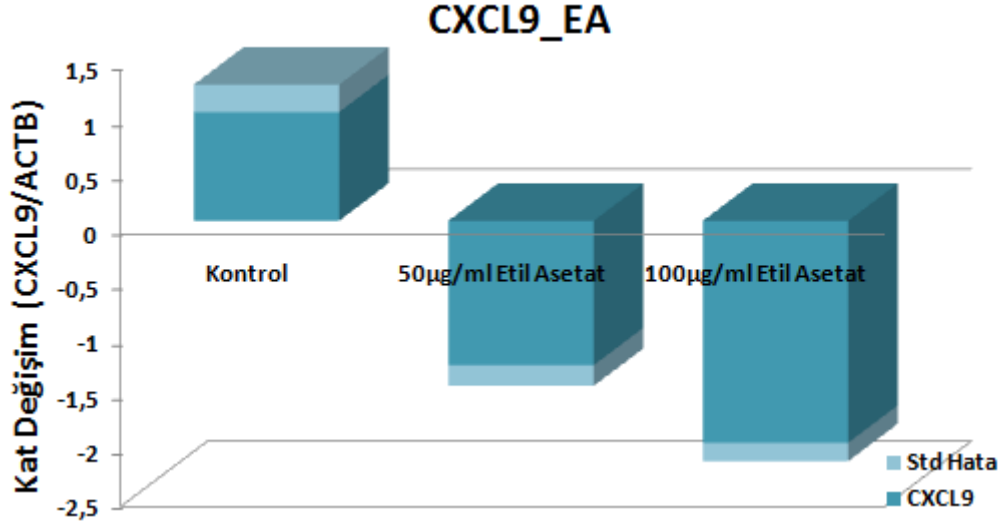
Şekil 38. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) APP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



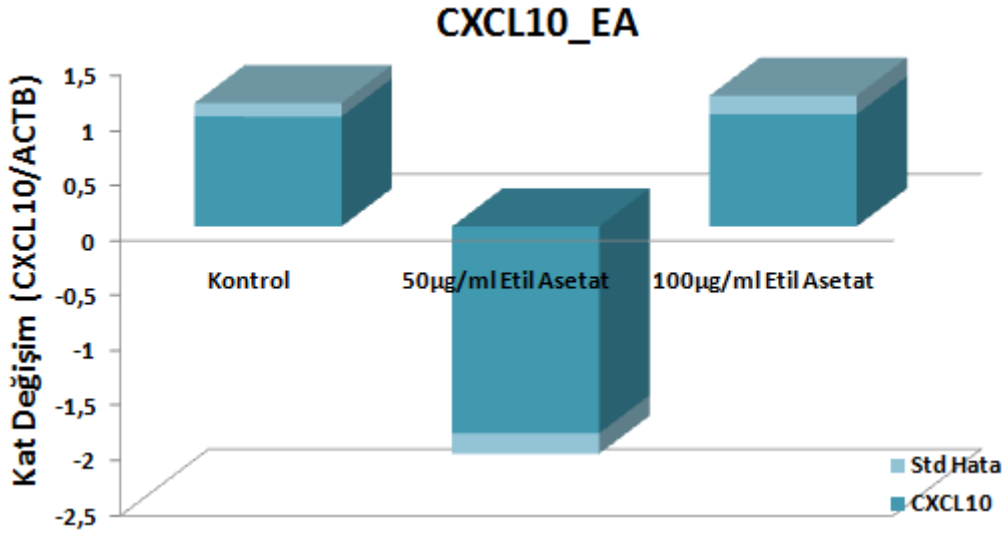
Şekil 39. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) C1S mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



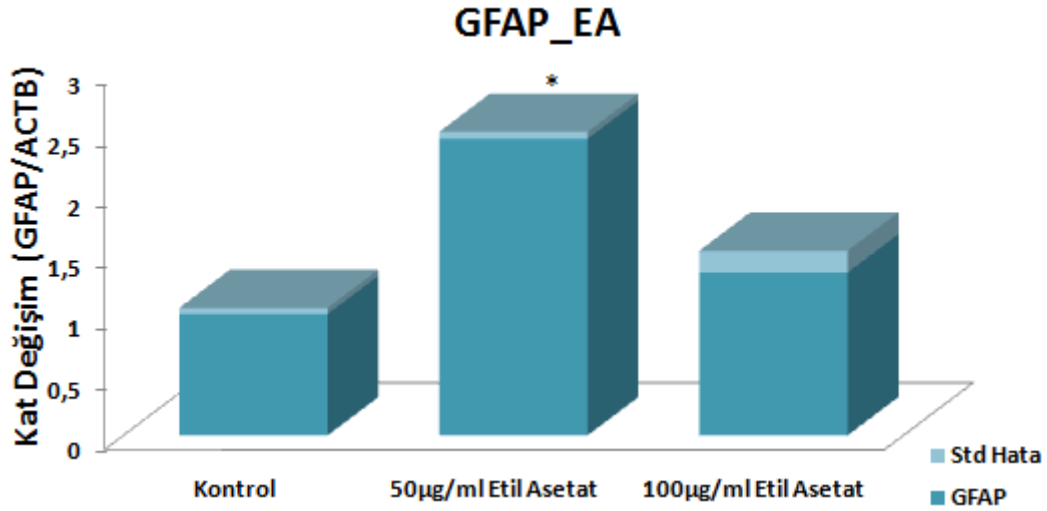
Şekil 40. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



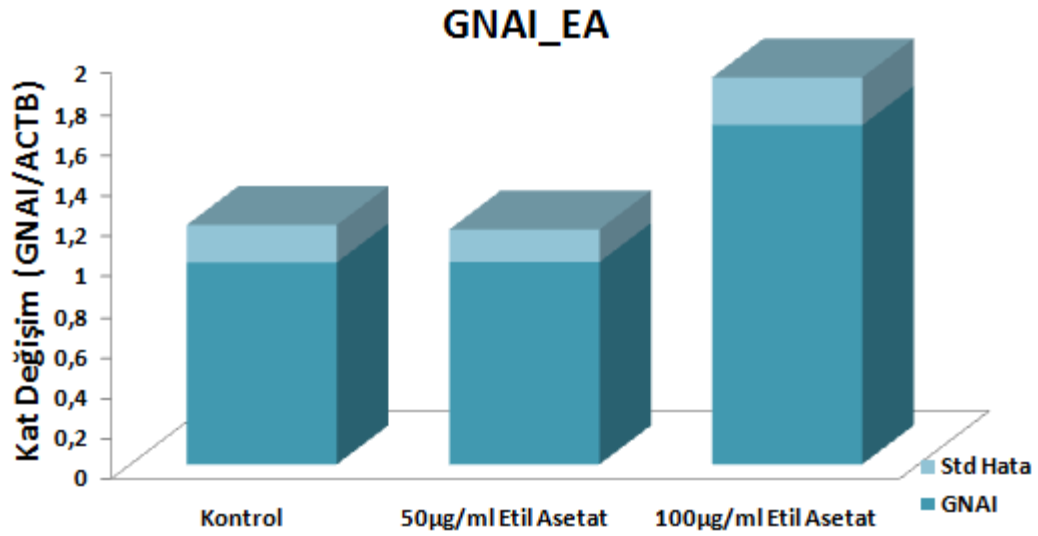
Şekil 41. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



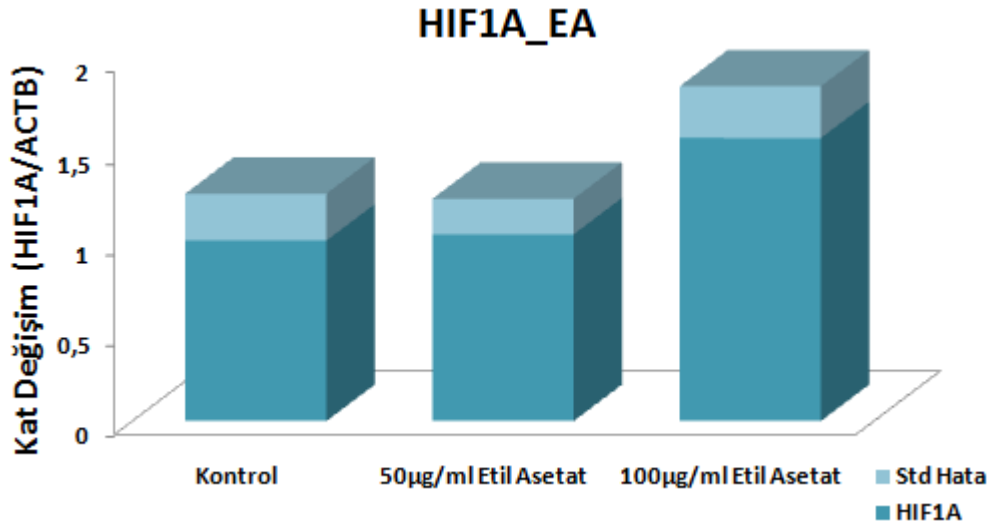
Şekil 42. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



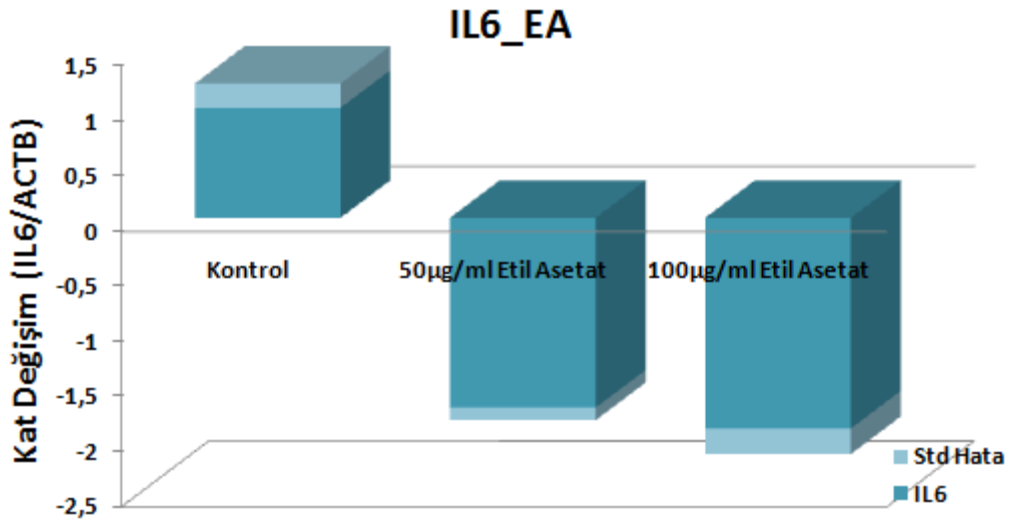
Şekil 43. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GFAP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



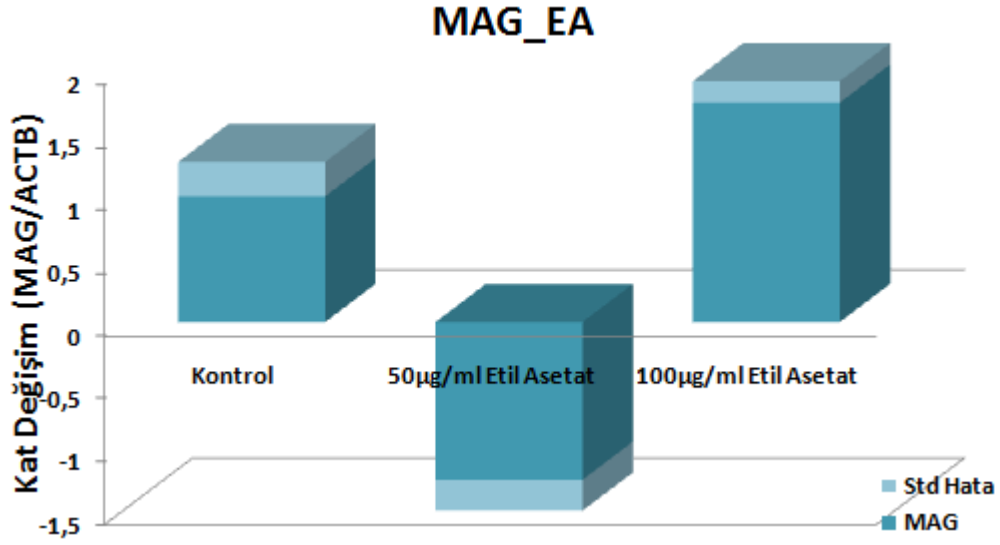
Şekil 44. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GNAI mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



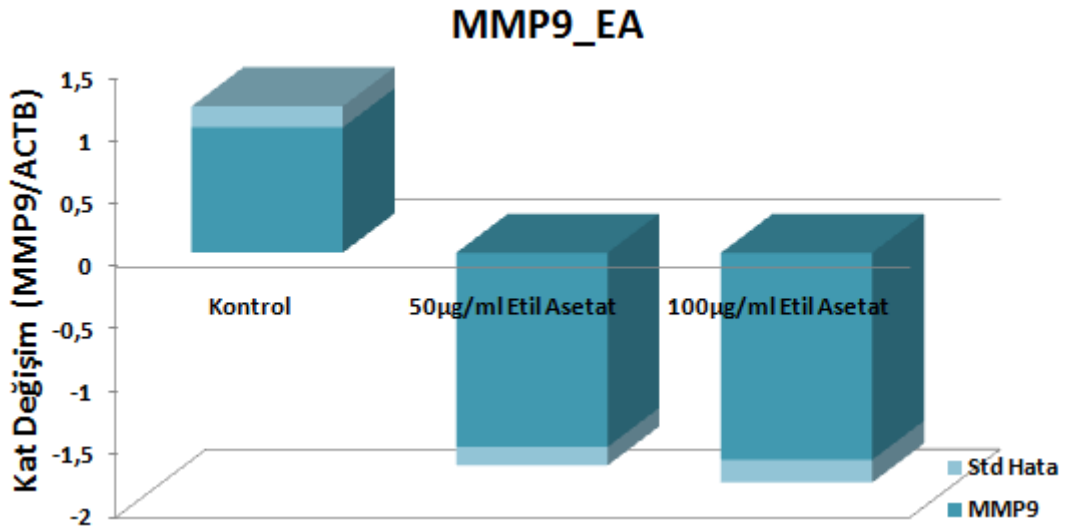
Şekil 45. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



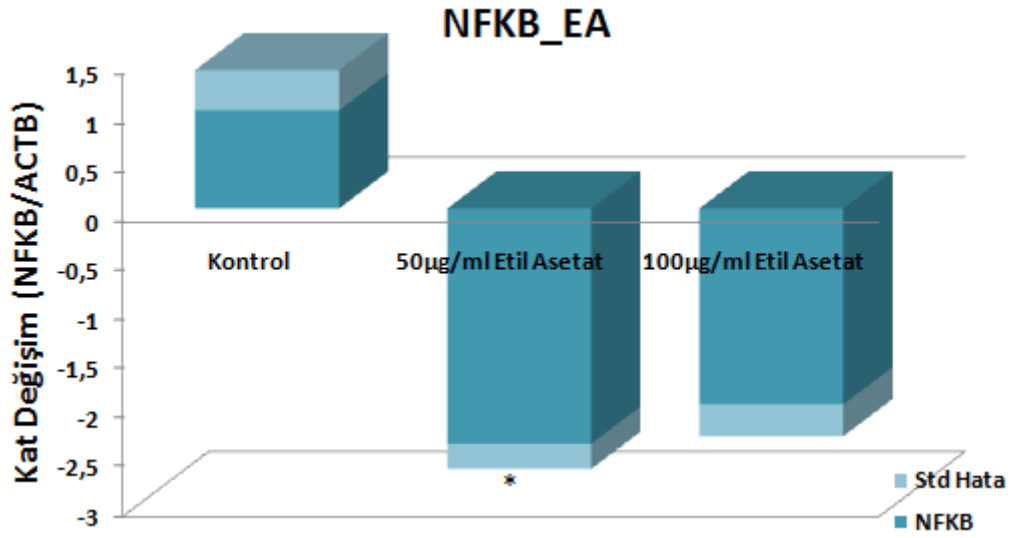
Şekil 46. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) IL6 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



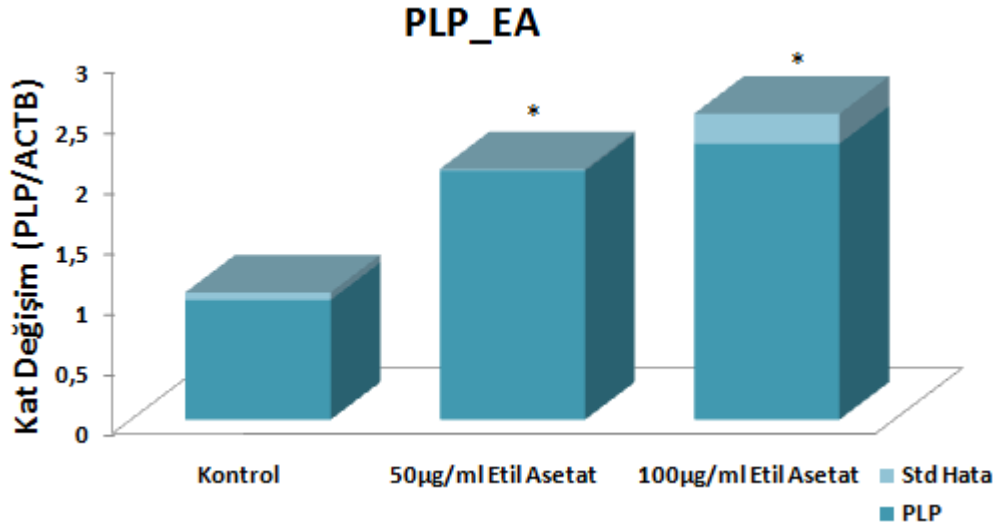
Şekil 47. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MAG mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



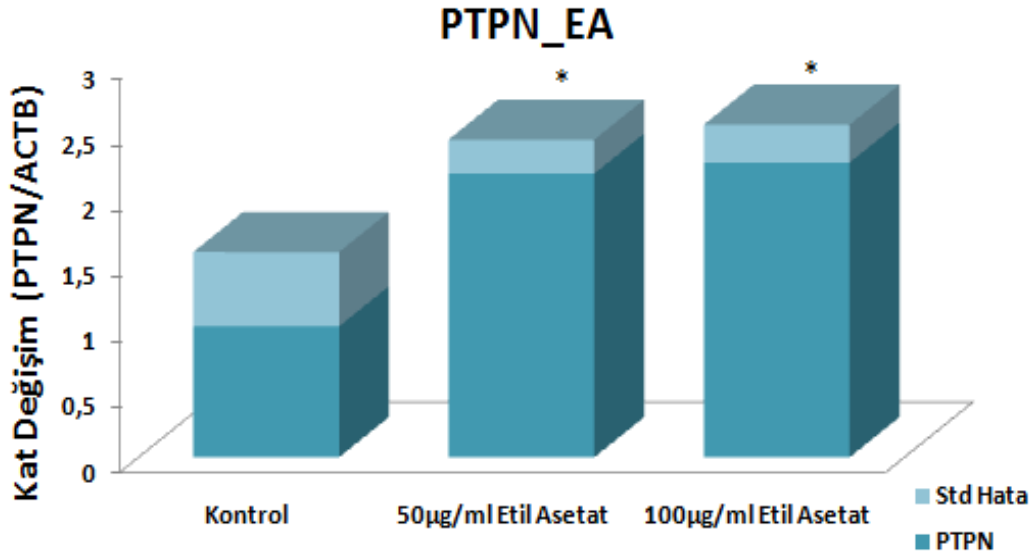
Şekil 48. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



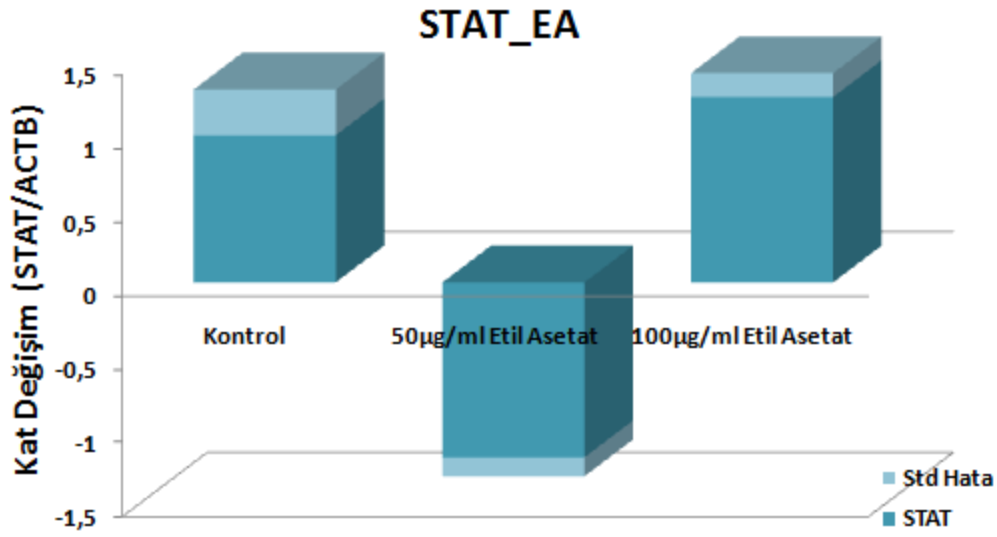
Şekil 49. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) NFKB mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



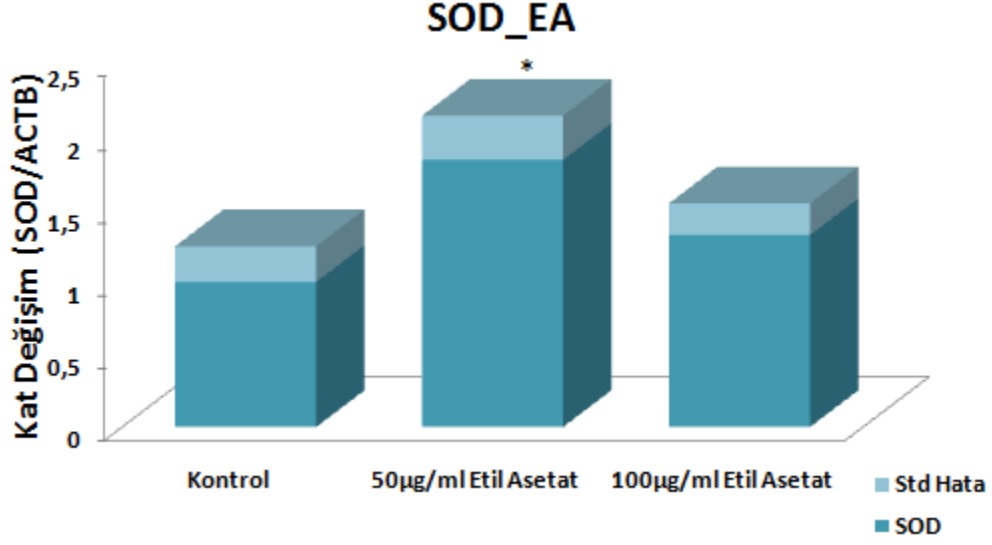
Şekil 50. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PLP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



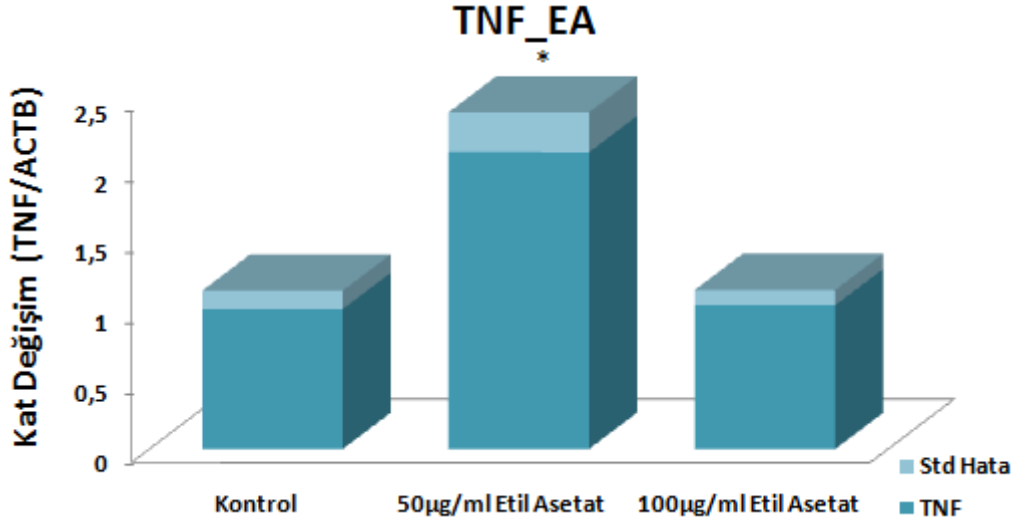
Şekil 51. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PTPN mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



Şekil 52. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) STAT mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



Şekil 53. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) SOD mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



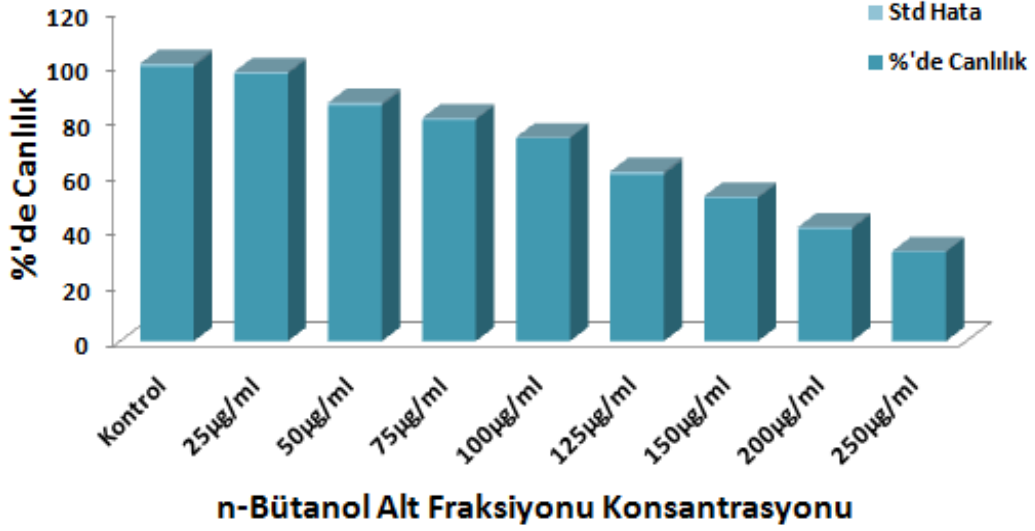
Şekil 54. Etil asetat alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) TNF mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

3.4.4 SH-SY5Y Hücrelerinde n-Bütanol Alt Fraksiyonu Çalışmaları

3.4.4.1 n-Bütanol Sitotoksisite Çalışması

Sitotoksisite testi için değişik konsantrasyonda n-bütanol alt fraksiyonu %20 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya (1x10³/kuyucuk)

ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda n-bütanol alt fraksiyonunun hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 222).

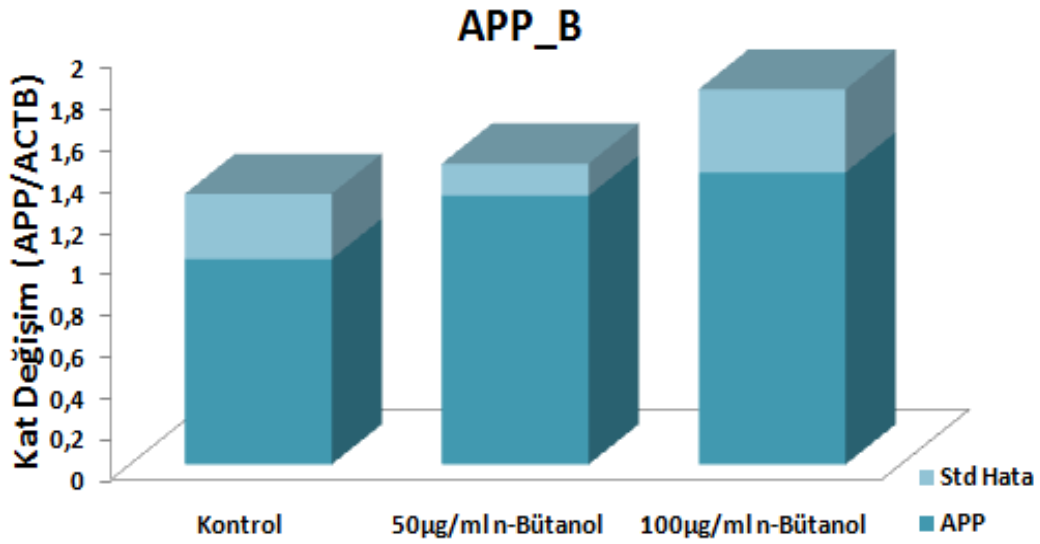


Şekil 55. n-Bütanol alt fraksiyonunun hücre canlılığına etkisi.

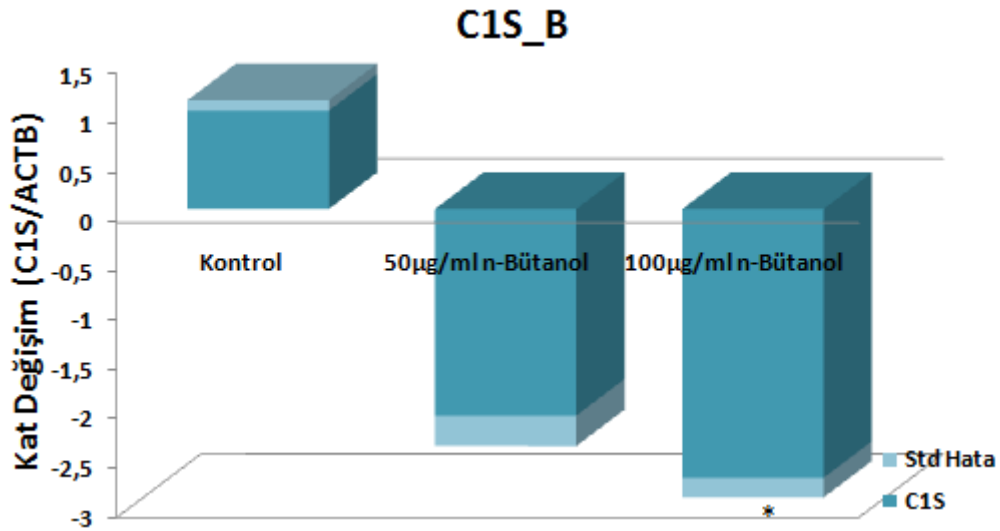
Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 50µg/ml ve 100µg/ml n-bütanol konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi.

3.4.4.2 n-Bütanol Alt Fraksiyonunun SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi

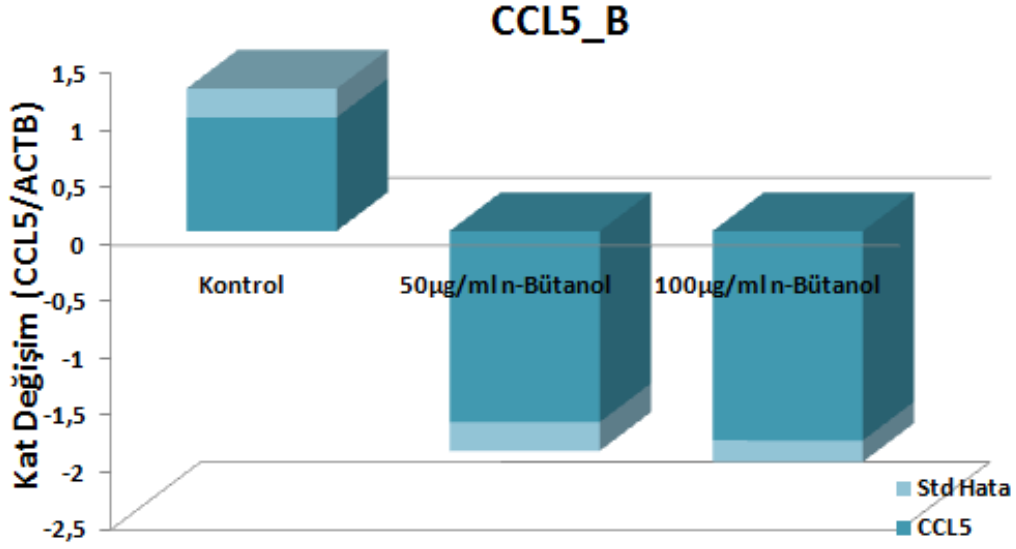
Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücrelere bu belirlenen dolarda n-bütanol alt fraksiyonu uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir (Şekil 223-239).



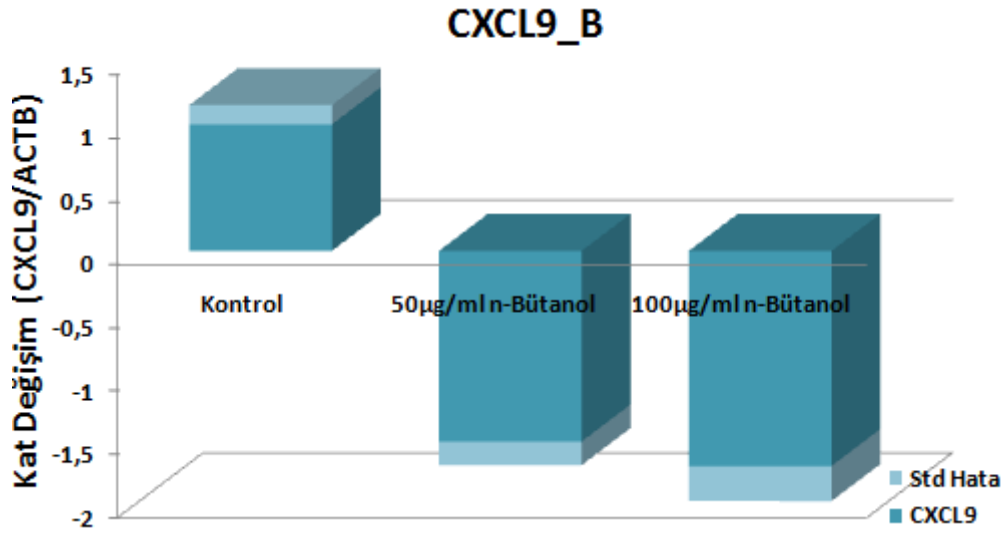
Şekil 56. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) APP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



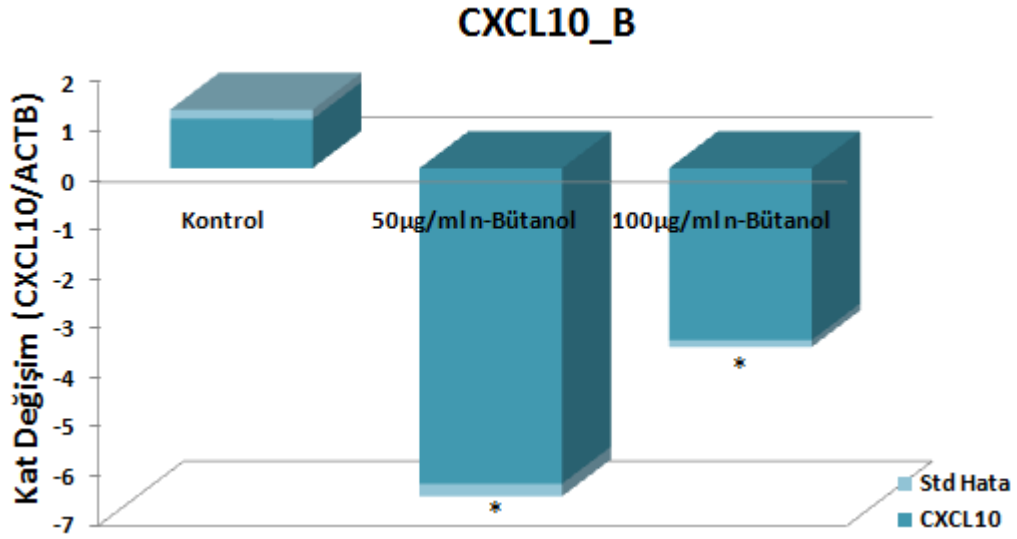
Şekil 57. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) C1S mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



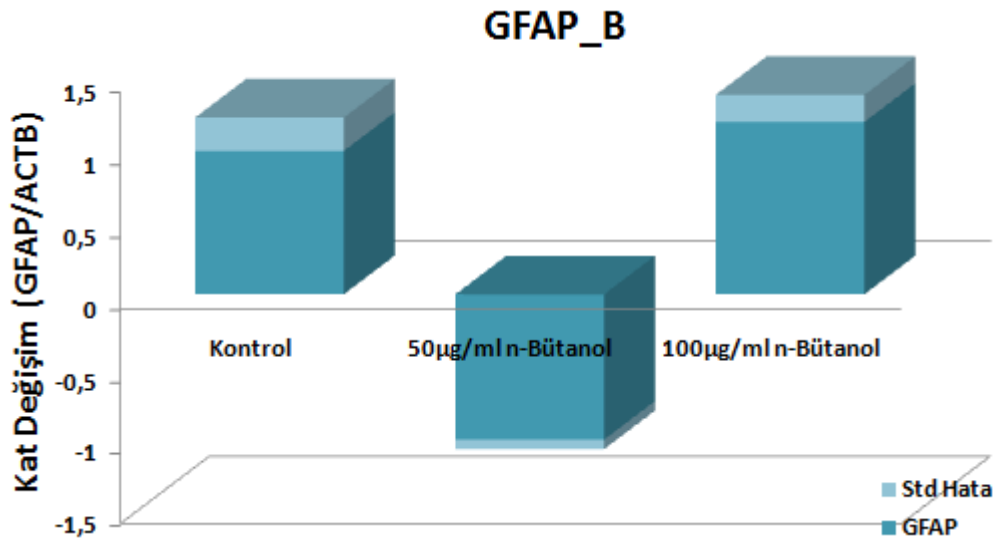
Şekil 58. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



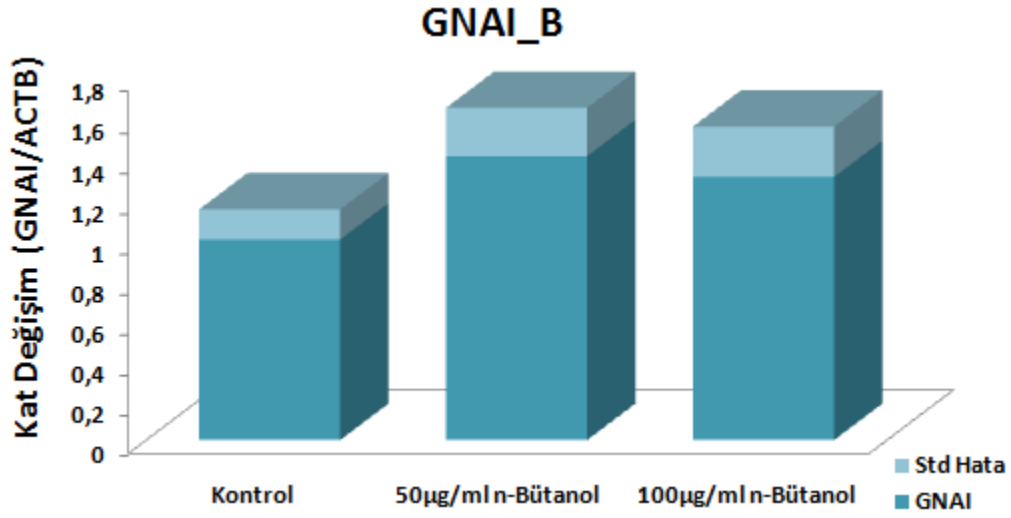
Şekil 59. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



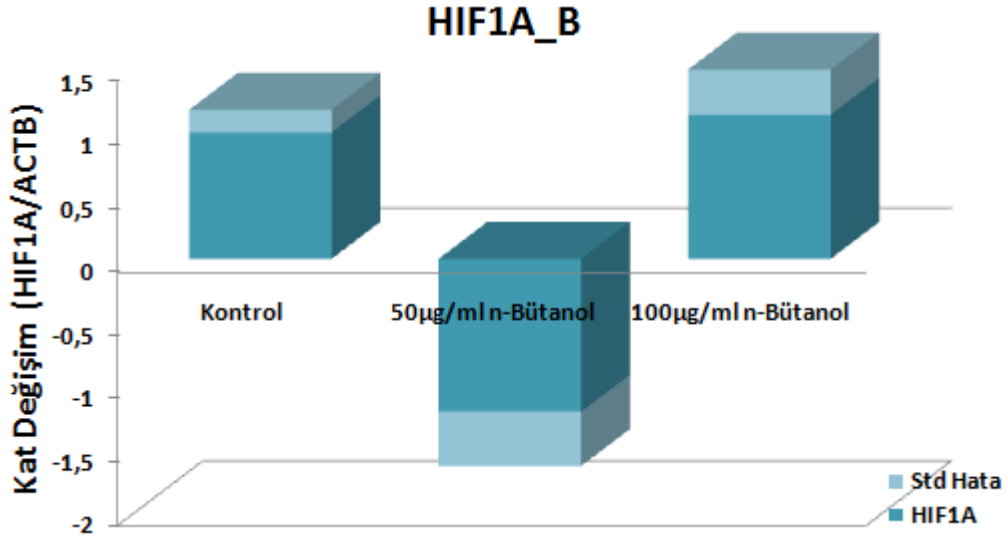
Şekil 60. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



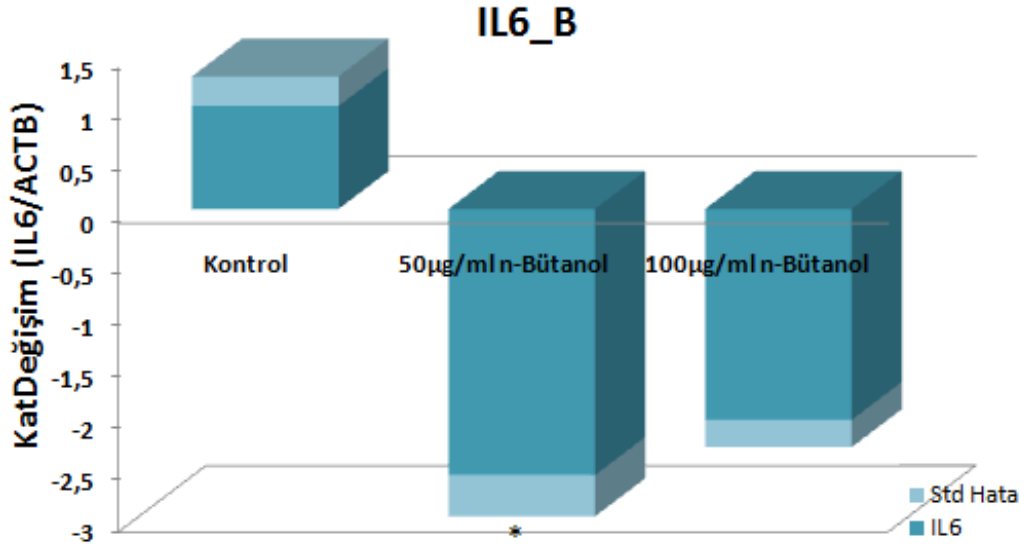
Şekil 61. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GFAP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



