

UTKU GÜNEŞ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2018





**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ÇEŞİTLİ BİTKİSEL FRAKSİYONLARIN İNSAN
PERİFERİK KAN T VE NK HÜCRE ÇOĞALMASI
ÜZERİNE ETKİLERİ**

UTKU GÜNEŞ

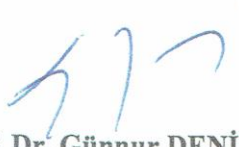
**DANIŞMAN
PROF. DR. GÜNNUR DENİZ**

**İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

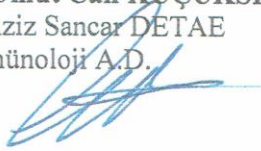
YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı, İmmünoloji Programında Yüksek Lisans öğrencisi Utku GÜNEŞ tarafından Prof. Dr. Günnur DENİZ'in danışmanlığında hazırlanan “Çeşitli Bitkisel Fraksiyonların İnsan Periferik Kan T Ve NK Hücre Çoğalması Üzerine Etkileri” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 14.09.2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

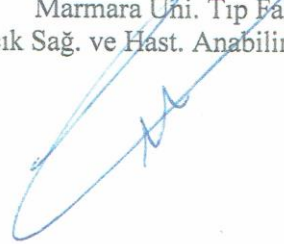


Prof. Dr. Günnur DENİZ
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
İmmünoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Umut Can KÜÇÜKSEZER
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
İmmünoloji A.D.



Doç. Dr. Elif KARAKOÇ AYDINER
Marmara Üni. Tıp Fak.
Çocuk Sağ. ve Hast. Anabilim Dalı



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.


Utku GÜNEŞ(İmza)



Sevgili Oğlum Yusuf Ali GÜNEŞ'e

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince kendisi ile çalışmaktan zevk aldığım ve bu süreçte bana her konuda yardımcı olan, beni her zaman dinleyen ve fikirlerime önem veren, deneyimleriyle yolumu aydınlatan, tez çalışmamın tamamlanması için her türlü imkanı sağlayan, güler yüzlü ve anlayışlı olmasıyla örnek aldığım ve bana olan inancını ve güvenini her zaman hissettiğim çok sevgili danışmanım ve hocam Prof. Dr. Günnur DENİZ'e tüm kalbimle teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca aldığım dersler aracılığıyla, eğitimime katkıda bulunan İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca verdiği fikirlerle çalışmalarına yardımcı ve destek olan sevgili hocam Doç. Dr. Umut Can KÜÇÜKSEZER hocama teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca manevi desteğiyle her an yanımda olan, çok değerli dostlarım Abdullah YILMAZ, Fulya Tuğba ARTUN, Aslıhan ŞENGELEN, Yunus AKSÜT, İlhan TAHRALI ve ayrıca tüm İmmünoloji ekibi arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Hayatıma girdiği andan itibaren her ihtiyaç duyduğumda desteğini ve sevgisini benden esirgemeyen ve bu günlere gelmemde büyük emeği olan sevgili eşim Nurten GÜNEŞ'e ve oğlum Yusuf Ali GÜNEŞ'e sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Eylül 2018

Utku GÜNEŞ

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 27052

İÇİNDEKİLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI.....	ii
BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Otoimmün Hastalıklar.....	3
2.2. Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları	4
2.3. Doğal Öldürücü (NK) Hücreler ve T hücreleri.....	5
2.3.1. Doğal Öldürücü (NK) Hücreleri	5
2.3.2. T hücreleri	6
2.4. Sitokinler.....	7
2.4.1. İnterlökin-1 β	7
2.4.2. İnterlökin-2 (IL-2).....	8
2.4.3. İnterlökin-4 (IL-4).....	8
2.4.4. İnterlökin-10 (IL-10).....	8
2.5. Bitkisel Ürünler.....	9
2.5.1. <i>Centaurea antiocchia</i>	11
2.5.2. <i>Cotinus coggygia</i>	12
2.5.3. <i>Crataegus microphylla</i>	12
2.5.4. <i>Olea europaea</i>	13
2.5.5. <i>Rosa damascena</i>	14
2.5.6. <i>Stachys cretica</i>	15
2.5.7. <i>Teucrium sandrasicum</i>	15
2.5.8. <i>Thymus Cinsler</i>	16

2.5.9. <i>Origanum vulgare</i>	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Olgular	19
3.2. Kullanılan Kimyasal Malzemelerin Hazırlanması	19
3.2.1. Zenginleştirilmiş RPMI-1640 (Complete Roswell Park Memorial Institute 1640) Hazırlanması	19
3.2.2. Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (DPBS) Hazırlanması	19
3.2.3. MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-II)-2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür) Hazırlanması	19
3.2.4. CFDA, SE (Karboksi Flöresein Diasetat Sukkinimidil Ester) Hazırlanması	19
3.3. Bitkilerin Eldesi Ve Fraksiyonların Hazırlanması	20
3.4. Periferik Kan Örneklerinin Eldesi	20
3.5. Periferik Kan Mononükleer Hücrelerin Eldesi	20
3.6. MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-II)-2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür) Yöntemi ile Hücre Çoğalmasının Belirlenmesi	21
3.7. PKMH Proliferasyonunun CFSE Yöntemiyle Belirlenmesi	22
3.8. Annexin V-Propidium İyodür (PI) Boyama ile Apoptozun Belirlenmesi	23
3.9. Fraksiyonların T ve NK Hücrelerinin Proliferasyonları Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	25
3.10. Rna İzolasyonu ve Kontrolü	26
3.10.1. RNA İzolasyonu	26
3.10.2. İzole Edilen RNA'ların Konsantrasyon, Safılık Kontrolü	27
3.10.3. cDNA Sentezi	27
3.11. Primerlerin Tasarlanması ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR) ile Gen Anlatım Düzeylerinin Belirlenmesi	28
3.11.1. Primerlerin Tasarlanması	28
3.11.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR) ile Gen Anlatım Düzeylerinin Belirlenmesi	29
3.12. İstatistiksel Analizler	30
4. BULGULAR	31
4.1. MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-II)-2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür) Yöntemi ile Hücre Çoğalmasının Belirlenmesi	31
4.2. PKMH Proliferasyonunun CFSE Yöntemiyle Belirlenmesi	36
4.3. Annexin V-Propidium İyodür (PI) Boyama ile Apoptozun Belirlenmesi	39

4.4. <i>Cotinus coggygria</i> Methanol fraksiyonunun T ve NK Hücrelerinin Proliferasyonları Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	42
4.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR) ile Gen Anlatım Düzeylerinin Belirlenmesi	50
5. TARTIŞMA	53
6. KAYNAKLAR	57
HAM VERİLER	66
FORMLAR	67
ETİK KURUL KARARI	69
PATENT HAKKI İZİNİ	70
TELİF HAKKI İZİNİ.....	71
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	72
ÖZGEÇMİŞ	73