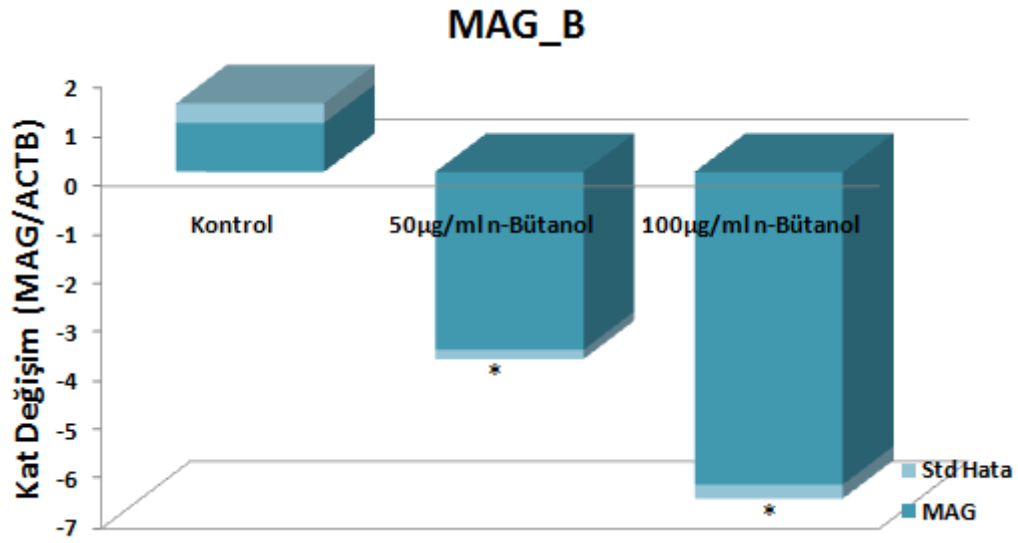
Şekil 62. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GNAI mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



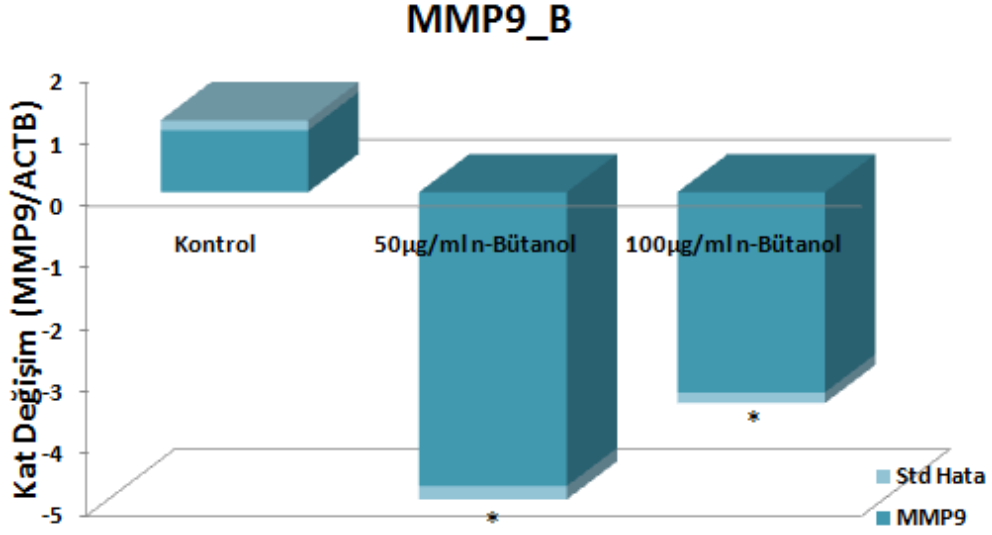
Şekil 63. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



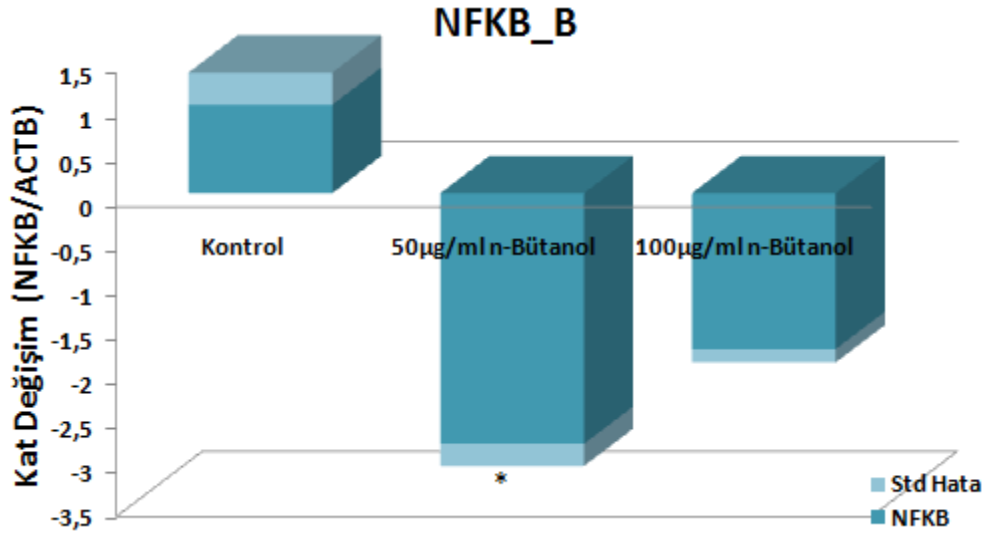
Şekil 64. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) IL6 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



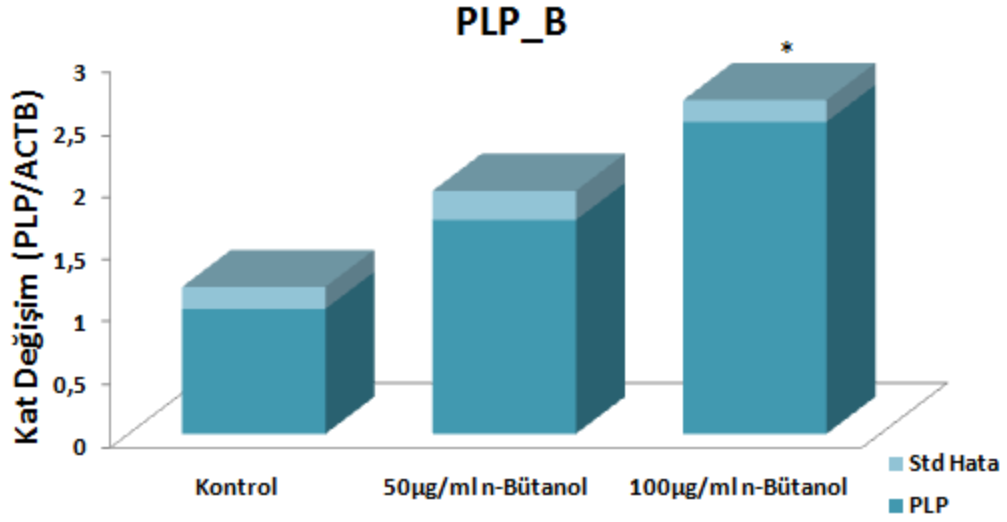
Şekil 65. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MAG mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



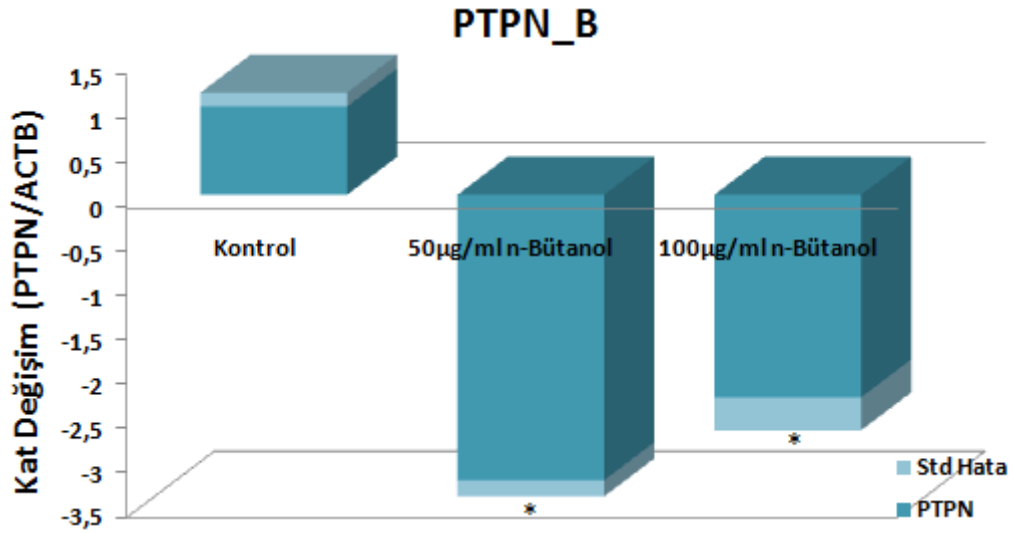
Şekil 66. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



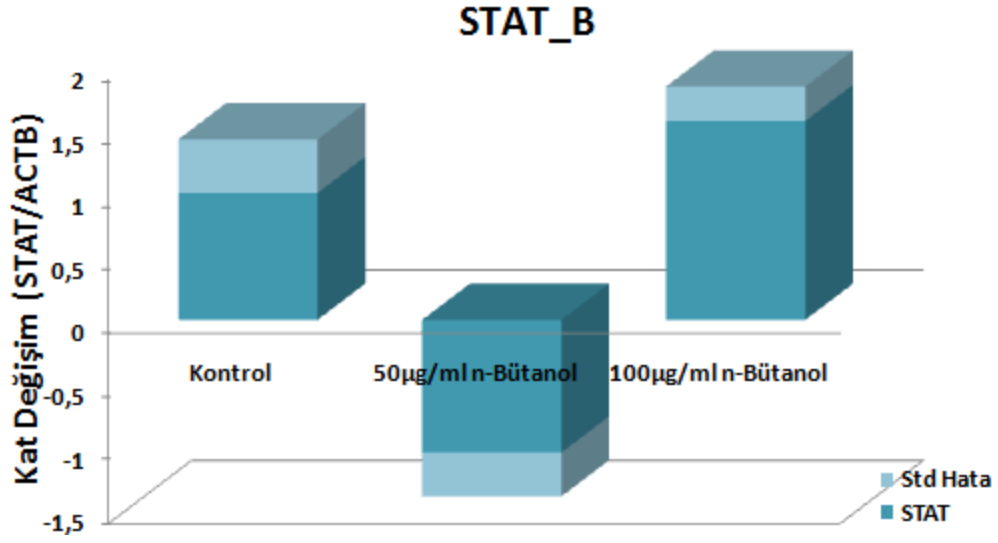
Şekil 67. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) NFKB mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



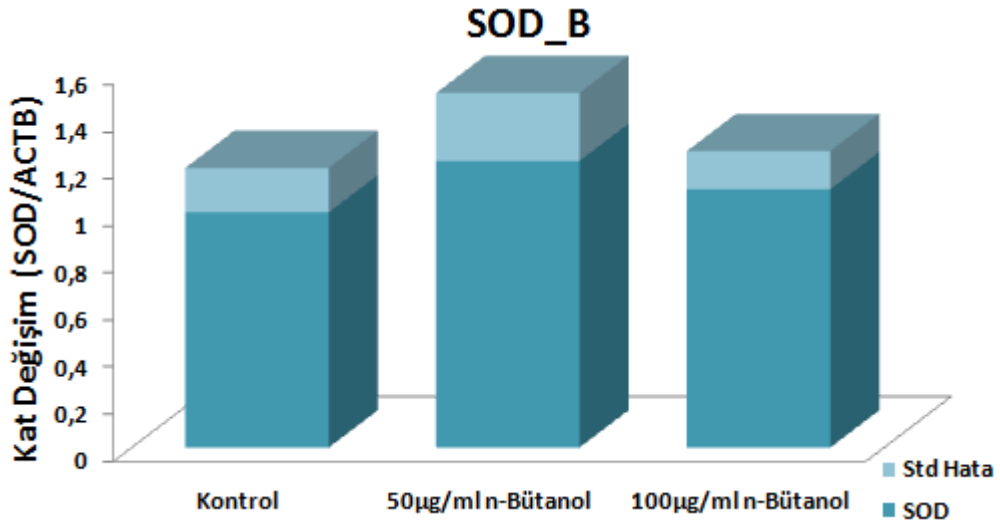
Şekil 68. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PLP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



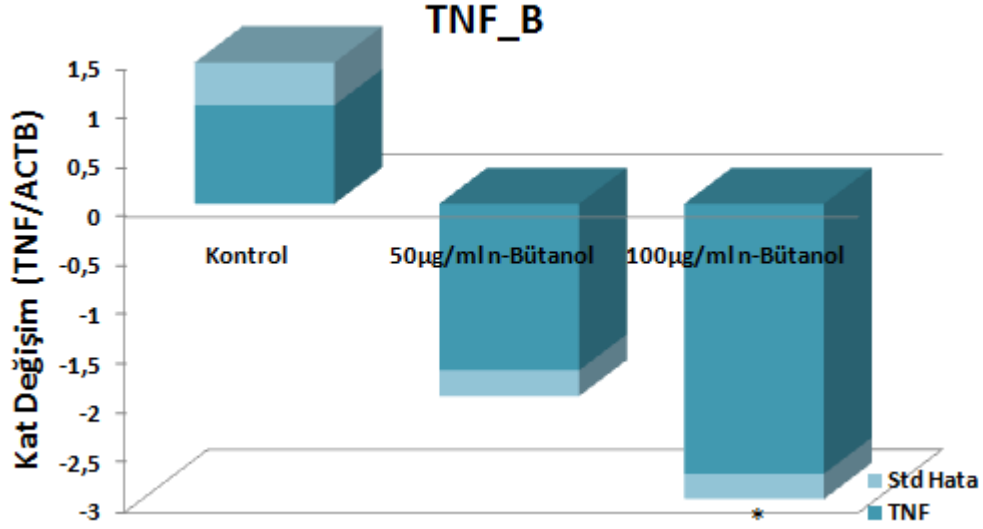
Şekil 69. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PTPN mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



Şekil 70. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) STAT mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



Şekil 71. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) SOD mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



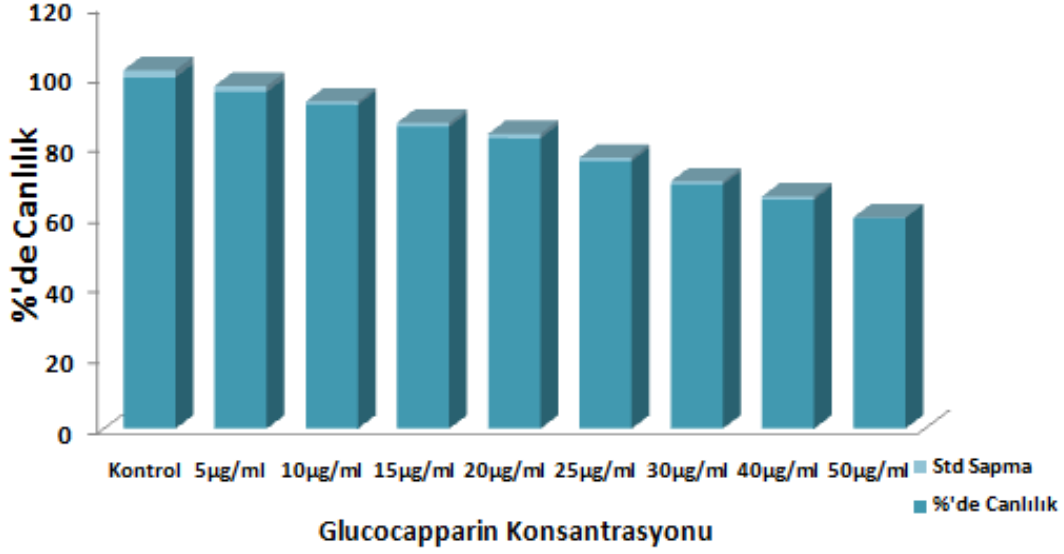
Şekil 72. n-Bütanol alt fraksiyonunun insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) TNF mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

3.4.5 SH-SY5Y Hücrelerinde İzole Edilen Saf Maddelerin Çalışmaları

3.4.5.1 SH-SY5Y Hücrelerinde Glucocapparin Aktif Maddesi Çalışmaları

3.4.5.1.1 Glucocapparin Sitotoksisite Çalışması

Sitotoksisite testi için değişik konsantrasyonda glucocapparin (GC) %20 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya (1×10^3 /kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda GC'in hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 240).

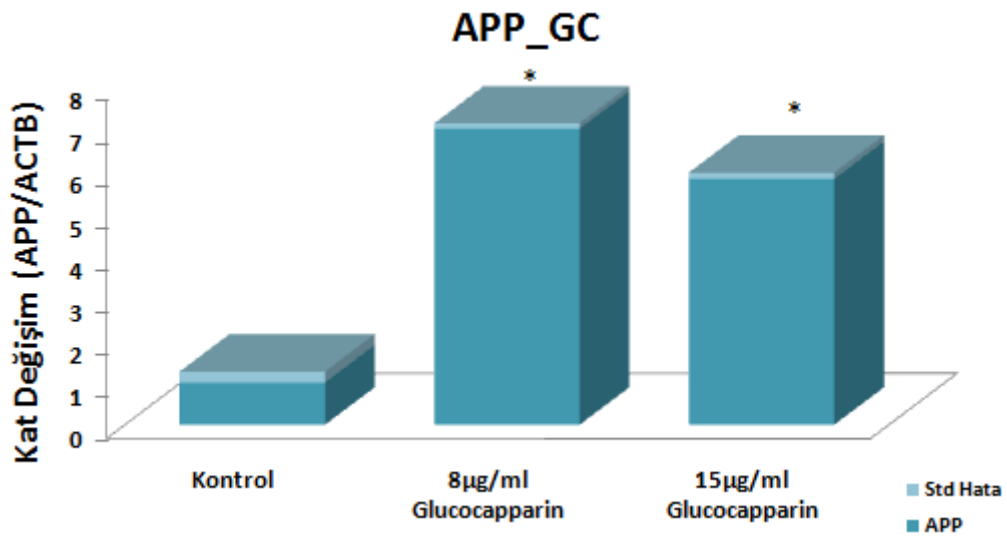


Şekil 73. Glucocapparinin hücre canlılığına etkisi.

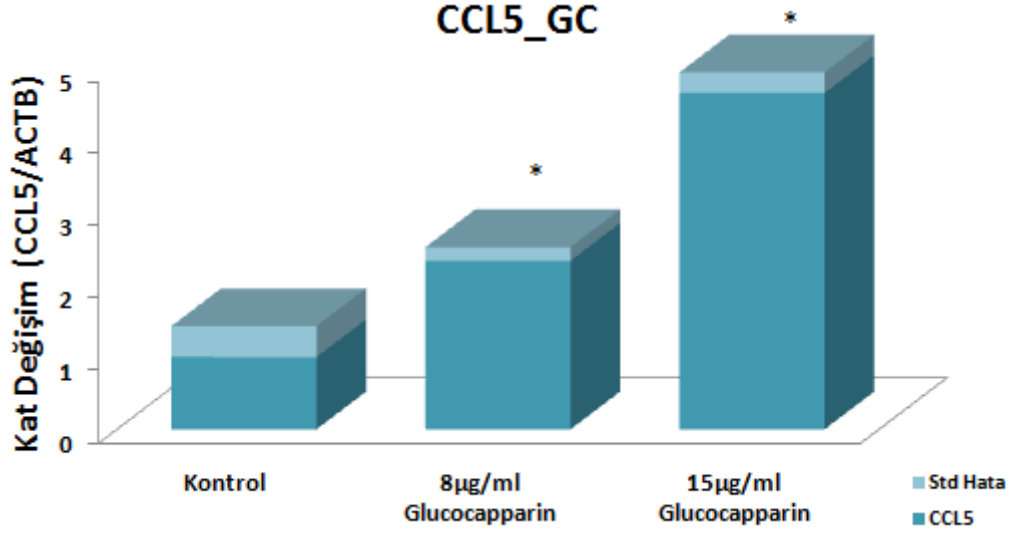
Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 8 µg/ml ve 15 µg/ml GC konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi.

3.4.5.1.2 Glucocapparin Aktif Maddesinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi

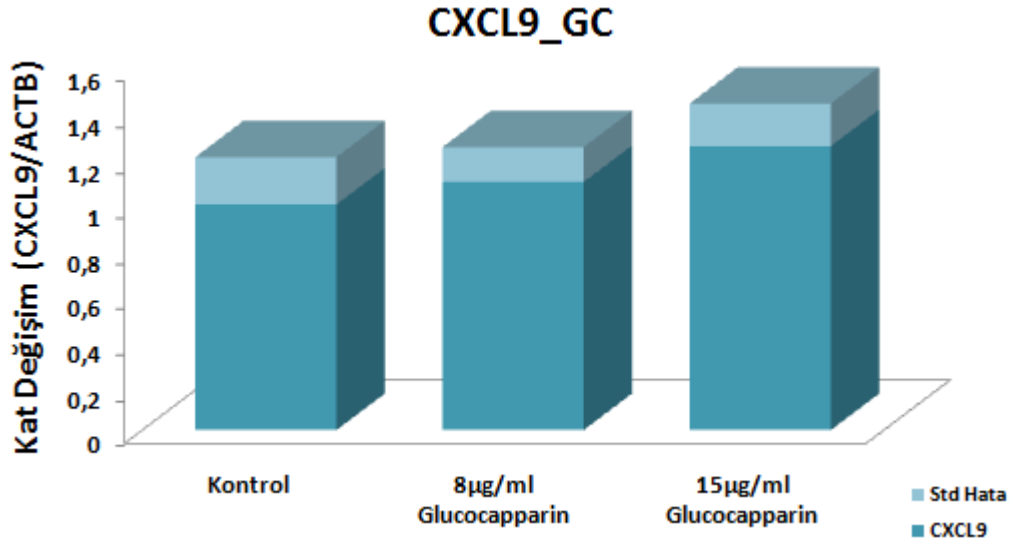
Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücelere bu belirlenen dolarda GC uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir (Şekil 241-255).



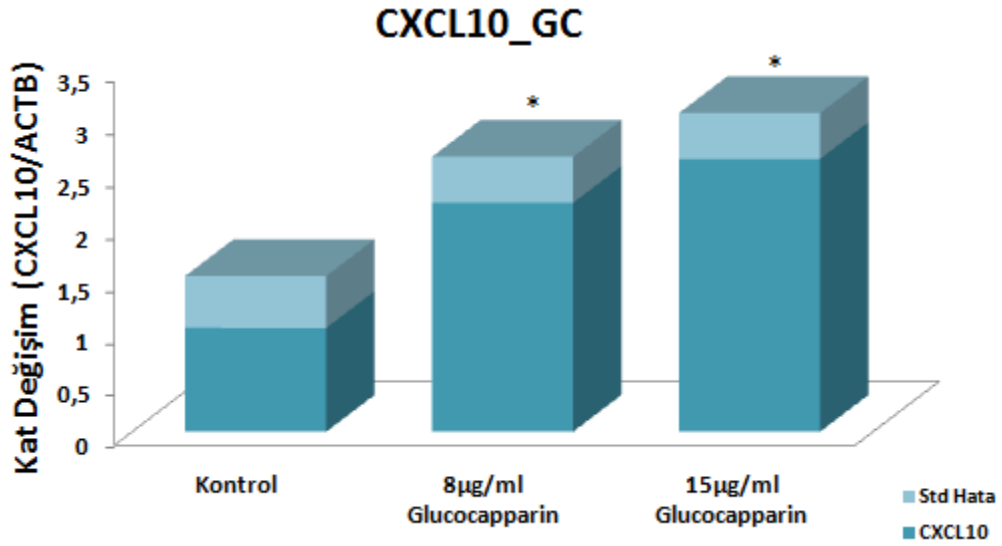
Şekil 74. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) APP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



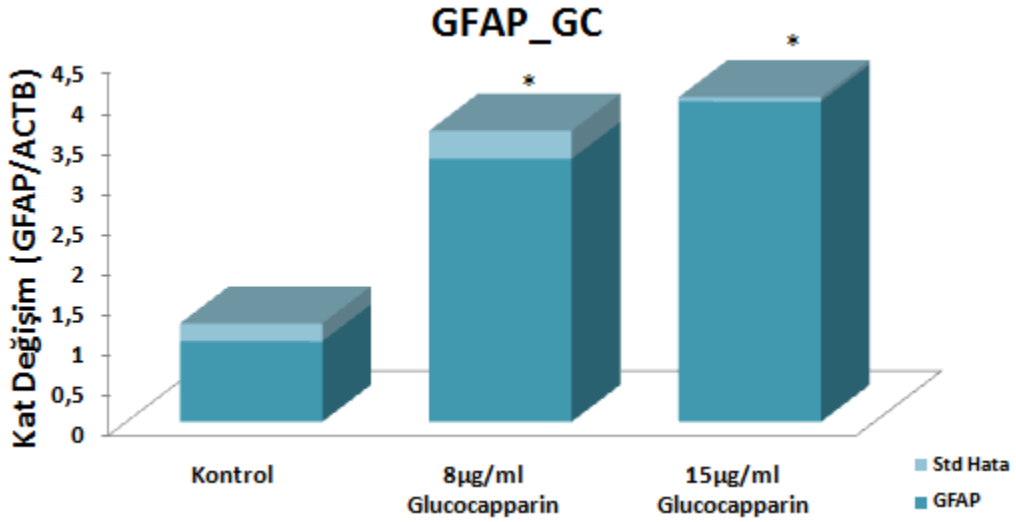
Şekil 75. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



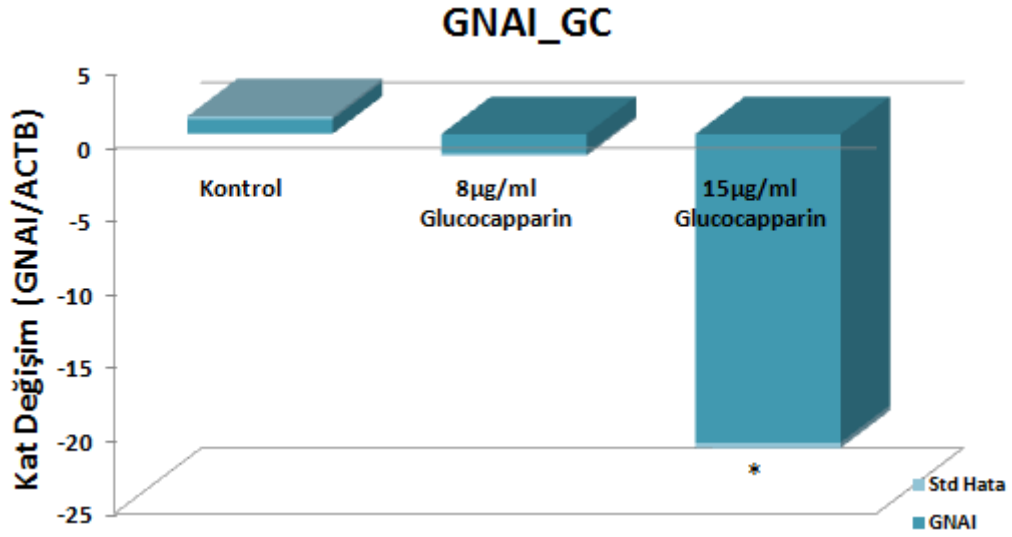
Şekil 76. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



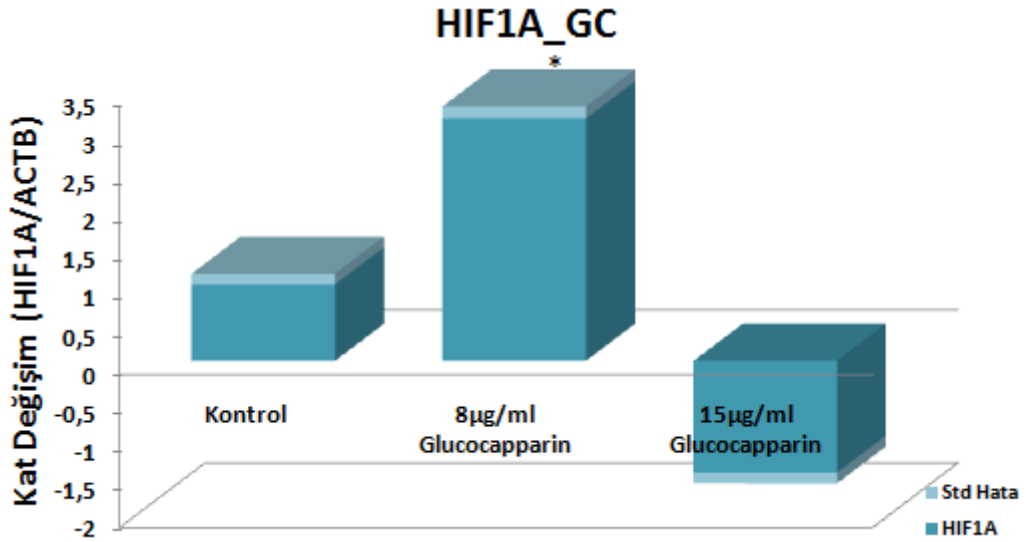
Şekil 77. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



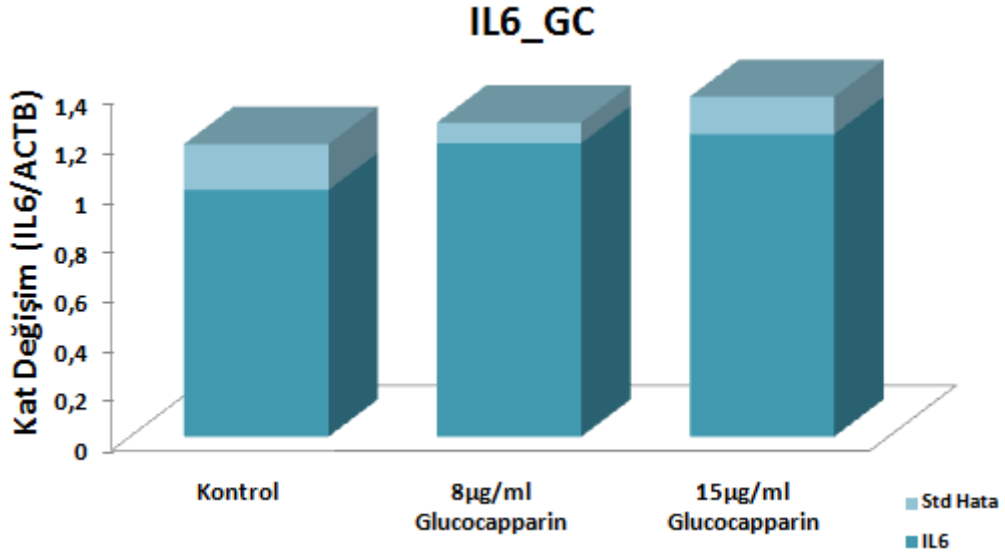
Şekil 78. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GFAP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



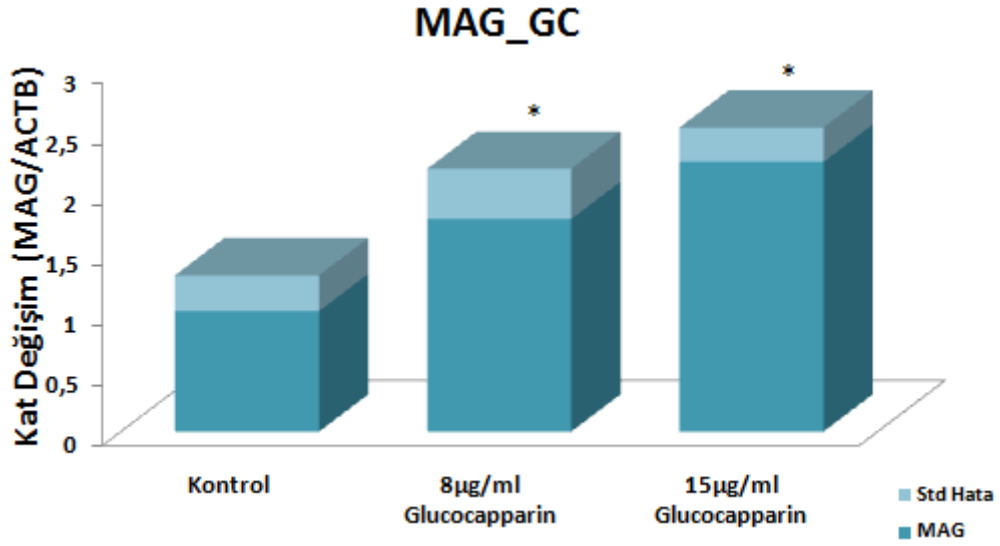
Şekil 79. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GNAImRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



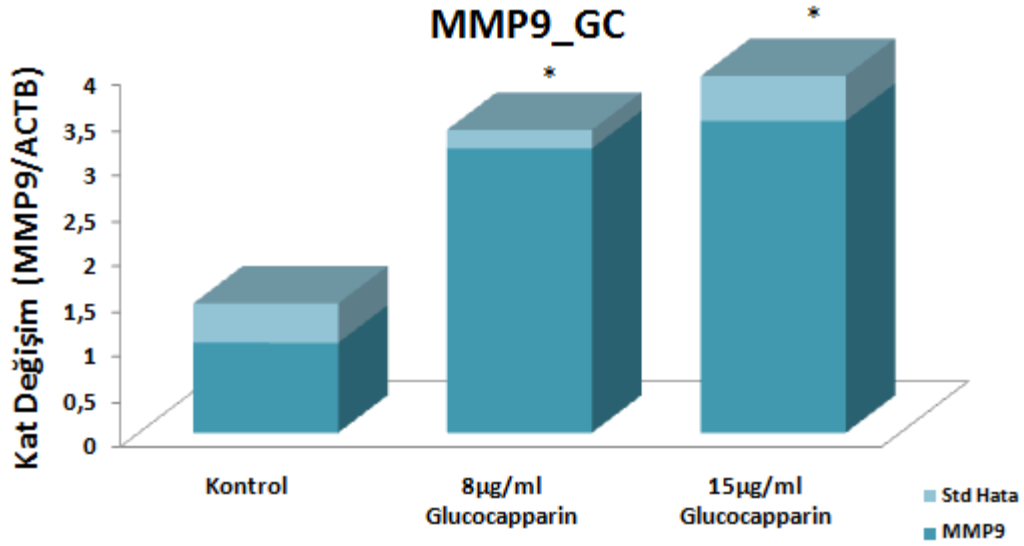
Şekil 80. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



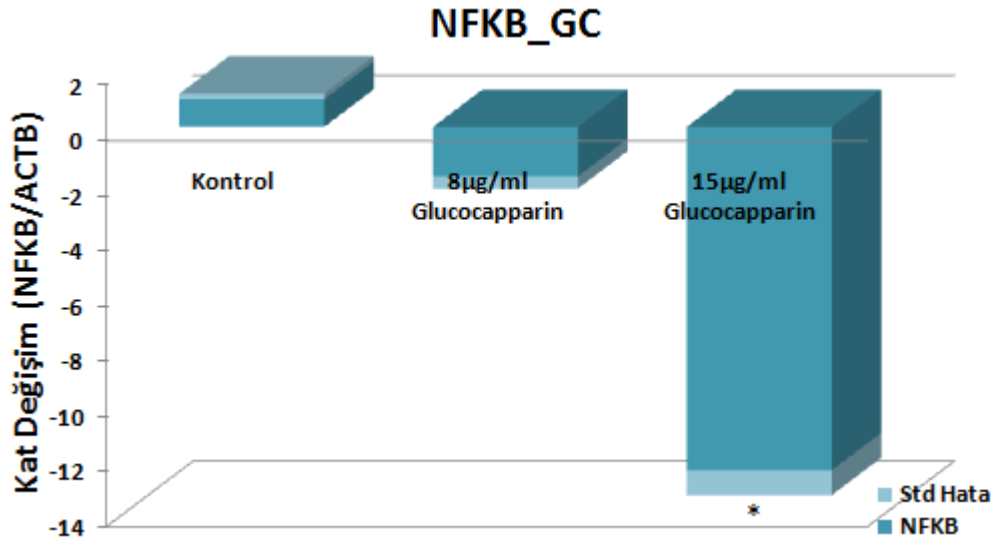
Şekil 81. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) IL6 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



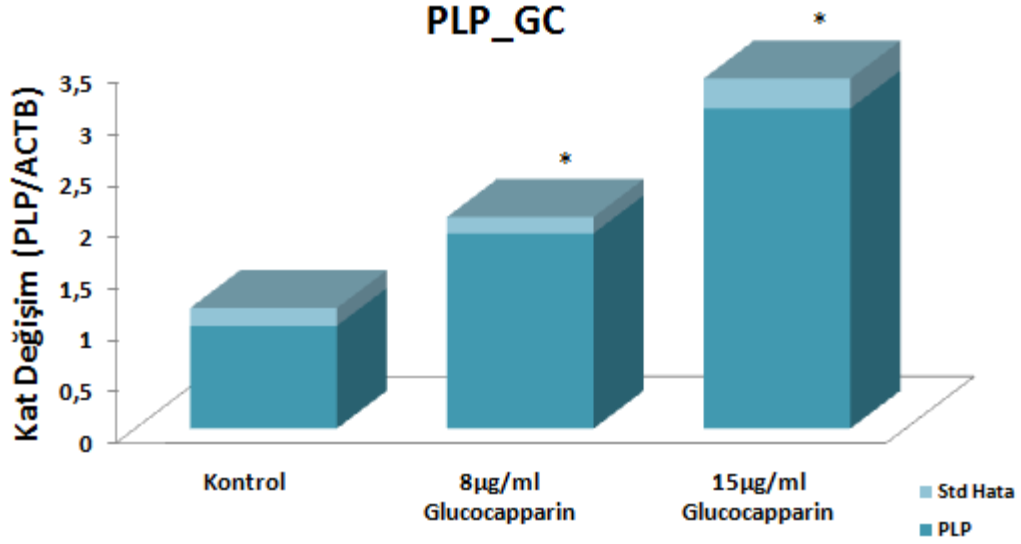
Şekil 82. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MAG mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



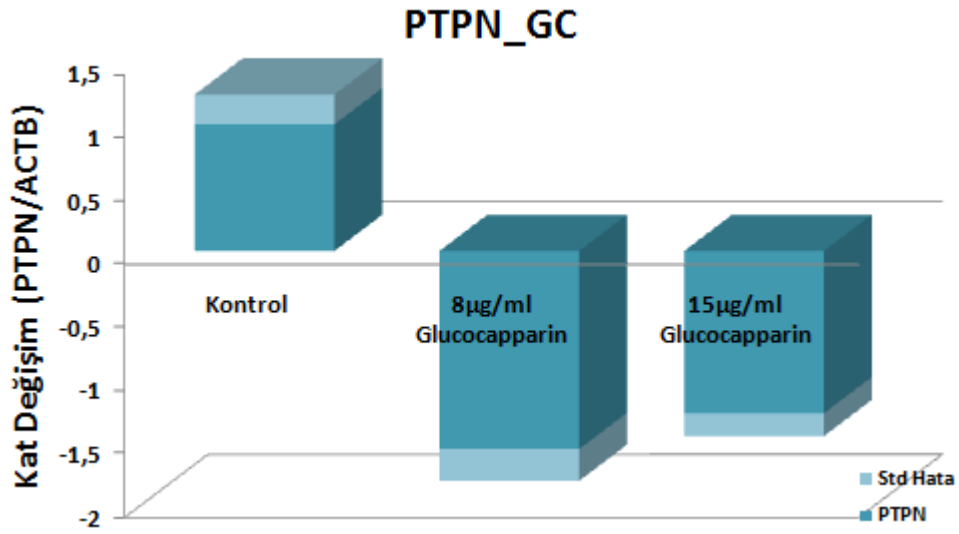
Şekil 83. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



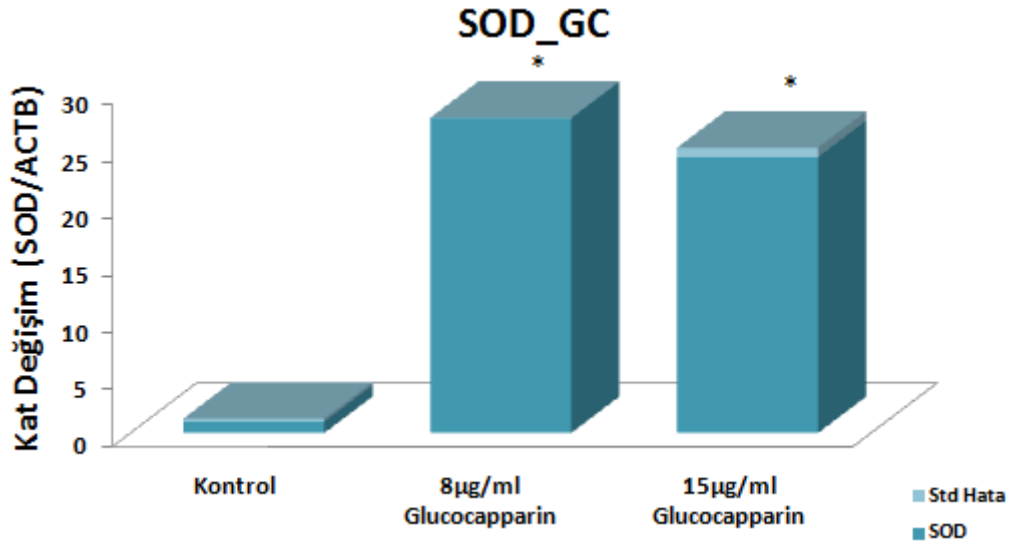
Şekil 84. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) NFKB mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



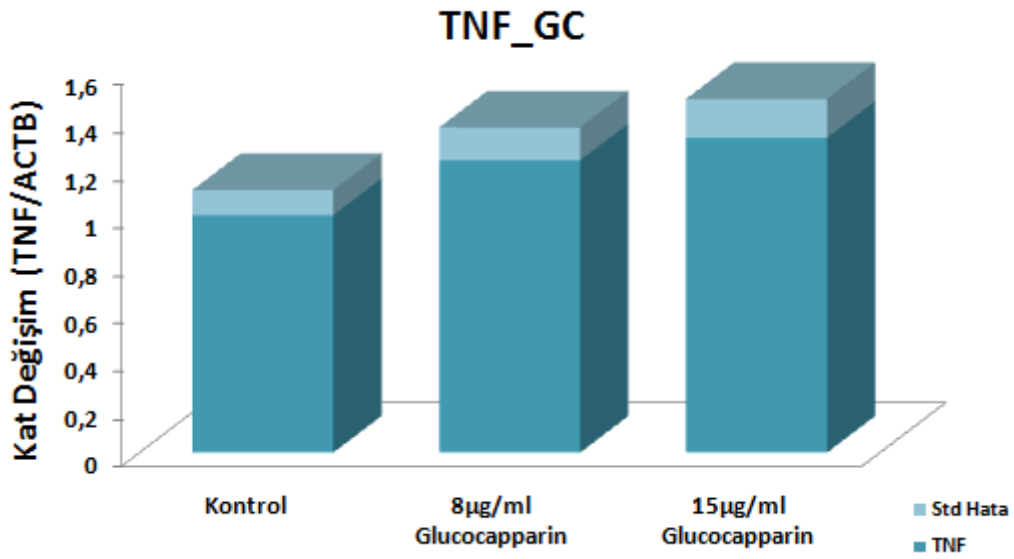
Şekil 85. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PLP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



Şekil 86. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PTPN mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



Şekil 87. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) SOD mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

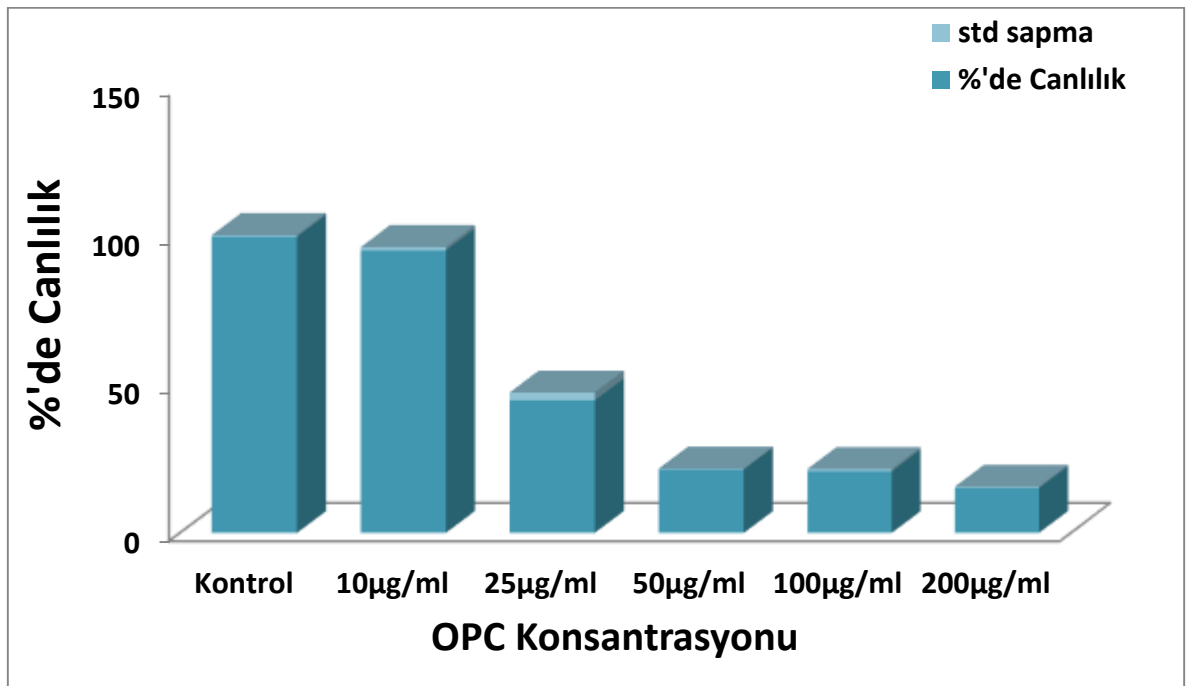


Şekil 88. Glucocapparin aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) TNF mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.

3.4.5.2 SH-SY5Y Hücrelerinde Olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat - OPC Aktif Maddesi Çalışmaları

3.4.5.2.1 Olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat - OPC Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda Olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat (OPC) %20 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya (1x10³/kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda OPC'nin hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 256).

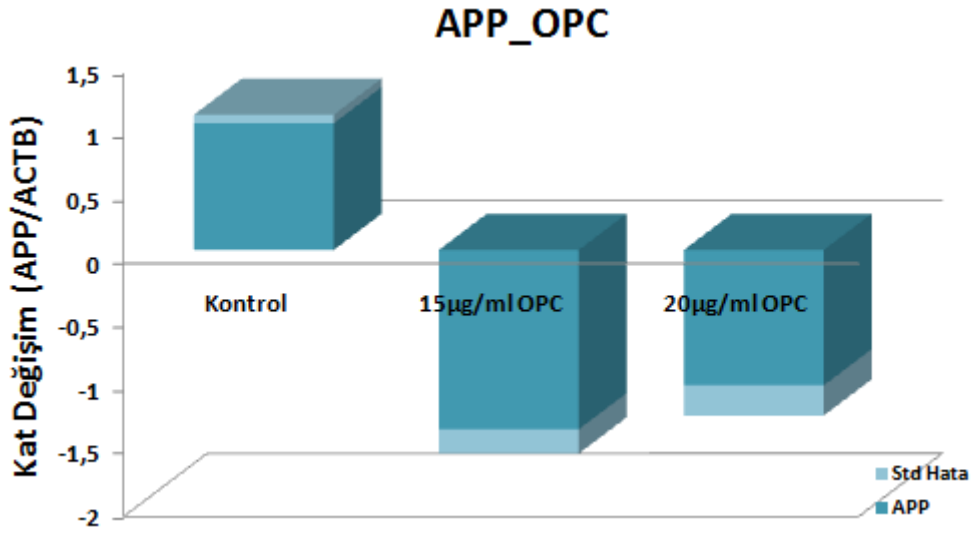


Şekil 89. Olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat'ın hücre canlılığına etkisi.

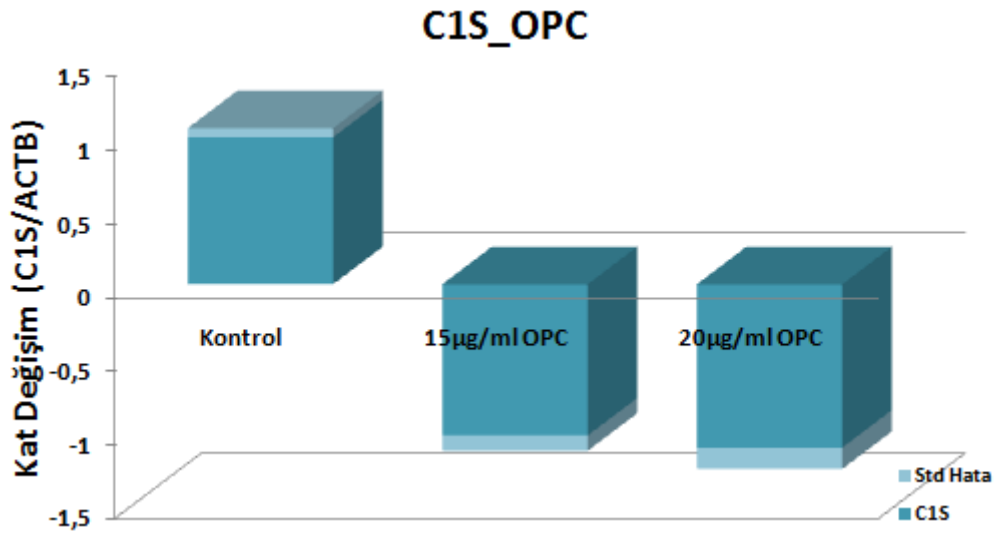
Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 15 µg/ml ve 20 µg/ml GC konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi.

3.4.5.2.2 Olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat Aktif Maddesinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi

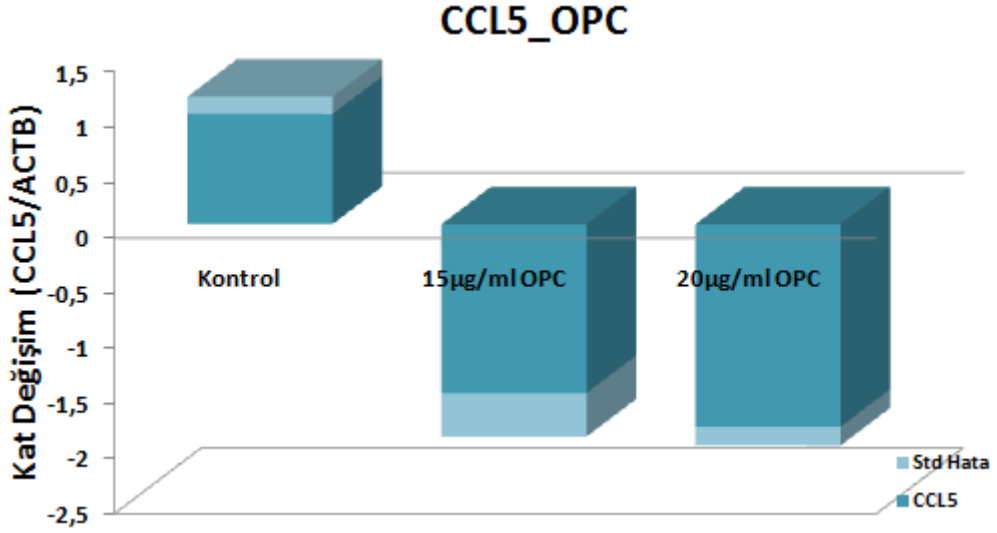
Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücrelere bu belirlenen dolarda OPC uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir (Şekil 257-272).



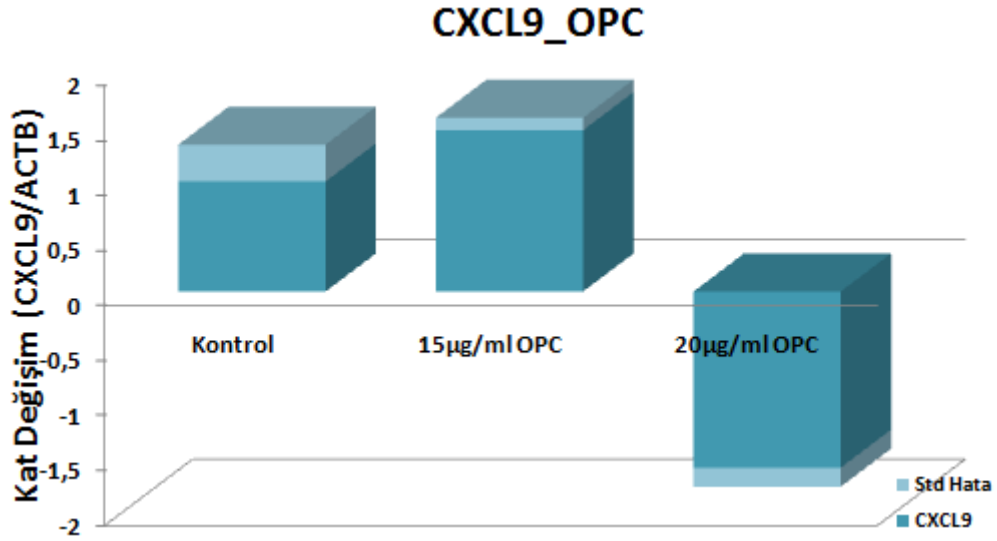
Şekil 90. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) APP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



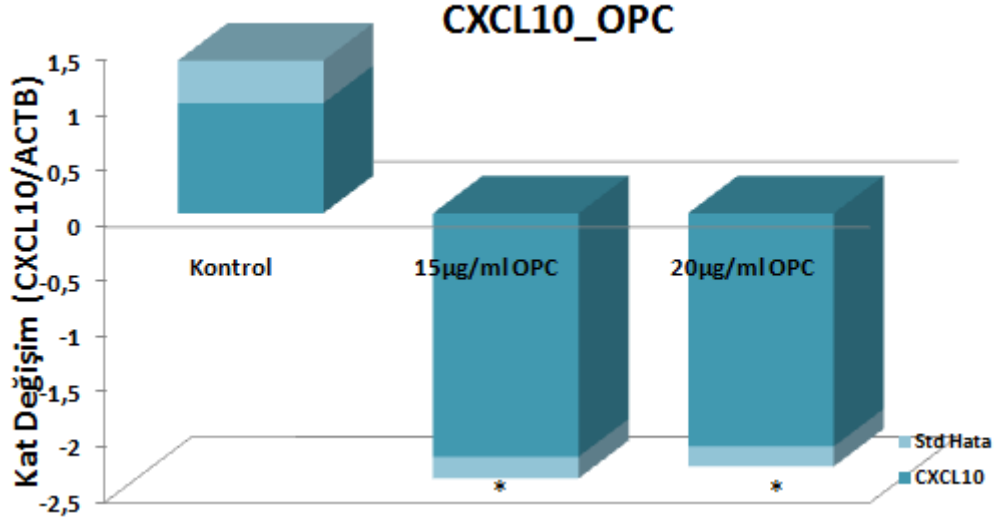
Şekil 91. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) C1S mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



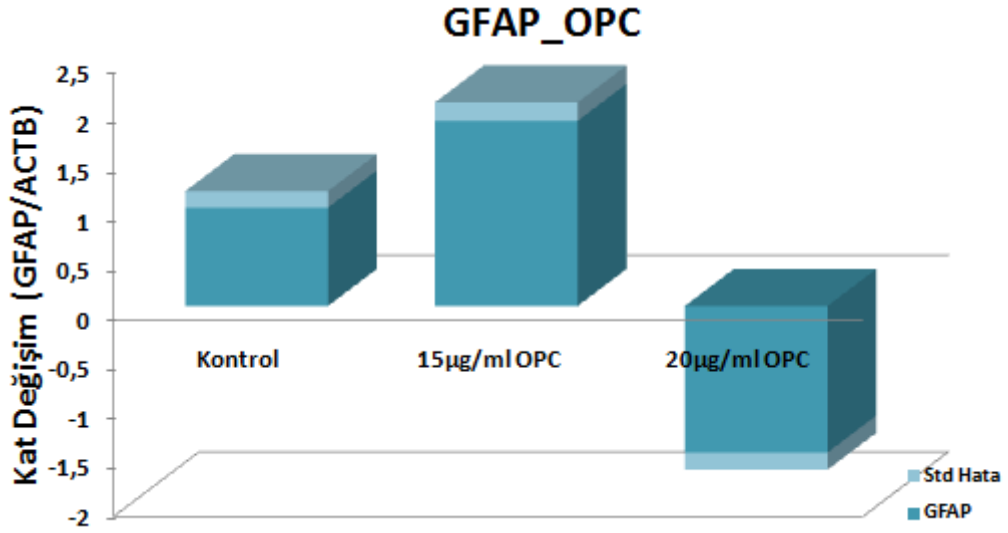
Şekil 92. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



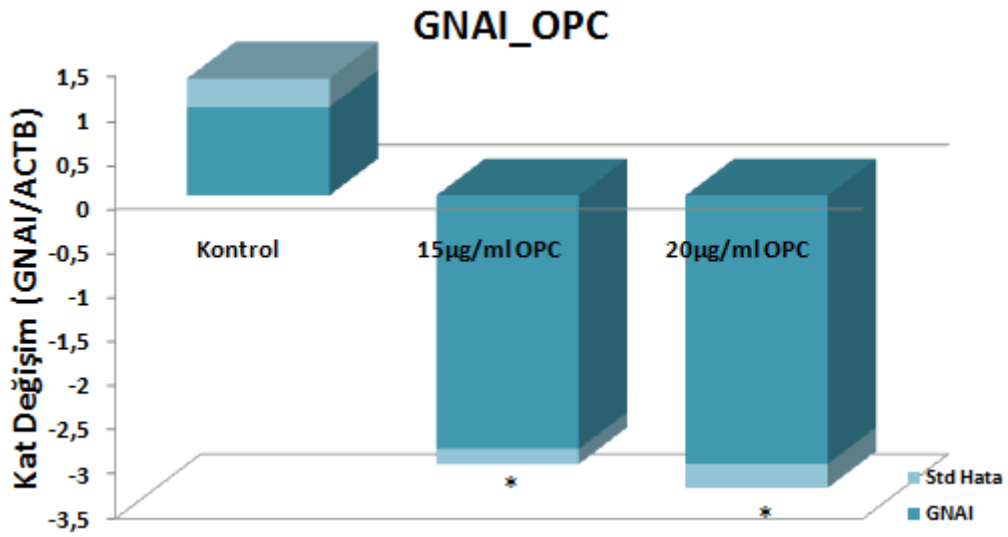
Şekil 93. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



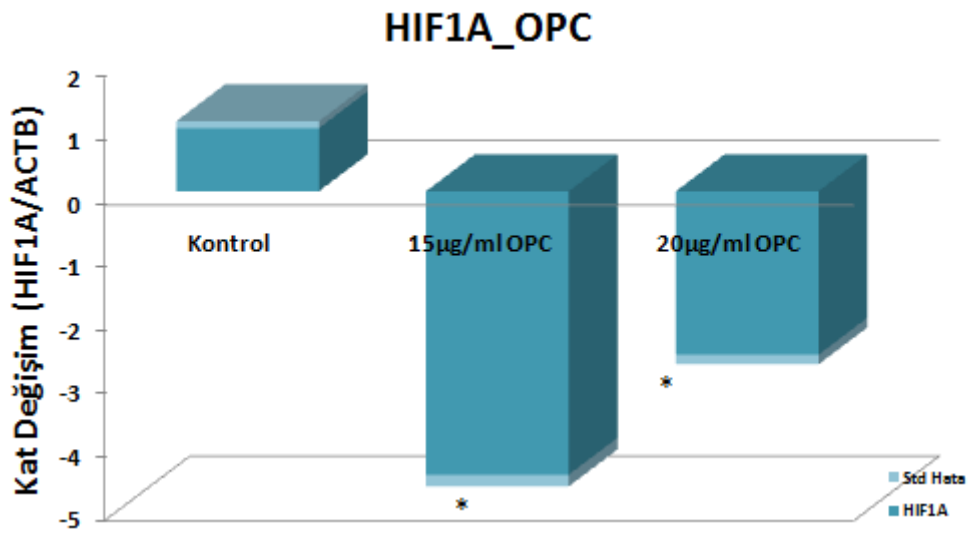
Şekil 94. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



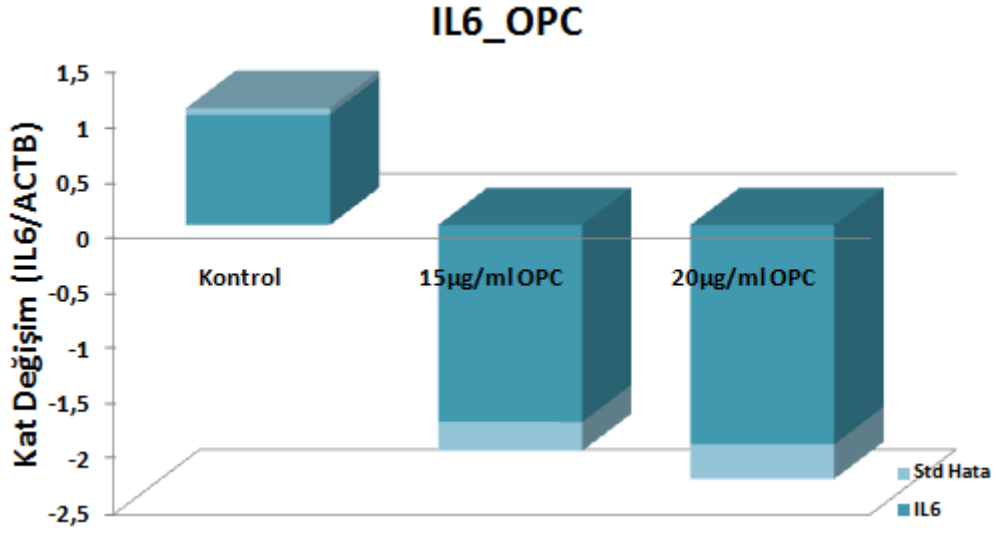
Şekil 95. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GFAP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



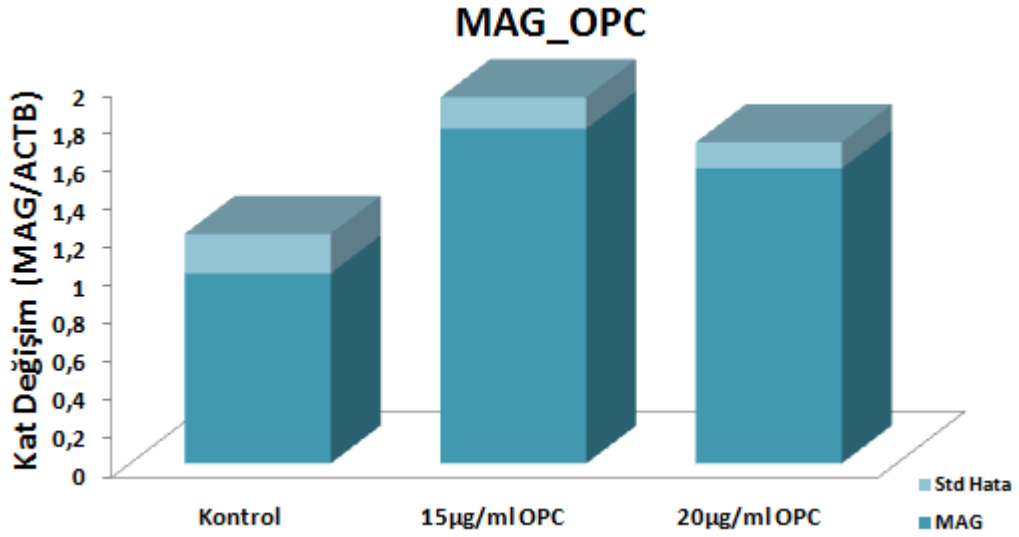
Şekil 96. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GNAI mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



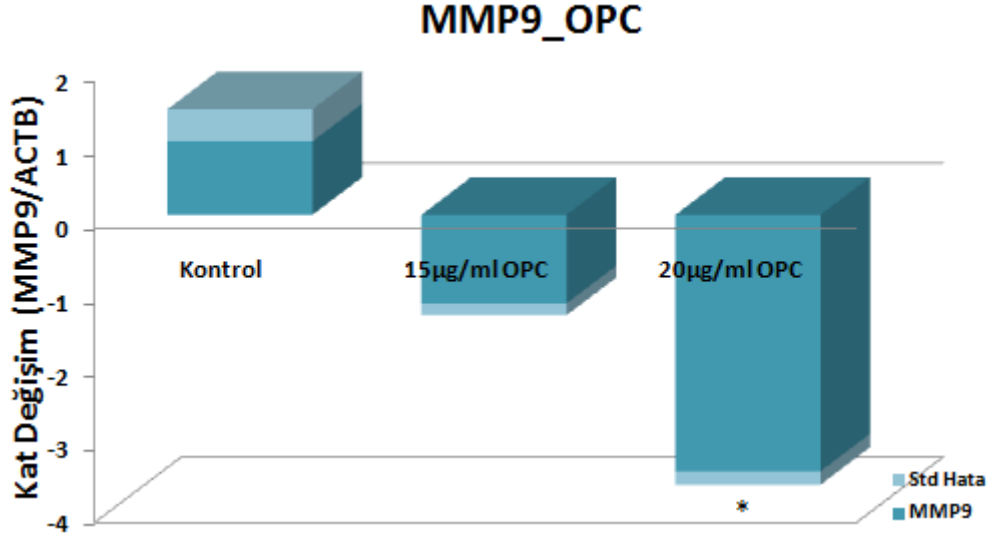
Şekil 97. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



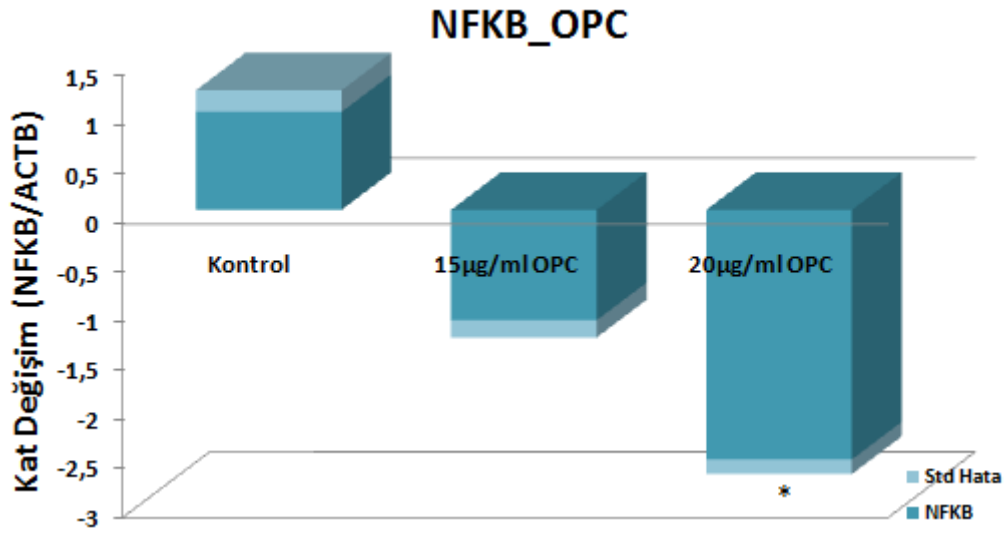
Şekil 98. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) IL6 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



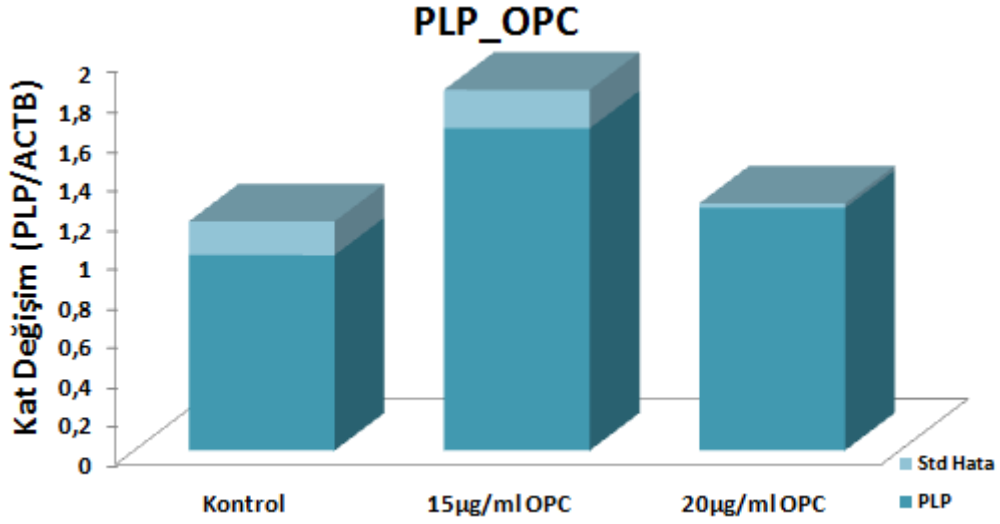
Şekil 99. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MAG mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



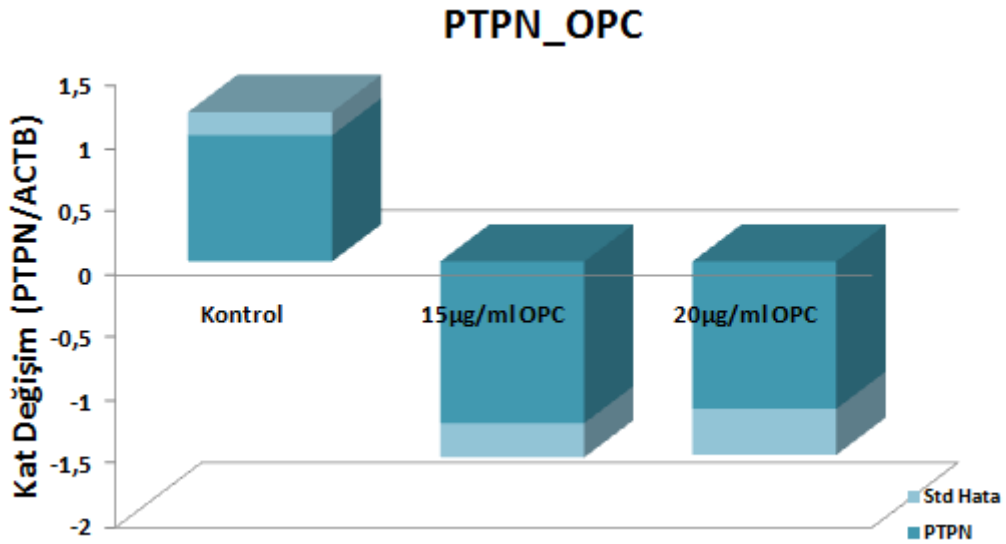
Şekil 100. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



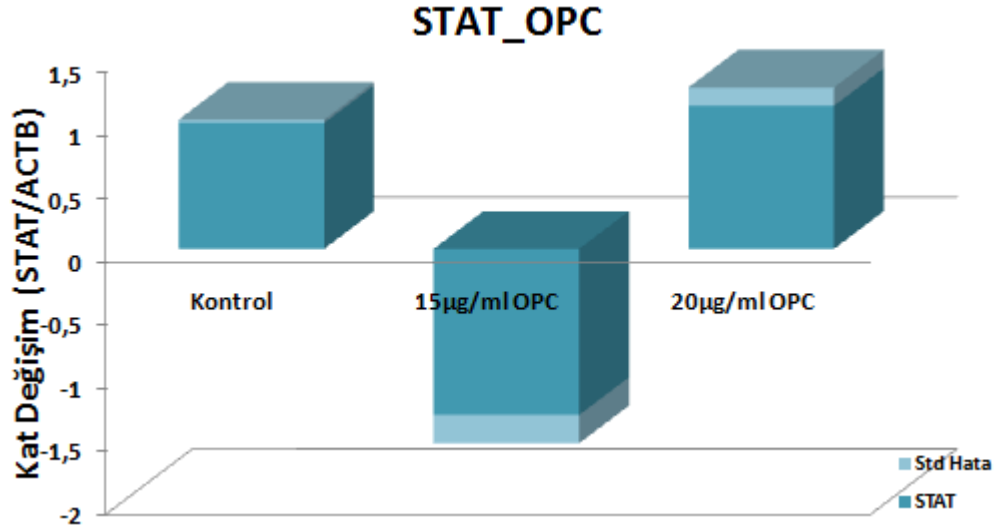
Şekil 101. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) NFKB mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



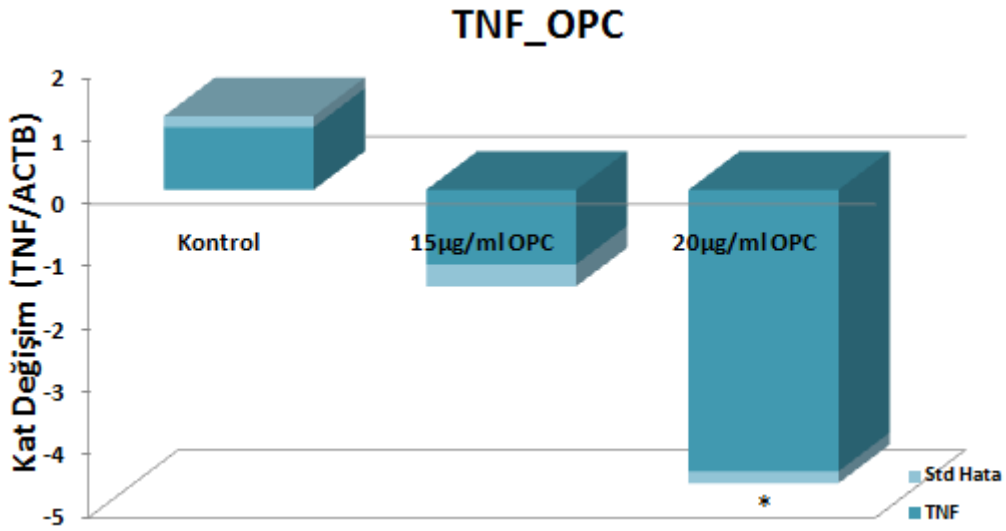
Şekil 102. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PLP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



Şekil 103. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PTPN mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



Şekil 104. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) STAT mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



Şekil 105. OPC aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) TNF mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

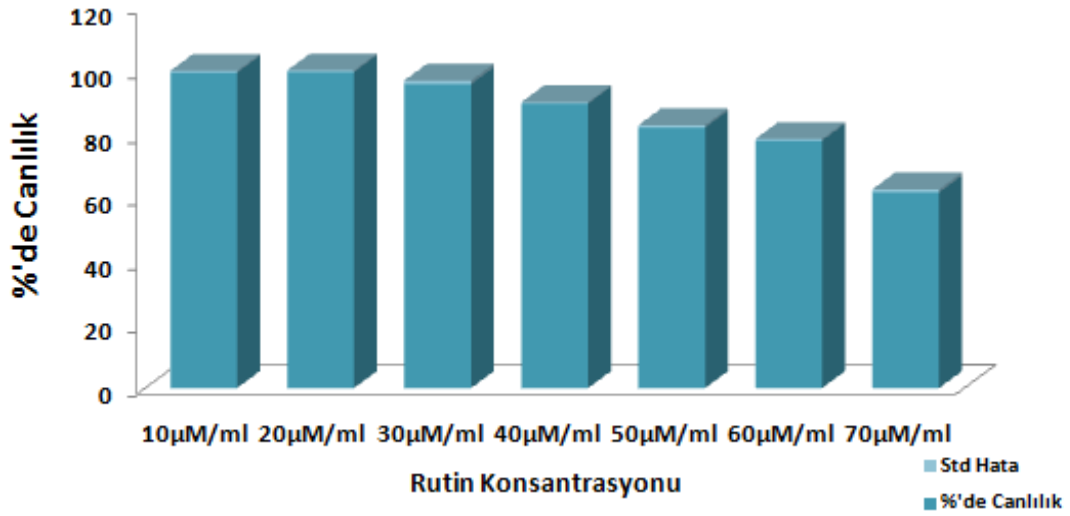
3.4.5.3 SH-SY5Y Hücrelerinde Olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat - OPC Aktif Maddesi ve Rutin Paralel Çalışmaları

Proje kapsamında yeni izole edilen ve MS ilişkili genlerde DAE modelinde görülen etkileri geri dönüştürme konusunda son derece pozitif veriler sunan OPC bileşiği yine proje kapsamında

MSCov içerisinde en fazla bulunduğunu tespit ettiğimiz rutin bileşiği ile kombine etkisi tanımlamak için birlikte çalışıldı.

3.4.5.3.1 Rutin Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda Rutin %10 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya (1x10³/kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda rutin hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 273).

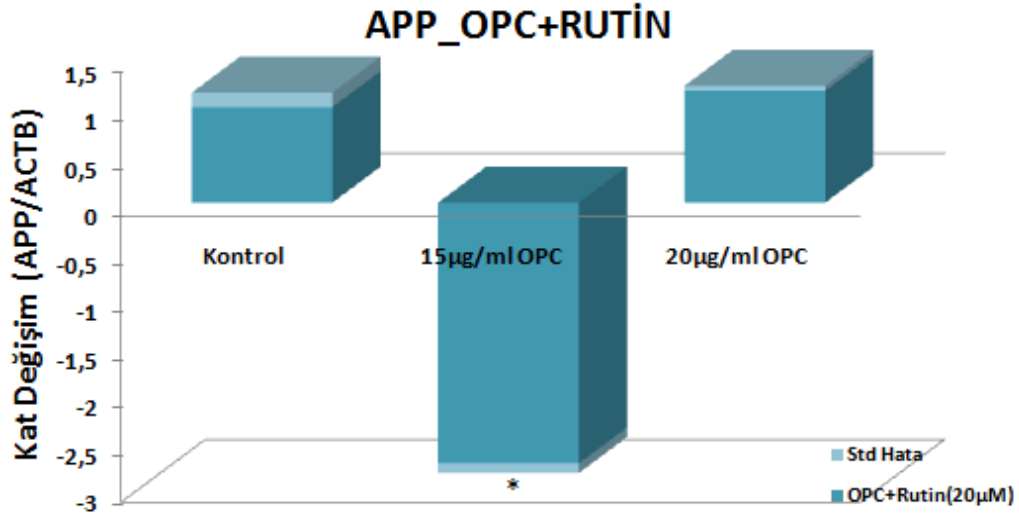


Şekil 106. Rutin'in hücre canlılığına etkisi.

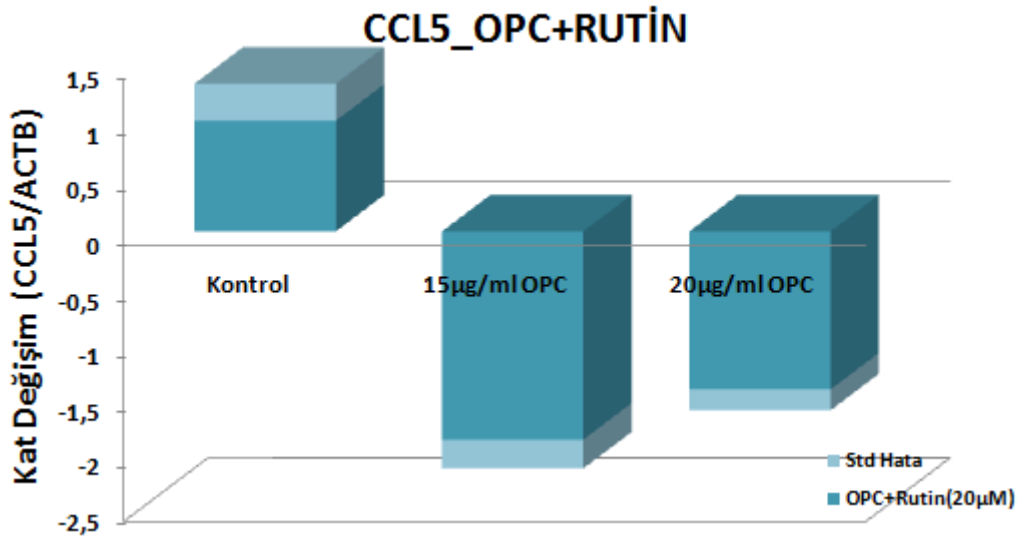
Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 20µM Rutin konsantrasyonunun 15µg/ml ve 20µg/ml OPC konsantrasyonlarıyla paralel olarak hücrelere uygulanmasına karar verildi.

3.4.5.3.2 Rutin ve Olean-12-en-28-ol, 3β pentakosanoat Aktif Maddesinin Kombine Uygulanmasının SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi

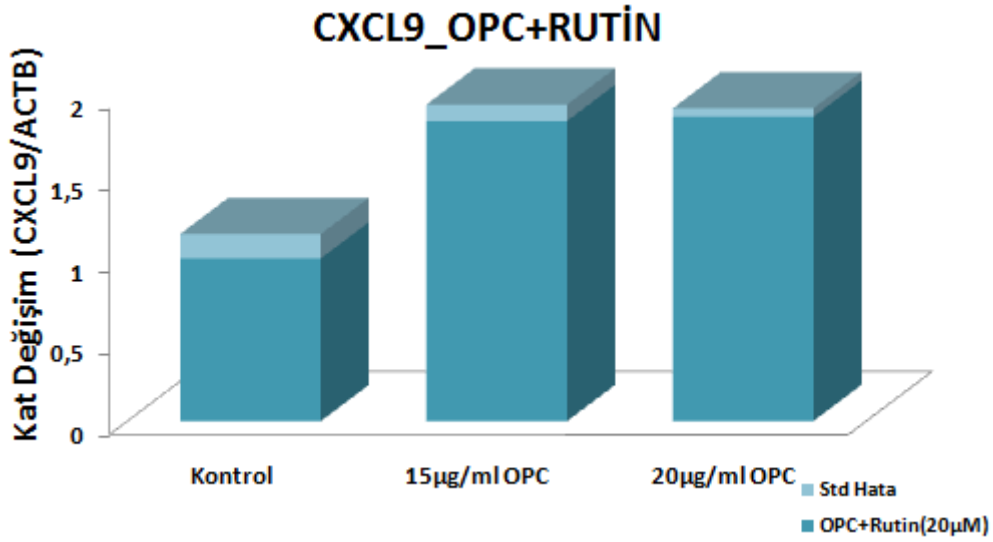
Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan OPC ve Rutin dozları belirlendikten sonra hücrelere bu belirlenen dolarda OPC+Rutin uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir (Şekil 274-287).