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: <i>In vitro</i> sitotoksik aktiviteleri değerlendirilen bitkiler	11
Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan antikorlara ait bilgiler	25
Tablo 3-2: Total RNA'dan cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon bileşenleri	27
3-3: Total RNA'dan cDNA sentezi için reaksiyon koşulları	28
Tablo 3-4: Genlerin qPZR ile çoğaltımı için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları.....	28
Tablo 3-5: qPZR reaksiyon bileşenleri ve miktarları.....	29
Tablo 3-6: qPZR için reaksiyon koşulları.....	30
Tablo 4-1: Fraksiyonların PKMH hücreleri üzerinde MTT yöntemi ile belirlenen inhibisyon değerleri (n=3)	35
Tablo 4-2: <i>Centaurea antiochia</i> ve <i>Cotinus coggygia</i> fraksiyonlarına ait CFSE yöntemiyle elde edilen SI değerleri ve anlamlılık düzeyleri (n=5)	38
Tablo 4-3: <i>Stachys cretica</i> ve <i>Teucrium sandrasicum</i> fraksiyonlarına ait CFSE yöntemiyle elde edilen SI değerleri ve anlamlılık düzeyleri (n=5)	38
Tablo 4-4: Değişen konsantrasyonlarda <i>Cotinus coggygia</i> ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış PKMH'lerin, Annexin V-PI boyama sonucunda bölgelere göre dağılımları (n=3).....	41
Tablo 4-5: <i>Cotinus coggygia</i> fraksiyonunun PBMC'ler üzerindeki SI değerine etkileri	43
Tablo 4-6: <i>Cotinus coggygia</i> fraksiyonunun CD4 ⁺ 'ler üzerindeki SI değerine etkisi ..	45
Tablo 4.7: <i>Cotinus coggygia</i> fraksiyonunun CD8 ⁺ 'ler üzerindeki SI değerine etkileri	45
Tablo 4-8: <i>Cotinus coggygia</i> fraksiyonunun CD56 ^{parlak} NK hücreleri üzerindeki SI değerine etkisi.....	48
Tablo 4-9: <i>Cotinus coggygia</i> fraksiyonunun CD56 ^{soluk} NK hücreler üzerindeki SI değerine etkisi.....	48
Tablo 4-10: Değişen konsantrasyonlarda <i>Cotinus coggygia</i> ekstresi uygulanan ve uygulanmayan PHA ile uyarılmış PKMH'lerinin IL-1 β , IL-2 IL-4 ve IL-10 gen ekspresyon düzeyleri.....	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: <i>Centaurea antiochia</i> türüne ait çiçek görüntüsü [66]	12
Şekil 2-2: <i>Cotinus coggygria</i> türüne ait çiçek görüntüsü [69]	12
Şekil 2-3: <i>Crataegus microphylla</i> türüne ait çiçek görüntüsü [74]	13
Şekil 2-4: <i>Olea europaea</i> türüne ait çiçek görüntüsü [79].....	14
Şekil 2-5: <i>Rosa damascene</i> türüne ait cicek görüntüsü [82].....	14
Şekil 2-6: <i>Stachys cretica</i> türüne ait çiçek görüntüsü [85]	15
Şekil 2-7: <i>Teucrium sandrasicum</i> türüne ait çiçek görüntüsü [89].....	16
Şekil 2-8: <i>Thymus praecox</i> türüne ait çiçek görüntüsü [95]	16
Şekil 2-9: <i>Thymus pseudopulegioides</i> türüne ait çiçek görüntüsü [96]	17
Şekil 2-10: <i>Thymus sipyleus</i> türüne ait çiçek görüntüsü [97]	17
Şekil 2-11: <i>Origanum vulgare</i> bitkisinin çiçeklerine ait görüntü [100]	18
Şekil 3-1: CFSE yoğunluğu ve bölünme sayısı ilişkisini gösteren grafik ve histogram [107].....	22
Şekil 3-2: Hücre bölünmeleri ile CFSE miktarındaki azalmayı gösteren histogram A) Uyarılmamış splanosit kültürü B) anti-CD3 ile uyarılmış splenosit kültüründe meydana gelen değişim [103]	23
Şekil 3-3: Annexin V ve PI boyama ile Apoptozun belirlenmesi [108]. (A: Canlı hücre grubu, B: Apoptotik hücre grubu).....	24
Şekil 4-1: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine <i>Centaurea antiochia</i> methanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi	32
Şekil 4-2: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine <i>Cotinus coggygria</i> methanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi	32
Şekil 4-3: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine <i>Crataegus microphylla</i> methanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi ..	32
Şekil 4-4: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine <i>Olea europaea</i> methanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi	33
Şekil 4-5: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine <i>Rosa damascena</i> methanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi	33
Şekil 4-6: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine <i>Stachys cretica</i> methanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi	33

Şekil 4-7: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine <i>Teucrium sandrasicum</i> metanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi .	34
Şekil 4-8: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine <i>Thymus praecox</i> metanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi	34
Şekil 4-9: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine <i>Thymus pseudopulegioides</i> metanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi.....	34
Şekil 4-10: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine <i>Thymus sipyleus</i> metanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi	35
Şekil 4-11: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine <i>Oryganum vulgare</i> metanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi	35
Şekil 4-12: FSC-SSC grafiğinde uyarımsız PKMH'in dağılımı, kapılama stratejisi ve % proliferasyon değerleri	37
Şekil 4-13: FSC-SSC grafiğinde PHA ile uyarılan PKMH'lerin dağılımı, kapılama stratejisi ve % proliferasyon değeri	37
Şekil 4-14: Uyarımsız PKMH'lerde apoptozun saptanması için kullanılan kapılama stratejisi ve hücrelerin dağılımı.....	39
Şekil 4-15: PHA uyarısı sonrası PKMH'lerde apoptozun saptanması	40
Şekil 4-16: <i>Cotinus coggygria</i> metanol fraksiyonunun, 100 µg/mL (solda) ve 25 µg/mL (sağda) konsantrasyonlarının lenfosit kapısı içindeki hücre oranı değişimleri...	41
Şekil 4-17: Değişen konsantrasyonlarda <i>Cotinus coggygria</i> ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış PKMH'nin CFSE yöntemi ile ölçülen SI verileri (n=9)	43
Şekil 4-18: CD4 ⁺ ve CD8 ⁺ T hücrelerinin proliferasyon verilerini ölçmek için kullanılan kapılama stratejisi (A: Lenfosit kapısı B: Lenfosit kapısı içindeki CD3 ⁺ ve CD3 ⁻ hücreler C: CD3 ⁺ hücreler içerisinde CD4 ⁺ hücreleri D: CD3 ⁺ içerisinde CD8 ⁺ hücreleri)	44
Şekil 4-19: Değişen konsantrasyonlarda <i>Cotinus coggygria</i> ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış CD4 ⁺ T hücrelerinin CFSE yöntemi ile ölçülen SI değerleri (n=9).....	44
Şekil 4-20: Değişen konsantrasyonlarda <i>Cotinus coggygria</i> ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış CD8 ⁺ T hücrelerinin CFSE yöntemi ile hesaplanan SI verileri (n=9)....	45
Şekil 4-21: CD4 ⁺ ve CD8 ⁺ T hücre proliferasyon yanıtlarının konsantrasyona bağlı karşılaştırılması.....	46

Şekil 4-22: CD56 ^{parlak} ve CD56 ^{soluk} NK hücrelerinin proliferasyon verilerini ölçmek için kullanılan kapılama stratejisi (A: Lenfosit kapısı B: Lenfosit kapısı içerisindeki CD3 ⁺ ve CD3 ⁻ hücreler C: CD3 ⁻ hücreler içerisinde CD56 ^{parlak} ve CD56 ^{soluk} hücreler)	47
Şekil 4-23: Değişen konsantrasyonlarda <i>Cotinus coggygia</i> ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış CD56 ^{parlak} T hücrelerinin CFSE yöntemi ile ölçülen SI verileri (n=9) ..	47
Şekil 4-24: Değişen konsantrasyonlarda <i>Cotinus coggygia</i> ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış CD56 ^{soluk} NK hücrelerinin CFSE yöntemi ile ölçülen proliferasyon verileri (n=9)	48
Şekil 4-25 CD56 ^{parlak} ve CD56 ^{soluk} NK hücrelerinin proliferasyon yanıtlarının ekstre dozuna bağlı karşılaştırılması	49
Şekil 4-26: Değişen konsantrasyonlarda <i>Cotinus coggygia</i> ekstresi uygulanan ve uygulanmayan PHA ile uyarılmış PKMH'lerinin IL-1 β ve IL-2 gen ekspresyon düzeyleri (n=3).....	50
Şekil 4-27: Değişen konsantrasyonlarda <i>Cotinus coggygia</i> ekstresi uygulanan ve uygulanmayan PHA ile uyarılmış PKMH'lerinin IL-4 ve IL-10 gen ekspresyon düzeyleri (n=3).....	51

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

CD	Farklılaşma Kümesi
CFSE	Karboksi Floresein Suksimidil Ester
DPBS	Dulbecco'nun Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi
FBS	Fetal Sığır Serumumu
IFN- γ	İnterferon gamma
IL	İnterlökin
MHC	Major Histokompatibilite Kompleks (temel doku-uygunluğu bileşeni)
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-II)-2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür
NK	Natural Killer (doğal öldürücü hücre)
qPZR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PKMH	Periferik Kan Mononükleer Hücre
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Kültür Ortamı
STL	Sitotoksik T Lenfositleri
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör Alfa

ÖZET

Güneş U. Çeşitli Bitkisel Fraksiyonların İnsan Periferik Kan T ve NK Hücre Çoğalması Üzerine Etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. İmmünoloji A.D. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul. 2018.

Bitkisel fraksiyonların biyoaktivitelerinin tanımlanması ve bu biyoaktivitelere uygun kullanım alanlarının oluşturulması önemli bir araştırma alanıdır. Bu tez çalışması kapsamında, 3'ü Türkiye'ye endemik olan toplam 11 metanolik bitki fraksiyonunun (*Centaurea antiochia*, *Cotinus coggygia*, *Crataegus microphylla*, *Olea europaea*, *Rosa damascena*, *Stachys cretica*, *Teucrium sandrasicum*, *Thymus praecox*, *Thymus pseudopulegioides*, *Thymus sipyleus*, *Oryganum vulgare*) uyarılmış periferik kan mononükleer hücreler (PKMH) üzerindeki anti-proliferatif etkileri Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi (MTT) kolorimetrik yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışılan bitki ekstraktlarından en yüksek inhibisyonu sağlayan *Centaurea antiochia*, *Cotinus coggygia*, *Stachys cretica* ve *Teucrium sandrasicum* fraksiyonlarının uyarılmış PKMH'ler üzerindeki etkileri Karboksi Floresein Suksitimidil Ester (CFSE) yöntemi ile akan hücre ölçerinde tekrar analiz edilmiş ve situmilasyon indeks (SI) parametreleri belirlenmiştir. *Cotinus coggygia* fraksiyonunun anti-proliferatif etkisini apoptotik yolları aktive ederek mi yaptığını belirlemek için Annexin V/Propidiyum iyodür boyama ile saptanmış ve apoptoza neden olmadığı görülmüştür. Periferik kan T ve doğal öldürücü (NK) hücreler üzerindeki etkileri ise proliferatif yanıt ile takip edilmiştir. *Cotinus coggygia* fraksiyonunun tüm hücre gruplarını inhibe ettiği ancak sitotoksik T hücrelerinin proliferasyonunu diğer hücre gruplarına göre daha etkili biçimde inhibe ettiği görülmüştür. Bu inhibisyonun sebebinin belirlemek amacıyla kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ile IL-1 β , IL-2, IL-4 ve IL-10 genlerinin anlatım düzeyleri araştırıldığında, IL-1 β , IL-2 ve IL-10 gen anlatımlarında azalma, IL-4 gen anlatımında artma olduğu belirlenmiştir. Bulgularımız *Cotinus coggygia* ekstresinin anti-enflamuar yolları aktive ettiğini düşündürmektedir.

Bu bulgular anti-enflamuar etkileri henüz araştırılmamış olan *Cotinus coggygia* methanol fraksiyonunun saptanan anti-enflamuar etkilerinin yeni anti-enflamuar etkili ilaçların ve bunlara bağlı tedavilerin geliştirilmesinde öncü olabileceğini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: T hücreleri, Doğal öldürücü hücreler, anti-enflamuar aktivite, İnterlökinler, İmmünoloji

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 27052

ABSTRACT

Gunes U. Effects of Various Herbal Fractions on Human Peripheral Blood T and NK Cell Proliferation. Istanbul University Institute of Health Sciences. Immunology. M.Sc. Thesis. Istanbul. 2018.

Identification of the bioactivity of plant fractions and the establishment of suitable areas for these bioactivity is important research area. As first part of this thesis, the anti-proliferative effects of 11 methanolic plant fractions, 3 of which are endemic to Turkey, (*Centaurea antiochia*, *Cotinus coggygia*, *Crataegus microphylla*, *Olea europaea*, *Rosa damascene*, *Stachys cretica*, *Teucrium sandrasicum*, *Thymus praecox*, *Thymus pseudopulegioides*, *Thymus sipyleus*, *Oryganum vulgare*) on stimulated peripheral blood mononuclear cells were determined by the colorimetric method of Mitochondrial Dehydrogenase Enzyme Activity (MTT). The effects of *Centaurea antiochia*, *Cotinus coggygia*, *Stachys cretica* and *Teucrium sandrasicum* fractions on the stimulated PBMCs, which provide the highest inhibition, were reanalyzed by the Carboxy Fluorescein Succinyl Ester (CFSE) method and the stimulation index (SI) parameters were determined. The Annexin V / Propidium Iodide staining method was used to determine if the anti-proliferative effect of the *Cotinus coggygia* fraction was caused by activation of apoptotic pathways and apoptosis was not observed. The effects of *Cotinus coggygia* fraction on peripheral blood T and Natural Killer (NK) cells were followed by a proliferative response of these cells. *Cotinus coggygia* fraction inhibited all cell populations but inhibited the proliferation of cytotoxic T cells more effectively than other cell groups. When the expression levels of IL-1 β , IL-2, IL-4 and IL-10 genes are investigated by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) to determine the cause of this inhibition, decrease in expression of IL-1 β , and IL-2. Our findings suggest that *Cotinus coggygia* extract activates anti-inflammatory pathways.

These findings support that the anti-inflammatory effects of *Cotinus coggygia* methanol fraction, which hasn't yet been investigated for its anti-inflammatory effects, may be pioneer in the development of new anti-inflammatory drugs and related treatments.

Key Words: T cells, Natural killer cells, Antiinflammatory activity, Interleukins, Immunology

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 27052

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İmmün sistem hastalıkları genel olarak 5 grup altında toplanabilirler. Bunlar, immün yetersizlikler, aşırı duyarlılık reaksiyonları, otoimmün hastalıklar, sepsis ve kanserdir [1]. Bu hastalıkların içinde kanser, otoimmün hastalıklar ve allerji gerek etkilenen kişi sayısı gerekse tedavi maliyetleri olarak diğerlerinden daha fazla ön plana çıkmaktadırlar. Kansere yakalanan kişi sayısı heryıl artmakla birlikte toplamda tüm Dünya nüfusunun %1.7'sini etkilemektedir. Sadece aşırı duyarlılık reaksiyonlarından olan astım hastalığı olan kişi oranı ise %8.3 civarındadır [2]. Otoimmün hastalıklardan birisine sahip olan kişi oranı ise %9 civarındadır [3]. Toplam aşırı duyarlılık reaksiyonlarından etkilenen kişi sayısının ise Dünya nüfusunun %40'inden fazlası olduğu tahmin edilmektedir. Otoimmün hastalıkların ve aşırı duyarlılık reaksiyonlarının, insan sağlığı için kanserden çok daha büyük bir risk oluşturduğu bu verilerden kolayca anlaşılmaktadır.