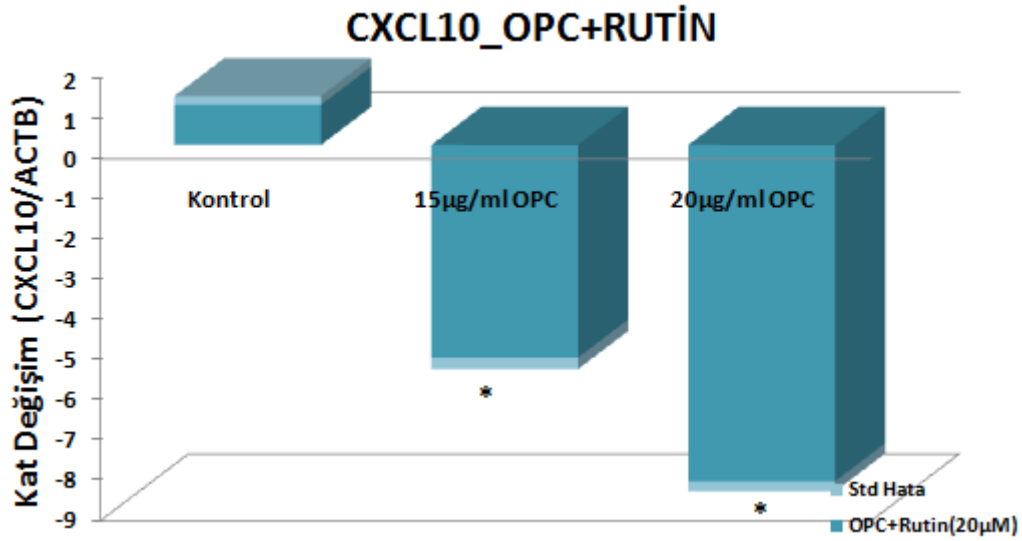
Şekil 107. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) APP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



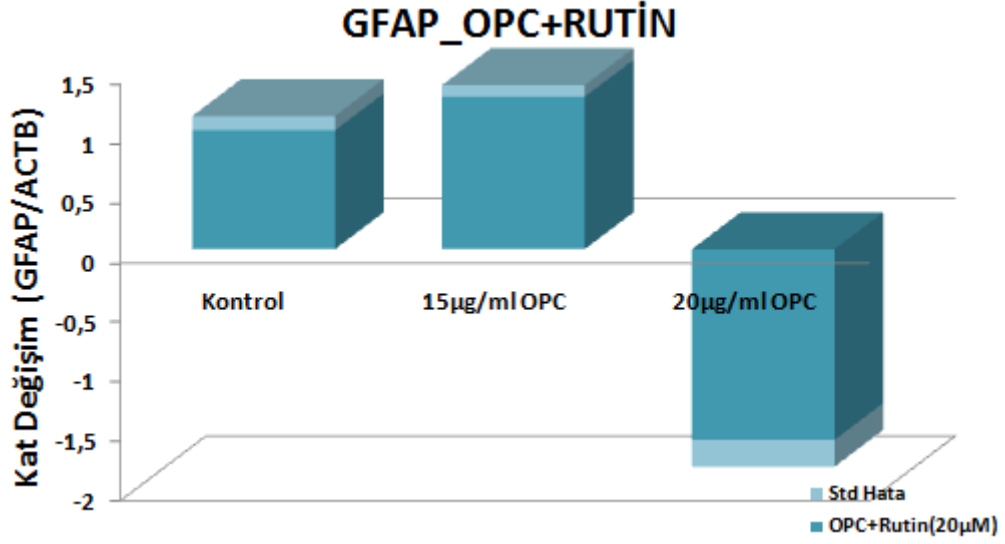
Şekil 108. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



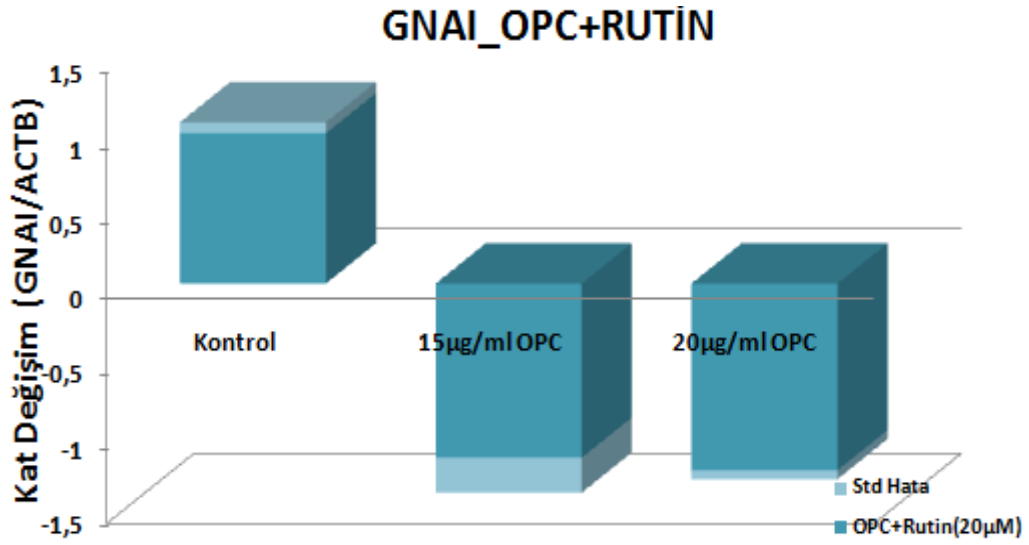
Şekil 109. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



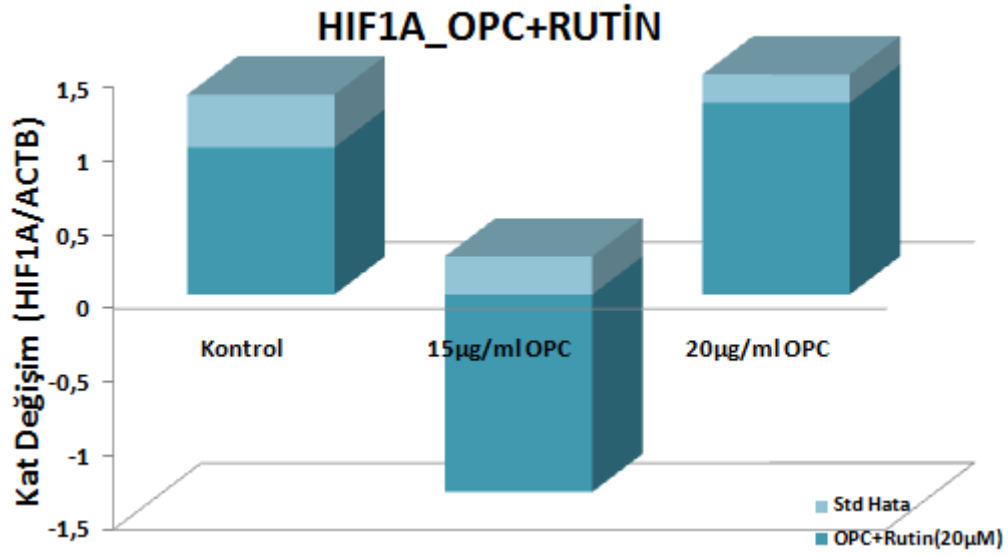
Şekil 110. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



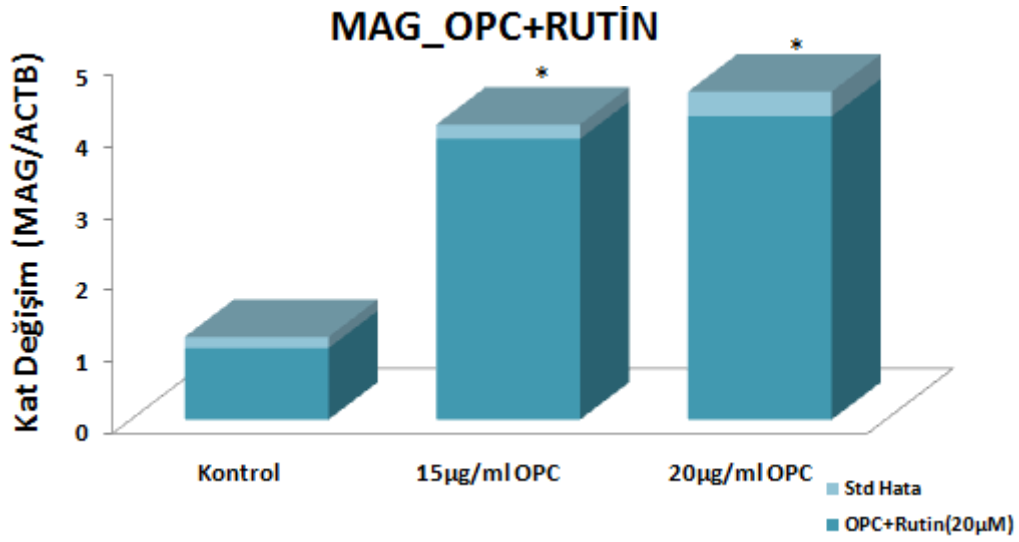
Şekil 111. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GFAP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



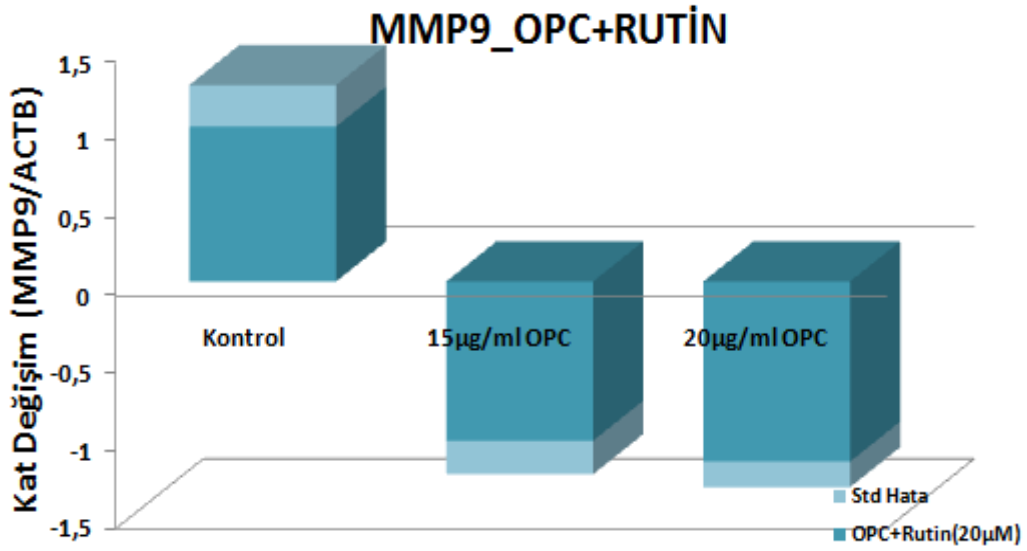
Şekil 112. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GNAI mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



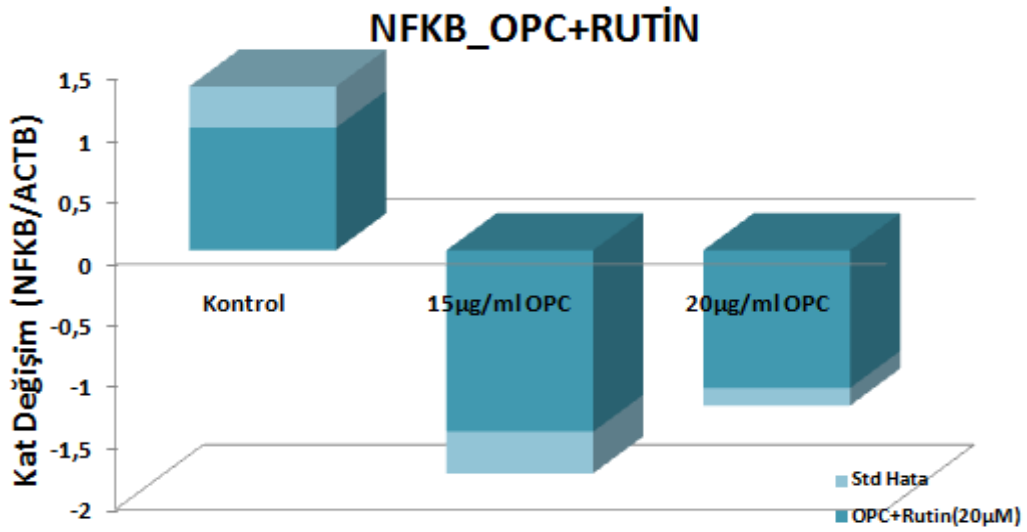
Şekil 113. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



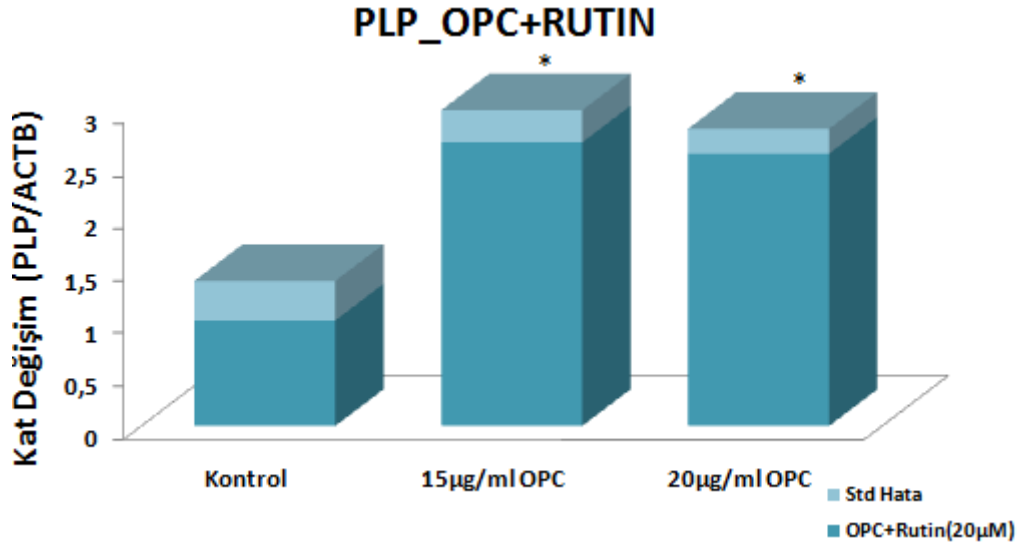
Şekil 114. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MAG mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



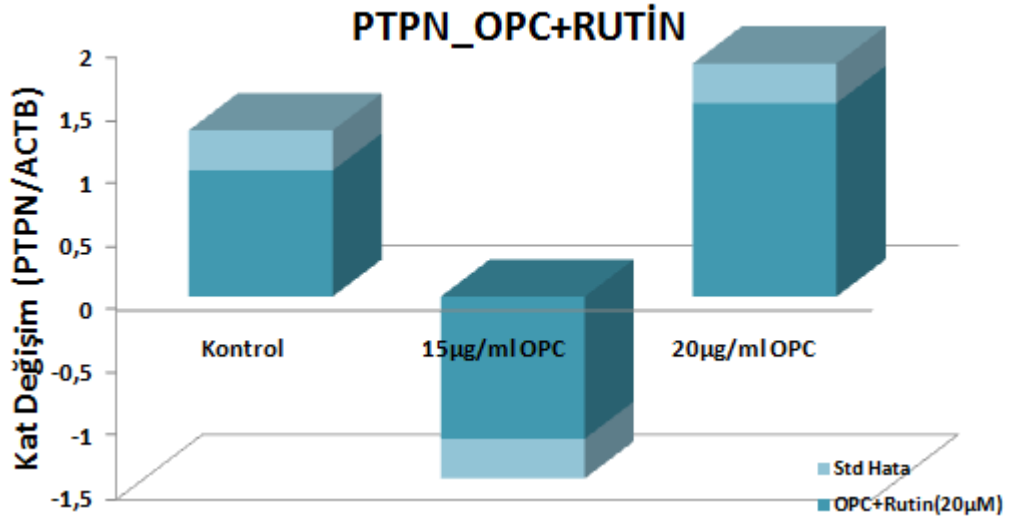
Şekil 115. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



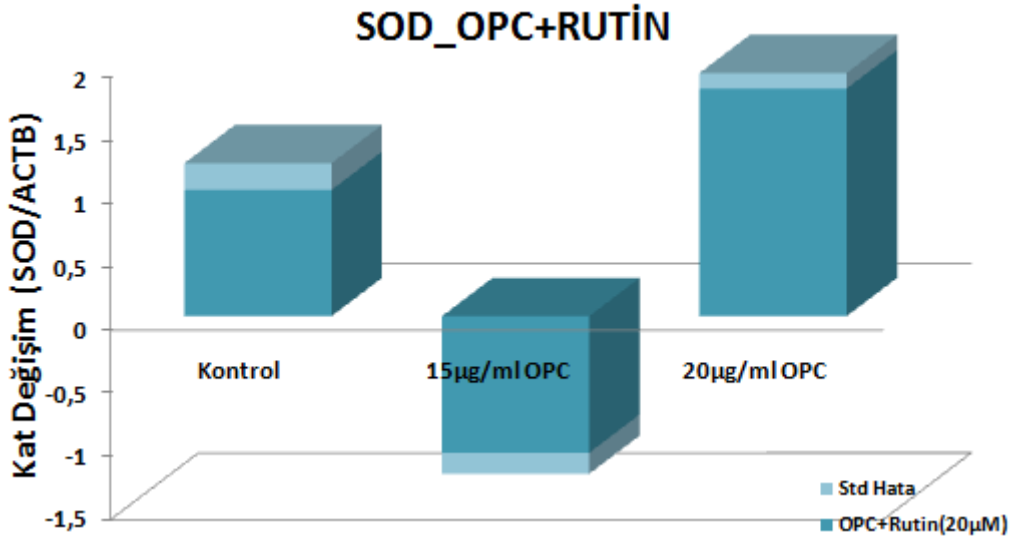
Şekil 116. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) NFKB mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



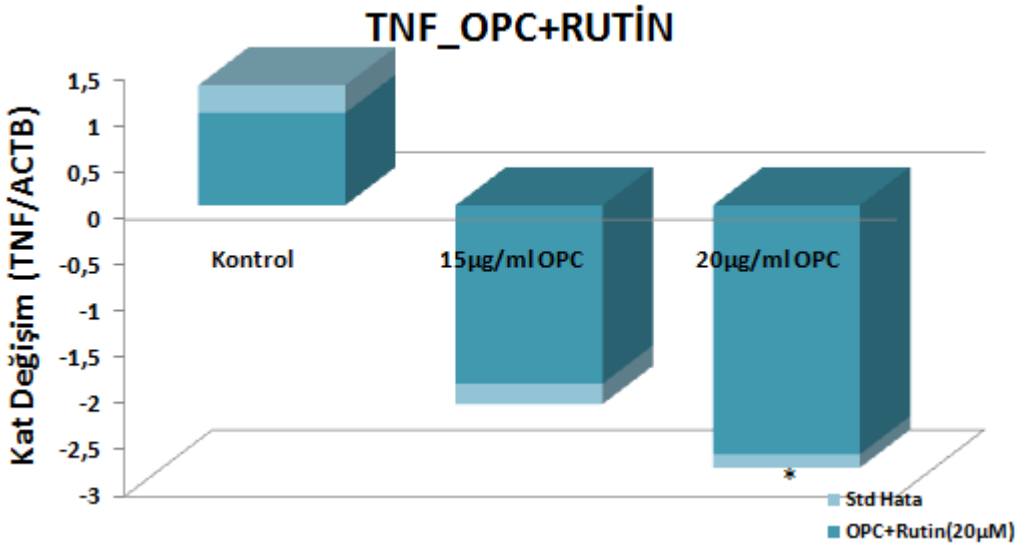
Şekil 117. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PLP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



Şekil 118. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PTPN mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



Şekil 119. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) SOD mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



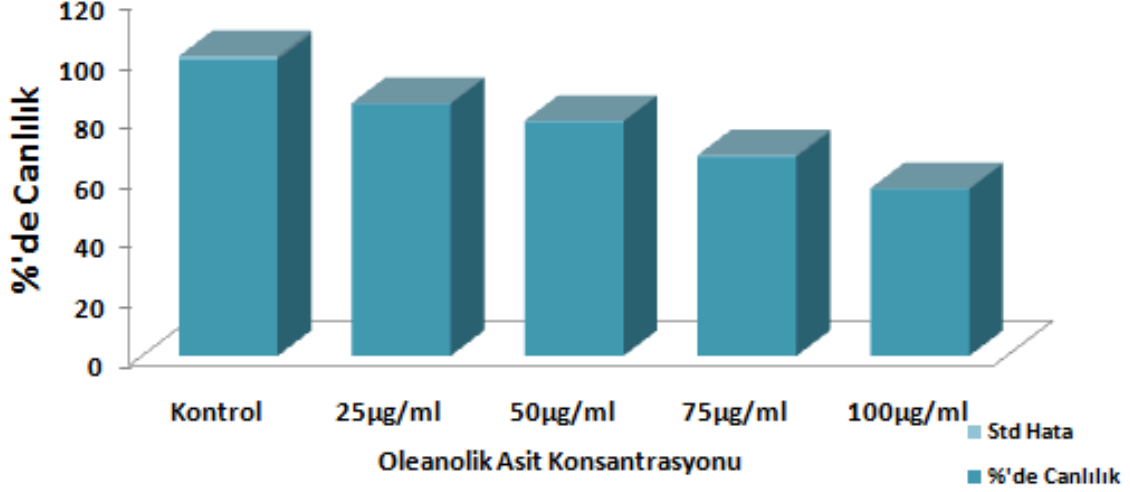
Şekil 120. OPC aktif maddesi ve rutin paralel uygulanmasının insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) TNF mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

3.4.5.4 SH-SY5Y Hücrelerinde Oleanolik Asit Aktif Maddesi Çalışmaları

3.4.5.4.1 Oleanolik Asit Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda Oleanolik Asit (OA) %20 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya (1x10³/kuyucuk) ekilen SH-

SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda OA'in hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 288).

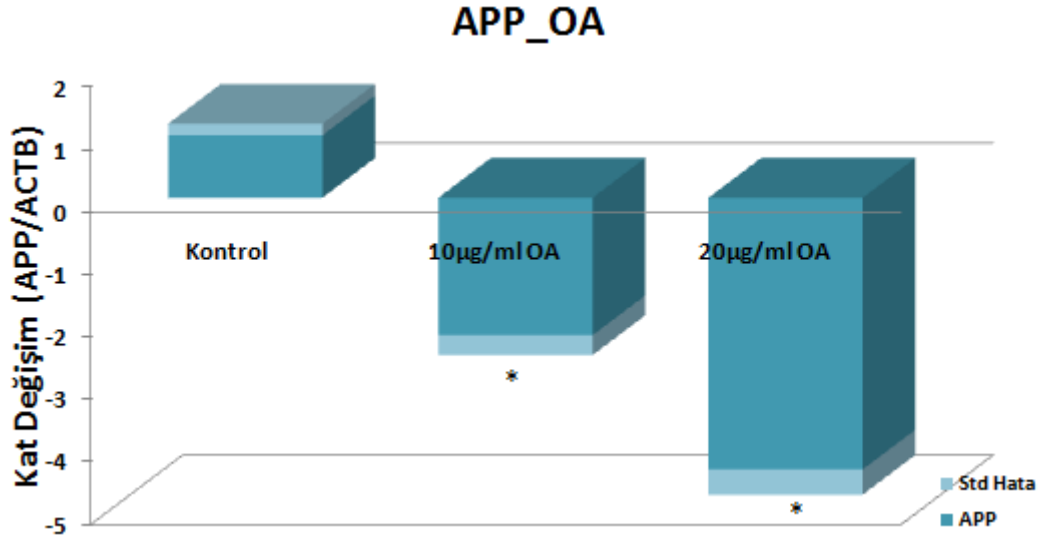


Şekil 121. Oleanolik asitin hücre canlılığına etkisi.

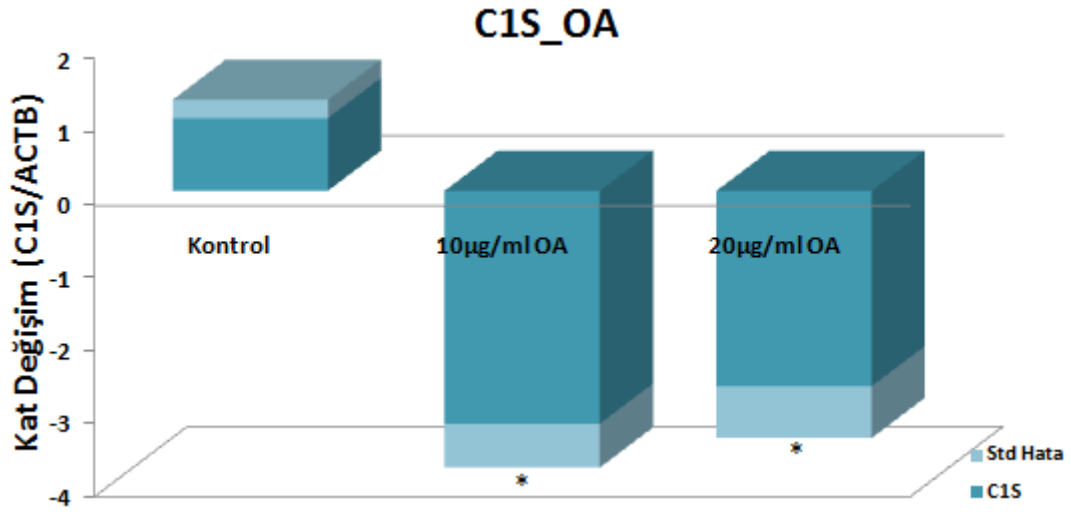
Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 10µg/ml ve 20µg/ml OA konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi.

3.4.5.4.2 Oleanolik Asit Aktif Maddesinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi

Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücrelere bu belirlenen dolarda OA uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir (Şekil 289-302).

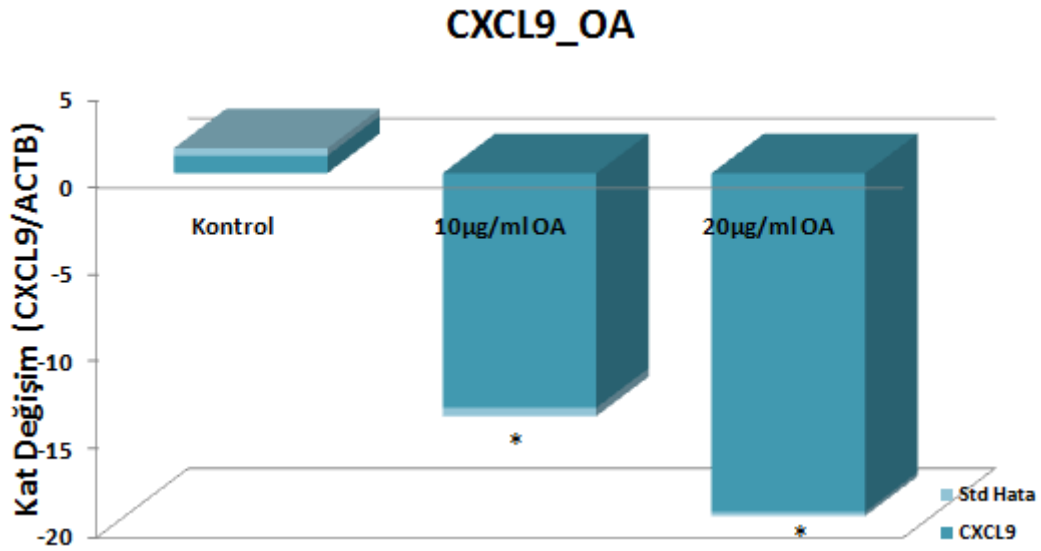


Şekil 122. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) APP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

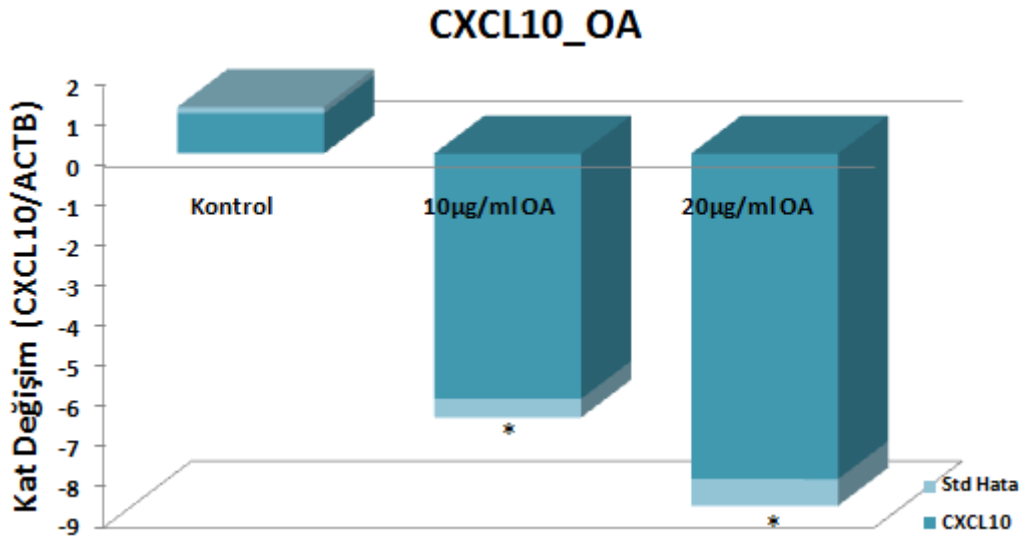


Şekil 123. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) C1S mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

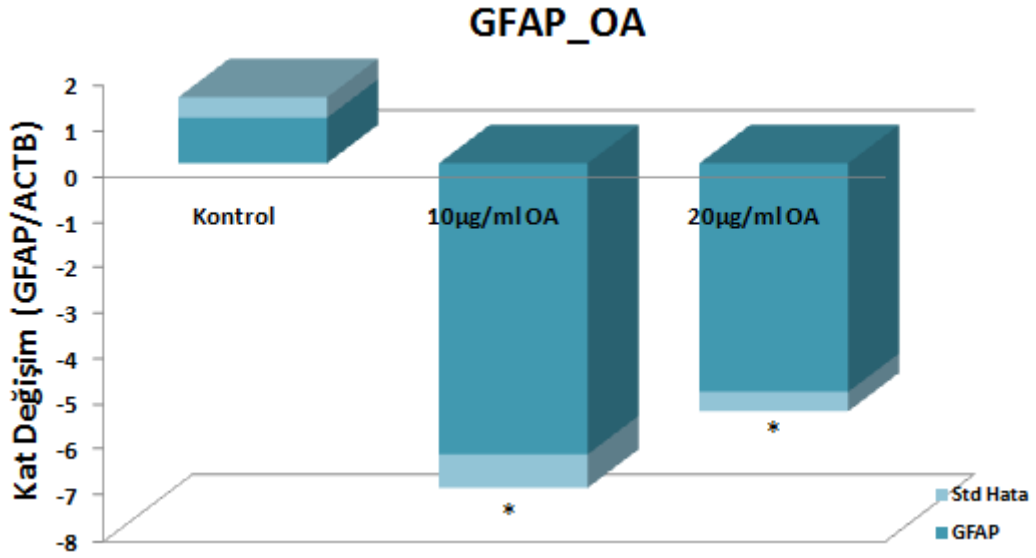
Şekil 124. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



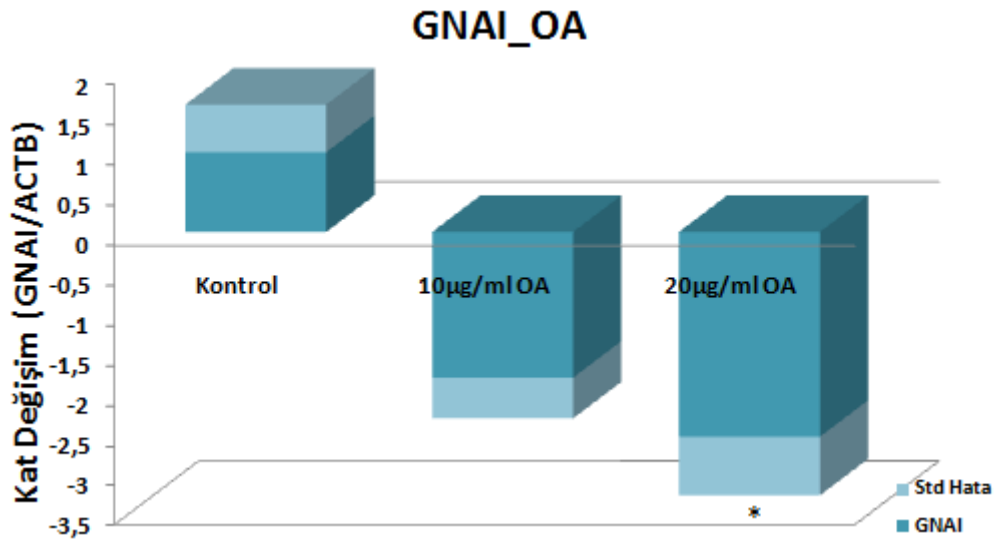
Şekil 125. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



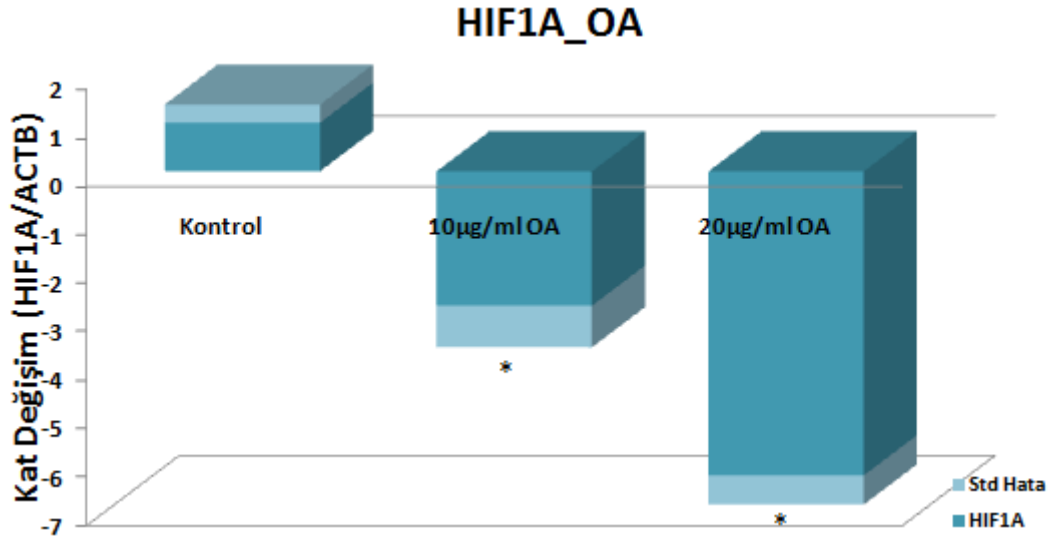
Şekil 126. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



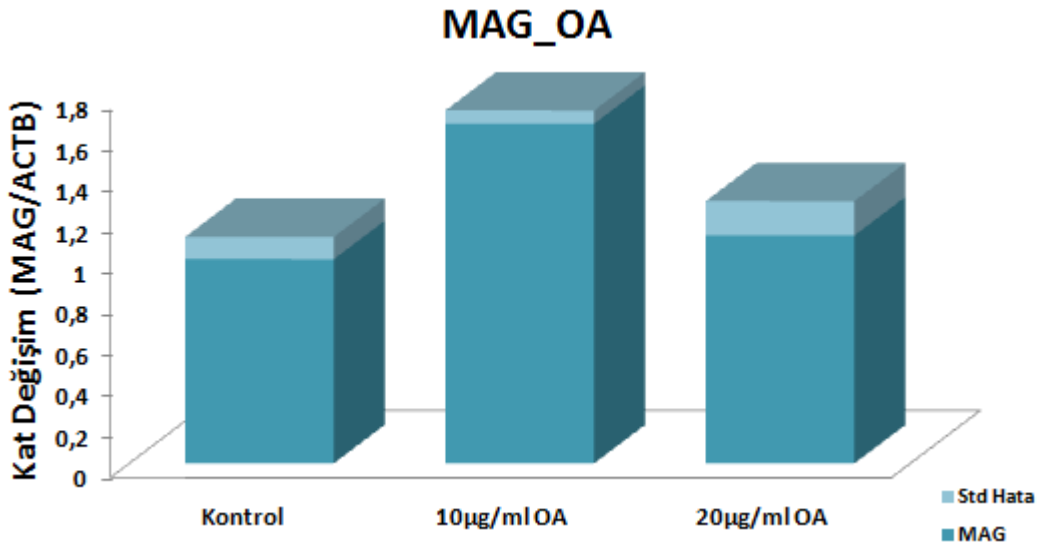
Şekil 127. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GFAP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



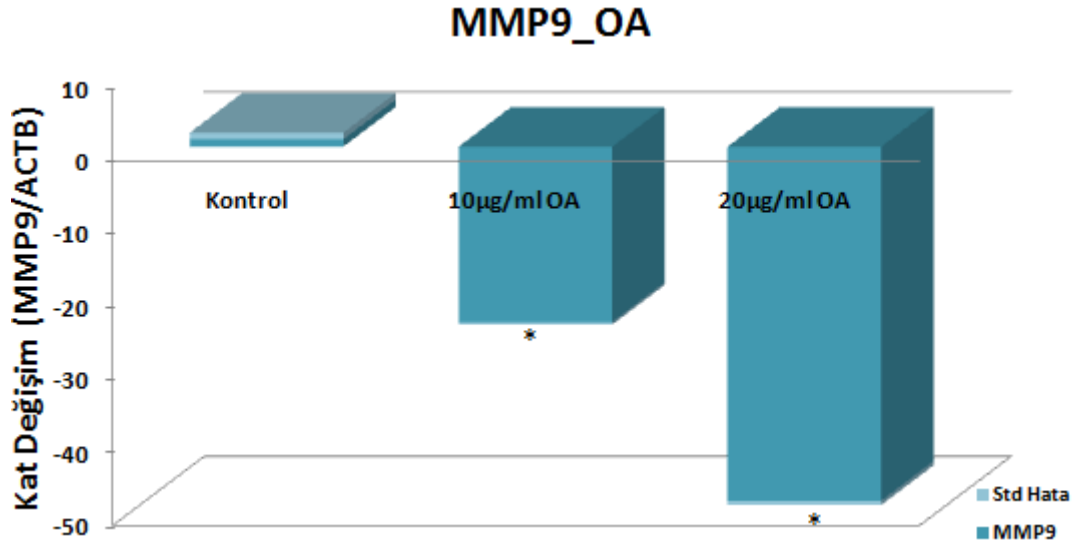
Şekil 128. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GNAI mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



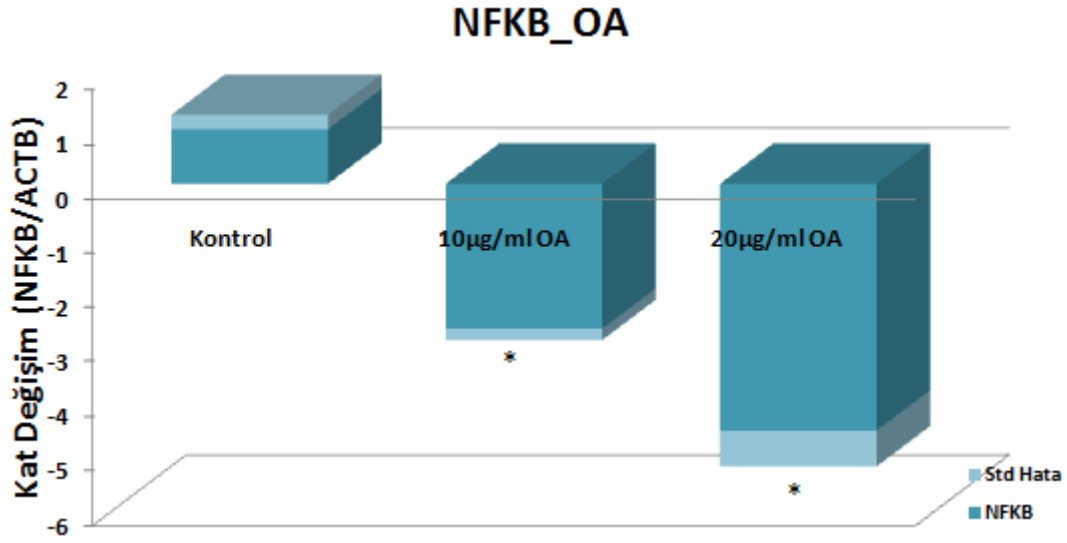
Şekil 129. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



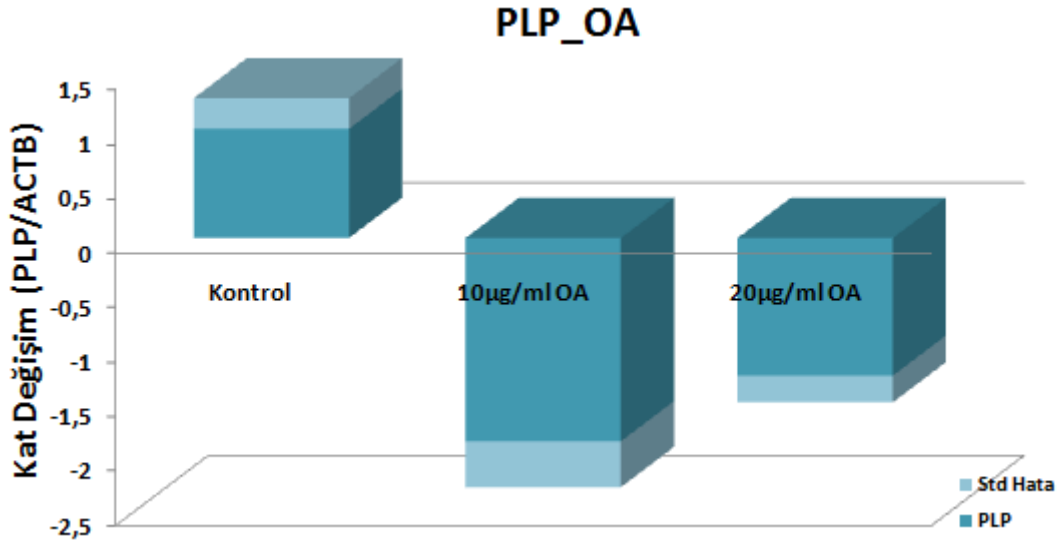
Şekil 130. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MAG mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



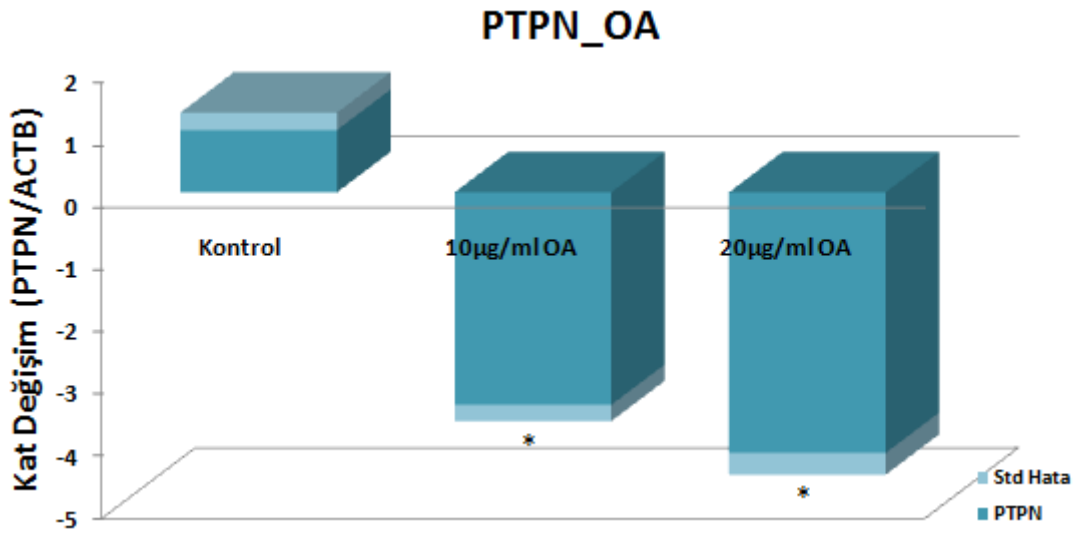
Şekil 131. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



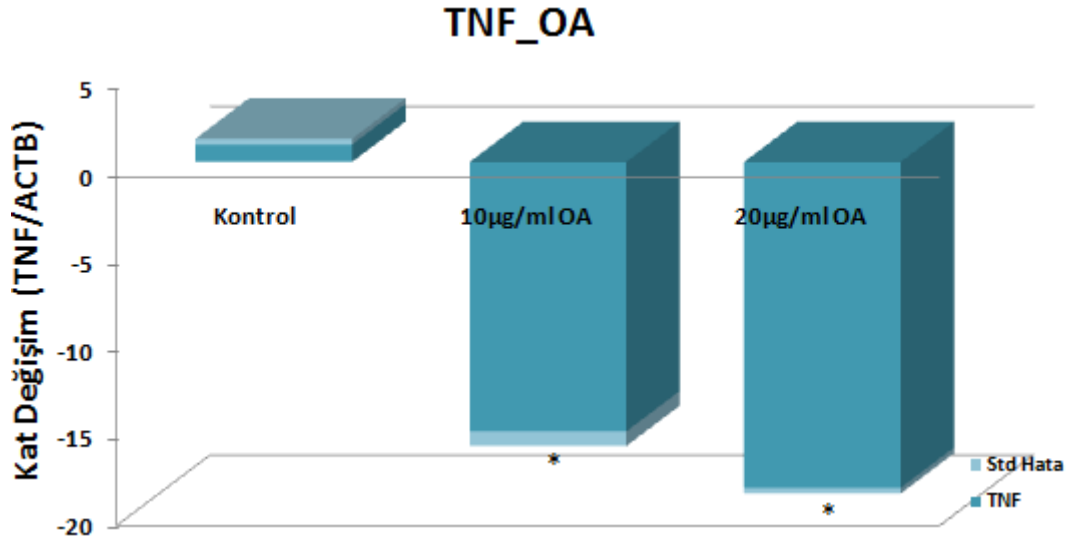
Şekil 132. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) NFKB mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



Şekil 133. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PLP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



Şekil 134. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PTPN mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



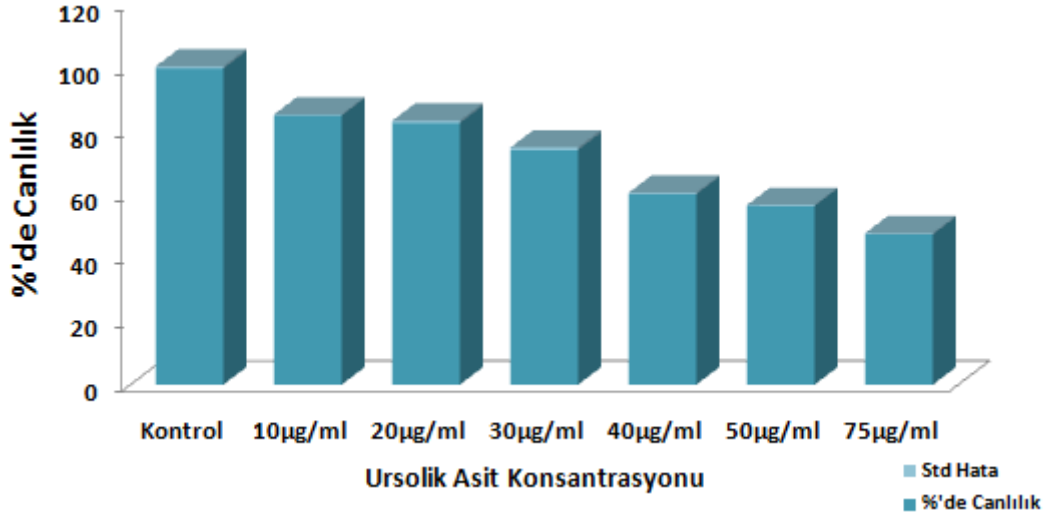
Şekil 135. Oleanolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) TNF mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

3.4.5.5 SH-SY5Y Hücrelerinde Ursolik Asit Aktif Maddesi Çalışmaları

MSCov ekstresi ve *Capparis ovata* bitkisinden izole edilen bir diğer bileşik olan ursolik asitin de MS ilişkili genlere olan etkileri araştırıldı.