Günümüzde otoimmün hastalıkların ve aşırı duyarlılık reaksiyonların tedavisinde en çok kullanılan ilaçlar steroid temelli immün baskılayıcılar ve steroid temelli olmayan immün baskılayıcılardır. Her iki ilaç tipinde kullanan hastalar için çok ciddi yan etkileri olmakta ve hastaların yaşam kalitelerini olumsuz etkilemektedir. Bunun yanında, iki ilaç tipide hastalıkların tedavisini sağlamamakta ve sadece semptomları tedavi etmektedirler. Bu bağlamda immün sistem hastalıklarının tedavisi için yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulduğu bir gerçektir.

Hastalıkların tedavisinde, bitkisel ürünlerin kullanılması antik çağlardan beri devam eden bir süreçtir. Özellikle yüzyıllar boyunca nedeni bilinmeyen ve ismi dahi olmayan pek çok hastalığın tedavisinde çok çeşitli bitkisel ürünler denenmiş ve insanları tedavi ettiğine inanılmıştır. Bu tür tıbbi bitkilerin dünyanın her tarafına dağılması doğanın insanlığa bir hediyesidir [4]. Günümüz modern tıbbında ise, nedensellik çerçevesinde bitkisel ekstreler yeniden değerlendirilmiş ve bu ekstrelerin temel bileşenleri aydınlatılmıştır. Bu yaklaşım sayesinde birçok hastalığın tedavisinde kullanılan çok çeşitli bitkisel moleküller tanımlanmış ve biyoaktiviteleri aydınlatılmıştır. Bu sayede, bitkisel ekstreler halk tıbbına ait bir yaklaşım olmaktan çıkmış ve yeni moleküllerin keşfi için bir havuz görevi görmeye başlamıştır [5].

Bu havuzdan seçilen moleküller biyoaktivitelerine göre çok çeşitli kullanım alanlarına dağılmaktadır. Bununla birlikte, insanların çoğunluğu sentetik ilaçları kullanmak yerine bu tür bitkisel ürünleri kullanmayı tercih etmektedir [6]. Aynı zamanda, bu tür ürünlerin doğal kaynaklı olması sebebiyle insanlar bu tür ürünlere daha fazla güvenmektedir [7]. Bu sebeplerle bitkisel ürünlerin immün hücreler üzerindeki etkileri iyi araştırılmalı ve anti-enflamatuvar/pro-enflamatuvar etkileri iyi tanımlanmalıdır.

Bu çalışmada, 3 tanesi Türkiye'ye endemik 11 metanolik bitki fraksiyonunun fitohemaglutinin (PHA) ile aktive edilmiş periferik kan mononükleer hücreler (PKMH) üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, öncelikle ucuz ve basit bir yöntem olan Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi (MTT) kolorimetrik yöntemi ile fraksiyonlar taranmış ve potansiyel fraksiyonların belirlenmesi hedeflenmiştir. *Centaurea antiochia*, *Cotinus coggygia*, *Stachys cretica* ve *Teucrium sandrasicum* fraksiyonlarının inhibisyona neden olduğu saptanmış ve uyarılmış PKMH'ler üzerindeki etkileri CFSE yöntemi ile akan hücre ölçer cihazında analiz edilmiş ve mitotik indeksi parametresindeki değişiklik belirlenmeye çalışılmıştır. PHA uyarımının oluşturduğu mitotik indeksi en fazla inhibe eden *Cotinus coggygia* fraksiyonunun bu anti-proliferatif etkiyi apoptatik yolları aktive ederek mi yaptığını belirlemek için Annexin V/Propidiyum iyodür boyama ile bu fraksiyonun apoptatik etkileri belirlenmiş ve T ve doğal öldürücü (NK) hücreler üzerindeki etkileri saptanmıştır. *Cotinus coggygia* metanolik fraksiyonunun uyarılmış PKMH hücrelerin gen anlatımlarını nasıl değiştirdiğini belirlemek amacıyla kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ile IL-1 β , IL-2, IL-4 ve IL-10 düzeyleri araştırılmıştır.

Ülkemizde endemik olan ve olmayan anti-enflamatuvar biyolojik aktiviteleri ortaya tam olarak konulmamış bitki fraksiyonları ile ilgili çalışmalar yeni etkin ilaçların geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir.

2. GENEL BİLGİLER

Aşırı duyarlılık reaksiyonları ve otoimmün reaksiyonlar immün sistemin düzenlenmesinde meydana gelen kusurlardan dolayı oluşan ve hastaların hayat kalitelerini önemli ölçüde etkileyen hastalıklardır. Bu 2 tip hastalık moleküler mekanizmalar olarak farklı yollardan kaynaklanmalarına rağmen, etkilenen insanlara yaşattıkları maddi ve manevi kayıpların büyüklüğü açısından ortak paydaya sahiptirler. Elli milyon Amerikan vatandaşının otoimmün hastalığının olduğu ve bu hastalıklarının tedavisi için Amerika'da yıllık olarak 100 milyar dolar harcandığı rapor edilmiştir ki bu rakam Amerika'da kanser tedavisine harcanan tutarın yaklaşık 2 katıdır [8].

Aşırı duyarlılık reaksiyonlarında ise durum çok daha vahimdir, 150 milyon Avrupa Birliği vatandaşı bu hastalıklardan etkilenmektedir. 2025 yılında, Avrupalı nüfusun %50'sinin aşırı duyarlılık reaksiyonlarından etkileneceği tahmin edilmektedir.

2.1. Otoimmün Hastalıklar

Otoimmün yanıt, bireyin kendi dokularına karşı immün yanıt geliştirmesi olarak ifade edilebilir. Otoimmünite ile doku hasarı ortaya çıkarsa otoimmün hastalıklar gelişir [9]. Başkabir ifadeyle, B hücreleri, T hücreleri veya her ikisinde de self-toleransın yürütülmesinden sorumlu mekanizmalarda yetmezlik veya kırılma sonucunda otoimmünite gelişebilir. Araştırmalar, T hücrelerinin otoimmünitedeki rolü üzerine odaklanmaktadır. Birinci neden, yardımcı T hücreleri ve bunların immün yanıtların düzenlemesindeki anahtar rolüdür. İkinci neden ise, çeşitli otoimmün hastalıklarda, genetik olarak Majör Doku Uygunluk Kompleksi (MHC) moleküllerinin (insanlarda HLA kompleksleri) T hücrelerine sunumunun otoimmüniteyi kolaylaştırmasıdır. Bu bakımdan, T hücre toleransındaki bozuklukların önemli bir otoimmünite mekanizması olduğu düşünülmektedir. T hücre tolerans bozukluğunun yol açtığı lezyonlara hücre-aracılı immün reaksiyonlar neden olmaktadır. Yardımcı T lenfosit bozuklukları aynı zamanda otoantikör üretimine yol açar; çünkü bu hücreler protein antijenlere karşı yüksek-affiniteli antikor üretimi için zorunludur. Otoimmüniteye yol açan majör faktörler; genetik yatkınlık ve enfeksiyonlar gibi çevresel tetikleyicilerdir. Yatkınlık genleri ve enfeksiyonlar, self-toleransta kırılmaya yol açarlar. Enfeksiyonlar ise otoreaktif lenfositlerin dokuya gelmesine ve aktifleşmelerine yol açarak doku hasarı

yaparlar. Enfeksiyon ve doku hasarı aynı zamanda self-antijenlerin yer aldığı immün sistemi taklit ederek self-toleransta kırılmaya yol açabilir [9].

Otoimmün hastalıklar sistemik veya organ-spesifik olabilirler. Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) gibi selfantijen ve spesifik antikorlardan oluşan immün komplekslerin dolaşımında yer aldığı hastalıklar tipik olarak sistemik hastalık yaparlar. Buna karşılık Multiple Skleros (MS), Tip I Diabetes Mellitus (DM), myastenia gravis gibi otoantikor veya dokularda yerleşmiş self-antijenlere T hücre yanıtlarının olduğu hastalıklar organ-spesifik hastalıkları oluşturur. Çeşitli efektör mekanizmalar farklı hastalıklardaki doku hasarından sorumludur.