3.4.5.5.1 Ursolik Asit Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda Ursolik Asit (UA) %20 DMSO'da çözülerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya (1x10³/kuyucuk) ekilen SH-SY5Y hücre dizisi üzerine 24 saat süresince maruz bırakıldı. 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda UA'in hücrelerin yaşam oranlarına etkisi belirlendi (Şekil 303).

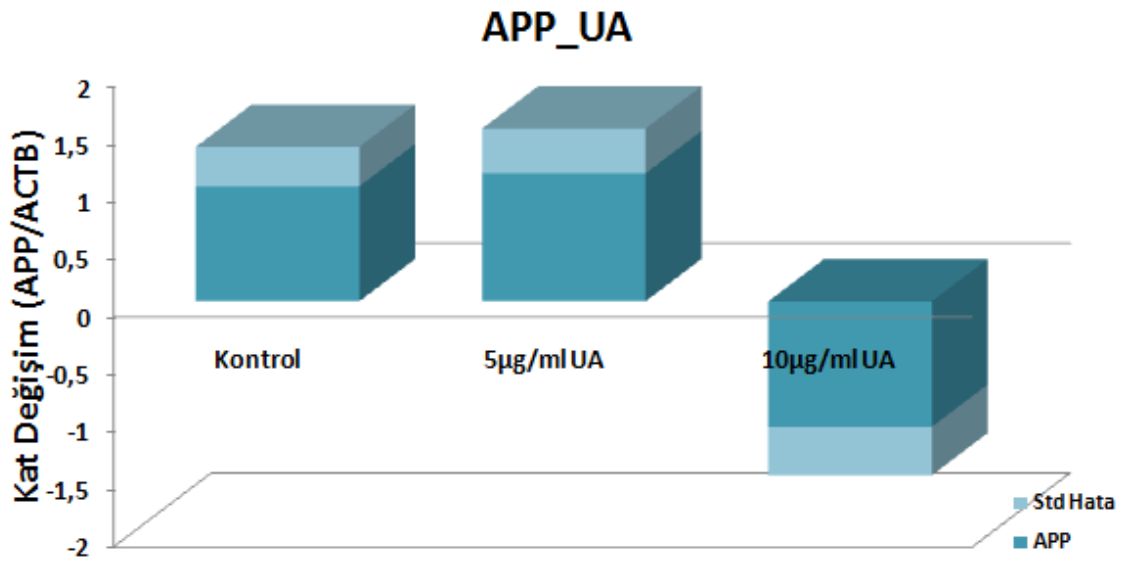


Şekil 136. Ursolik asitin hücre canlılığına etkisi.

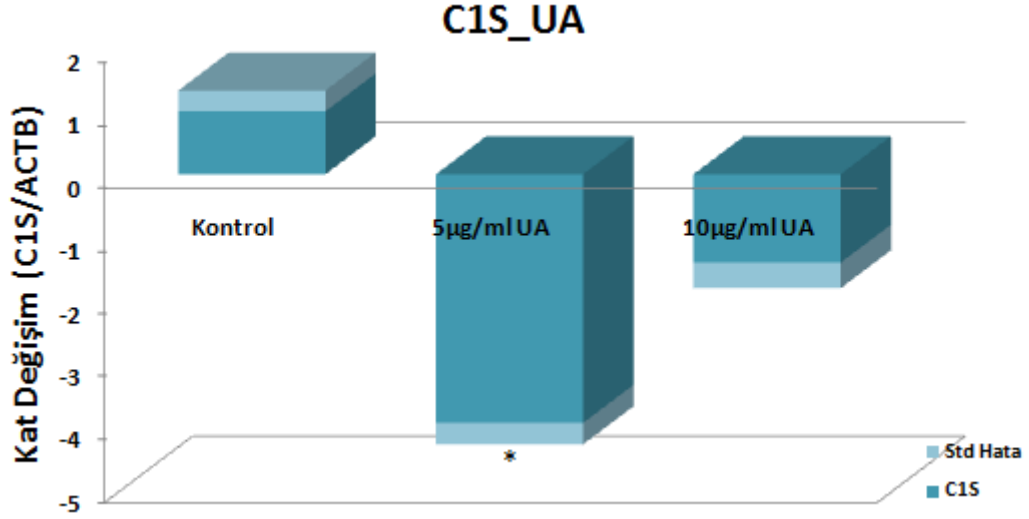
Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonraki çalışmalarda 5µg/ml ve 10µg/ml UA konsantrasyonlarının kullanılmasına karar verildi.

3.4.5.5.2 Ursolik Asit Aktif Maddesinin SH-SY5Y Hücrelerinde Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Etkisi

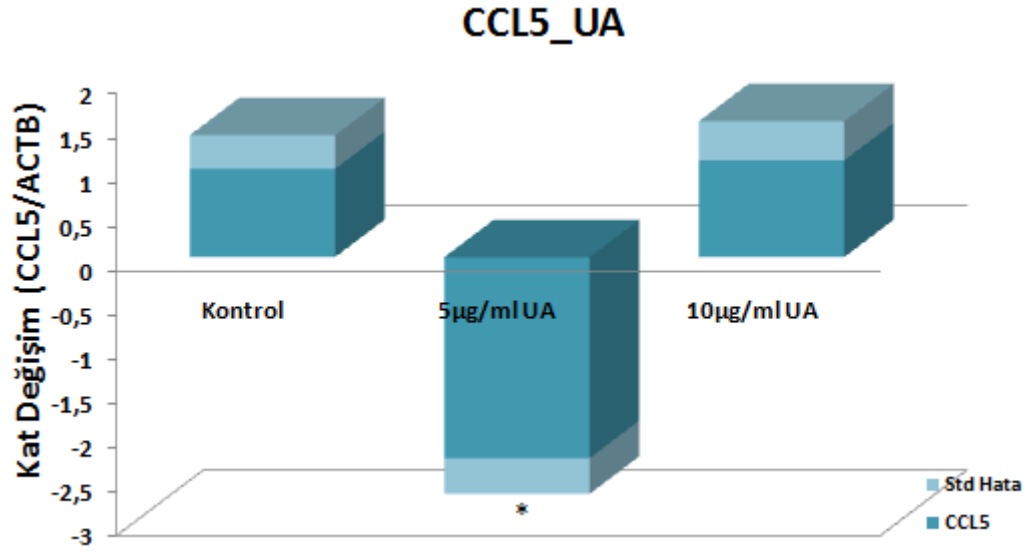
Sitotoksosite çalışmasıyla kullanılacak olan dozlar belirlendikten sonra hücelere bu belirlenen dolarda UA uygulandı. 24 saatin sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar kullanılarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri çalışıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir (Şekil 304-317).



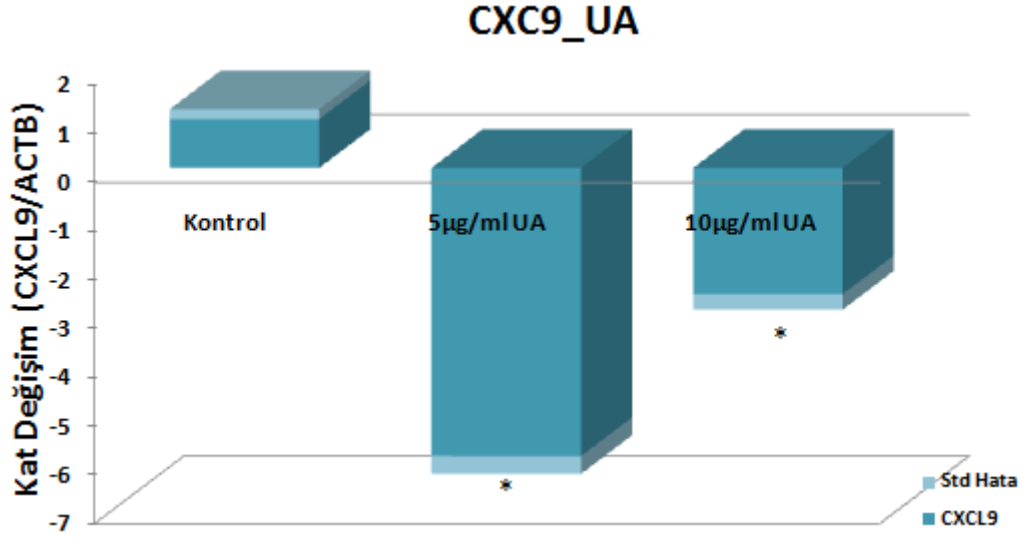
Şekil 137. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) APP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



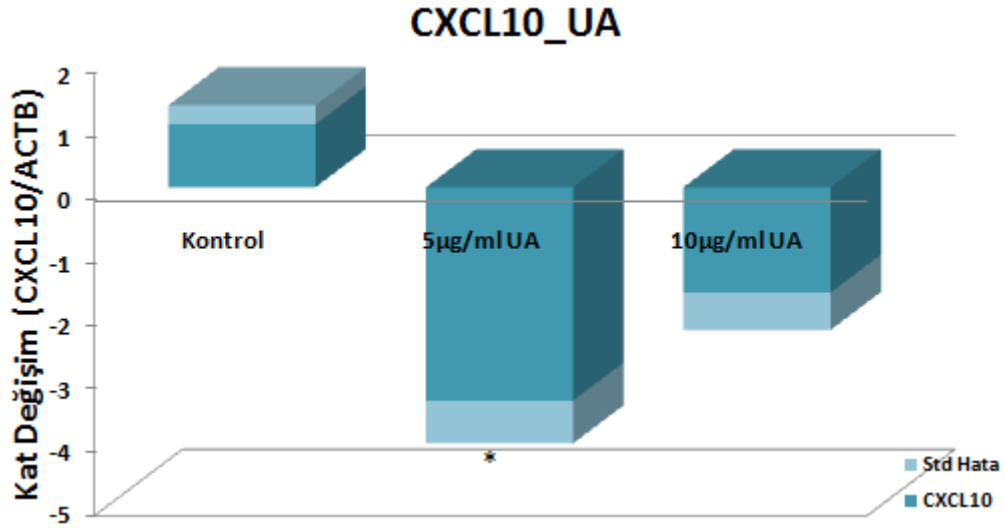
Şekil 138. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) C1S mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



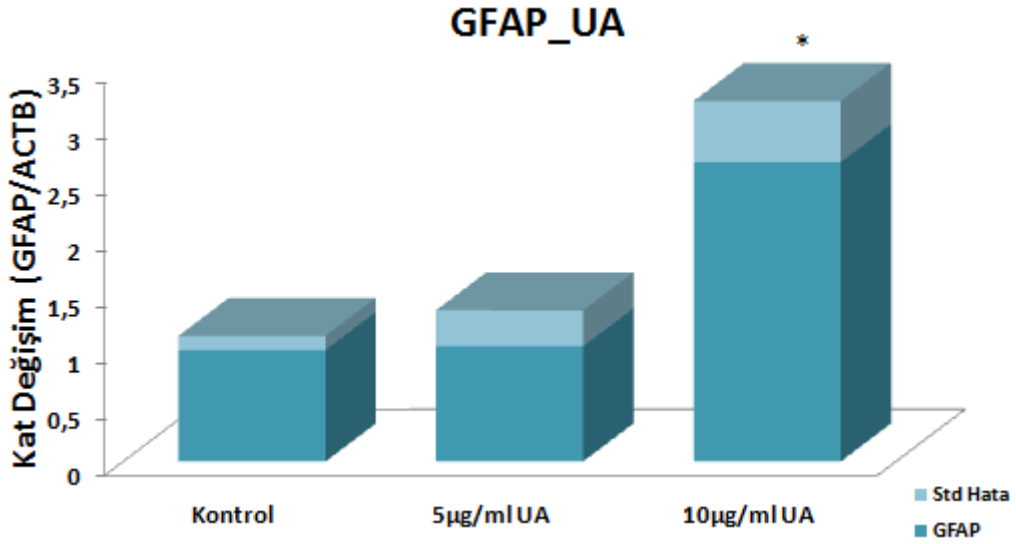
Şekil 139. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CCL5 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



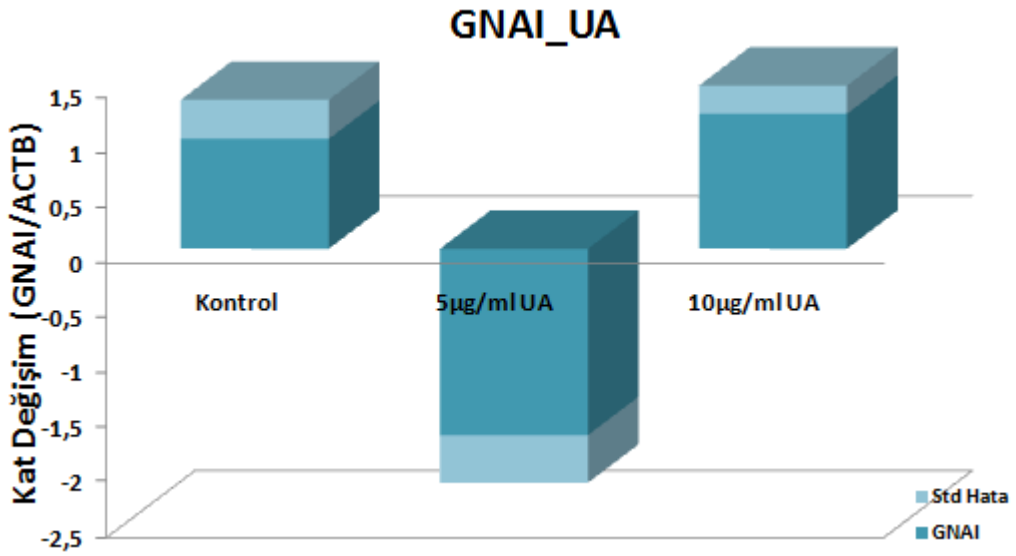
Şekil 140. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL9 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



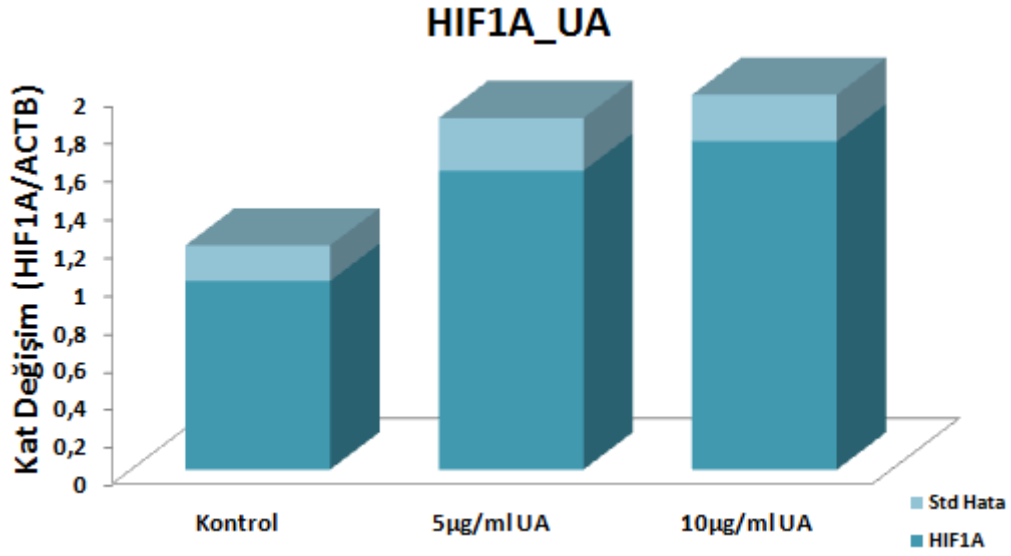
Şekil 141. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) CXCL10 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



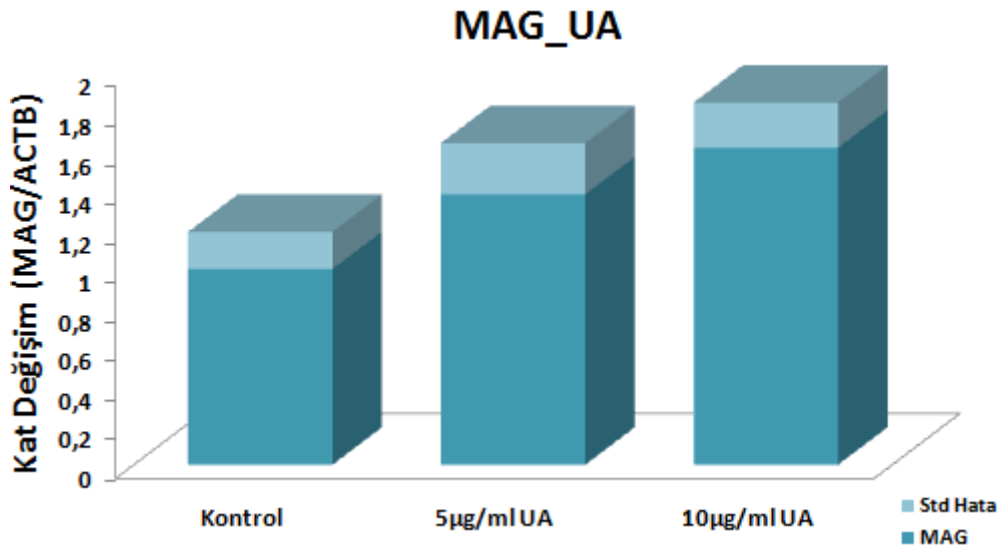
Şekil 142. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GFAP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



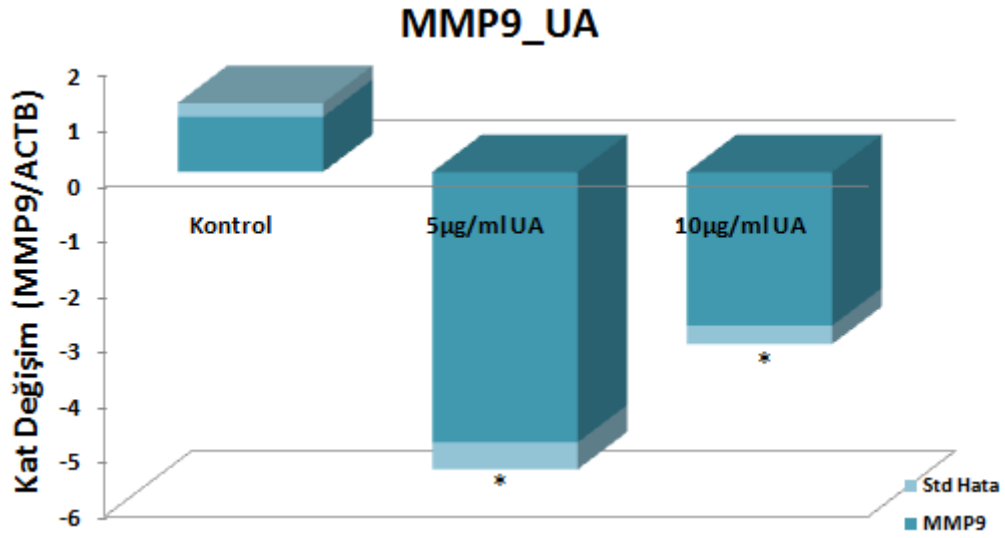
Şekil 143. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) GNAI mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



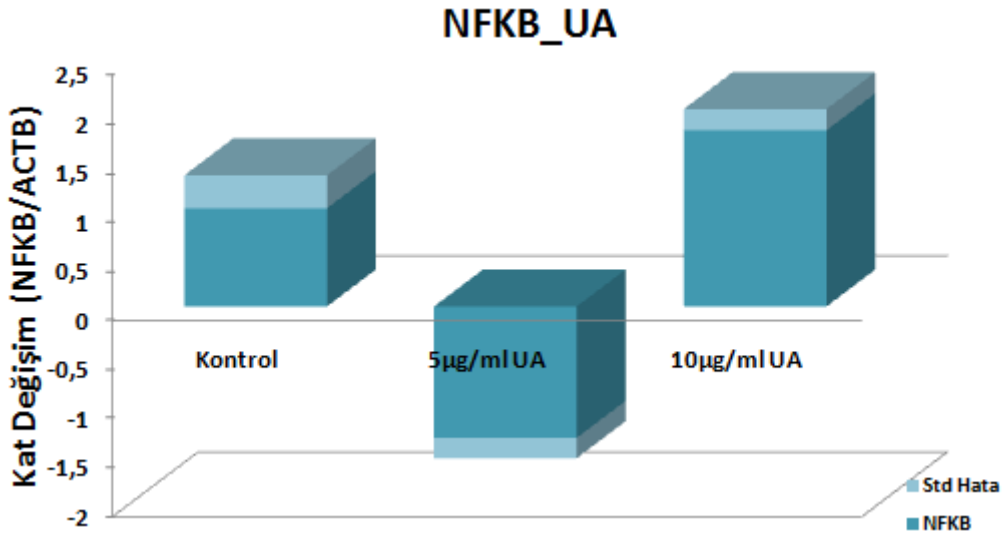
Şekil 144. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) HIF1A mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



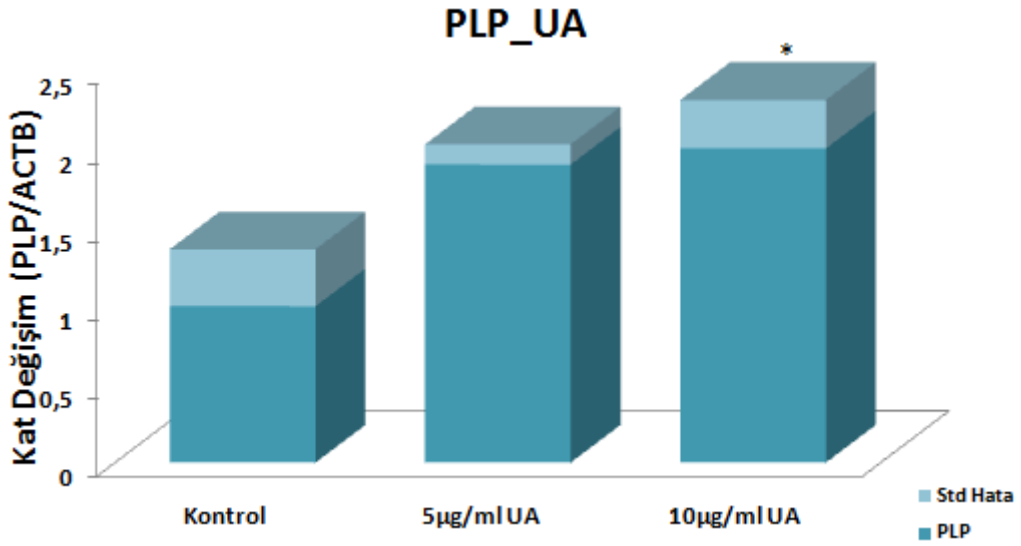
Şekil 145. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MAG mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



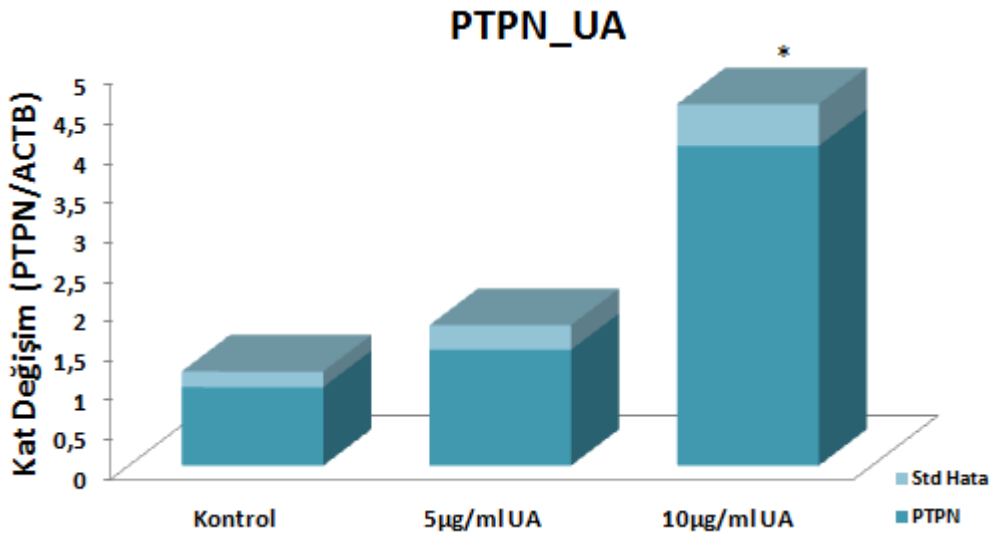
Şekil 146. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) MMP9 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) P < .05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



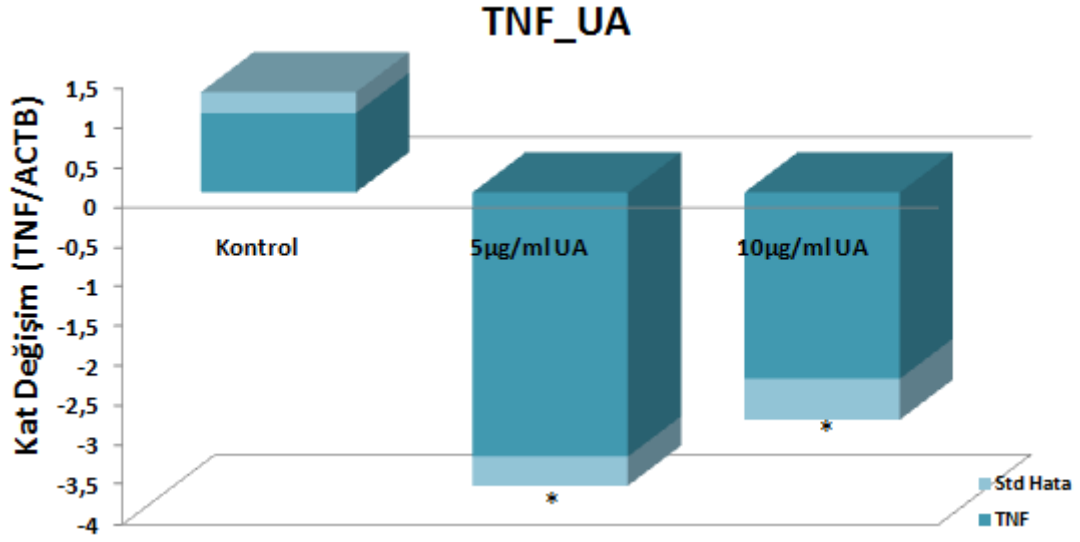
Şekil 147. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) APP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı.



Şekil 148. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PLP mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



Şekil 149. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) PTPN mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



Şekil 150. Ursolik asit aktif maddesinin insan nöroblast hücre hattında (SHSY5Y) TNF mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edildi. Kontrol değerleri 1 alındı. (*) $P < .05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

4 TARTIŞMA

Multipl skleroz giriş bölümünde de detaylı olarak anlatıldığı gibi son yıllarda özellikle ülkemizde de prevalansı artan, dünyanın en yaygın nörolojik bozukluklarından biridir. Bununla birlikte hastalığın etiolojisinden ve patofizyolojisinden kaynaklanan bilinmeyenler ve hastalık karakterlerinin çoklu faktörlerce etkilenen heterojen yapıda olmasından dolayı MS için hala tamamen etkin bir tedavi yöntemi ve kesin tedavi sağlayan ilaçlar yoktur. Bununla birlikte, günümüzde MS'in semptomatik tedavisinde kullanılan yedi adet FDA tarafından onaylanmış, hastalığı modifiye edici ilaç bulunmaktadır ve bunlar da başlangıç olarak bu proje önerisinde yürütülen analizlere benzer çalışmalar ile geliştirilmiştir.

Bu nedenle hastalığın tedavisinde bitkilere dayalı alternatif tedaviler halk arasında kullanılmaktadır. Bu çalışmada Türkiye'de MS hastalarının tedavi için sıklıkla kullandığı *Capparis ovata*'nın iyileştirici etkileri fare MS modeli olan deneysel alerjik ensefalomyelit (DAE) modelinde moleküler, histolojik ve immünokimyasal metotlar ile açığa kavuşturulmaya çalışıldı. DAE MSS'nde görülen ve insanları etkileyen en yaygın nörodejeneratif hastalık olan Multipl Skleroz (MS) için bir hayvan modeli teşkil etmektedir (Martin ve McFarland, 1995). MSCov adını verdiğimiz, tamamen doğal maddeler kullanılarak, hiçbir kimyasal madde ya da çözücü kullanılmadan *Capparis ovata* bitkisi tomurcuk, meyve ve çiçek karışımından elde ettiğimiz (patent X) ekstrenin iyileştirici etkisinin fraksiyonlanarak alt fraksiyonlarda ve izole edilen saf bileşikler düzeyinde ile tanımlamaya çalışıldı.

Proje kapsamında, öncelikle MSCov ile moleküler toksikolojik çalışmalar gerçekleştirildi. Çünkü DAE modelinde kullanılacak güvenli doz saptaması yapılması gerekiyordu. Her ne kadar proje öncesinde öngörüler ile 500 mg/kg/gün dozu tek olarak araştırılması planlanmış olmasına rağmen, daha bilimsel olması, daha doğru olması nedeniyle 2 doz (250 mg/kg/gün ve 750 mg/kg/gün) daha eklenerek 3 farklı doz ile çalışmalar yapıldı.

Moleküler toksikoloji çeşitli ksenobiyotik ajanların canlı organizmalar üzerinde etkileri moleküler gen ekspresyon düzeyinde inceleme çalışmalarıdır. İlaç-vücut etkileşimlerinin anlaşılması ilaç geliştirme için çok önemlidir. Olası yan etkiler için anahtar anlayışlar sunarak ilaç geliştirme programlarının her aşamasında çok önemlidir. 1980'lerin sonlarında %40 olan ilaç etkileşim toksisite oranı moleküler profil çalışmaları ile günümüzde %13'ün altına düşürülmüş durumdadır. Bu nedenle bizim çalışmamızda toksik etkiye aktif şekilde yanıt olan 13 farklı biyolojik yolakta yer alan 380 anahtar gen ve 4 adet normalizasyon (housekeeping) geninin ekspresyonları çalışıldı. Seçilen biyolojik yollar (apoptoz, nekroz, DNA hasarı ve tamiri, mitokondriyal enerji metabolizması, yağ asidi metabolizması, oksidatif stres, ısı şok tepkisi, katlanmamış protein stresi, sitokrom P450 ve ilaç metabolizması, steatoz, kolestaz,

fosfolipidoz ve immün tepki) çok geniş bir yelpazede veri üretecek şekilde ve temel genler olarak seçildi. Böylelikle çok geniş bir yan etki tarama ve belirlenmesi hedeflendi. Bu yollar hemen hemen tüm fizyolojik mekanizmaları kapsayacak verileri üretebilmesi sağlandı ve önemli bir güvenilirlik oluşturulması sağlandı. Böylelikle bu bitkiyi kullanılabilecek kitle açısından da önemli bir veri oluşturulmuş oldu. Çünkü çeşitli ajanların doğrudan insan deneklerde güvenilirliği olmadığı ve denenemediği için ilaçlar gibi ajanların ve çeşitli uygulamaların etkinliği yalnızca hayvan çalışmalarından speküle edilebilir (Fay vd., 2012).

PubMed üzerinde (arama tarihi: 26 Aralık 2015) "hayvan" terimi ile yaptığımız arama 5.854.259 sonuç verirken "hasta" terimi ile yapılan arama 5.368.066 sonuç vermektedir. Bir başka deyiş ile hayvan çalışmaları doğrudan hastalar ile yapılan çalışmalardan daha fazladır. Her ne kadar kemirgenler Homo sapiens ile tartışmasız uzak akrabaları olmalarına rağmen fareler ve sıçanlar, biyomedikal literatürde kral konumunda bulunmaktadır. Bu bilgiler proje kapsamında gerçekleştirilen hayvan çalışmalarının geçerliğini destekler verilerdir. Bu veriler ve değerlendirmeler ışığında elde ettiğimiz verilerin dikkatli değerlendirmeler ile birlikte insan biyolojisi için faydalı veriler olduğunu söylemek mümkün olacaktır.

Moleküler toksikoloji profillemeye çalışmaları ile DAE modelinde 500 mg/kg/gün dozun kullanılmasına karar verildi. Çünkü daha düşük olan doz (250 mg/kg/gün) ile araştırılan genlerin hiç birinde kontrol hayvanlara göre hiçbir değişiklik gözlenmedi. Bununla birlikte daha yüksek olan doz (750 mg/kg/gün) ile profillemeye çalışmaları yaklaşık 110 genin ifade düzeyleri kontrol hayvanlara göre anlamlı olarak farklılık gösterdi. Bu genler üzerine olan etkilerde karmaşık karakterlidir. Bu beklenen bir durumdur çünkü ekstrede çok farklı bileşen bulunması nedeniyle incelenen genler üzerinde de farklı etkiler gözlenmiştir. Hâlbuki bu proje önerisinde saptanılan ve kullanılan doz olan 500 mg/kg/gün moleküler toksisite profillemesinde kullanılan 384 genden sadece 10 tanesinde farklılıklar oluşturdu. Bu genler ve yollar takip edilen bölümlerde tek ele alınarak değerlendirilmektedir. Bu noktada, saptanan dozun aslında oldukça yüksek bir doz olduğunu çünkü 1 gr ekstre nin yaklaşık 100 gr yaş bitkiden kurutulmuş elde edildiği göz önüne alındığında önemli bir miktardır. Ayrıca, bu dozda güvenli sayılabilecek, yan etki potansiyeli olmayan veriler üretmesi de önemlidir. Burada şu şekilde bir spekülasyon yapılabilir: Kapari binlerce yıldır insanlar tarafından tüketilen bir bitki olması bu noktada toksik olma ihtimalini de düşürmektedir. Netice olarak yüksek bir dozun tedavi etmeni olarak herhangi bir yan etki göstermeden kullanılabilmesi önemlidir ve tedavi oluşturması ve kullanılabilirliği için çok önemli bir veridir.

MSCov'un MT dizin analizleri ile toksikolojik profili irdelendiğinde apoptotik yoldan 1 gen (CD40L), DNA hasarı ve tamiri ilişkili 2 gen (Mgmt ve Ogg1)ısı şok tepkisi ilişkili 1 gen (HspB7), kolestaz ilişkili 3 gen (Abcc2, Abcc3 ve Apoe), fosfolipidoz ilişkili 2 gen ve immün yanıt ilişkili

3 gen (Ahr, Apof ve Hrg) olmak üzere toplam 10 gen profili değişiklik göstermiştir. Bu genlerin tamamı kontrol değerlere göre artış göstermekle birlikte artış değerleri aslında hiçbir gen için 2,5 kat değerinin üzerine çıkmamıştır. Anlamlılık düzeyinin ± 2 olduğu göz önünde bulundurulduğunda aslında bu genlerdeki değişimlerin dramatik değişimler olmadığını, sıfır değerlerde olduğunu söylemek mümkündür.

CD40L, ayrıca CD154 olarak da adlandırılır, genellikle etkinleştirilmiş T hücreleri üzerinde ifade edilir ve TNF süper ailesinin üyesi olan bir proteindir (Schönbeck ve Libby, 2001). Ekspres edildiği hücre tipine bağlı olarak çok farklı etkilere yol açmaktadır. Genel olarak adaptif immün sistem için önemli bir reseptördür. Bu açıdan 500 mg/kg/gün MSCov'un adaptif immüniteyi uyarıcı etkisi olduğunu söylemek mümkündür. Bununla birlikte bu ligandın aktifleşmesi için gerekli olan CD40 antijeni MS dizin analizlerinde kontrol ile aynı bulunması bu etkinin karşılık bulmadığı değerlendirmesini de birlikte getirmektedir.

DNA hasarı ve ilişkili genlerden Mgmt, aynı zamanda Agt veya Agat olarak da bilinen O6-alkilguanin DNA alkiltransferaz enzimini kodlayan gen dir (Tano vd., 1990). O6-alkilguanin DNA alkiltransferaz enzimi genom kararlılığı için çok önemlidir çünkü bu enzim replikasyon ve transkripsiyon esnasında doğal olarak gerçekleşen mutajenik O6-metilguanin DNA lezyonlarının geri onarımını gerçekleştirir. Böylelikle oluşabilecek hatalı-eşleşme olasılıklarını ve mutasyonları önler. Bu açıdan MSCov'un bu enzimin ifade düzeyini önemli ölçüde artırması (yaklaşık 4 katlara kadar tespit edilen tekrarlar oldu) MS için olmasa da genel anlamda önemli bir etkidir. Böylelikle MSCov kimyasal karsinojenlere de karşı artı bir değer içerdiğini ileri sürmek yanlış olmayacaktır.

DNA hasarı ve tamiri ilişkili diğer gen olan 8-Oksoguanin glikosilaz (Ogg1), baz-eksizyon tamirinde rol alan bir DNA glikosilaz enzimidir (Bav d., 2014). 8-Oksoguanine (8-okzoG), reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkisi sonucu olarak ortaya çıkan mutajenik bir üründür.

Yapılan çalışmalar vücut sıvılarındaki 8-okzoG seviyesinin çeşitli toksik kimyasallara, inhale ajanlara ve oksidanlara maruz kalmanın iyi bir biyobelirteci olduğunu, maruziyetin düzeyi ile de iyi korrelasyon sergilediğini göstermiştir (Lunec 1998). Ayrıca, artan 8-okzoG'nin küçük GTPaz aktivasyonu ile özellikle proenflamatuar etki gösteren genlerin ifade düzeylerini de artırdığı bildirilmiştir (Radag ve Boldogh, 2010). Bu bilgiler ışığında MSCov'un hem çeşitli kimyasal ajanlar tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerinin neden olduğu 8-okzoG düzeyini süpüren enzimi aktive etmesiyle ant-mutajenik etkiye sahiptir ve hem de bu 8-okzoG tarafından gerçekleştirilen proenflamatuar etkiyi baskılamasıyla da antienflamatuar etkiye sahip olduğu tespit ilk kez bu çalışmamız ile tespit edildi. Gerçekten MSCov'un bu şekilde dual bir etki göstermesi MS hastalığı tedavisi içinde önemli bir özelliktir.

Bu profillemeye çalışmaları ile tespit edilen diğer bir gen ısı şok proteini beta 7, 27 kDa büyüklüğünde kardiovasküler bir şaperondur (Entrez gen ID: 27129, 6-Aralık 2015). Literatürde üzerinde fazla çalışma ve bilgi bulunmayan bu proteinin iskelet protein ağlarının oluşmasında ve düzenlenmesinde önemli olduğu bildirilmiştir (Brinkmeier ve Ohlendieck, 2014). Ayrıca literatürde bu gen ile ilişkili bir hastalıkta bildirilmemektedir (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HSPB7>; 26 Aralık 2015). Mevcut veriler ışığında MSCov'un HspB7 geninin ifade düzeyini az bir miktar da olsa artırması, kalp ve iskelet kasının protein ağ yapısının korunmasında koruyucu bir etki şeklinde yorumlanması yanlış olmayacaktır.