Bir self-antijene karşı gelişen otoimmün reaksiyonlar, dokulara hasar vererek dokunun diğer antijenlerinin salınımına ve bu antijenlere spesifik lenfositlerin aktivasyonuna yol açarak hastalığın şiddetlenmesine yol açarlar. Bu fenomene ‘epitop yayılımı’ denilir ve bir otoimmün hastalığın bir kere geliştikten sonra neden kronikleşme ve ilerleme eğiliminde olduğunu açıklar [10].

2.2. Aşırı Duyarlılık Reaksiyonları

1906 yılında Clemens von Pirquet allerji kelimesini kullanmış ve hem konakçıyı koruyucu (host-protective) hem de potansiyel olarak konakçıya zararlı (host-injurious) bağışıklık reaksiyonlarını tanımlamıştır [11]. Kelime, Yunanca “*allos*” (diğer) ve “*ergon*” (aksiyon, hareket) sözcüklerden gelmektedir [12]. Antikor veya hücre aracılı olarak gerçekleşebilen allerji, immünolojik mekanizmalar tarafından başlatılan bir aşırı duyarlılık reaksiyonu olarak da tanımlanmaktadır. Aşırı duyarlılık reaksiyonları, bireylerde allerjik astım, allerjik rinokonjonktivit, allerjik rinit (saman nezlesi), egzama gibi problemlere neden olmaktadır [13].

Aşırı duyarlılık reaksiyonları 1963 yılında, İngiliz immünologlar Coombs ve Gell (1963) tarafından 4 grup altında sınıflandırılmıştır. Bu gruplar Tip I, Tip II, Tip III ve Tip IV allerjik reaksiyonlardır [11, 14]. Allerjik reaksiyonlarda en çok görülen grup ani aşırı duyarlılık veya Tip I aşırı duyarlılık grubudur. Allerjen antijenlere karşı üretilen IgE antikorlarının mast hücrelerine bağlanması ve mediyatörlerin salgılanması ile Tip I aşırı duyarlılık reaksiyonları tetiklenir ve popülasyonun %25’ine etki ederek genellikle allerjik rinit şeklinde kendini gösterir [14, 15]. Tip II aşırı duyarlılık reaksiyonunda ise belirli bir hücre veya doku yüzeyinde bulunan antijenlere karşı oluşan IgE dışındaki (IgG, IgM sınıfı) antikorlar rol oynamaktadır ve bu hücre ya da dokulara

hasar vererek işlevlerini bozabilirler. Tip III aşırı duyarlılıkta, antikorlar çözünür antijenlere karşı oluşur ve oluşan antikorlar bu antijenlerle kompleksler oluşturabilir. Bu duyarlılık reaksiyonu ile gelişen immün kompleksler çeşitli dokuların damarlarında birikerek enflamasyona (yangı) ve doku hasarına yol açabilirler. Tip IV aşırı duyarlılık reaksiyonu ise hücrel tip aşırı duyarlılık reaksiyonu (geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu) olup bu duyarlılık reaksiyonlarında T hücreleri rol oynamaktadır [14].

2.3. Doğal Öldürücü (NK) Hücreler ve T hücreleri

2.3.1. Doğal Öldürücü (NK) Hücreleri

Doğal öldürücü (NK) hücreleri kemik iliği kökenli, büyük granüllü lenfositlerdir ve doğal immün sistemin bir elemanıdır. Patojenler ve tümörlere karşı spontan sitotoksik aktivite gösterirler. NK hücreleri periferik kan lenfositlerinin %5-15'ini oluştururlar [16]. NK hücreleri, kanser hücreleri ve virüsle enfekte hücrelere karşı doğal bir sitotoksik aktivite gösterirler. Bu görevlerinin yanında, immünoregülatör sitokin üretimini de yaparlar [17, 18]. NK hücreleri fonksiyonlarını, yüzeylerinde eksprese ettikleri çeşitli aktivatör ve inhibitör reseptörler arasındaki etkileşimler aracılığıyla gerçekleştirir ve IFN- γ , IL-2, IL-12 gibi sitokinler tarafından aktive olurlar [16, 19]. İnhibitör reseptörler bir inhibisyon sinyali oluştururken, aktivatör reseptörler NK hücre aktivasyonunu ve hedef hücre lizisini başlatırlar. Bu reseptörler arasında NKG2A inhibitör, NKG2D ve NKp44 ise aktivatör reseptördür [19]. NK hücreleri aktivasyonu takiben uygun hedef hücrelere karşı sitotoksik fonksiyonlar sergilemenin yanında doğal ve edinsel immün yanıtları düzenleyen çeşitli sitokinler ve kemokinler (IFN- γ , GM-CSF ve TNF- α) salgırlar [20]. Th₁ ve Th₂ hücrelerine benzer şekilde insan NK hücre alt gruplarının da NK1 ve NK2 olarak iki gruba ayrıldığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir. NK hücreleri; T hücre reseptörü (THR), immüoglobülin (Ig) veya CD3 molekülünü eksprese etmemelerine karşılık, hücre yüzeylerinde “nöral hücre yapışma molekülü-1” (CD56) ekspresyonu ile karakterizedir. CD56 ekspresyonunun özgül fonksiyonu tanımlanmamış olmakla birlikte, NK hücreleri CD56 ekspresyonunun yoğunluğuna bağlı olarak "CD56^{parlak}" ve "CD56^{soluk}" olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Yüksek oranda Fc γ RIIIA reseptörü CD16 ve perforin eksprese eden CD16⁺CD56^{soluk} NK hücreleri, total periferik kan NK hücrelerinin yaklaşık %90'ını oluşturmaktadırlar [16, 21]. Bu hücreler uyarıma bağlı olarak değişen miktarlarda IFN- γ sekrete edebilen ve hedef hücreleri etkili şekilde öldüren hücrelerdir [22]. Kandaki total

NK hücrelerinin küçük bir bölümünü (%5-10) ise CD16⁻CD56^{parlak} NK hücreleridir. Düşük seviyede perforin ve CD16 eksprese eden CD56^{parlak} NK hücreleri uyarımı takiben yüksek miktarlarda IFN- γ ve TNF- α salgırlar. Bu fonksiyonlarda CD56^{soluk} NK hücrelerine göre üstün olmakla birlikte, yalnızca uzun süreli uyarımdan sonra sitolitik aktivite geliştirebilmektedirler [18]. Yüksek seviyede sitokin sekresyonundan dolayı CD56^{parlak} NK hücrelerinin enflamasyondan sorumlu veya regülatör etkili hücreler oldukları ileri sürülmektedir. Bu olgunlaşmamış NK hücreleri sekonder lenfoid dokularda [23] ve enflamasyon alanlarında yüksek oranda bulunurlar [24]. Bu özellikleriyle NK hücrelerinin, otoimmün yanıtları düzenleyebildikleri bildirilmiştir [25].

2.3.2. T hücreleri

Hücrel immüitenin temelini T lenfositler oluşturur. Timusta olgunlaşrlar ve yüzey reseptörleri ile yabancı “*non-self*” ve kendi “*self*” dokuları ve hücreleri, enfeksiyöz ajanları tanıyabilirler. Sinyalleri ile B lenfositleri uyararak harekete geçirirler. Makrofajlar ve lenfositler arasında iletişimi ve koordinasyonu sağlarlar. İşlevlerine ve yüzey antijenlerine göre sitotoksik, yardımcı ve düzenleyici tipleri bulunur [14].

T hücreleri işlevlerine göre sahip oldukları yüzey moleküllerine göre sınıflandırılırlar. CD8⁺ T lenfositler, hedef hücreleri öldürürler. CD4⁺ T lenfositler, antikor üretimi için immün yanıtları sağlarlar. CD8⁺ T lenfositler sitotoksik T hücreleri, CD4⁺ T lenfositler ise yardımcı T hücreleri (Th) olarak adlandırılırlar [26].

CD8⁺ sitotoksik T hücreleri major doku uygunluk kompleksi-I'e (MHC-I) karşı cevap oluştururlar. Perforin ve granzim ile hedef hücreyi apoptoza yönlendirirler. Sitolizin ile membranda porlar oluşturarak moleküllerle hedef hücreleri lizise uğratırlar. Ayrıca apoptozda uyarıcı olan Fas ligandı (FasL) eksprese ederler ve hedef hücredeki Fas ile bağlanarak hücreyi apoptoza uğratırlar. Hedef hücrelerdeki antijenler virüs ve tümör hücrelerine aittir [14, 26].

CD4⁺ T lenfositlere antijen sunumu MHC-II molekülleri taşıyan ASH'ler aracılığı ile olur. CD4⁺ T hücreleri, maruz kaldıkları sitokinlere göre Th₁ ve Th₂ alt gruplarına ayrılır. IL-12 ve IL-18, Th₁ yönünde, IL-4 ise Th₂ yönünde farklılaşmaya yol açar. TGF- β ise düzenleyici T hücre (T_{reg}) yönüne ilerlemeyi sağlar. Th₁ hücreleri,

gecikmiş tipte hipersensitivite (Tip 4 hücresele tepkime) gibi proinflatuvar yanıtları indüklerken, Th₂ hücreleri allerjik reaksiyonları yönetirler [9, 27].

Th₁ ve Th₂ ortak olarak IL-2 salgırlar ve fenotip olarak ayırt edilemezler. Th₁; makrofajlarla ilişkili olarak IFN- γ ve TNF- α salgırlar. IFN- γ , Th₂ yönelimini ve işlevlerini azaltır. Hücresele immüitenin ana hücresi olarak sitotoksik T lenfositlerini (STL) aktive eder ve makrofaj aktivasyonu yapar. Th₂; B lenfositlerle ilişkili olarak, IL-4, 5, 6, 10 ve 13 salgırlar. Hümorale immüitede B lenfosit çoğalmasını, izotip değişimini ve nötrale eden antikor üretimini sağlar. IL-4, Th₂ sitokinlerinin artmasına yol ačan pozitif geribildirime yol açar. IL-10 sitokini IL-2 ve IFN- γ üzerinden Th₁ yanıtlarını baskırlar [9, 26, 28].

CD25⁺CD4⁺ T hücreleri immün hücreler üzerinde güçlü baskılama yaparlar ve düzenleyici T lenfositleri (T_{reg}) olarak bilinirler[29, 30], TGF- β ve IL-10 ile naive T hücrelerinin farklılaşmasını sağlar [31] .

2.4. Sitokinler

Sitokinler, farklı hücre tipleri tarafından üretilip sekrete olan protein yapılı geniş bir ailenin genel adıdır. İmmüitenin tüm yollarının kontrolünden sorumludurlar. Sitokinler enfeksiyonlara, immün yanıtlara, kansere, enflamasyona ve travmaya karşı yanıtları düzenlerler veya yanıtları oluştururlar. Bazı sitokinler enflamasyonun ilerlemesi yönünde etki gösterirken (pro-enflamatuvar), bazıları da enflamasyonu azaltıcı etki gösterirler (anti-enflamatuvar) [14].

İmmüitenin aracıları ve düzenleyicileri olan sitokinler, özellikle yardımcı T hücre alt grupları tarafından üretilenler, edinsel immün sistemin aracılık ettiği konak savunmasına katkı sağlarlar ve immün yanıtları düzenlerler. Ayrıca T ve B hücrelerinin aktivasyon ve farklılaşmasından da sorumludurlar. Bazı sitokinler hematopoez için büyüme faktörü olup, kemik iliğindeki öncüllerden farklı tip immün hücrelerin oluşumunu düzenlemektedirler [9].

2.4.1. İnterlökin-1 β (IL-1 β)

IL-1 ailesinin bir üyesi olan IL-1 β , IL-1 α ile çok az bir dizi homojonitesi göstermelerine rağmen hücre üzerinde aynı reseptöre bağlanırlar. IL-1 β enflamasyonu kontrol eden ana stokinlerden bir tanesidir. Ana görevi, konakçının patojene karşı

verdiği cevabı düzenlemek olsada, otoimmün ve allerjik hastalıklarda önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir [32-34].

2.4.2. İnterlökin-2 (IL-2)

IL-2, beyaz kan hücrelerinin aktivitesini düzenleyen, protein yapıdaki bir sitokindir. Enfeksiyonlara karşı vücudun doğal savunmasının bir parçası olup, yabancı ile öz olanı birbirinden ayırt etmede rol alır. İyi tanımlanan ve iyi karakterize edilen ilk interlökin molekülüdür. Primer olarak aktivasyonu takiben antijen-spesifik CD4 ve CD8 T hücreleri tarafından üretilir ve IL-2 reseptörü aracılığıyla otokrin/parakrin bir proliferatif programa aracılık etmektedir [18]. IL-2, T hücrelerinin büyüme, çoğalma ve efektör T hücrelerine farklılaşmaları için gereklidir [35, 36]. T hücre reseptörüne (THR) antijen bağlanması, IL-2 salınımını ve IL-2 reseptör ekspresyonunu uyarır. IL-2 aynı zamanda regülatör T hücre olgunlaşması için timusta T hücre gelişimi boyunca da gereklidir [14, 37]. T hücre büyüme faktörü olmasının yanında IL-2, NK hücrelerinin çoğalmalarını uyarmakta ve sitotoksik aktivitelerini arttırmaktadır [38]. Ayrıca B hücreleri tarafından antikör üretimi ve çoğalmasını desteklemektedir [39, 40].

2.4.3. İnterlökin-4 (IL-4)

IL-4, naif yardımcı T hücrelerinin Th₂ hücrelerine farklılaşmalarını uyarır [14]. IL-4 tarafından aktivasyonu takiben, Th₂ hücreleri ilave IL-4 üretirler. IL-4'ün fazla üretimi, allerjiyle ilişkilidir [41, 42]. IL-4'ün pek çok biyolojik rolü vardır. Bunlardan bazıları aktive B ve T hücre çoğalmasını uyarmak, B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşmalarını sağlamak ve dendritik hücrelerin antijen sunma kapasitelerini arttırmaktır [43].

2.4.4. İnterlökin-10 (IL-10)

IL-10, insan sitokin sentez inhibitör faktörü (CSIF) olarak da bilinen bir anti-enflamatuvar sitokin olup, primer olarak monositler tarafından üretilmekte ve daha az olarak Th₂, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regülatör T hücreleri ve aktive T ve B hücrelerinin belirli bir alt grubunda üretilmektedir. IL-10 ekspresyonu, uyarılmamış dokularda minimal düzeydedir ve kommensal veya patojenik flora tarafından tetiklenmesi gerektiği bilinmektedir [44]. Viral enfeksiyona karşı immün yanıt süresince NK hücre aktivitesini inhibe etmek için T hücreleri tarafından salınan IL-10, immünregülasyon ve enflamasyonda görev almaktadır [45]. MHC sınıf-II antijenlerinin ve makrofajlar

üzerindeki ko-stimülatör moleküllerin ekspresyonunu azaltmakta ve aynı zamanda B hücre sağkalımını, çoğalmasını ve antikor üretimini arttırmaktadır. IL-10, makrofajlar ve regülatör T hücreleri gibi hücreler tarafından üretilen IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF- α ve GM-CSF gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin sentezini inhibe etme kapasitesine sahiptir [46].