AbcC2, ATP-bağlayıcı kaset alt familyası C üyesi 2 yada kanalikül multispesifik organik anyon taşıyıcı 1 (cMOAT) olarak adlandırılan çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein 2 (MRP2) kodlayan bir gendir (van der Schoor vd., 2015). Benzer olarak AbcC3 de ATP-bağlayıcı kaset alt familyası C üyesi 3 veya çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein 3 (MRP3) olarak adlandırılan proteini kodlar. Bu proteinler özellikle hepatositlerin kanalikül (apikal) kısmında ifade edilmektedir ve safra taşıma işlevleri yapmaktadır (Sekine vd., 22006). Organik anyonların safra ve bağırsak salgılanmasında indüklenabilir bir taşıyıcı olarak hareket etmesiyle kolestatik hepatositlerden safra asitlerinin ve glukuronidlerin atılımı için alternatif bir yol olarak işlev görebilmektedir (van der Schoor vd., 2015). Bunun yanı sıra, vinblastin gibi antikanser ilaçları da dahil olmak üzere bir çok ilacın geri taşınmasında rol oynaması nedeni ile de memeli hücrelerinde ilaç direncine önemli katkıda bulunduğu görülmektedir. Sonuç olarak MSCov'un bu genler üzerindeki etkisi kılıcın iki yüzü gibi yorumlanabilir. Bir yandan normal fizyolojik koşullar ve kolestatik durumlar için avantaj olabilecek bir durum sergilerken diğer yandan ilaç direncine katkı sağlaması bir negatif durum olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, MSCov kullanımının duruma göre değişiklik arz etmesi ve dikkatli kullanılması gereklidir. Bu noktada, bu genleri ile ilgili dikkate alınması gereken bir diğer durum da he iki genin intron yapılarında Nrf2 (Nükleer faktör 2) cevap elemanı olarak görev yapan diziler bulundurmalarıdır (van der Schoor vd., 2015). Böylelikle oksidatif hasara karşı da cevap olarak işlev yapmaktadırlar. Buradan şu yorumu yapmak yanlış olmayacaktır. MSCov ekstresi içerisindeki bir bileşik Nrf2 üzerinden bu genlerin ifadelerini uyarıyor olabilir. Bu yönüyle de oksidan stresine karşı bir tepki olarak ele alındığında da MSCov koruyucu bir rol sergilemektedir.

ApoE geni tarafından kodlanan protein şilomikronların majör bir apoproteini olup. Belirli bir karaciğer ve periferel hücre reseptörüne bağlanan ve trigliserid zengin lipoprotein bileşenlerin normal katabolizması için gereklidir (Rall vd., 1982) . Gelişen çalışmalar APOE ve APOE izoformlarının fonksiyonlarının lipid metabolizması ötesine geçtiğini ve normal beyin fonksiyonlarının gerçekleşmesi için de önemli olduğunu göstermiştir (Mahley vd., 2000). MSS'nde kolesterol ve lipid metabolizması periferalden farklıdır ve miyelin tabakasının sentezi için önemlidir (Dietschy ve Turley, 2004). Oldukça yeni olan ve son dönemlerde yapılan

çalışmalar beyindeki ApoE'nin bazı nörolojik hastalıkların ortak bir özelliği olan beta-amiloid (A β) temizlenmesini düzenlediğini önermektedir. (Kim vd., 2011; Bien vd., 2012). Bunun yanı sıra, tespit edilen ApoE artışının periferalde triaçil gliserol ve kolesterol metabolizmasını düzenlenmesinde önemli olduğu da aşikardır çünkü bu genin eksikliğinde VLDL kalıntılarının tamamen giderilememesinden dolayı disbetalipoproteinemia veya tip III hiperlipoproteinemia gibi hastalıklar ve artan kardiovasküler hastalık riskleri bildirilmiştir. Bununla birlikte ApoE polimorfik bir gen dir ve her ne kadar alelik isoformları sadece 1 veya 2 amino asitte farklılık gösterse de fizyolojik ve işlevsel olarak önemli farklılıklar arz etmektedir. Bu nedenle bu çalışmada tayin edilen bu ApoE ifade değişikliğinin tam anlamını tespit edebilmek için alelik isoform tespiti gereklidir.

Ayrıca, ApoE'nin anti-enflamatuar, ve immün modülatör özellikleri olduğu gösterilmiştir (Grainger vd., 2004; Ali vd., 2005; Braesch-Andersen vd., 2013). ApoE eksojen lipid antijenlerin teslim aracı olarak işlev görerek T-hücre aktivasyonunu sağlar (van den Elzen, 2005). Apolipoprotein E serum kaynaklı lipid antijenlerinin antijen sunan hücreler (APC) tarafından T-hücre aktivasyonunda kullanılması için taşınmasına aracılık eder. Böylece, bağışıklık sistemi lipid antijenlere immünolojik tepkiler geliştirmek için bir lipid metabolizması bileşeni olan ApoE ile birlikte çalışır (van den Elzen, 2005). Bu açıdan ele aldığımızda bizim için elde ettiğimiz bu sonuçlar daha enteresan ve bu noktanın daha fazla irdelenmesi gerektiğini göstermiştir. Çünkü toksikolojik önemi yanısıra ApoE'nin nörodejeneratif hastalıklarda önemli olması, immün düzenleyici ve anti-enflamatuar etkiye sahip olması MS çalışmaları içinde detaylandırılması gerekliliğini gösterdi. Bu noktada ilerleyen zamanda daha detaylı çalışmalar yapılması düşünülmektedir. Bu konuda sonuç olarak, yukarıda da belirtildiği gibi daha detay verilere ihtiyaç duyulmasına rağmen mevcut verilerinin MSCov için pozitif etki olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Her ne kadar kolestaz yanısıra immün tepkide de yer alan bir diğer gen ApoF de aynen ApoE gibi kolesterol taşınmasında ve metabolizmasında yer alan ancak lipoprotein yapısında minör olan bir lipoproteindir. Bu gen ile ilgili literatürde fazla bir veri bulunmamaktadır (Pubmed de "ApoF" terimi ile yapılan tarama sonucunda sadece 29 yayına ulaşılmaktadır, 26 Aralık 2015). Bu yayınlarda da bizim çalışma alanımız ile örtüşen veriler yoktur. ApoF ile ilişkili "Dacryoadenitis" hastalığı bildirilmiştir (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=APOF>; 26 Aralık 2015). Bu da göz yaşı bezlerinin enflamasyonu ile ilgili olan bir hastalık olması ve ApoF eksikliği ile ilişkili olması açısından MSCov'un bu genin ifade düzeyini artırması pozitif olarak ele alınabilir. Ancak bunun çok uzak bir çıkarım olduğunu da belirtmek gerekir.

Aril hidrokarbon reseptörü (AhR) aromatik hidrokarbonların biyolojik yanıtların düzenlenmesinde rol oynayan bir ligand-aktifleştirici transkripsiyon faktörüdür (Bradford vd., 1992; Kewley vd., 2004). Bu reseptör, sitokrom P450 olarak ksenobiyotik metabolize edici enzimleri regüle ettiği bilinmektedir ve çevresel adaptasyonun düzenlenmesinde önemlidir. AhR'in fizyolojik açıdan en önemli rolü gelişimde ki rolüdür (Hahn vd., 2006). Bunun yanısıra son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar AhR aktivasyonunu interlökin 22 uyarılarak ve Th17 bastırılarak enflamasyon baskılanması gibi immünolojik tepkilerin oluşturulması için de çok önemli olduğu gösterilmiştir (Quintana vd., 2008; Li vd., 2011; Monteleone vd., 2011; Wei vd., 2014; Cella ve Colonna., 2015). Bu nokta da çalışmamız için önemli bir diğer veride bu konuda elde edilmiştir. Çünkü MSCov'un anti-enflammatuar etkisinin altında yatan mekanizmalara açıklık sağlayan bir veri oldu. Burada özellikle MSCov üzerinden AhR'nin Th17 üzerinden baskılayıcı etki gösterdiğini söylemek ve tespit etmek önemli oldu. Çünkü bu hücreler MS'in patofizyolojisinde de son derece önemlidirler. Böylelikle MSCov'un MS için tedavi edici etkisine de bir açıklık kazandırıldı. Tabi ki bu verini doğrudan deneyler için doğrulaması gereklidir ve bunu için yeni deneyler (proje önerisinde yer almayan) gerçekleştirilmesi gereklidir.

Hrg geni insanlarda histidin bakımından zengin glikoproteini kodlar. Histidin bakımından zengin glikoprotein (HRG), bir çok domeynli bir yapıya sahiptir ve bu nedenle Zn⁺², hem, tropomiyozin, heparin ve heparan sülfat, plazminojen, plazmin, fibrinogen, trombospondin, IgG, ve FcγR gibi bir çok ligand ile etkileşime girer ve önemli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde yer alır (Jones cd., 2005). Bu glikoprotein, T lenfositler, eritrosit, EBV dönüştürülmüş insan B hücreleri, trombositler, gibi endotel, melanom, yumurtalık, fibroblast, lenfoma ve miyeloid hücre hatları dahil olmak üzere bir çok hücre tipine bağlanmaktadır. Bu gen ifade düzeyinin MSCov tarafından artırılması bu ekstre için çok önemli bir avantaj olarak ifade edilebilir. Çünkü Hrg ifadesi hücre proliferasyonu ve adhezyonu, koagülasyon ve anjiogenez gibi süreçlerde önemli olması yanısıra immün hücrelerin düzenlenmesinde de yer almaktadır. Yapılan çalışmalar HRG'nin *in vivo* olarak immün komplekslerin oluşumunda, çözünürleştirilmesinde ve sonradan uzaklaştırılmasında önemli bir role sahip olabileceğini göstermektedir (Gorgani vd., 1999; Allison vd., 2005). Bu nedenle, MSCov'ın hrg üzerinden etki göstererek immün düzenleyici bir etki gösterdiğini söylemek mümkündür.

Bu bölümde gerçekleştirilen toksikolojik profillemeye çalışmaları MSCov için hem toksikolojik ve hem de MS üzerinde patofizyolojik mekanizmalara etkisi açısından önemli veriler üretildi. Genel anlamda proje önerisinde kullanılan 500 mg/kg/gün dozun toksik olmadığını, bu dozda önemli bir yan etki oluşturacak veri tespit edilmediğini söylemek olasıdır. Ancak, toksisitenin doz bağımlı olduğuna vurgu yapmaya gerek olmamakla birlikte bu durumun 750 mg/kg/gün dozda geçerli olmadığı gerçeği ile teyit edilmektedir. MSCov kullanılan 500 mg/kg/gün dozda protein ağ yapılarını koruyucu, DNA hasarı ve tamiri ilişkili genler üzerinden mutajenik etki

engelleyici, toksik oluşumları baskılayıcı; çeşitli taşıyıcılar üzerinden kolestatik hepatosit için alternatif oluşturucu ve böylelikle tedavi edici, antioksidan sistemi uyarıcı, AhR üzerinden Th17 baskılayıcı, ApoE ve F üzerinden kolesterol metabolizmasını düzenleyici ve nörodejeneratif olguları giderici ve birden fazla gen üzerinden bağışıklık sistemini düzenleyici gibi önemli etkiler gösterdiği tespit edildi. Bu etkilerin yanısıra, MS ilişkili bazı fizyolojik ve patolojik olgulara da etkisi belirlendi ve etki mekanizmalarına dolaylı veriler sağlandı. Sonuç olarak, kullanılan 500 mg/kg/gün doz toksik değildir ve yararlı etkiler sağlamaktadır.

Daha önce de belirtildiği gibi 500 mg MSCov ekstre elde etmek için yaklaşık 50 gram yaş kapari gereklidir. Bu verilerden yola çıkarak insan için bir spekülasyon yapacak olursak ortalama 70 kg olan bir insanın bir batında 3,5 kg kapari tüketmesi anlamına gelen bir değerdir. Bu nedenle, bu dozda insan için toksik bir etki göstermesi olası değildir. Bu noktada yukarıda da belirtildiği gibi insanlığın gelişim sürecinde binlerce yıldır bu bitkiyi gıda olarak kullanması da bu durum için altında yatan bir adaptasyon mekanizması olarak kabul edilebilir.

Çalışmalarımızda toksik olmayan güvenli doz saptaması gerçekleştirildikten sonra DAE modeli ile tedavi çalışmalarına geçildi. Bu işlem için proje başlarında hayvanların kullanılan MOG antijenine direnç göstermesi nedeni ile bazı sıkıntılar yaşandı ve hasta modeli oluşturulmakta zorluklar ile karşılaşıldı. Ancak ilerleyen süreçte kobay firmasının da yeni hayvan ithal etmesiyle gelen ve kullanılan yeni grup hayvanlarda bu durum aşıldı ve bu deneyler proje süresinde farklı zamanlarda olmak üzere dört defa tekrar edildi. Öncelikle, hastalığın klinik skor olarak pik değerlere ($3,5 \pm 0,5$) ulaştığı durumlarda hayvanlarda kontrollere göre anlamlı olarak değişen gen ifadeleri dizinler ("array") kullanılarak saptandı. Bu çalışmalar neticesinde 22 adet gen saptadık. Bu genler enflamasyon/sitokin/kemokin ilişkili genler (CCL5, CXCL9, CXCL10, HIF1A, NFKB, PTPN11, STAT3, TNF α); miyelin ilişkili genler (MAG, MBP, PLP, SOD); T-hücre aktivasyonu ilişkili genler (CD4, IL6, TGFB1); kalıtsal bağışıklık (adaptif immünite) ilişkili genler (C1s); apoptoz ilişkili genler (BCL2, MMP9); reseptör ilişkili genler (H2-Eb1); hücre adezyonu ilişkili genler (APP) ve diğerleri (GFAP; GNAI; YWHAH) şeklinde gruplandı.

İncelendiğinde bu genlerin MS patofizyolojisi ile bir şekilde ilgili olduğu görülmektedir. Bu genlerin proje ile ilgi ve önemini açmak ve yorumlamalar getirebilmek için, öncelikle kısa kısa teorik bilgiler ele alınarak yapılan değerlendirmeler aşağıda verilmektedir.

RANTES adıyla da bilinen CCL5, monositler, bellek T-yardımcı hücreler ve eozinofiller için kemo-çekicidir (kemokindir). Bazofillerden histamin salınımına neden olur ve eozinofilleri aktive eder. MS hastalarının beyin omurilik sıvısında arttığı ve biyobelirteç olduğu bildirilmiştir (Sorensen vd., 1999; Tomioka ve Matsui, 2014). CCL5 bizim çalışmamızda, DAE modelinde CXCL10'dan sonra en fazla artış gösteren ikinci (78 kat) gen oldu.

CXCL10 geni, enflamatuar kemokin olarak tanımlanan ve CXCR3'e (nöroimmün kemokin reseptörü) bağlanarak T hücreleri, eozinofiller, monositler ve NK hücreleri gibi lökositlerin aktivasyonu yoluyla bağışıklık yanıtına aracılık eden ve pleiotropik etki gösteren küçük bir proteindir (Vazirinejad vd., 2014).. CXCL10 MS'de lökosit göç faktörü olarak etki ederek ve proenflamatuar reaksiyonlara aracılık ederek demiyelinizasyonun sürecini teşvik edici etki gösterilmiştir (Muller vd., 2004). Ayrıca, yapışma moleküllerinin ifade düzeylerini düzenleyen ve dolayısıyla, otoreaktif bağışıklık uyumlu hücrelerinin kan-beyin bariyerini transendotelial geçişini oldukça kolaylaştırdığı bildirilmiştir (Butmann vd., 2004). "Disease" veri bankasında MS'in yanısıra birçok başka hastalık ile de ilişkilendirilmiştir. Yukarıda belirtilen etkilerden dolayı MS patojenezinde ve nökslerde önemli bir kemokindir. Proje çalışmalarımızda en fazla artış gösteren (yaklaşık 80 kat) gen oldu.

CXCL10 gibi bir başka CXCR3 ligandı olan CXCL9, interferon-gamma tarafından indüklenebilir olarak bilinen ancak CXCL10 ile yapısal ilişkisi olmayan ve işlevsel olmayan, C-X-C kemokin alt grubu içinde bir proteindir. Genellikle fizyolojik şartlar altında lenfoid olmayan dokularda tespit edilemeyecek kadar düşük olan bu kemokin, güçlü bir enfeksiyon veya immünoenflamatuar yanıt sırasında özellikle de interferon gama ile indüklenir. CXCR3 ve muhtemelen ilave reseptörlere bağlanarak CD4⁺-Th1 hücreleri, CD8⁺-T hücreleri ve NK hücreleri üzerinde etki göstererek lökosit göçlerini uyarıdığı önerilmektedir (Muller vd., 2010). Bu nedenle özellikle merkezi sinir sisteminde MS ile birlikte pek çok farklı patolojik koşullarda arttığı bildirilmesine rağmen tam net bir veri yoktur (Carter vd., 2007). Bu çalışmaların sonuçları bazen şaşırtıcı bazen de çelişkili olduğu görülmektedir. Nöroenflamatuar hastalıkların patojenezinde bu kemokinin rolü için daha fazla ve detaylı çalışmalar ihtiyaç vardır. Ancak bizim çalışmamızda yaklaşık 13 kat gibi bir artış göstererek MS ile ilişkili ve önemli olduğunu gösterdi.

Hipoksi indüklenebilir faktörü 1-alfa, HIF1A geni tarafından kodlanan bir heterodimerik transkripsiyon faktörünün hipoksi ile tetiklenebilen bir alt-birimidir (Semenza vd., 1996). Temelde heliks-döngü-heliks PAS domeyni içeren bir proteindir ve hipoksiye karşı hücrel ve gelişimsel yanıtın ana düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir (Hogenesh vd., 1997). Bu genin kontrolünün bozulması yada fazla ifade edilmesi öncelikle kanser olmak üzere bir çok patofizyolojik durum için neden olduğu bildirilmektedir (Hu vd., 2013). Son dönemlerde yapılan çalışmalar MS'de spinal beyaz ve gri maddede gözlenen nörolojik bozuklukların hipoksi ilişkili olduğu ve gözlenen fonksiyon bozuklukları ve kayıplarının HIF1a ekspresyonu ve aktivasyonu ile doğrusal orantılı olduğu bildirilmiştir (Davies vd., 2013; Gaber vd., 2015). Bizim çalışmamızda HIF1a geni yaklaşık ortalama 5 kat değişim gösterdiği tespit edildi.

NF- κ B (aktifleşmiş B hücreleri Nükleer Faktör kappa hafif zincir-arttırıcı) DNA transkripsiyonu, sitokin üretimi ve hücre canlılığının kontrol eden, bir protein kompleksidir (Gilmore 2006). Hemen hemen tüm hayvan hücre tiplerinde bulunan ve stres, birçok uyanlara karşı hücrel tepkileri düzenlemede yer almaktadır. Her ne kadar enflamasyon ve otoimmün hastalıklar ile ilişkisi gösterilen bir faktör olmasına rağmen, Pubmed'de "MS" ve "NF- κ B" terimleri ile yapılan tarama sadece 7 adet yayın vermektedir (28 Aralık 2015). NF- κ B hücrede hızlı yanıt oluşturan birincil transkripsiyon faktörlerindedir. Hücrede normal zamanda etkin olmayan halde bulunur ve aktifleşmek için protein sentezine gerek duymaz ve sadece inaktif halden aktif hale döner. Bu çalışmamızda NF- κ B MS modelinde yaklaşık 4 kat artış gösterdi.

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

Janus Kinaz/Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü (JAK/STAT) sinyal yolu sitokinlerin biyolojik aktivitelerine aracılık eder ve bağışıklık tepkilerinin geliştirilmesi ve düzenlenmesi için önemlidir (O'Shea ve Plenge, 2012). JAK/STAT yolunun regülasyonu MS/EAE de dahil olmak üzere pek çok oto-bağışıklık hastalıklarına katkıda bulunur (Benveniste.vd., 2014). Altmıştan fazla sitokin ve büyüme faktörü bu yolağı kullanmaktadır. STAT3 MS duyarlılık geni olarak teşhis edilmiştir (Baranzini vd, 2009; Jakkula vd., 2010), ve bağımsız bir diğer çalışmada (Lill vd., 2012) STAT3 MS riskinde bir artış ilişkisi bildirmiştir. Bu çalışmamızda da STAT3 gen ifade düzeyinde DAE modelinde anlamlı artışlar kaydedildi.

TNFa geni, tümör nekroz faktörü (TNF) süper ailesine ait olan çok fonksiyonlu bir pro-enflatuar sitokini kodlar (vasalli, 1992) Bu sitokin özellikle makrofajlar tarafından salgılanır. ve TNFRSF1A/TNFR1 ve TNFRSF1B/TNFR2 reseptörlerine bağlanarak işlevlerini gerçekleştirir. Bu sitokin hücre çoğalması, farklılaşma, apoptoz, lipid metabolizması ve pıhtılaşma dahil çok geniş bir yelpazede biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde yer almaktadır. Bu sitokin, otoimmün hastalıklar, insülin direnci ve kanser gibi hastalıklarda çeşitli rol oynadığı gösterilmiştir (probet, 2015). "Disease" veri bankasında multipl skleroz yanı sıra romatoid artrit, enflatuar barsak hastalığı, aşırı duyarlılık reaksiyonu tip II hastalığı, kanser, sıtma, bağ dokusu hastalığı, ankilozan spondilit, psoriatik artrit, sedef hastalığı, tüberküloz, vasküler

hastalık ve peritonit astım ile ilişkisi bildirilmektedir. Bizim de bu çalışmamızda DAE modelinde dördüncü en fazla (26 kat) artış kaydettiğimiz gen oldu.

MS dizin çalışmalarımız ile farklılık tespit ettiğimiz ikinci grup genler miyelin ilişkili genlerdir. Yukarıda ki grup genlerde artış gözlenirken miyelin ilişkili genlerin tamamında baskılanma gözlemlendi.

Miyelin temel protein (MBP) geni tarafından kodlanan bu protein, sinir sisteminde oligodendrosit ve Schwann hücrelerinin miyelin kılıfının önemli bir yapı taşıdır (Harauz ve Boggs, 2013). MBP sadece kompakt miyelin oluşunda klasik yapıştırıcı rolü oynamasının yanı sıra oligodendrosit çoğalmasında ve miyelinogenez sırasında zar oluşum ve uzatma sürecine aktif katılım gösteren ve stabilizasyonda önemli bir proteindir (Kenrick vd., 2015). MBP'lerin azalması miyelin membran bağlanmada zayıflamalara neden olabilmektedir. Bu mekanizma multipl skleroz gibi demiyelinasyon hastalıklarında bir neden olarak ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmamızda MBP geni anlamlı azalma göstermiştir.

MBP gibi miyelin kılıfının yapısında bulunan bir diğer gen ürünü miyelin-ilişkili glikoproteindir (MAG). İmmüoglobülin üst ailesinin bir üyesi olan MAG, 100kD büyüklüğündedir ve miyelin-oluşturucu hücreler (oligodendrositler ve Schwann hücreleri, her ikisi de) arasındaki etkileşimleri düzenler (Quarles, 1989). Diğer miyelin proteinlere kıyasla multipl skleroz plaklarının gelişiminde erken kaybı bu hastalığın patogenezinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Nakara vd., 2003, Quarlee, 2007). Bu çalışmamızda da MAG ifadesinde MBP'de gözlemlendiği gibi anlamlı baskılanma tespit edildi.

Proteolipid protein 1 (PLP1) geni, merkezi sinir sisteminde ana miyelin proteini olan bir transmembran proteolipid proteini kodlar. Bu protein, miyelin tabakasının sıkılaştırılması ve stabilizasyonunda ve korunmasında rol oynar ve yanı sıra oligodendrosit gelişmesi ve aksonal sağlık bakımından da oldukça önemlidir. Bu proteinin MS hastalığının seyir süreçleri ile doğrusal ilişki gösteren dört proteinden biri olduğu bildirilmiştir (Raphael vd., 2012). Bizim çalışmamızda anlamlı olarak değişmese de baskılanma gözlemlendi ve çalışmaya dahil edildi.

SOD1 geni süperoksit dismutaz 1 ya da süperoksit dismutaz [Cu-Zn] olarak bilinen, insanlarda kromozom 21 üzerinde yer alan enzimi kodlar. SOD reaktif oksijen türlerini süpürücü bir enzimdir ve daha çok apoptoz ve amiyotrofik lateral skleroz ile ilişkilendirilmiştir. Ancak NİMS hastalarının kanlarında SOD düzeylerinin kontrol hastalara oranla azaldığı rapor edilmiştir (Polachini vd., 2015). Aslında SOD doğrudan miyelin ile ilişkili olmamasına rağmen dolaylı olarak miyelin dejenerasyonunda ilişkili olduğu önerildiğinden bu grup genler içine alınmıştır. Çalışmamızda bizde SOD1 gen ifade düzeyinin baskılandığını tespit ettik.

MS dizin çalışmalarımız ile farklılık tespit ettiğimiz üçüncü grup genler T-hücre aktivasyonu ilişkili genler olarak ortaya çıktı. Bu grup genlerin tamamında artış gözlemlendi.

CD4 antijeni ya da T-hücre yüzey glikoproteini olan CD4, MHC sınıf II antijen/T hücre reseptörü etkileşimleri için yardımcı protein/reseptördür. Bu gen, T lenfosit hücrelerinde ana histouyumluluk kompleksi sınıf II antijenler ile etkileşime giren bir membran glikoprotein proteini kodlar ve aynı zamanda insan immün yetmezlik virüsü için de bir reseptördür (Brady vd., 1993). Bu gen, sadece T lenfositlerde değil aynı zamanda B hücreleri, makrofajlar ve granüositlerde de ifade edilir. Aynı zamanda, beyin belirli bölgelerinde de ifade edilir. Bu protein T-hücre aktivasyonunun erken döneminde aktivasyon başlatıcı ve artırıcı olarak işlev yapmasından dolayı merkezi sinir sisteminde enfeksiyon veya bağışıklık aracılı nöronal hasar oluşunda önemli bir rol oynar (Chitnis, 2007). "Disease" veri bankasında MS'in yanısıra birçok başka hastalık ile de ilişkilendirilmiştir. Bizim alışmamızda da CD4 antijen ifade düzeyi ortalama dört kat artış gösterdiği tespit edildi.

İnterlökin 6 (IL-6) geni, enflamasyonda ve B hücrelerinin olgunlaşmasında rol oynayan bir sitokin kodlar. Buna ek olarak, kodlanmış proteinin ateşli ya da otoimmün hastalıklarda enfeksiyon indüklemeye yeteneğine sahip olan bir endojen pirojen gösterilmiştir. Bu protein, özellikle serum içine salgılanması ve IL-6 reseptör alfa ile transkripsiyonel enflamatuvar yanıtı neden olduğu akut ve kronik enflamasyon bölgelerinde üretilmektedir (Krumbholz and meini 2014). Bu alışmamızda IL6 düzeyi yaklaşık 5-6 kat artış göstermiştir.

Transforme edici büyüme faktörü-beta 1 (TGF-beta1) hemopoietik hücrelerde çeşitli etkileri olan güçlü bir düzenleyici sitokindir (Goris vd., 2007). TGFb1'in bağışıklık sisteminde önemi, lenfosit proliferasyonu, farklılaşması ve fonksiyonunu düzenlenmesi ile toleransı muhafaza etmesidir (Kim vd., 2005). T-hücreleri arasında, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺-T reg hücreleri TGFb1'in önemli kaynağıdır ve enflamasyonik bölgelerde bağışıklık yanıtları bastırır (Marie vd., 2006). TGFb1 ekspresyonu veya onun T-hücreleri üzerindeki sinyal kusurları çeşitli otoimmün hastalıkların başlangıcı ile bağlantılıdır. Bu nedenle, TGF-betanin multipl skleroz gibi oto-bağışıklık hastalıklarının kontrolü için terapötik opsiyon olarak önerilmektedir.(Mirshafiey ve Mohsenzadegan, 2009) Bununla birlikte, TGF-b1'nin, multipl skleroz veya deneysel modeli üzerinde koruyucu etkilerini gösterdiği ana mekanizma hala açıklanmaya ihtiyaç duymaktadır ve incelenmesi gereken konu olarak durmaktadır. Bizim alışmamızda da TGFb1 hasta modelinde anlamlı artışlar göstermiştir.

MS dizini ile farklılık arz eden bir diğer gen de kalıtsal bağışıkta yer alan C1s geni oldu. C1s klasik kompleman sistemi yolunun ilk bileşeni oluşturmak için C1q ve C1r ile kompleks oluşturan ve C2 ve C4'ü aktive eden bir serin proteazdır (Gal vd., 2002). Bu bileşen kalıtsal bağışıklık için önemlidir ve DAE modelinde oldukça artış göstermiştir. Son dönem yapılan

çalışmalar kompleman sistemin sistemik aktivasyonunun MS'in patogeneğinde önemli olduğunu gösteren kanıtlar sunmaktadır (Ingram vd., 2009). Hatta bazı çalışmalar artan serum düzeylerinin biyomarkör (belirteç) olarak kullanılabilirliğini ileri sürmektedir (Ingram vd., 2012). Bu kanıtlar bizim yaptığımız tespitinde doğru olduğunu desteklemektedir.

Apoptoz ilişki iki gende de MS dizini ile anlamlı artışlar tespit edildi. Bcl-2 (B-hücreli lenfoma 2), geni tarafından kodlanan Bcl2 proteini insanlardaki Bcl-2 familyasının temel bir düzenleyici üyesidir ve mitokondri dış zar integral proteindir. Apoptoz ya da programlanmış hücre ölümü düzenleyen bir proteindir. Genel anlamda Bcl2 , apoptozu inhibe etmesi nedeniyle anti-apoptotik bir protein olarak kabul edilir (Hockenbery vd., 1990). Apoptotik gen ifadesi ve klinik hastalık aktivitesinde değişiklikler arasında kesin bir ilişki değerlendirilmemiştir. Ancak, NİMS hastaların periferal-kan-tek-çekirdekli-hücrelerinde (PBMC) anti-apoptotik (özellikle Bcl2) genlerinin ifade düzeylerinin önemli düzeyde arttığı bildirilmiştir (Achiron vd., 2007). Bu çalışmada da Bcl2 ifade düzeyinin DAE modelinde yaklaşık 2,5 kat arttığı tespit edildi.

MMP9 Matriks metalloproteinaz (MMP) ailesinin bir proteini olarak hem embriyonik gelişme, üreme ve dokunun yeniden şekillenmesi gibi normal fizyolojik süreçlerin, hem de artrit ve metastaz gibi hastalık süreçlerinde hücre dışı matriks yıkımına katılırlar. Birçok MMP hücre dışı proteinazlar tarafından kesildikleri zaman aktif hale gelen inaktif proproteinler olarak salgılanırlar. Bu gen tarafından kodlanan enzim izoformu, tip IV ve tip V kolajenleri parçalar. Rhesus maymunlarda ve farelerde yapılan çalışmalar enzimin kemik iliği hematopoetik progenitör hücrelerin, IL-8 kaynaklı harekete geçirilmesinde etkili olduğunu göstermektedir. MMP-2/9'un MS patojenizinde potansiyel olarak BBB geçirgenliğini arttırdığı önerilmektedir (Tasaki vd., 2014). Bizim çalışmamızda da MMP9 için MS modelinde anlamlı artışlar tespit edildi.

Doku uyuşmazlık 2, Sınıf II Antijen E Beta (H2-EB1) geni, HLA-DRB1, HLA sınıf II beta zinciri paraloglarına dahildir. Sınıf II molekülü, bir alfa (DRA) ve bir beta zincirinden (DRB) oluşan bir heterodimerdir ve her iki alt birim de membrana bağlıdır. Hücre dışı proteinlerden türetilen peptitlerin sunulmasında yer alması nedeni ile bağışıklık sisteminde merkezi bir rol oynar. Bu gen MS ile ilişkisi ve risk faktörü olduğu ilk tanımlanan lokustur ve esas sorumlu genidir (Schmid vd., 2007; Handunnetthi vd., 2010). Bizim de bu çalışmamızda dördüncü en yüksek artış tayin ettiğimiz gen oldu.

Bir hücre yüzey reseptörü olarak çalışan amiloyid beta prekürsör protein A (APP), nöronların yüzeyinde nöronal adhezyon, aksonogenez ve nörit büyüme ile ilgili fizyolojik işlevleri yerine getirmektedir (Aydın cd., 2012). Protein-protein etkileşimleri ile hücre hareketliliği ve transkripsiyon düzenlenmesinde de rol alır. APBB1-KAT5'e bağlanarak transkripsiyon aktivasyonunu indükler ve Numb proteini ile etkileşimiyle de Notch sinyal yolağını inhibe eder

(Multhaup.vd., 2015) "Disease" veri bankasında bu protein ile ilişkili olarak: alzheimer hastalığı, amiloidoz nörodejeneratif hastalıklar, toksik ensefalopati, down dendromu, akciğer kanseri ve karsinoma gibi hastalıklar bildirilmiştir. Bu gen aslında bizim çalışmamızda anlamlı bir değişkenlik göstermedi. Ancak nörodejeneratif hastalıklarda çok çalışılan ve incelenen bir gen olması açısından dolayı projede bu genin ifade düzeylerinin değişimleri takip edildi: Çünkü özellikle bu genin ifade düzeyinde baskılayıcı etki gösterme, önemli bir özelliktir ve popüler olması açısından bilimsel ve kamusal ilgi uyandırmaktadır.

MS dizin analizleri ile genelde herhangi bir kategoriye dahil edilmeyen 2 adet daha gen ile anlamlı farklılıklar tespit edildi. Bu genlerden ilki Glial fibriler asidik proteinidir (GFAP). Bu gen, olgun astrositlerin ana ara filaman proteinlerinden birini kodlar. GFAP'ın MS hastalarının beyin omurilik sıvısında hastalık süreçlerini belirlemede ve nörodejenerasyonu tanımlamada bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği iddia edilmektedir (Giovannoni, 2006; 2014). Proje çalışmalarımızda da GFAP ifade düzeyinde DAE modelinde yaklaşık 5 kat artış gözlemlendi

YWHAH geni, son derece korunmuş bir protein ailesi olan 14.3.3 protein ailesindedir ve metabolizma, protein değiş tokuşu, sinyal iletimi, apoptoz ve hücre döngüsü regülasyonu gibi birçok canlı hücre süreçlerinde rol alırlar. Bu protein merkezi sinir sistemi nöronlarında yüksek seviyelerde ifade edilen asidik 30-kDa ağırlığında bir proteindir. Literatürde MS hastalarının beyin-omurilik sıvısında tespit edilen 14-3-3 proteinin beyin yıkımı için bir belirleyici olduğunu gösteren tek bir yayın bulunmaktadır ve 14-3-3 proteininin MS patolojisinde aktif bir rol oynadığı ileri sürülmektedir (Sato vd., 2004). Başka veri olmaması bu hipotezi önemli derecede sorgulanır kılmaktadır. Bizim çalışmamızda da DAE modelinde yaklaşık 2 kat artış gösterdiği için ilerleyen çalışmalara dahil edilmiştir. Bu yönüyle proje çalışmalarımız belki de literatüre bu anlamda yeni bir veri sağlamış olacaktır.

Sonuç olarak, yapılan MS dizin çalışmalar ile 22 adet gen projenin tedavi protokollerinde takip edilen genler olarak seçildi. Tespit edilen genlerin literatür ve veri bankalarında sunulan bilgi ve veriler ile uygunluk ve paralellik arz ettiği görülmektedir. Bu genlerin tek tek ve farklı örnekler ile kendi tasarladığımız primerler ile validasyonlarını yapıldı ve deneylerde kullanıldı. Ayrıca bu genlerin bazılarını protein düzeyinde de immünokimyasal (Western blotting) olarak da analiz ettik. Böylelikle sürekli 84 geni takip etmek yerine sadece değişen genleri kapsayan bir küme ile genleri analiz ettik.

Takip eden çalışmalarımıza öncelikle ana ekstre olan MSCov ile başladık. Öncelikle, MSCov'un tespit edilen gen ifade düzeylerin birkaç tekrarlı deneyler ile inceledik ve daha sonra da MSCov yanı sıra bu ekstreden elde ettiğimiz alt ekstreleri de DAE hayvanlara uygulayarak fraksiyonların etkilerini de araştırdık. Tüm bu deneylerden elde edilen veriler aşağıdaki Tablo 32'de genel olarak verilmektedir.

Tablo 1. Hayvanlarda deney gruplarının beyin dokularında seçilen genlerde mRNA ekspresyon düzeylerinin ortalama kat değışim ("kat değışim") sonuçları.

Genler	Gen Kodu	Uygulama Protokolleri (Kat Değişim)*							
		MSCov Kontrol	DAE	PDAE	DAE- MSCov	DAE- MSCov D	DAE- MSCov E	DAE- MSCov B	DAE- Jelimsi Faz
Enflamasyon/Kemokin/Sitokin İlişkili Genler									
CCL5	NM_013653	1,63	78,28	62,23	4,94	20,03	13,86	7,75	36,47
CXCL9	NM_008599	1,31	13,43	8,65	2,44	3,35	3,68	2,94	5,67
CXCL10	NM_021274	2,01	79,13	67,25	6,26	15,52	7,13	8,48	31,36
HIF1A	NM_010431	1,75	4,95	3,55	1,28	3,75	2,79	2,69	8,49
NFKB	NM_008689	-1,34	4,48	2,79	-1,41	-6,33	1,94	1,79	2,42
PTPN11	NM_011202	-1,22	-1,20	-1,47	-1,46	2,28	2,88	1,92	2,48
STAT3	NM_011486	-1,42	2,78	2,18	-1,38	1,75	1,38	1,43	2,84
TNF α	NM_013693	1,87	26,33	18,50	5,42	7,16	5,08	3,23	9,79
Miyelin İlişkili Genler									
MAG	NM_010758	1,64	-2,20	-2,13	1,15	1,44	1,28	1,09	1,49
MBP	NM_010777	1,23	-2,80	-2,08	1,21	1,48	1,10	1,33	1,75
PLP	NM_011123	1,80	-1,63	-1,23	1,53	1,52	1,05	1,46	2,60
SOD	NM_011434	1,40	-2,36	-2,08	1,54	1,68	1,29	2,45	4,07
T-hücre Aktivasyonu İlişkili Genler									
CD4	NM_013488	1,49	3,96	5,50	2,04	4,39	1,96	3,28	2,75
IL6	NM_031168	-1,32	5,56	4,61	1,68	1,96	1,53	1,24	1,78
TGFB1	NM_011577	-1,33	2,70	2,23	-1,43	1,59	-1,44	1,81	1,54
Kalıtsal Bağışıklık İlişkili Genler									
C1s	NM_144938	1,16	7,00	5,21	-1,20	3,59	6,07	4,57	17,40
Apoptoz İlişkili Genler									
BCL2	NM_009741	1,03	2,17	1,87	-1,27	1,42	1,77	1,48	1,77
MMP9	NM_013599	-1,03	2,83	2,64	-1,47	-1,73	-2,41	-1,70	2,23
Reseptör İlişkili Genler									
H2-Eb1	NM_009741	-1,55	35,57	28,77	6,14	17,16	13,88	7,67	32,53
Hücre Adezyonu İlişkili Genler									
APP	NM_007471	-1,22	1,16	1,26	1,14	1,07	-1,84	-1,77	1,49
Diğerleri									
GFAP	NM_010277	1,28	5,42	3,69	1,59	7,39	3,87	2,99	9,45
YWHAH	NM_011738	-1,04	2,12	1,81	1,22	1,15	2,26	2,37	4,50

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

Tabloda uygulama protokolleri altında yer alan ilk sütunda hasta edilmeyen hayvanlara MSCov uygulanması ile elde edilen değerler yer alırken ikinci sütunda ise hastalık skorlarını pik değerlerde ($3,5 \pm 0,5$) olduğu DAE hayvanlar ile elde edilen değerler yer almaktadır. Takip eden üçüncü sütunda ise deney protokolü süresince önce hastalık oluşturulup, tedavi hayvanlar ile aynı koşullarda tutulan ve herhangi bir uygulama yapmadan deney sürecinin

sonunda tedavi uygulamaları ile birlikte ötenazi edilerek dokuları alınan hayvanlardan elde edilen değerler sunulmaktadır. Biz bu grubu paralel hastalar anlamına gelen PDAE ile kodlandırdık. Bu grupta genlerin birçoğunda elde edilen ifade düzeyinde pik değerlerde karşılaşılan kat değişimlere göre biraz değişiklikler olduğu, artış gözlemlenen genlerin kat değişimlerinin biraz daha azaldığı; azalma gözlemlenen genlerin de azalma düzeylerinin biraz daha küçüldüğü tespit edildi. Bu duruma aykırı davranan tek gen CD4 olmuştur. Bu tespit, deney tasarımıımızın doğruluğunu ve gerekliliğini göstermek açısından da önemlidir. Böylelikle hasta edilmiş hayvanların bekleme süreçlerinde kendiliklerinden gösterdikleri iyileşme ve etkileri, tedavi etme amaçlı uygulanan deney protokolü ile oluşturulan iyileştirme etkilerinden çıkarılarak net değerler elde etme ve daha doğru sonuçlar üretilmesi sağlandı.

Tablo 32’de uygulama protokolleri altında yer alan üçüncü ve takip eden diğer sütunlar; hasta edilen hayvanlara, hastalık değerlerinin pik skorlara ulaşmasından sonra 21 gün boyunca sırasıyla, 500 mg/kg/gün dozda MSCov ve MSCov’dan geri tüketim işlemi ile elde edilen alt fraksiyonların verimlik esas alınarak hesaplanan dozlarda uygulamaları sonucunda beyin dokularında elde edilen verileri kapsamaktadır. Bu noktada ana MSCov ekstresi ile paralellik oluşturulması için ekstreden ne verimde fraksiyon elde edildi ise bu verimlik oranından yola çıkılarak ana uygulanan 500 mg doza eşit doz değerleri hesaplanarak uygulandı. Böylelikle dozların birbirleri ile paralel olması sağlandı.