2.5. Bitkisel Ürünler

Bitkiler insanlar tarafından besin kaynağı olmanın yanı sıra ilaç, tekstil, yakıt ve kimyasal bileşenlerin üretimi için çok uzun yıllardır kullanılmaktadır. Geleneksel ve tamamlayıcı tıpta kullanılan bitkiler, günlük hayatta kullanılarak nesilden nesile aktarılmıştır ve bu sayede belli bir bilgi birikimi oluşmuştur [47]. Dünyadaki farklı geleneksel tedavi sistemlerinde kullanılan tıbbi bitkilerin farmakolojik özellikleri ve biyolojik aktivitelerinin insanlık yararı için kullanılmak üzere ortaya konulması için yoğun bir çalışma yürütülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre dünya nüfusunun neredeyse %80'i temel sağlık ihtiyaçları için bitkisel ilaçlara ve/veya bitkisel ürünlere gerek duymaktadır [48].

Tıbbi bitkiler, modern ve geleneksel tıpta kullanılan ilaçların en zengin biyokaynaklarıdır. Geleneksel toplumlar tarafından kullanılan çoğu tıbbi bitkinin etkinliği bilimsel olarak kanıtlanmamış olup bu bitkilerin biyolojik aktiviteleri hakkında bilgi sağlayacak etkin biyoanalizlere ihtiyaç duyulmaktadır[49]. Etnobotanik çalışmalardan elde edilen bilgi biyolojik kaynakların korunması ve bu kaynaklardan faydalanılması için oldukça önemlidir [47]. Bununla birlikte, geleneksel tıp, bitkilerden elde edilen 1600 yeni ilacın ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu yüzden, etnomedikal bitkilere ait bilgilerin ve bilimsel analizlerin bir araya getirilmesi büyük önem taşımaktadır [50]. Temel sağlık tedavisi olarak bitkilerin bölgesel kullanımı farmakolojik özelliklerinden ileri gelmektedir. Çoğu bitki ekstresi etkinliğini metabolitlerinin varlığına borçludur. Bu metabolitler genellikle bitkilerin kök, yaprak, sürgün ve kabuk gibi çeşitli kısımlarında bulunmaktadır. Tıbbi bitkilerin peptitler, doymamış uzun zincirli yağ asitleri, aldehitler, alkaloidler, esansiyel yağlar ve fenolik bileşenler içerdiği farklı çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Bu bileşenler virüs, mantar ve bakteriler dahil insan ve hayvan patojenlerine karşı uygulanan tedavilerde oldukça etkindirler [51]. Bu nedenle, bitkilerin çoğu önemli ilaçların kaynağı haline gelmiştir. Böylece ilaç endüstrisi sentetik ilaçların hazırlanmasında kullanılabilen biyoaktif

ajanların bir kaynağı ve/veya modeli olarak geleneksel tıptan etkin bir şekilde faydalanmaktadır [52].

Dünyada reçetelendirilen ilaçların yaklaşık olarak %25'i bitkisel orijinli olup 3000'den fazla bitki türünün ise anti-kanser özelliklerinin olduğu bildirilmiştir [53]. “*Paclitaxel*”, “*vinblastine*”, “*irinotecan*”, “*topotecan*”, “*etoposide*” ve “*combretastatin*” gibi klinik öneme sahip ilaçlar bitkilerden elde edilmiştir.

Bitkiler ile yapılan immün düzenleyici biyolojik aktivite çalışmalarının, bitkisel ekstreler ile yapılan anti-kanser ve anti-oksidan gibi diğer biyolojik aktivite çalışmalarının gölgesinde kaldığı söylenebilir. Buna rağmen son yıllarda immün düzenleyici aktivite çalışmalarına rağbet hızla artmaktadır. Turunçgillerde bulunan “*auraptene*” isimli molekülün insan Th₂ ve T_{reg} hücrelerinin proliferasyonunu artırıcı yönde etkilerinin olduğu gösterilmiştir [54]. *Aloe barbadensis* metanol fraksiyonunun T hücre aktivasyonunu engellediği ve immün düzenleyici aktivite gösterdiği de rapor edilmiştir [55].

Türkiye büyük bir halk tıbbı bilgisine ve zengin bir floraya sahiptir, bu nedenle ilgili çalışmalar için potansiyel bir kaynak sunmaktadır. Bitki çeşitliği anlamında en zengin ülkelerden birisi Türkiye'dir. Sınırları dahilinde yaklaşık 10,500 tür tanımlanmış olup bunların %30'u endemiktir [47]. Bir yerin çevresel önemini ortaya konulmasında endemizm önemli bir belirleyicidir. Diğer Avrupa ülkeleriyle kıyaslandığında Türkiye'deki endemizm oranı oldukça yüksektir. Türkiye'deki geleneksel tıp çalışmaları Cumhuriyetin kuruluşundan (1923) itibaren ilerleyerek devam etmiştir[56]. Günümüzde kırsal alanlarda yaşayan insanların büyük bir çoğunluğu geleneksel olarak besin ve tedavi amaçlı bitkileri kullanmaktadır. Son yıllarda, tedavi amaçlı kullanılan bitkilerin geleneksel kullanımları Türkiye'de de araştırmacıların dikkatini çekmiştir [47].

Çalışmamızda, 3 tanesi Türkiye'ye endemik olan toplam 11 bitkiye ait bilgiler Tablo 2.1'de, bitkilerin genel görünüşleri ise Şekil 2.1-8'de verilmektedir.

Tablo 2-1: *In vitro* anti-proliferatif aktiviteleri değerlendirilen bitkiler

Kod	Tür	Bölgesel isimlendirme	Familiya	Bitkinin Kullanılan Kısmı	ISTE no
F1	<i>Centaurea antiochia</i>	Sultan Dikeni (Endemik)	Colchicaceae	Toprak üstü kısımları	48868
F2	<i>Cotinus coggygria</i>	Boyacı sumacı	Anacardiaceae	Yapraklar	80926
F3	<i>Crataegus microphylla</i>	Alıç, Akdiken	Rosaceae	Yapraklar	76223
F4	<i>Olea europaea</i>	Zeytin	Oleaceae	Yapraklar	106286
F5	<i>Rosa damascena</i>	Isparta gülü	Rosaceae	Çiçekler	106285
F6	<i>Stachys cretica</i>	Dik deli çay	Lamiaceae	Toprak üstü kısımları	98166
F7	<i>Teucrium sandrasicum</i>	Ülper (Endemik)	Lamiaceae	Toprak üstü kısımları	87526
F8	<i>Thymus praecox</i>	Dağ Kekigi	Lamiaceae	Toprak üstü kısımları	40192
F9	<i>Thymus pseudopulegioides</i>	Kekik	Lamiaceae	Toprak üstü kısımları	40210
F10	<i>Thymus sipyleus</i>	Kekik (Endemik)	Lamiaceae	Toprak üstü kısımları	-
F11	<i>Oryganum vulgare</i>	Kuş zemulu	Lamiaceae	Toprak üstü kısımları	86060

2.5.1. *Centaurea antiochia*

Centaurea genusu Türkiye’de en yaygın olarak bulunan genulardan bir tanesidir [57]. Yabani tür olarak yetişen 205 taksonu bulunmaktadır [58, 59]. *Centaurea* genusu flavonoid, terpen ve laktonlar açısından oldukça zengin bir içeriğe sahiptir. Geleneksel halk tıbbında bu genusa ait bitkiler yüksek ateşin tedavisinde, karaciğer ve böbrek hastalıklarının tedavisinde, anti-diyabetik olarak kullanılmaktadır [56, 60].