Öncelikle MSCov uygulaması ile seçilen hedef genlerin ifade düzeylerinde hasta PDAE hayvanlara göre değişimleri dikkatlice irdelediğimizde çok önemli değişimler olduğunu görmek mümkündür. MSCov uygulaması çalışılan genlerin tamamında, gen ifade düzeylerinde hastalığın oluşturduğu etkiler hemen hemen kontrol, yani hasta olmayan hayvan değerlerine yaklaşacak şekilde değiştirilmiş ya da dönüştürülmüştür. Sonuçlarda verdiğimiz ve sadece klinik skorlama ile elde ettiğimiz iyileşme belirtileri moleküler düzeyde de teyit edildi. Hatta klinik skorlarda görülen iyileşmeden daha da fazla olduğunu söylemek mümkündür. İncelenen 22 genden 6 tanesi hariç kalan 16 gen, hasta olmayan kontrol hayvanlar ile karşılaştırıldığında farklı değildir. Bu altı genden iki tanesi (CXCL9 ve CD4) hemen hemen anlamlılık sınırına kadar yaklaşmış durumdadır (2,44 ve 2,04). Diğer kalan dört gen (CCL5, CxCL10, TNF α ve H2-Eb1) ise ifade düzeyleri 80 kat ve 35 kat gibi, değerlerden ortalama 5 katlara düşmüştür. Bu genler de nöroenflamasyonda çok önemli olan genlerdir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, MSCov’un etkisi şu şekilde önerilebilir-sıralanabilir:

- a) Anti-enflamatuar etki: oldukça güçlü bir etki gözlemlendi
- b) Miyelin rejenerasyonu: çünkü miyelin oluşumunda yer alan proteinlerin artması
- c) T- ve B-hücre aktivasyonunu baskılaması: immünosupresif etki
- d) Kompleman aktivasyonunu baskılaması

- e) Apoptotik etki: anti-apoptotik genleri ketlemesi
- f) Miyelin ilişkili antijen sunumunu engellemek: özgün immünosupresif etki
- g) DNA koruyucu ve tamir edici: anti-mutajenik etki
- h) Protein ağ-yapılarını koruyucu
- i) Anti-kolestatik etki
- j) Antioksidan etki
- k) Çoklu ilaç direncini tetikleme
- l) Bağışıklık düzenleyici: immünomodülatör
- m) Th17 baskılayıcı – dolaylı tespit edilen etki (daha fazla çalışma yapılmalıdır)

Çoklu bileşenler içermesi açısından bu şekilde çok farklı etkiler göstermesi mümkündür. Burada önemli olan etkilerin kümülatif değerlendirmesinin bir nokta hariç çok pozitif olarak ortaya çıkmasıdır. Belki de MSCov'u bu denli önemli bir tedavi etmeni kılan da bu kümülatif değer olabilir.

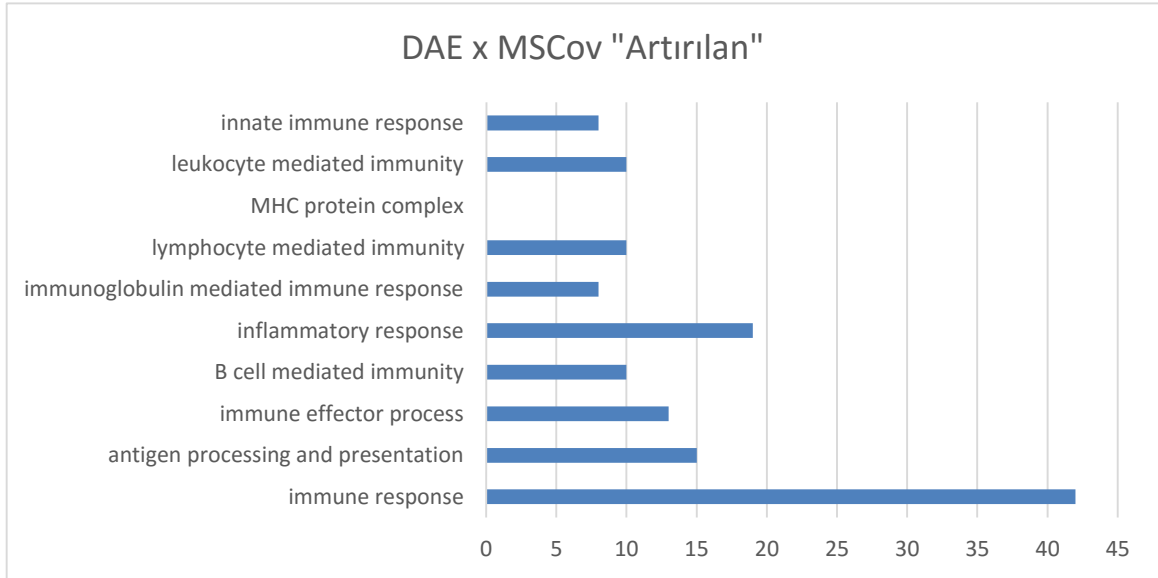
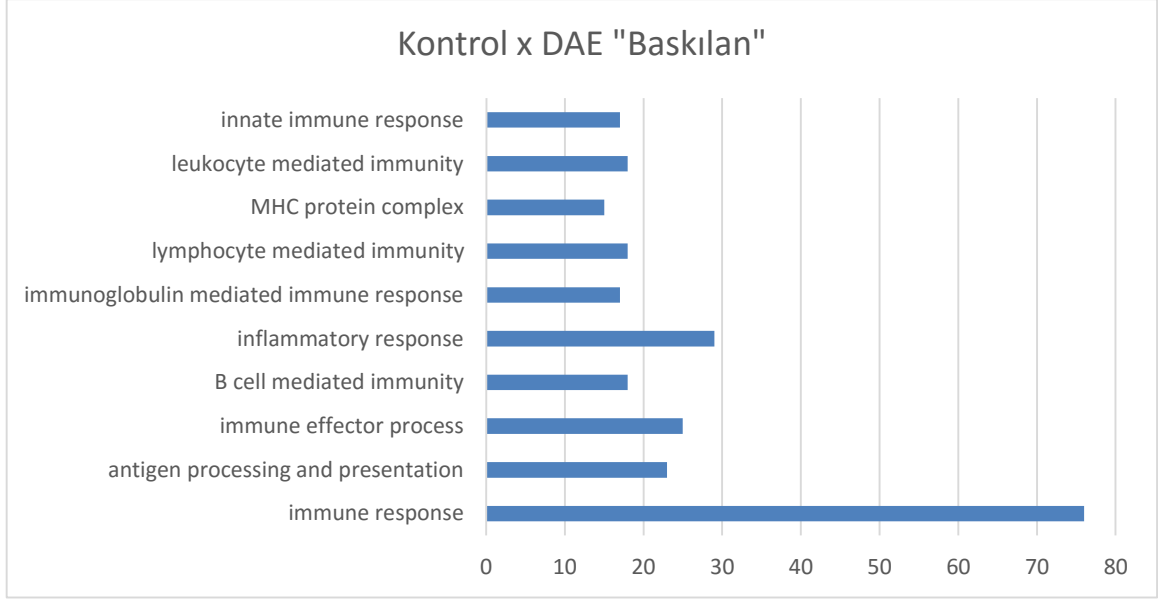
Sonuç olarak, ana ekstre MSCov için, DAE ve dolayısı ile MS için çok önemli tedavi edici bir ekstre (preparat) olduğunu söylemek mümkündür. Yukarıda belirtilen toksikolojik değerlendirmeler de dikkate alındığında, MSCov'un güvenli bir tedavi ajanı olduğu rahatlıkla ileri sürülebilir. Bu noktada, bu bitkinin insanlar tarafından gıda olarak da tüketildiği gerçeği ile birlikte, Sağlık Bakanlığından sağlanacak izin dahilinde, tıp doktorları ve temel bilimcilerin birlikte olduğu uzman bir ekip ile birlikte, MSCov'un gönüllü insanlar üzerinde denenmesinin ülkemiz ilaç sektörü için de bir kazanç olacağı muhakkaktır.

Bununla birlikte, projenin diğer iş paketleri dahilinde MSCov uygulaması ile yapılan histolojik ve immünohistolojik deneyler de, moleküler ve gen ifade düzeyinde elde ettiğimiz sonuçları destekler veriler üretti. "Luxol fast blue" ile yapılan histokimyasal boyamalarda DAE grubundaki deneklere ait beyin kesitlerinde miyelinli fibrillerde gözlenen dejenerasyonların MSCov tedavisi ile kaybolduğu ve miyelinli sinir fibrillerinin yer yer düzensizlikler olmakla birlikte normal yapı ve görünüme sahip oldukları tespit edildi. Benzer olarak, medulla spinalis dokusuna ait kesitlerin toluidin mavisi ile yapılan histokimyasal boyamalarında, DAE grubunda gözlemlenen miyelin kılıf dejenerasyonları, MSCov uygulaması ile izlenen değişikliklerin önemli oranda azaldığı ve miyelinli sinir liflerinde akson ve miyelin kılıfın daha normal oldukları gözlemlendi. Bu her iki boyama metodu miyelin özgün olduğu için, MSCov'un miyelin kılıfının rejenerasyonunu uyardığı yukarıda MAG, MBP ve PLP gibi miyelin ilişkili proteinlerin gen ifade düzeylerinde saptadığımız verileri de doğrular şekildedir. Bu değerlendirmemizi daha da kuvvetlendiren veriler immünohistokimyasal deneylerden de sağlandı. Her iki antijene (MAG ve MBP) ait antikolar ile yapılan immünohistokimyasal boyamalar değerlendirildiğinde; beyinde periventriküler alanda ve yer alan beyaz cevherde DAE gruplarında azaldığı gözlenen

MBP ve MAG immünreaktivitesinin MSCov uygulanan tedavi gruplarında ise önemli artışlar gözlenerek kontrol gruplara yaklaştığı tespit edildi

Nöroenflamasyonun belirteçleri olarak kullanılan CD45 ve GFAP antijenlerine spesifik antikolar kullanılarak gerçekleştirilen immünohistokimyasal boyamalar değerlendirildiğinde ise; DAE gruplarında, beyinde periventriküler alanda yer alan beyaz cevherde arttığı gözlenen CD45 ve GFAP immünreaktivitesinin MSCov gruplarında ise DAE grubuna göre önemli oranlarda derecelerde azalma gösterdiği görüldü. Burada elde edilen sonuçlar da, gen ifade düzeylerinde elde edilen moleküler veriler ile birbirini destekler ve teyit eder durumdadır.

MSCov'un anti-enflamatuar ve nöro-koruyucu etkileri bütçe gerekçesi ile az sayıda örnek ile de olsa tüm genom transkriptom analizleri ile de teyit edildi. Kontrol, hasta (paralel) ve MSCov ile tedavi uygulanan deneklerden elde edilen beyin dokularında 56 bin transkript probu ile yapılan analizlerde, hasta olan DAE hayvanlarda arttığı ("up regulated") gösterilen bağışıklık ilintili yolak ve genlerin, MSCov ile tedavi sonucunda baskılandığı ("down regulated") ve normal değerlere yaklaştırıldığı tespit edildi. DAE hayvanların beyin dokusunda toplam 523 transkriptin kontrol hayvanlara göre farklı şekilde ifade edildiği, bu transkriptlerden 102 tanesinin arttığı ve 421 tanesinin azaldığı tespit edildi. Bu DAE farelerin MSCov ile tedavilerinin bir sonucu olarak 452 transkript değişim gösterdi. Bunlardan 281 artarken 171 transkript azaldı. Bu rakamsal değişikliklerin anlamsal ifadelerini açıklamak için yolak ("pathway") analizleri gerçekleştirildi. Bu amaç için, David Biyoinformatik veritabanı DAE ve MSCov uygulanmış farelerde farklı düzenlenen ilişkili biyolojik süreçleri tespit etmek için kullanıldı. Yolak analizleri, MS hastalık modeli DAE de bağışıklık tepkisi, antijene işleme ve sunumu, immün efektör işlemi, B hücrelerinin aracılık ettiği bağışıklık, enflamasyon yanıtı, doğuştan gelen bağışıklık tepkisi ile ilişkili genlerin baskılandığını ortaya koymuştur. MSCOV tedavisi, bu genlerin ve yolakların çoğunun geri düzenlenmesini sağladığı tespit edildi (Şekil 318).

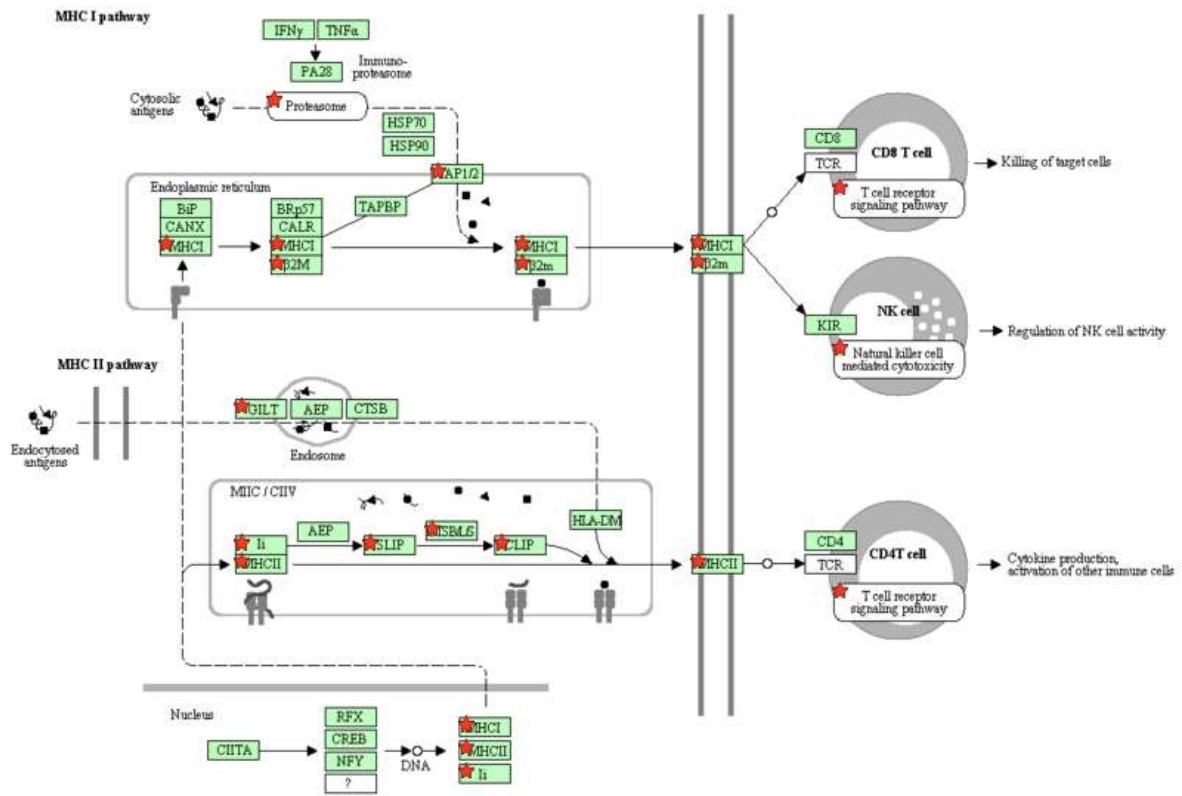


Şekil 1. Tüm genom transkriptom analizlerinden hasta modeli DEA ve MSCov uygulaması ile değişik ifade edildiği tanımlanan transkriptlerin DAVİD veri bankası kullanılarak elde edilen yolak analizleri. Üst panel: Kontrolle karşı DAE dokularda değişen bağışıklık ilişkili yollar. Alt panel: DAE hayvanlarda gözlenen değişime uğrayan yolların MSCov uygulaması ile değişimlerinin karşılaştırılması. (Not: şekiller veri bankasında online üretildiği için üzerinde düzeltme yapılamadığı için yolak isimleri İngilizce sunulmuştur)

Bu yollardan MS'da dahil olmak üzere pek çok nörodejenaratif hastalığın oluşumu için önemli olan, antijen işleme ve sunma (immün sistem) yolağında 23 genin DAE hastalık modelinde baskılandığı tespit edildi (Şekil 319-A). Baskılan bu 23 genin 12 tanesi MSCov uygulaması ile tekrar artırılabacak şekilde düzenlendiği tespit edildi (Şekil 319-B). Benzer ilişkiler diğer yollar ile de tayin edildi.

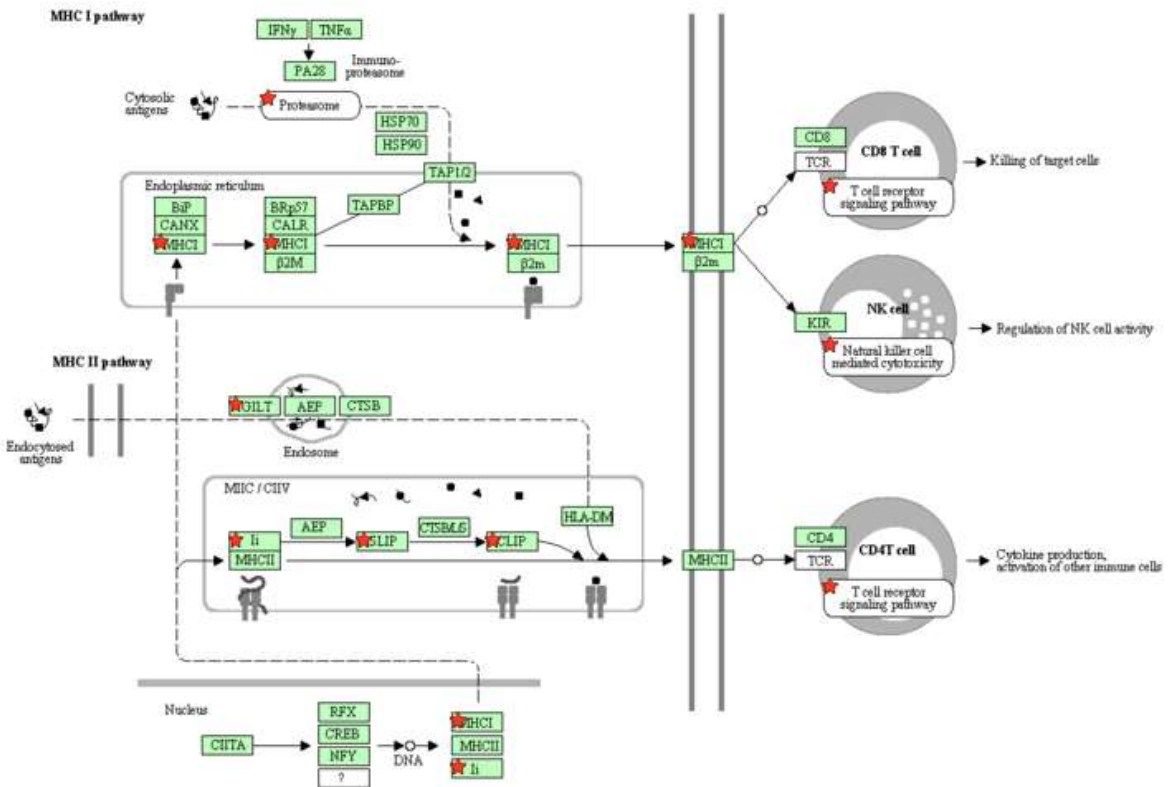
A)

ANTIGEN PROCESSING AND PRESENTATION



B)

ANTIGEN PROCESSING AND PRESENTATION



Şekil 2. Antijen işleme ve sunumu yolağında DAE modelinde baskılan 23 genden 12 tanesinin MSCov uygulaması ile tekrar artırılması. A) DAE modelinde baskılanan 23 gen B) MSCov uygulaması ile tekrar artan 12 gen.

MSCov ekstresinden elde edilen alt fraksiyonlar ile yapılan uygulamalar ele alındığında hiçbir alt fraksiyon ana ekstre MSCov ile benzer yada daha iyi veriler üretilemedi. Tek tek ele alındıklarında, bazı genlerin ifade düzeylerinde pozitif etkiler gözlemlenmesine rağmen tüm genler birlikte değerlendirildiğinde fraksiyonların etkileri zaman zaman kendi içinde zıt veriler ürettiği saptandı. Bir gende anti-enflamatuar etki gösteren uygulama bir diğer gende enflamatuar etki ettiği izlendi. Özellikle jelimsi faz ele alındığında hiçbir iyileştirici etki elde edilmezken, yer yer kötüleştirici etkiler saptandı. Bu fraksiyonun çözünür olmayan yüksek yapılı polimerdik bileşikler ve kompleksler olduğunu söylemek mümkündür. O nedenle bu faz ile daha ileri ayırıştırma ve fraksiyonlama çalışmalarına devam edilmedi.

MSCov'dan geri tüketilerek elde edilen diğer 3 alt fraksiyon kendi aralarında değerlendirildiğinde en fazla pozitif etki gösteren fraksiyonun MSCov-D olarak kodlanan diklorometan ekstresi olduğu görülmektedir. Bu fraksiyon hem anti-enflamatuar etki gösteren etkiler ve hem de miyelin rejenerasyonu edici etkiler sergilediği gözlemlendi. Bu sonuçlarımız yukarıda MSCov ile görüldüğü gibi histokimyasal ve immünohistokimyasal deneyler ve analizler ile de teyit edildi.

MSCov'dan elde edilen fraksiyonların etkilerini irdelemek ve içerikleri ile bir paralellik var mı ya da nasıl bir içerik-işlev ilişkileri sergilediklerini saptamak amacıyla bu fraksiyonların özellikle flavanoid içerikleri analiz edildi. Çünkü literatürde çeşitli flavonoid bileşiklerin anti-enflamatuar etkiler sergiledikleri rapor edilmektedir (Serefani vd., 2010; Nguyen vd., 2015; Parhiz vd., 2015). Hem ana ekstre ve hem de alt ekstrelerin (jelimsi faz hariç) izokersetin, izoramnetin, kampferol-3-O-rutinozit, kampferol, luteolin-7-O-glukozit, p-kumarik asit, pirogallol, kersetin-3-O-arabinosit, kersetin, rutin, t-ferulik asit ve ursolik asit içerdiği belirlendi. Ana ekstrede seyreklik olmaları nedeniyle tespit edilemeyen bazı bileşikler konsantre olmaları nedeniyle alt fraksiyonlarda daha rahat tayin edildiler. Flavonoid bileşik içerikleri ve uygulamalar ile moleküler düzeyde gen ifadelerinde gözlemlenen değişiklikler karşılaştırmalı olarak analiz edildiğinde bu bileşikler ile bir pozitif korelasyon ve uyum olmadığı tespit edildi. Sonuç olarak, özellikle MSCov başta olmak üzere, ana ekstre ve alt fraksiyonlar ile gözlemlenen etkiler bu fraksiyonların etkilerinin flavonoid ilişkili olmadığını teyit etmektedir. MSCov'un yukarıda sayılan etkilerini, özellikle MS için gözlemlenen iyileştirici etkilerini flavonoid bileşikler ile ilişkilendirmek mümkün değildir. Bu tezimizin, ilerleyen bölümlerde bahsedilecek hücre kültürü deneyleri ile desteklendiği görüldü.

Hem MSCov'dan elde edilen üç ana alt fraksiyonlardan ve hem de ham bitkinin bölümlerinden ekstraksiyon işlemlerine ve bileşik izolasyonlarına devam edilerek, NMR, kütle ve diğer spektral yöntemler kullanılarak izole edilen bileşiklerin yapıları aydınlatıldı. Bu bileşiklerden bazıları doğal bir bitkiden ilk kez izole edilmiş yeni bileşiklerdir. Bunun yanında yapıları bilinen bazı bileşiklerde (gkukokapparin, ursolik asit, rutin, vb) izole edildi ve tanımlandı. Yeni olan ve tanımlanan bileşiklerden dördünün steroid, birinin triterpenoid, bir diğerinin fenolik ve birinde alkolit yapıdaki bileşikler olduğu belirlendi:

- a) Glukokapparin
- b) β -Sitosterol
- c) $5\beta,6\beta$ - epoksikolestan, 3β -ol
- d) $5\alpha,6\alpha$ - epoksikolestan, 3β -ol
- e) Stigmast-5,22-dien- 3β -ol, miristat
- f) Olean-12-en-28-ol, 3β -pentakosanoat (yeni)
- g) Bis -(3-metiloktil) fitalat (yeni)
- h) 1H-indol-, 2-hidroksi, 3-karboksilik asit (yeni)

Bu bileşiklerden β -sitosterol ile ilgili literatürde yayın bulunduğu için proje de incelenmedi (öncelik tanınmadı). Diğer bileşikler $5\beta,6\beta$ - epoksikolestan, 3β -ol; $5\alpha,6\alpha$ - epoksikolestan, 3β -ol ve stigmast-5,22-dien- 3β -ol, miristat yapı tanımlama çalışmaları için tüketildiği ve kalan miktarlar moleküler çalışmalar için yeterli olmadığı için çalışılmamıştır. Tekrar elde etme çalışmaları devam etmektedir. Özellikle, stigmast-5,22-dien- 3β -ol, miristat yapısal özellikleri açısından ümit vadetmesi nedeniyle üzerinde durulmaktadır ve eğer elde edilebilirse projenin sonuçlanmasından sonra da çalışılması sürdürülecektir. Yeni olan bileşiklerden son ikisi (Bis - (3-metiloktil) fitalat ve 1H-indol-, 2-hidroksi, 3-karboksilik asit) projenin son döneminde izole edilip yapı tanımlanması tamamlanmıştır. Bu iki bileşik, özellikle fitalat, toksik bileşiklerdir ve diğer bileşiklerde olduğu gibi tanımlama analizlerinde tüketilmelerinden dolayı moleküler çalışmalar için yeterli değildir. Yeni olan ve ilk başlarda etkinlik için olumlu olduğumuz olean-12-en-28-ol, 3β -pentakosanoat (OPC) moleküler çalışmalar için ancak üç kez izole edilerek çalışılmıştır.

Proje kapsamında elde edilen saf bileşiklerin çok az olması (5-8 mg bileşik) nedeniyle hayvan denemeleri için hiçbir şekilde yeterli olmaması, ya da imkansız olması nedeniyle; bu bileşiklerin *in vitro* koşullarda çalışılması amacıyla, proje kapsamına öneride yer almamasına rağmen, grup yürütme komitesinin izni ile de hücre kültürü deneyleri eklendi. Öncelikle, hücre kültürü için hayvan modeli ile uyum sağlayabilecek modeller araştırıldı ve sonunda SH-SY5Y hücrelerinde karar kılındı. Karşılaştırma yapabilmek için, DEA modelinde tespit ettiğimiz genleri öncelikle MSCov ve MSCov'dan elde edilen alt fraksiyonlarla denemeleri

gerçekleştirildi. Bu deneyler için öncelikle doz saptamaları için sitotoksinite deneyleri gerçekleştirildi. Bu deneylerden NOEL ve LOEL benzeri değerler saptanmaya çalışıldı. Çünkü bu denemeler için kanser çalışmalarının aksine, kullanılacak dozların hücre üzerine toksik etki göstermemesi gereklidir. Hücre kültürlerinden de LOE ve NOEL tayinleri yapılması mümkün değildir. O nedenle bu değerlere yakın olabilecek 2 farklı bazen de 3 farklı dozlar saptanarak etki belirleme çalışmaları için kullanıldı.

MSCov ekstresi ve bu ekstreten geri tüketimle elde edilen alt fraksiyonların SH-SY5Y hücrelerinde DAE ile karşılaştırmalı sonuçları Tablo 33'de verilmektedir.

Tablo 2. MSCov ekstresinin ve Diklorometan, Etil asetat, n-Bütanol alt fraksiyonlarının SHSY-5Y hücrelerinde seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine etkilerinin kat değişim sonuçları. Sonuçlar karşılaştırma açısından deneysel MS oluşturan DAE grubu sonuçları ile birlikte verilmiştir.

Gen*	DAE	MSCov			Diklorometan		Etil Asetat		n-bütanol	
		4mg/ml	6mg/ml	9mg/ml	20µg/ml	40µg/ml	50µg/ml	100µg/ml	50µg/ml	100µg/ml
APP	1,16	-2,73	-3,20	-2,03	1,54	1,89	3,68	4,62	1,31	1,42
C1S	1,16	-1,62	-1,94	-1,85	-1,76	-1,43	-1,53	-1,62	-2,10	-2,73
CCL5	78,28	-3,21	-2,99	-2,09	-1,12	-2,23	1,34	-1,99	-1,68	-1,84
CXCL9	13,43	-3,32	-2,90	-1,90	-1,76	-2,21	-1,33	-2,04	-1,51	-1,70
CXCL10	79,13	-2,32	-2,83	1,10	-1,32	-1,28	-1,88	1,02	-6,42	-3,50
GFAP	5,42	-2,50	-1,99	2,39	1,15	-1,22	2,45	1,34	-1,01	1,20
GNAI	1,89	-1,41	-1,29	2,00	-1,61	-1,13	1,00	1,68	1,42	1,31
HIF1A	4,95	-3,24	-1,90	-1,78	-3,15	-3,82	1,03	1,57	-1,21	1,14
IL6	5,56	1,34	-2,51	-2,10	-1,45	-1,67	-1,73	-1,92	-2,58	-2,05
MAG	-2,20	1,43	1,68	2,34	1,34	1,21	-1,25	1,75	-3,64	-6,39
MMP9	2,83	-1,68	-2,43	-2,67	-1,35	-1,98	-1,55	-1,65	-4,75	-3,23
NFKB	4,48	-2,16	-1,02	1,07	-1,71	1,58	-2,40	-2,00	-2,83	-1,76
PLP	-1,63	1,10	1,74	3,80	1,55	1,07	2,08	2,31	1,71	2,50
PTPN11	-1,20	-2,62	-1,56	-1,07	1,38	1,03	2,17	2,25	-3,24	-2,30
SOD	-2,36	-1,11	-1,23	1,47	1,24	1,76	1,84	1,32	1,22	1,10
STAT3	2,78	1,22	1,05	2,58	-1,82	-1,34	-1,19	1,26	-1,04	1,57
TNF	26,33	-2,34	-1,81	-1,20	-2,12	-2,40	2,12	1,03	-1,69	-2,74

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

Bu sonuçlar, SH-SY5Y hücrelerinin *in vitro* etkinliklerin tespiti için kullanılabilirliğini gösterdi. Her ne kadar DAE gibi hayvan modelinde elde edilen veriler kadar olmasa da uygulamalar için gen ifade düzeyinde paralellik tespiti bizim bu değerlendirmeyi yapmamıza veri oluşturdu ve

kullanılabilirliği için pozitif veriler olarak ele alındı. Burada da hayvan deneylerinde tespit ettiğimiz gibi MSCov alt fraksiyonlarında ana eskre MSCov kadar etki gözlenmedi.

Devam eden çalışmalarımızda izole edilen ve yapısı aydınlatılan bileşiklerden elimizde hücre kültürü ile çalışmak için yeteri kadar kalan yeni bileşiklerle veya analizlerle MSCov içeriğinde varlığı tespit edilen flavonoid bileşikler ile seçilen genler üzerine etkileri incelendi. Bu çalışmalardan elde ettiğimiz sonuçlar Tablo 34-35'de derleme halinde sunulmaktadır.

Tablo 3. MSCov ekstresinden elde edilen Olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat (OPC), Olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat+Rutin kombine uygulaması ve Oleanolik asit aktif bileşenlerin SHSY-5Y hücrelerinde seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine etkilerinin kat değişim sonuçları. Sonuçlar karşılaştırma açısından deneysel MS oluşturan DAE grubu sonuçları ile birlikte verilmiştir.

Gen Adı	DAE*	OPC		OPC+Rutin (20mM)		Oleanolik Asit	
		15 μ g/ml	20 μ g/ml	15 μ g/ml	20 μ g/ml	10 μ g/ml	20 μ g/ml
APP	1,16	-1,42	-1,07	-2,73	1,17	-2,20	-4,35
CCL5	78,28	-1,53	-1,84	-1,88	-1,43	-4,41	-3,73
CXCL9	13,43	1,47	-1,60	1,85	1,87	-13,41	-19,36
CXCL10	79,13	-2,21	-2,12	-5,29	-8,37	-6,13	-8,14
GFAP	5,42	1,88	-1,49	1,28	-1,60	-6,40	-5,02
GNAI	1,89	-2,87	-3,03	-1,16	-1,24	-1,83	-2,57
HIF1A	4,95	-4,49	-2,59	-1,34	1,30	-2,77	-6,27
IL6	5,56	-1,79	-1,99	-1,58	-1,80	1,55	1,93
MAG	-2,20	1,76	1,55	3,93	4,25	1,66	1,12
MMP9	2,83	-1,20	-3,49	-1,03	-1,16	-24,05	-48,59
NFKB	4,48	-1,13	-2,55	-1,48	-1,12	-2,66	-4,53
PLP	1,80	1,65	1,24	2,69	2,58	-1,86	-1,26
PTPN	-1,20	-1,28	-1,17	-1,13	1,53	-3,41	-4,19
SOD	-2,36	1,44	1,56	-1,08	1,80	-1,80	-2,05
TNF	26,33	-1,19	-4,49	-1,93	-2,69	-15,45	-18,69

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

Tablo 4. MSCov ekstresinden elde edilen glukokapparin, ve ursolik asit aktif maddelerinin SHSY-5Y hücrelerinde seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine etkilerinin kat değişim sonuçları. Sonuçlar karşılaştırma açısından deneysel MS oluşturan DAE grubu sonuçları ile birlikte verilmiştir.

Gen Adı	DAE*	Glukokapparin		Ursolik Asit	
		8µg/ml	15µg/ml	5µg/ml	10µg/ml
APP	1,16	7,02	5,83	1,11	-1,09
CCL5	78,28	2,33	4,65	-2,28	1,10
CXCL9	13,43	1,10	1,26	-5,91	-2,59
CXCL10	79,13	2,21	2,63	-3,39	-1,67
GFAP	5,42	3,27	3,98	1,03	2,69
GNAI	1,89	-1,33	-21,10	-1,70	1,23
HIF1A	4,95	3,17	-1,46	1,59	1,74
IL6	5,56	1,19	1,23	1,68	1,91
MAG	-2,20	1,77	2,24	1,38	1,62
MMP9	2,83	3,16	3,47	-4,91	-2,79
NFKB	4,48	-1,79	-12,46	-1,34	1,79
PLP	1,80	1,90	3,12	1,91	2,01
PTPN	-1,20	-1,56	-1,28	1,47	4,07
SOD	-2,36	27,71	24,29	1,77	2,11
TNF	26,33	1,23	1,33	-3,33	-2,35

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

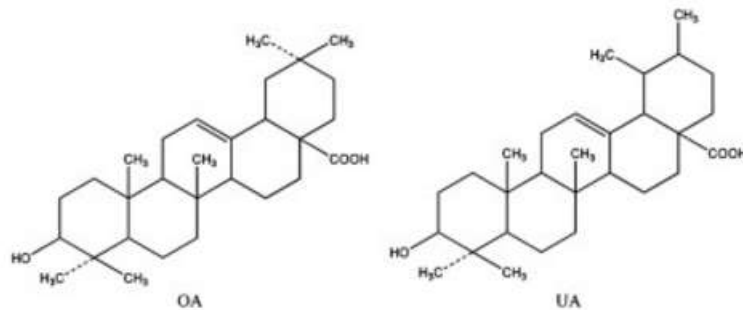
Saf maddelerin seçili genlerin ifade düzeylerine etkileri DAE ile mukayeseli olarak karşılaştırıldığında ve kontrol veriler ele alındığında, Olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat (OPC) bileşiği kontrol ile en uyumlu sonuçları üreten bileşik olarak ortaya çıkmaktadır. Her ne kadar oleanolik asit gen ifade düzeylerine etkileri daha fazla olarak görünse de, bu değerler kontrol hayvanlarda saptanan değerlerin de çok altındadır. Bu durumda oleanolik asitin yan etki oluşturması çok kuvvetle muhtemeldir. Hâlbuki OPC için durum böyle değildir. OPC ile seçili genlerin DAE de gözlenen artış veya azalışlar tersine dönerken, genlerin ifade düzeylerinde gözlenen kat değişimler hiçbir zaman kontrol değerleri aşan veriler olmadığı görülmektedir. Hâlbuki OA için durum böyle değildir. OA ile literatürde bir adet DAE modelinde koruyucu etki gösterdiğini bildiren yayın mevcuttur (Martin vd., 2010). Bu çalışmada OA'nın enflamatuar hücrelerin kan-beyin bariyerinden sızmasını azalttığı ve MSS'ne infiltrasyonu baskıladığı bildirilmektedir. Ancak çalışmada detaylı gen ifadeleri incelenmediği için bizim elde ettiğimiz diğer veriler ile karşılaştırılması mümkün değildir. Bu etkiler örneğin MMP9 baskılanması ile ilişkilendirilebilir (bizim tespitlerimizde olduğu gibi) ancak bu genler bahsedilen çalışmada tayin edilmemiştir.

Bu veriler OPC'nin yan etki ihtimali düşük ancak tedavi etmenliği güçlü bir bileşik olarak önerilmesini kuvvetle desteklemektedir. Ayrıca, OPC'nin etki ettiği genler irdelendiğinde hem

anti-enflamatuar etki gösterdiği hem de miyelin rejenerasyonunu tetiklediği söylenebilir. Bu nedenle, hem semptomatik etkilerinin giderilmesinde hem de sistematik tedavisinde ümit verici bir bileşik olduğunu söylemek mümkündür. Bizim bu noktada önerimiz OPC yapısındaki pentakosonoat grubunun bu bileşiğin biyolojik bulunurluğuna pozitif etki kattığı, hücre zarlarına ve çeşitli lipofilik ajanlar ile etkileşimine olumlu etki ettiğini düşündürmektedir. Bu nedenle de toksisitesi düşmektedir. Ayrıca, OA'ya oranla da %50 daha yüksek dozlarda toksisite göstermemektedir.

Literatürde triterponoid bileşiklerin MS ile ilgili olarak immüdüzenleyici ve tedavi edici etkilerini gösteren tek biri çalışmalar mevcuttur (Pareek vd., 2011). Bu çalışmada kullanılan triterponoidde OPC gibi bir oleanolik asit türevidir ve MS patolojisinde çok önemli olan IL-17 ekspresyonunu baskılayarak DAE modleli üzerinde iyileştirici etkiler yaptığı bildirilmiştir. Ancak bu çalışmada kullanılan triterponoid sentetik bir bileşiktir. Bununla birlikte, son yıllarda farklı triterponoidler ile *in vitro* ortamlarda yapılan deneylerde immünregülatör etkileri gösterilmiştir (Blaževski vd., 2013; Jeong vd., 2013). Bu veriler ışığında, doğal olarak ilk defa bu çalışmada izole edilen ve bir triterpenoid olan OPC bileşiğinin de MS için ümit verici bir terapötik ajan olma ihtimali çok yüksektir. Bu veriler değerlendirilerek, OPC için proje çıktısı olarak bir patent başvurusu yapılmış ve OPC'nin daha ileri terapötik inceleme ve analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla bir 1003 proje başvurusu yapılmıştır. Bu projemiz ikinci aşama da değerlendirilmektedir.

İzole edilen ve incelenen diğer bileşiklere baktığımızda gkukokapparin ve ursolik asitin herhangi bir tedavi edici etki göstermediğini söylemek mümkündür. Her iki bileşik ile aksine etkiler bile tespit edildi. Bu nedenle bu bileşiklerin MS ile ilişkilendirilmesi mümkün değildir. Enterasan olan bir durum, oleanolik asit ile ursolik asitin yapılarının çok büyük oranda aynı olmasına rağmen etkilerinin bu kadar farklı olmalıdır (Şekil 30). Tek bir metil grubunun yer değiştirmesi bile bileşiğin etkisini %100 farklılaştırabilmektedir.



Şekil 3. Oleanolik asit (OA) ve ursolik asit (UA) karşılaştırmalı kimyasal yapıları

OPC ile birlikte kombine olarak rutin uygulaması yaptığımız deneyler de enteresan sonuçlar elde edildi. Rutin MSCov ekstresinde en fazla olan ikinci flavonoid olması nedeni ile tercih edildi ve elimizde ticari olarak da mevcuttu. Ayrıca rutin ile ilgili bağışıklık sistemini artırdığı ve düzenleyici etkisi olduğunu bildirir *in vitro* veriler de bulunmaktadır. Ancak bizim yaptığımız veriler rutin için bu yönde immünodüzenleyici etki gösterdiğini desteklememektedir. Tam tersine, kombine uygulama ile OPC ile elde edilen pozitif etkileri de bozucu sonuçlar elde edildi. Bu noktada, MSCov ekstresi ve alt ekstrelerde flavonoid bileşiklerle yapılan yorumlarımızı destekler verilerdir ve birbirleri ile örtüşmektedir. Ekstre ve alt fraksiyonların etkileri de içerdikleri flavonoid bileşikler ile bir paralellik ve uyum göstermemekteydi. Burada hücre hattında rutin ile elde ettiğimiz sonuçlarda flavonoidlerin MS tedavisi için bir etkilerinin olmadığı hipotezimizi ve çıkarımımızı çok kuvvetle desteklemektedir.

Sonuç olarak, yaptığımız moleküler, tüm genom transkriptom analizleri, immünohistokimyasal analizler MSCov ekstresinin MS terapisi için ümit vadeden, ucuz ve güvenli bir alternatif ve tamamlayıcı tedavi ajanı olduğunu çok kuvvetle desteklemektedir. İlaveten bu ekstre yada *Capparis ovata* bitkisinden izole ettiğimiz olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat bileşiğinin de moleküler veriler ışığında MS için çok önemli alternatif bir terapötik olma özelliği taşımaktadır ve bu nedenle devam eden çalışmalar ile *in vivo* olarak çalışılması gereklidir.

5 SONUÇ

Proje kapsamında yürütülen moleküler, toksikolojik, histolojik, immünohistokimyasal, transkripsiyonel ve analitik çalışmalar, *Capparis ovata* bitkisinden elde edilen ve MSCov ismi verilen sulu ekstrenin, halen kesin tedavisi bulunmayan MS hastalığı için hem düşük maliyeti hem de yan etkilerinin olmaması (güvenilirliği) ve aynı zamanda kolay kullanılabilir olması göz önüne alındığında, yüksek potansiyelli ve önemli bir alternatif etmeni olduğunu kuvvetle desteklemektedir.

Benzer olarak, proje kapsamında *Capparis ovata* bitkisinden izole edilen ve yapısı tayin edilen ve *in vitro* moleküler etkileri tespit edilen olean-12-en-28-ol, 3 β pentakosanoat bileşiği de MS için çok önemli alternatif bir terapötik olma özelliği taşıdığı gösterildi.

İlaveten, proje çok verimli ve üretken bir çalışma oldu. Proje kapsamında 8 adet bileşik izole edildi ve bunlardan 3 tanesi yeni bileşiklerdir. Ayrıca, kalan bileşiklerden 2 tanesi de doğal bir bitkiden ilk defa izole edilen ve tanımlanan bileşiklerdir. Yeni bileşik izolasyonunun ve de yapısının tanımlanmasının zorlukları göz önüne alındığında bu rakamların gerçekten önemli olduğu daha iyi ortaya çıkmaktadır. Proje çalışmalarından OPC için bir adet Patent başvurusu yapılmaktadır ve yapısal inceleme aşamasındadır. Benzer olarak, OPC bileşiğinin sentezini ve daha ileri düzeylerde *in vivo* ortamlarda çalışılmasını öngören bir adet 1003 proje önerisi de üretildi. Bu proje önerisi birinci aşamayı geçerek ikinci aşamada incelemededir. Yayın olarak da, verilerin yeni olası ve patentlenmesi beklentisi ile yayın yapmaktan kaçınılmış ancak 5 adedi SCI olmak üzere toplam 11 adet uluslararası bildiri üretilmiştir. SCI bildirilerin 1 adedi 8 dakikalık e-bildiri olarak sunulmuştur. Sonuç raporu ile projenin DAE sonuçlarını kapsayan geniş içerikli bir yayın hazırlanmış ve dünyanın en prestijli MS dergisi olan "Multiple Sclerosis Journal" submit edildi.

Sonuç olarak, proje önerisinde başta öngörülen hedeflere tam manasıyla ulaşıldı ve çalışmalara devam edilecektir.

6 KAYNAKLAR

- Achiron, A., Feldman, A., Mande, I. M., Gurevich, M. 2007. "Impaired expression of peripheral blood apoptotic-related gene transcripts in acute multiple sclerosis relaps", *Annals of the New York Academy Sciences*,;1107, 155-167.
- Akgül, A. 1996. "Yeniden keşfedilen lezzet: Kapari (Capparis spp.)", *Gıda*, 21, 119-128.
- Al Said, M. S., Abdelsattar, E. A., Khalifa, S. I., el Feraly, F. S. 1988. "Isolation and Identification of an anti-inflammatory principle from *Capparis spinosa*", *Pharmazie*, 43, 640-641.
- Ali, K., Middleton, M., Puré, E., Rader, D. J. 2005. "Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response in vivo", *Circulation Research*, 97, 922-927.
- Angelini, G., Vena, G. A., Filotico, R., Foti, C., Grandolfo, M. 1991. "Allergic contact dermatitis from *Capparis spinosa* L. applied as wet compresses", *Contact dermatitis*, 24, 382-383.
- Anonim. 1995. "Capparis spp. hakkında genel bilgiler ve ormancılık açısından önemi", *Ege Ormancılık Araştırma Enstitüsü, Teknik Rapor*, İzmir.
- Anonim. 1998. "Gebere (Kapari, Capparis) bitkisinin özellikleri, ekonomik değeri ve ormancılık çalışmalarındaki önemi", *Orman Bakanlığı, Kozalak Gazetesi* 1, 25.
- Apel, A., Greim, B. Zettl, U. K., 2005. "How frequently do patients with multiple sclerosis use complementary and alternative medicine?", *Complement Therapy Medicine*, 13, 258-263.
- Ascherio, A., Munger, K. L. 2007a. "Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection", *Annals of Neurology*, 61, 288–299.
- Ascherio, A., Munger, K. L. 2007b. "Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: noninfectious factors", *Annals of Neurology*, 61, 504–513.
- Aydin, D., Weyer, S. W., Müller, U. C. 2012. "Functions of the APP gene family in the nervous system: insights from mouse models", *Experimental Brain Research*, 217, 423-434.
- Ba, X., Aguilera-Aguirre, L., Rashid, Q. T., Bacsi, A., Radak, Z., Sur, S., Hosoki, K., Hegde, M. L., Boldogh, I. 2014. "The role of 8-oxoguanine DNA glycosylase-1 in inflammation", *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 16975-16997.
- Bağcı, C. Şimşek, S., 1999. "Capparis ovata desf. Farelerde karaciğer enzimleri ile bazı kan parametreleri üzerine etkisi", *Genel Tıp Dergisi*; 9, 123-125.

- Barcellos, L. F., Oksenberg, J. R., Begovich, A. B., Martin, E. R., Schmidt, S., Vittinghoff, E., Goodin, D. S., Pelletier, D., Lincoln, R. R., Bucher, P., Swerdlin, A., Pericak-Vance, M. A., Haines, J. L., Hauser, S. L. 2003. "HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course", *The American Journal of Human Genetics*, 72, 710–716.
- Beecham, A. H., Patsopoulos, N.A., vd. 2014. "Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis", *Nature genetics*, 45, 11.
- Bellosillo, B., Colomer, D., Pons, G., Gil, J. 1998. "Mitoxantrone, a topoisomerase II inhibitor, induces apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells", *British Journal of Haematology*, 100, 142–146.
- Benveniste, E. N., Liu, Y., McFarland, B. C., Qin, H. 2014. "Involvement of the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling Pathway in Multiple Sclerosis and the Animal Model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis", *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 34, 577-588.
- Bielekova, B., Goodwin, B., Richert, N., Cortese, I., Kondo, T., Afshar, G., Grand, B., Eaton, J., Antel, J., Frank, J. A., McFarland, H. F., Martin, R. 2000. "Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83–99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand", *Nature Medicine*, 6, 1167–1175.
- Bielekova, B., Sung, M. H., Kadom, N., Simon, R., McFarland, H., Martin, R. 2004. "Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis", *Journal of Immunology*, 172, 3893–3904.
- Bien-Ly, N., Gillespie, A. K., Walker, D., Yoon, S. Y., Huang, Y. 2012. "Reducing human apolipoprotein E levels attenuates age-dependent A β accumulation in mutant human amyloid precursor protein transgenic mice", *Journal of Neuroscience*, 32, 4803-4811.
- Blaževski, J., Petković, F., Momčilović, M., Paschke, R., Kaluđerović, G. N., Mostarica, S. M., Miljković, D. 2013. "Betulinic acid regulates generation of neuroinflammatory mediators responsible for tissue destruction in multiple sclerosis in vitro", *Acta Pharmacologica Sinica*, 34, 424-431.
- Brady, R. L., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Lange, G., Davis, S. J., Williams, A. F., Barclay, A. N. 1993. "Crystal structure of domains 3 and 4 of rat CD4: relation to the NH2-terminal domains", *Science*, 979–983.

- Braesch-Andersen, S., Paulie, S., Smedman, .C, Mia, S., Kumagai-Braesch, M. 2013. "ApoE Production in Human Monocytes and Its Regulation by Inflammatory Cytokines", 8, 11-20.
- Brinkmeier, H., Ohlendieck, K. 2014. "Chaperoning heat shock proteins: proteomic analysis and relevance for normal and dystrophin-deficient muscle", *Proteomics Clinical Applications*, 8, 875-895.
- Browne, P., Chandraratna, D., Angood, C., Tremlett, H., Baker, C., Taylor, B. V., Thompson, A. J. 2014. "Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity", *Neurology*, 83, 1022-1024.
- Burbach, K. M., Poland, A., Bradfield, C.A. 1992. "Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 8185–8189.
- Buttmann, M., Merzyn, C., Rieckmann, P. 2004. "Interferon- β induces transient systemic IP-10/CXCL10 chemokine release in patients with multiple sclerosis", *Journal of Neuroimmunology*, 156, 195-203.
- Caporro, M., Disanto, G., Gobbi, C., Zecca, C. 2014. "Two decades with glatiramer acetate subcutaneous injection - the current role of standard and new high dose – low frequency glatiramer acetate in relapsing remitting multiple sclerosis treatment", *Journal of Patient Preference and Adherence*", 8, 1123-1334.
- Carter, S. L., Müller, M., Manders, P. M., Campbell, I. L. 2007. "Induction of the genes for Cxcl9 and Cxcl10 is dependent on IFN-gamma but shows differential cellular expression in experimental autoimmune encephalomyelitis and by astrocytes and microglia in vitro", *Glia*, 55, 1728–1739.
- Carvalho, J. F. S., Silva, M. M. C, Melo, M. L. S. 2009. "Highly efficient epoxidation of unsaturated steroids using magnesium bis (monoperoxyphthalate) hexahydrate", *Tetrahedron*", 65, 2773-2781.
- Cella, M., Colonna, M. 2015. "Aryl hydrocarbon receptor: Linking environment to immunity", *Seminars in Immunology*, 27, 310-314.
- Chitnis, T. 2007. "The Role of CD4 T Cells in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis", *International Review of Neurobiology*, 79, 43-72.

- Cohen, J. A., Barkhof, F., Comi, G., Hartung, H. P., Khatri, B. O., Montalban, X., Pelletier, J., Capra, R., Gallo, P., Izquierdo, G., Tiel-Wilck, K., de Vera, A., Jin, J., Stites, T., Wu, S., Aradhye, S., Kappos, L. 2010. "Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis", *New England Journal of Medicine*, 362, 402-415.
- Coles, A. 2015. "Newer therapies for multiple sclerosis", *Annals of Indian Academy of Neurology*, 18, 30–34.
- Compston A., Coles A. 2002. "Multiple sclerosis," *The Lancet*, 359, 1221–1231.
- Compston, A., Coles, A. 2008. "Multiple sclerosis". *The Lancet*, 372, 1502-1517.
- Crossley, R. J. 1984. "Clinical safety and tolerance of mitoxantrone", *Seminars in Oncology*, 11, 54–58.
- Davies, A. L., Desai, R. A., Bloomfield, P. S., McIntosh, P. R., Chapple, K. J., Linington, C., Fairless, R., Diem, R., Kasti, M., Murphy, M. P. and Smith, K. J. 2013. "Neurological deficits caused by tissue hypoxia in neuroinflammatory disease", *Annals Neurology*, 74, 815–825.
- Dendrou, C. A., Fugger, L., Friese, M. A., 2015. "Immunopathology of multiple sclerosis", *Nature Review Immunology*, 15, 545-558.
- Dietschy, J. M., Turley, S. D., 2004. "Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal", *Journal of Lipid Research*, 45, 1375-1397.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Feather-Stone, R. M. 1961. "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity", *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95.
- Elzen, P., Garg S., León, L., Brigl, L., Leadbetter, E. A., Gumperz, J. E., Dascher, C. C., Cheng, T., Sacks, F. M., Illarionov, P. A., Besra, G. S., Kent, S. C., Moody, D. B., Brenner, M. B. 2005. "Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation", *Nature*, 437, 906-910.
- Fay, M. P., Follman, D. A., Lynn, F., Schiffer, J. M., Stark, G. V., Kohberger, R., Quinn, C. P., Nuzum, E. O. 2012. "Anthrax vaccine-induced antibodies provide cross-species prediction of survival to aerosol challenge", *Science Translational Medicine*, 4, 151.

- Fidler, J. M., DeJoy, S. Q., Gibbons, J. J. 1986. "Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. I. Suppression of B lymphocyte function", *Journal of Immunology*, 137, 727–732.
- Fujinami, R. S., Oldstone, M. B. 1985. "Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity", *Science*, 230, 1043–1045.
- Gaber, T., Strehl, C., Sawitzki, B., Hoff, P., Buttgereit, F. 2015. "Cellular energy metabolism in T-lymphocytes", *International Review Immunology*, 34, 34-49.
- Gál, P., Ambrus, G., Závodszy, P. 2002. "C1s, the protease messenger of C1. Structure, function and physiological significance", *Immunobiology*, 205, 383-394.
- Germano, M. P., Pasquale, R. D., D'angelo, V., Catania, S., Silvari, V., Costa, C. 2002. "Evaluation of Extracts and Isolated Fraction from *Capparis spinosa* L. Buds as an Antioxidant Source", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1168-1171.
- Ghalie, R. G., Edan, G., Laurent, M. 2002. "Cardiac adverse effects associated with mitoxantrone (Novantrone) therapy in patients with MS", *Neurology*, 59, 909–913.
- Ghule, B. V., Muruganathan, G., Nakhat, P. D., Yeole, P. G. 2006. "Immunostimulant effects of *Capparis zeylanica* Linn. Leaves", *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 311-315.
- Gilmore, T. D. 2006. "Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives", *Oncogene*, 25, 6680–6684.
- Giovannoni, G. 2006. "Multiple sclerosis cerebrospinal fluid biomarkers", *Disease Markers*, 22, 187-196.
- Giovannoni, G. 2014. "Cerebrospinal fluid analysis", *Handbook Clinical Neurology*, 122, 681-702.
- Gold, R., Linington, C., Lassmann, H. 2006. "Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research", *Brain*, 129, 1953–1971.
- Gorgani, N. N., Altin, J. G., Parish, C. R. 1999. "Histidine-rich glycoprotein prevents the formation of insoluble immune complexes by rheumatoid factor", *Immunology*, 98, 456–463.

- Goris, A., Williams-Gray, C.H., Foltynie, T., Brown, J., Maranian, M., Walton, A., Compston, D.A., Barker, R.A., Sawcer, S.J. 2007. "Investigation of TGFB2 as a candidate gene in multiple sclerosis and Parkinson's disease", *Journal of Neurology*, 254, 846–848.
- Goverman, J. 2009. "Autoimmune T cell responses in the central nervous system", *Nature Reviews Immunology*, 9, 393–407.
- Grainger, D. J., Reckless, J., McKilligin, E. 2004. "Apolipoprotein E modulates clearance of apoptotic bodies in vitro and in vivo, resulting in a systemic proinflammatory state in apolipoprotein E-deficient mice", *Journal of Immunology*, 173, 6366-6375.
- Gran, B., Hemmer, B., Vergelli, M., McFarland, H. F., Martin, R. 1999. "Molecular mimicry and multiple sclerosis: degenerate T-cell recognition and the induction of autoimmunity", *Annals of Neurology*, 45, 559–567.
- Hafler, D. A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E. S., Daly, M. J., De Jager, P. L., de Bakker, P. I., Gabriel, S. B., Mirel D. B., Ivinson, A. J., Pericak-Vance, M. A., Gregory, S. G., Rioux, J. D., McCauley, J. L., Haines, J. L., Barcellos, L. F., Cree, B., Oksenberg, J. R., Hauser, S. L. 2007. "Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genome wide study", *The New England Journal of Medicine*, 357, 851–862.
- Hahn, M. E., Karchner, S. I., Evans, B. R., Franks, D. G., Merson, R. R., Lapsertis, J. M. 2006. "Unexpected diversity of aryl hydrocarbon receptors in non-mammalian vertebrates: insights from comparative genomics", *Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology*, 305, 693–706.
- Handunnetthi, L., Ramagopalan, S. V., Ebers, G. C. 2010. "Multiple sclerosis, vitamin D, and HLA-DRB1*15", *Neurology*, 74, 1905-1910.
- Harauz, G., Boggs, J. M. 2013. "Myelin management by the 18.5-kDa and 21.5-kDa classic myelin basic protein isoforms", *Journal of Neurochemistry*, 125, 334-361.
- Havrdova, E., Galetta, S., Hutchinson, M., Stefoski, D., Bates, D., Polman, C. H., O'Connor, P. W., Giovannoni, G., Phillips, J. T., Lublin, F. D., Pace, A., Kim, R., Hyde, R. 2009. "Effect of natalizumab on clinical and radiological disease activity in multiple sclerosis: a retrospective analysis of the Natalizumab Safety and Efficacy in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (AFFIRM) study", *Lancet Neurology*, 8, 254–260.
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., Latz, E. 2014. "Innate immune activation in neurodegenerative disease", *Nature Review Immunology*, 14, 463–477.

- Hickey, W. F. 1999. "The pathology of multiple sclerosis: a historical perspective", *Journal of Neuroimmunology*, 98, 37– 44.
- Hockenbery, D., Nuñez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D., Korsmeyer, S.J. 1990. "Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death", *Nature*, 348, 334-336.
- Hoganesch, J. B., Chan, W. K., Jackiw, V. H., Brown, R. C., Gu, Y. Z., Pray-Grant, M., Perdew, G. H., Bradfield, C. A. 1997. "Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway", *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 8581–8593.
- Hu, Y., Liu, J., Huang, H. 2013. "Recent agents targeting HIF-1 α for cancer therapy", *Journal of Cell Biochemistry*, 114, 498-509.
- Huppert, J., Closhen, D., Croxford, A., White, R., Kulig, P., Pietrowski, E. 2010. "Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption", *The FASEB Journal*, 24, 1023-1034.
- Ingram, G., Hakobyan, S., Hirst, S. L., Harris, C. L., Loveless, S., Mitchell, J. P., Pickersgill, T. P., Robertson, N. P., Morgan, B. P. 2012. "Systemic complement profiling in multiple sclerosis as a biomarker of disease state", *Multiple Sclerosis*, 18, 1401–1411.
- Ingram, G., Hakobyan, S., Robertson, N. P., Morgan, B. P. 2009. "Complement in multiple sclerosis: its role in disease and potential as a biomarker", *Clinical Experimental Immunology*, 155, 128-139.
- Inocencio, C., Rivera, D., Obon, M. C., Alcaraz, F., Barrena, J. A. "A systematic revision of *Capparis* section *Capparis* (Capparaceae)", *Annals Of The Missouri Botanical Garden*, 92, 122-149.
- Jacobs, L. D., Cookfair, D. L., Rudick, R. A., Herndon, R. M., Richert, J. R., Salazar, A. M., Fischer, J. S., Goodkin, D. E., Granger, C. V., Simon, J. H., Alam, J. J., Bartoszak, D. M., Bourdette, D. N., Braiman, J., Brownschidle, C. M., Coats, M. E., Cohan, S. L., Dougherty, D. S., Kinkel, R. P., Mass, M. K., Munschauer, F. E., Priore, R. L., Pullicino, P. M., Scherokman, B. J., Whitham, R. H. 1996. "Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis", *Annals of Neurology*, 39, 285-294.
- Jeong, Y. H., Hyun, J. W., Kim Van Le, T., Kim, D. H., Kim, H. S. "Kalopanaxsaponin A Exerts Anti-Inflammatory Effects in Lipopolysaccharide-Stimulated Microglia via Inhibition of JNK and NF- κ B/AP-1 Pathways", *Biomolecules and Therapeutics*, 21, 332-337.

- Jersild, C., Svejgaard, A., Fog, T. 1972. "HL-A antigens and multiple sclerosis", *The Lancet*, 7762, 1240–1241.
- Johnson, K. P., Brooks, R., Cohen, J. A., Ford, C. C., Goldstein, J., Lisak, R. P. vd. 1995. "Copolymer I reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III, multicentre, double-blind, placebo-controlled trial", *Neurology*, 45, 1268-1276.
- Jones, A. L., Hulett, M. D., Parish C.R. 2005. "Histidine-rich glycoprotein: A novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems", *Immunology and Cell Biology*, 83, 106–118.
- Kantarci, O. H. 2008. "Genetics and natural history of multiple sclerosis" *Seminars in Neurology*, 28, 7–16.
- Kappos, L., Radue, E. W., O'Connor, P., Polman, C., Hohlfeld, R., Calabresi, P., Selmaj, K., Agoropoulou, C., Leyk, M., Zhang-Auberson, L., Burtin, P. 2010. "A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis", *New England Journal of Medicine*, 362, 387-401.
- Kewley, R. J., Whitelaw, M. L., Chapman-Smith, A. 2004. "The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators", *International Journal of Biochemical Cell Biology*, 36 189–204.
- Kivrak, I., Duru, M. E., Öztürk, M., Mercan, N., Harmandar, M., Topcu, G. 2009. "Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*", *Food Chemistry*, 116, 470-479.
- Kim, I.Y., Kim, M.M., Kim, S.J. 2005. "Transforming growth factor-beta: biology and clinical relevance", *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38, 1–8.
- Kim, J., Jiang, H., Park, S., Eltorai, A. E., Stewart, F. R., Yoon, H., Basak, J. M., Finn, M. B., Holtzman, D. M. 2011. "Haploinsufficiency of human APOE reduces amyloid deposition in a mouse model of amyloid- β amyloidosis. *Journal of Neuroscience*, 31, 18007-18012.
- Kolls, J. K., Linden, A. 2004. "Interleukin-17 family members and inflammation", *Immunity*, 21, 467-476.
- Korn, T., Reddy, J., Gao, W., Bettelli, E., Awasthi, A., Petersen, T. R. 2007. "Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation", *Nature Medicine*, 13, 423-431.

- Krumbholz, M., Meinl, E. 2014. "B cells in MS and NMO: pathogenesis and therapy", *Seminars in Immunopathology*, 36, 339-350.
- Kułakowska, A., Drozdowski, W. 2014. "Does interferon beta therapy affect survival of multiple sclerosis patients?", *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, 48, 436-441
- Kumrala, A., Tuzun, F., Ozbal, S., Ergur, B. U., Yilmaz, O., Duman, N., Ozkan, H. 2012. "Lipopolysaccharide-preconditioning protects against endotoxin-induced white matter injury in the neonatal rat brain", *Brain research*, 1489, 81-89.
- Kyhse-Anderson, J. 1984. "Electroblotting of Multiple Gels. A Simple Apparatus Without Buffer Tank for Rapid Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 10, 203-209.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nature*, 227, 680-684.
- Lee, D. H., Linker, R. A., Gold, R. 2008. "Spotlight on fumarates", *International MS Journal*, 15, 12–18.
- Lenk, H., Muller, U., Tanneberger, S. 1987. "Mitoxantrone: mechanism of action, antitumor activity, pharmacokinetics, efficacy in the treatment of solid tumors and lymphomas, and toxicity", *Anticancer Research*, 7, 1257–1264.
- Li, Y., Innocenti, S., Withers, D. R., Roberts, N. A., Gallagher, A. R., Grigorieva, E. F., Wilhelm, C., Veldhoen, M. 2011. "Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation", *Cell*, 147, 629–640.
- Lunec, J. 1998. "ESCODD: "European Standards Committee on Oxidative DNA Damage", *Free Radical Research*, 1998, 29, 601-608.
- Mahley, R. W., Rall, S. C. Jr. 2000. "Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein", *Annual Review Genomics Human Genetics*, 1, 507-537.
- Marie, J.C., Liggitt, D., Rudensky, A.Y. 2006. "Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor", *Immunity*, 25, 399–401.
- Marques, R. E., Guabiraba, R., Russo, R. C., Teixeira, M. M. 2013. "Targeting CCL5 in inflammation", *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 17, 1439-1460.

- Martín, R., Carvalho-Tavares, J., Hernández, M., Arnés, M., Ruiz-Gutiérrez, V., Nieto, M. L. 2010. "Beneficial actions of oleanolic acid in an experimental model of multiple sclerosis: A potential therapeutic role", *Biochemical Pharmacology*, 79, 198-208.
- Martinelli, V., Radaelli, M., Straffi, L., Rodegher, M., Comi, G. 2009. "Mitoxantrone: benefits and risks in multiple sclerosis patients", *Neurological Sciences*, 30, 167-170.
- Massberg, S., vonAndrian, U. H. 2006. "Fingolimod and sphingosine-1-phosphate modifiers of lymphocyte migration", *The New England Journal of Medicine*, 355, 1088-1091.
- Mathew, A., Pakan, J. M., Collin, E. C. 2013. "An ex-vivo multiple sclerosis model of inflammatory demyelination using hyperbranched polymer", *Biomaterials*, 34, 5872– 5882.
- Mehling, M., Johnson, T. A., Antel, J., Kappos, L., Bar-Or, A. 2011. "Clinical immunology of the sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis", *Neurology*, 76, 20-27.
- Mikita, J., Dubourdieu-Cassagno, N., Deloire, M. S., Vekris, A., Biran, M., Raffard, G., Brochet, B., Canron, M. H., Franconi, J. M., Boiziau, C., Petry, K. G. 2011. "Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration", *Multiple Sclerosis*, 17, 2–15.
- Miller, A. E., O'Connor, P., Wolinsky, J. S., Confavreux, C., Kappos, L., Olsson, T. P., Truffinet, P., Wang, L., D'Castro, L., Comi, G., Freedman, M. S. 2012. "Pre-specified subgroup analyses of a placebo-controlled phase III trial (TEMSO) of oral teriflunomide in relapsing multiple sclerosis", *Multiple Sclerosis Journal*, 18, 1625-1632.
- Mirshafiey, A., Mohsenzadegan, A., 2009. "TGF- β as a promising option in the treatment of multiple sclerosis", *Neuropharmacology*, 56, 929-936.
- Moharreg, D., Khiabani, R. A., Linker, R., Gold, Stangel, M. 2009." Fumaric acid and its esters: an emerging treatment for multiple sclerosis", *Current Neuropharmacology*, 7, 60–64.
- Monteleone, I., Rizzo, A., Sarra, M., Sica, G., Sileri, P., Biancone, L., MacDonald, T. T., Pallone, F., Monteleone, G. 2011. "Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract", *Gastroenterology*, 141, 237–248.

- Muller, D. M., Pender, M. P., Greer, J. M. 2004. "Chemokines and chemokine receptors: potential therapeutic targets in multiple sclerosis", *Current Drug Targets Inflammation Allergy*, 3, 279-290.
- Multhaup, G., Huber, O., Buée, L., Galas, M. C. 2015. "Amyloid Precursor Protein (APP) Metabolites APP Intracellular Fragment (AICD), A β 42, and Tau in Nuclear Roles", *The Journal of Biological Chemistry*, 290, 23515-23522.
- Munoz-Torredo, D. 2008. "Acetylcholinesterase inhibitors as disease-modifying therapies for Alzheimer's disease", *Current Medicinal Chemistry*, 15, 2433-2455.
- Murray, T. J. 2009. 'The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries', *Journal of the Neurological Sciences*, 277, 3-8.
- Müller, M., Carter, S., Hofer M. J., Campbell, I. L. 2010. "The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity a tale of conflict and conundrum", *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 36, 368–387.
- Müller, S. K., Bender, A., Laub, C., Högen, T., Schlaudraff, F., Liss, B., Klopstock, T., Elstner, M. 2013. "Lewy body pathology is associated with mitochondrial DNA damage in Parkinson's disease", *Neurobiology Aging*, 34, 2231-2233.
- Nakahara, J., Takemura, M., Gomi, H., Tsunematsu, K., Itoharu, S., Asou, H., Ogawa, M., Aiso, S., Tan-Takeuchi, K. 2003. "Role of radial fibers in controlling the onset of myelination", *Journal of Neuroscience Research*, 72, 279–289.
- Nguyen, T. Y., To, D. C., Tran, M. H., Lee, J. S., Lee, J. H., Kim, J.A., Woo, M. H., Min, B. S. 2015. "Anti-inflammatory Flavonoids Isolated from *Passiflora foetida*", *Natural Product Communication*, 10, 929-931.
- O'Connor, K. C., Bar-Or, A., Hafler, D. A. 2001. "The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis", *Journal of Clinical Immunology*, 21, 81–92.
- O'Connor, P. W., Goodman, A., Kappos, L., Lublin, F. D., Miller, D. H., Polman, C., Rudick, R. A., Aschenbach, W., Lucas, N. 2011. "Disease activity return during natalizumab treatment interruption in patients with multiple sclerosis", *Neurology*, 78, 1858–1865.
- Oksenberg, J. R., Barcellos, L. F., Cree, B. A., Baranzini, S. E., Bugawan, T. L., Khan, O., Lincoln, R. R., Swerdlin, A., Mignot E., Lin, L., Goodin, D., Erlich H. A., Schmidt, S., Thomson, G., Reich, D. E., Pericak-Vance, M. A., Haines, J. L., Hauser S. L. 2004.

- "Mapping multiple sclerosis susceptibility to the HLA-DR locus in African Americans", *The American Journal of Human Genetics*, 74, 160–167.
- O'Shea, J. J., Plenge, R. 2012. "JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease", *Immunity*, 36, 542-550.
- Ostman, A., Yang, Q., Tonks, N. K. 1994. "Expression of DEP-1, a receptor-like protein-tyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density", *Proceedings of the National Academy of Science*, 91, 9680–9684.
- Ozturk, M., Kolak, U., Topçu, G., Öksüz, S., Choudhary, M. I. 2011. "Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical scavenging activity guided fractionation", *Food Chemistry*, 126, 31-38.
- Ölmez, Z., Akın, E. , Göktürk, A. 2011. "Farklı Yetiştirme Ortamı ve Polietilen Tüp Boyutunun Kapari (*Capparis Ovata* Desf.) Fidanlarının Bazı Morfolojik Özellikleri Üzerine Etkisi", *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 12,101-108.
- Pareek, T. K., Belkadi, A., Kesavapany, S., Zaremba, A., Loh, S.L., Bai, L., Cohen, M. L., Meyer, C., Liby, K. T., Miller, R. H., Sporn, M. B., Letterio, J. J. 2011. "Triterpenoid modulation of IL-17 and Nrf-2 expression ameliorates neuroinflammation and promotes remyelination in autoimmune encephalomyelitis", *Scientific Reports*, 1, 201-212.
- Parhiz, H., Roohbakhsh, A., Soltani, F., Rezaee, R., Iranshahi, M. 2015. "Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models", *Phytotherapy Research*, 29, 323-331.
- Paty, D. W., Li, D. K. 1993. "Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial", *Neurology*, 43, 662-667.
- Paxinos, G., Franklin, K. B. 2001. "The mouse brain in stereotaxic coordinates", Academic Press. 2nd edition.
- Pike, C. J., Burdick, D., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G., Cotman, C. W. 1993. "Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state", *Journal of Neurology*, 13, 1676-1687.
- Polachini, C. R., Spanevello, R. M., Zanini, D., Baldissarelli, J., Pereira, L. B., Schetinger, M. R., da Cruz I. B., Assmann, C. E., Bagatini, M. D., Morsch, V. M. 2015. "Evaluation of

- Delta-Aminolevulinic Dehydratase Activity, Oxidative Stress Biomarkers, and Vitamin D Levels in Patients with Multiple Sclerosis”, *Neurotoxicity Research*, 1-13.
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J. A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F. D., Montalban, X., O’Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A. J., Waubant, E., Weinshenker, B., Wolinsky, J. S. 2011. “Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria”, *Annals of Neurology*, 69, 292-302.
- Probert, L. 2015. “TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects”, *Neuroscience*, 302, 2-22.
- Quarles, R. H. 1989. “Myelin-associated glycoprotein in demyelinating disorders”, *Critical Reviews in Neurobiology*, 5, 1-28.
- Quarles, R. H. 2007. “Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond”, *Journal of Neurochemistry*, 100, 1431-1448.
- Quintana, F. J., Basso, A. S., Iglesias, A. H., Korn, T., Farez, M. F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., Weiner, H. L. 2008. "Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor", *Nature*, 453, 65–71.
- Radak, Z., Boldogh, I. 2010. “8-Oxo-7,8-dihydroguanine: links to gene expression, aging, and defense against oxidative stress”, *Free Radical Biological Medicine*, 49, 587-596.
- Rall, S. C. Jr., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W. 1982. “Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence”, *Journal of Biological Chemistry*, 259, 4171-4178.
- Ransohoff, R. M. 2010. “Turning over the Chance card on MS susceptibility”, *Nature Immunology*, 11, 570–572.
- Rahael, I., Mahesula, S., Kalsaria, K., Kotagiri, V., Purkar, A. B., Anjanappa, M., Shah, D., Pericherla, V., Jadhav, Y. L., Raghunathan, R., Vaynberg, M., Noriega, D., Grimaldo, N. H., Wenk, C., Gelfond, J. A., Forsthuber, T. G., Haskins, W. E. 2012. “Microwave and magnetic (M²) proteomics of the experimental autoimmune encephalomyelitis animal model of multiple sclerosis”, *Electrophoresis*, 33, 3810-3819.
- Rosenberg, L. S. Carvlin, M. J., Krugh, T. R. 1986. “The antitumor agent mitoxantrone binds cooperatively to DNA: evidence for heterogeneity in DNA conformation”, *Biochemistry*, 25, 1002–1008.

- Sath, J., Yamamura, T. K. 2004. "The 14-3-3 Protein ϵ Isoform Expressed in Reactive Astrocytes in Demyelinating Lesions of Multiple Sclerosis Binds to Vimentin and Glial Fibrillary Acidic Protein in Cultured Human Astrocytes", *The American Journal of Pathology*, 165, 577-592.
- Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C. C., Patsopoulos, N. A., Moutsianas, L. 2011. "Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis", *Nature*, 476, 214–219.
- Schmidt, H., Williamson, D., Ashley-Koch, A. 2007. "HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: a HuGE review", *American Journal of Epidemiology*, 165, 1097-1109.
- Schönbeck, U., Libby, P. 2001. "The CD40/CD154 receptor/ligand dyad", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58, 4–43.
- Sekine, T., Miyazaki, H., Endou, H. 2006. "Molecular physiology of renal organic anion transporters", *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 290, 251–261.
- Sela, M., Arnon, R., Teitelbaum, D. 1990. "Suppressive activity of Cop-1 in EAE and its relevance to multiple sclerosis", *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 88, 303-314.
- Smenza, G. L., Rue, E. A., Iyer, N. V., Pang, M. G., Kearns, W. G. 1996. "Assignment of the hypoxia-inducible factor 1 α gene to a region of conserved synteny on mouse chromosome 12 and human chromosome 14q", *Genomics*, 34, 437–439.
- Se, H., Lee, I. S., Park, J. E., 2013. "Role of Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 7 in the Regulation of TNF- α Production in RAW 264.7 Macrophages", *PLoS One*, 8, 11-18.
- Serfina, M., Peluso, I., Raguzzini, A. 2010. "Flavonoids as anti-inflammatory agents", *Proceedings of the Nutrition Society*, 69, 273-278.
- Sorensen, P. S., Bertolotto, A., Edan, G., Giovannoni, G., Gold, R., Havrdova, E., Kappos, L., Kieseier, B. C., Montalban, X., Olsson, T. 2012. "Risk stratification for progressive multifocal leukoencephalopathy in patients treated with natalizumab", *Multiple Sclerosis*, 18, 143–152.
- Sørensen, T. L., Tani, M., Jensen, J., Pierce, V., Lucchinetti, C., Folcik, V. A., Qin, S., Rottman, J., Sellebjerg, F., Strieter, R. M., Frederiksen, J. L., Ransohoff R. M. 1999. "Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients", *Journal of Clinical Investigation*, 103, 807-815.

- Stauffer, M., 2006. "Understanding Multiple sclerosis", (Ph D), The University Press of Mississippi is a member of the Association of American University Presses.
- Steinman, L., Zamvil, S. 2003. "Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis", *Nature Reviews Immunology* 3, 483-492.
- Szczuciński A., Losy, J. 2007. "Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. Potential targets for new therapies," *Acta Neurologica Scandinavica*, 115, 137–146.
- Tao, K., Shiota, S., Collier, J., Foote, R. S., Mitra, S. 1990. "Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 686–690.
- Tasaki, A., Shimizu, F., Sano, Y., Fujisawa, M., Takahashi, T., Haruki, H., Abe, M., Koga, M., Kanda, T. 2014. "Autocrine MMP-2/9 secretion increases the BBB permeability in neuromyelitis optica", *Journal of Neurology Neurosurgery Psychiatry*, 85, 419-430.
- Tesoriere, L., Butera, D., Gentile, C. and Livrae, M. A. 2007. "Bioactive Components of Caper (*Capparis spinosa* L.) from Sicily and antioxidant Effects in a Red Meat Simulated Gastric Digestion", *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55, 8465-8471.
- Tomoka, R., Matsui, M. 2014. "Biomarkers for multiple sclerosis", *Internal Medicine*, 53, 361-365.
- Tovey, E. R., Baldo, B. A. 1987. "Comparison of Semidry and Conventional Tank Buffer Electrotransfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Membranes", *Electrophoresis*, 8, 384-387.
- Tuzun, F., Kumral, A., Dilek, M., Ozbal, S., Ergur, B., Yesilirmak, D. C, Duman, N., Yılmaz, O., Ozkan, H. 2011. "Maternal omega-3 fatty acid supplementation protects against lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain", *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 25, 849-854.
- van der Schoor, L. W., Verkade, H. J., Kuipers, F., Jonker, J. W. 2015. "New insights in the biology of ABC transporters ABCC2 and ABCC3: impact on drug disposition", *Expert Opinion Drug Metabolism Toxicology*, 11, 273-293.
- Vassall, K. A., Bamm, V. V., Harauz, G. 2015. "MyelStones: the executive roles of myelin basic protein in myelin assembly and destabilization in multiple sclerosis", *Biochemical Journal*, 472, 17-32.

- Vassalli, P. 1992. "The pathophysiology of tumor necrosis factors", *Annuals Review Immunology*, 10, 411–452.
- Vazirinejad, R.A., Ahmadi, Z.B., Kazemi A.M., Hassanshahi, G., Kennedy D. 2014. "The Biological Functions, Structure and Sources of CXCL10 and Its Outstanding Part in the Pathophysiology of Multiple Sclerosis", *Euroimmunomodulation*, 21, 322-330.
- Wei, P., Hu, G. H., Kang, H. Y., Yao, H. B., Kou, W., Liu, H., Zhang, C., Hong, S. L. 2014. "An aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress the Th17 response in allergic rhinitis patients", *Laboratory Investigation*, 94, 528–535.
- Weinshenker, B. G. 1996. "Epidemiology of multiple sclerosis", *Neurologic Clinics*, 14, 291–308.
- Wingerchuk, D. M. 2012. "Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression", *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 5, 13–22.
- Wu, M., Tsirka, S. E. 2009. "Endothelial NOS-deficient mice reveal dual roles for nitric oxide during experimental autoimmune encephalomyelitis", *Glia*, 57, 1204–1215.
- Yednock, T. A., Canon, C., Fritz, L. C., Sanchez-Madrid, F., Steinman, L., Karin, N. 1992. "Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin", 356, 63-66.
- Yong, V. W. 2004. "Prospects for neuroprotection in multiple sclerosis", *Frontiers in Biosciences*, 9, 864-872.
- Zhang, H.Y., Yang, D. P., Ji, H. F. 2006. "Naturally occurring multipotent anti-Alzheimer's agents", *Expert Opinion Drug Discovery*, 1, 269-277.
- Zheng, X. P., Hu, X.Q., Zhou, G. Y., Lu, Z.Q., Qiu, W., Bao, J., Dai, Y.Q. 2008. "Soluble egg antigen from *Schistosoma japonicum* modulates the progression of chronic progressive experimental autoimmune encephalomyelitis via Th2-shift response", *Journal of Neuroimmunology*, 194, 107–114.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. ALAATTİN ŞEN
Proje No:	112S187
Proje Başlığı:	Deneysel Multipl Skleroz Modelinde (DAE) MSCOV'un İyileştirici Etkilerinin Moleküler Mekanizmalarının Saptanması
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	BEKİR UĞUR ERGÜR, SEDA ÖZBAL, ŞEVKİ ARSLAN, UFUK KOLAK, IŞIL GAZİOĞLU
Danışmanlar:	GÜLAÇTI TOPÇU
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	PAMUKKALE Ü. FEN-EDEBİYAT F. BİYOLOJİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/11/2012 - 15/11/2015
Onaylanan Bütçe:	476000.0
Harcanan Bütçe:	430576.1

TÜBİTAK

<p>Öz:</p>	<p>Multipl Skleroz (MS), hala etiyojisi tam olarak bilinmemekle beraber genetik ve çevresel faktörler tarafından tetiklenen, immün bozukluğunun neden olduğu, merkezi sinir sisteminin kronik, enflamatuar ve demiyelizan bir hastalığıdır. Günümüzde MS tedavisi için kullanılan mevcut olan ilaçların kullanımları ile karşılaşılan sıkıntı, tam tedavi etmeni olmamaları ve yan etkilerden dolayı, MS için alternatif tedavi ajanlarının saptanması ve ilaç geliştirilmesi çalışmaları devam etmektedir. Bu kapsamda, projede öncelikle Capparis ovata bitkisinden elde edilen ekstre (MSCov) veya Capparis ovata bitkisinden doğrudan elde edilen ekstratlar çeşitli ekstraksiyon ve kromatografi teknikleri uygulanarak alt fraksiyonlar ve saf bileşikler elde edildi. Hem ana ekstre MSCov ile ve hem de alt fraksiyonlar ile multipl skleroz deneysel hayvan modeli olan DAE oluşturduğumuz CL57BL/6 farelerde, klinik skorlama, moleküler gen ifade değişkenlikleri, toksikolojik etki belirleme, histolojik ve immünohistokimyasal inceleme ve takipleri, tüm genom transkriptom analizleri gerçekleştirildi. Özellikle ana ekstre MSCov ile tedavi edilen DAE hayvanların hem klinik skorlar ve hem de moleküler gen ifade düzeyleri hastalığın kontrol hayvanlara benzer şekilde geri dönüştürüldüğünü teyit etti. Ayrıca histolojik ve immünohistokimyasal verilerimiz, DAE hayvanlarda tespit edilen miyelin tabakasındaki deformasyonların ve immünolojik tanılarının, MSCov uygulaması ile büyük oranda iyileştirildiği ve immünreaktivite kontrol skorlara yaklaştığını gösterdi. Bu ekstreten olası yan etkilerini tanımlamak için yapılan toksikolojik gen profillemeye çalışmamız MSCov'un 500 mg/kg/gün dozda güvenilir olduğunu, önemli bir yan etki oluşturmadığını destekledi. Bu verilerimiz Tüm genom transkriptom analizleri ile de teyit edildi. DAE hayvanlarda bağışıklık yanıtı ile ilgili yollarda ifade düzeyleri artan transkriptlerin MSCov uygulamaları ile tekrar baskılandığını gösterildi. Ancak elde edilen alt ekstratların hiç birisi ile ana ekstreya benzer sonuçlar elde edilemedi. Bu nedenle, MSCov ile gözlenen bu iyileştirici etkilerin içerdiği çok farklı bileşkenlerin pleiotropik etkileri olduğu; fraksiyonlama da birlikte pozitif etki oluşturan bileşkenlerin bir birinden ayrılması yada kompleks yapılarının bozulması nedeni ile etkilerinin kaybolduğu önerilmektedir.</p> <p>Capparis ovata bitkisinden yada ana MSCov ekstreteninden proje kapsamında 8 bileşik [glukokapparin, ? -sitosterol, 5?,6?- epoksikolestan, 3?-ol, 5?,6?- epoksikolestan, 3?-ol, stigmast-5,22-dien-3?-ol, miristat, olean-12-en-28-ol, 3?-pentakosanoat (yeni), Bis -(3-metiloktil) fitalat (yeni), 1H-indol-, 2-hidroksi, 3-karboksilik asit (yeni)] saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Bu bileşiklerin miktarları yeterli olmadığı için hayvan deneyleri yerine in vitro hücre kültüründe etkileri araştırılmıştır. Bu modellerde yapılan deneyler olean-12-en-28-ol, 3?-pentakosanoat bileşiğinin, hem immün baskılayıcı ve hem de miyelin oluşumunu tetikleyici etkiler göstermesi nedeniyle; MSCov ile gözlenen etkilerden sorumlu olabilecek, önemli bir terapötik ajan potansiyeli taşıdığı tespit edildi. Diğer bileşiklerin MS için etkin olma özellikleri oluşturmadığı saptandı.</p> <p>Sonuç olarak, proje ile önerilen hedefler başarı ile gerçekleştirildi ve patent dahil yeni araştırmalara temel oluşturacak çıktılar üretildi.</p>
<p>Anahtar Kelimeler:</p>	<p>Capparis ovata, Multipl Skleroz, MSCov, olean-12-en-28-ol, 3?-pentakosanoat (OPC), Terapötik ajan</p>
<p>Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:</p>	<p>Hayır</p>
<p>Projeden Yapılan Yayınlar:</p>	<p>1- Anti-neuroinflammatory effect of butanolic subextract of Capparis ovata water extract used as an alternative and complementary treatment for multiple sclerosis (Makale - Diğer Hakemli Makale),</p>