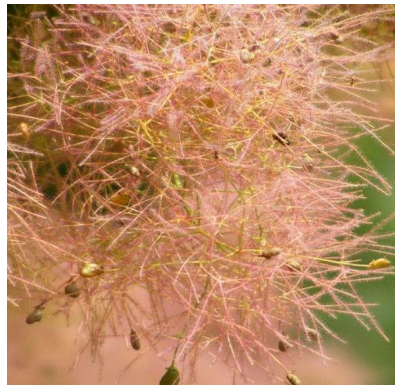
Centaurea antiochia türü Türkiye’ye endemik bitki olup [61, 62] (Kültür, 2010; Bona, 2013) Peygamber çiçeği olarak isimlendirilmektedirler. Bu endemik türün anti-oksidan, anti-bakteriyel ve anti-kanser aktivitesi yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [63-65]. İmmünolojik etkileri ile ilgili bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.



Şekil 2-1: *Centaurea antiochia* türüne ait çiçek görüntüsü [66]

2.5.2. *Cotinus coggygia*

Cotinus coggygia Scop. (sumak) Güney ve Güney Batı Avrupa’da doğal olarak yetişen bir bitkidir. Anti-inflamatuvar, anti-septik ve kanama durdurucu özellikleri sebebi ile halk tıbbında kullanılmaktadır. Genellikle ishal tedavisinde, yara iyileştirici ve çeşitli cilt rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. *Cotinus coggygia*, monoterpen, yüksek miktarda tanin, gallik asit, metil galat, pentagaloil glukoz ve flavonoit, mirisetin, kersetin ve kaempiferol içermektedir. Anti-oksidan, sitotoksik [67] yara iyileştirici, anti-inflamatuvar ve anti-mikrobiyal etkileri yapılan biyolojik aktivite çalışmaları ile de ortaya konulmuştur [68]. T ve NK proliferasyonu ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.



Şekil 2-2: *Cotinus coggygia* türüne ait çiçek görüntüsü [69]

2.5.3. *Crataegus microphylla*

Crataegus cinsi Kuzey Amerika, Kuzey Afrika, Asya’nın doğusu ve batısı, Orta Asya ve Avrupa’yı içine alan ılıman bölgelerin kuzeyinde ve Hindistan, Çin gibi ülkelerde doğal olarak yetişmekte ve Alıç olarak isimlendirilmektedir [70, 71]. Halk tıbbında çok eski zamanlardan beri kullanıldığı bilinmektedir. Özellikle kalp

rahatsızlıklarının tedavisindeki kullanımı 1800'lere kadar gitmekte olup, çok sayıda laboratuvar ve klinik testler ile Alıç'ın kardiyovasküler hastalıkların tedavisindeki etkisi ortaya konulmuştur. Aynı zamanda sahip olduğu oligomerik prosiyanitler, flavonoitler, triterpenler, polisakkaritler, katekolaminler gibi fitokimyasallar değerlendirilerek sitotoksik, anti-HIV, anti-inflamatuvar ve anti-mikrobiyal aktivitelerini de gösterdiği farklı çalışmalarla ortaya konulmuştur [71]. Günümüzde ise kanser, diyabet ve iktidarsızlık için terapötik ajan olarak kullanımına ek olarak genelde kardiyovasküler hastalık tedavisinde, Türkiye'de ise halk tıbbında bu bitkinin farklı kısımları kullanılarak öksürük, grip, astım, mide ağrıları, romatizmal ağrılar, hemoroid ve kalp rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılmaktadır [72] Türkiye'de yetişen farklı alıç bitkileri ile yapılan biyolojik aktivite ve kimyasal bileşen analizi çalışmaları son yıllarda bu cinse olan ilginin artmasına yol açmıştır [72]. Ancak, çalışmamızda kullandığımız *Crataegus microphylla* türü ile ilgili herhangi bir biyolojik aktivite ve kimyasal bileşen analizi çalışması yapılmamış olup bu türden 7 farklı flavonoit izole edilip tanımlanmıştır [73].

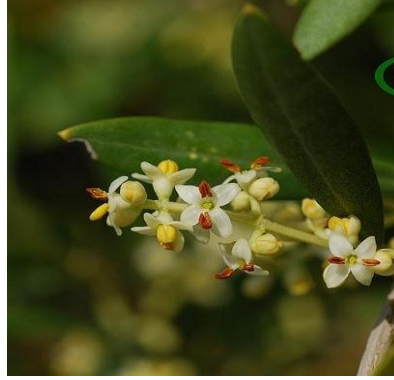


Şekil 2-3: *Crataegus microphylla* türüne ait çiçek görüntüsü [74]

2.5.4. *Olea europaea*

Olea europaea Akdeniz havzasında doğal olarak yetişen ve antik çağdan bu yana tedavi edici özellikleri iyi bilinen bir bitkidir [75, 76]. Zeytin bitkisinin meyveleri anti-oksidan, anti-kanserojen, anti-inflamatuvar, anti-mikrobiyal, kardiyotonik gibi biyolojik aktiviteleri gösteren oldukça fazla hidrofilik (fenolik asitler, fenolik alkoller, flavonoitler ve sekoirdoitler) ve lipofilik (kresoller) bileşenlere sahiptir [75]. Zeytinin meyve ve yapraklarında bulunan maslinik asit anti-tümoral, anti-diyabetik, anti-oksidan ve anti-HIV aktiviteleri yapılan fitokimyasal çalışmalarla ortaya konulmuştur [77]. Zeytin bitkisinin yapraklarında oldukça fazla bulunan oleuropein isimli fenolik bileşenin

lipit metabolizmasını ve obezite ile ilgili problemleri iyileştirdiği, anti-tümör ajan olarak davrandığı ve anti-HIV aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [78]. T ve NK çoğalması üzerine yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır.



Şekil 2-4: *Olea europaea* türüne ait çiçek görüntüsü [79]

2.5.5. *Rosa damascena*

Rosa damascena gül yağı üretimi için yüzyıllardır yetiştirilmektedir [80]. Monoterpen alkoller ve hidrokarbonlar gibi sekonder metabolitler izole edilmiştir. Halk tıbbında analjezik, anti-depresan, anti-inflamatuvar, diüretik ve kozmetik olarak kullanılmaktadır. Ayrıca *Rosa damascena* Miller (Isparta gülü) türünün anti-bakteriyel aktiviteye sahip olduğu ortaya konulmuştur [81]. Dünyada gül yağı parfüm, krem, sabun, losyon ve diğer kozmetik ürünlerin esans bileşeni olarak kullanılmakta olup gül suyu ise yiyecekler ve içecekler için aroma verici olarak kullanılmaktadır. Gül yağı ve gül suyu üreticilerinin başında Bulgaristan, Türkiye ve İran olup Kuzey Afrika, Hindistan ve Çin'de de az da olsa gül suyu üretilmektedir [80].



Şekil 2-5: *Rosa damascena* türüne ait çiçek görüntüsü [82]

2.5.6. *Stachys cretica*

Stachys cinsi en çok Akdeniz, Güney-batı Asya, Kuzey ve Güney Amerika ve Güney Afrika'da doğal olarak yetişmektedir. Ancak, Yeni Zelanda ve Avustralya'da doğal olarak yetişmemektedir. Akdeniz bölgesinde ve İran'da bitkisel ilaç ve dağ çayı olarak kullanılmaktadır [83]. Halk tıbbında dezenfektan, anti-spazmodik, balgam sökücü, öksürük kesici, genital tümörün gelişmesini ve ülser kanserini önleyici olarak kullanılmaktadır. Bazı çalışmalarla sitotoksik, anti-inflamatuvar ve anti-oksidan aktiviteleri ortaya konulmuştur. Bu cinse ait türlerin sahip olduğu ana sekonder metabolitler olarak flavonoidler, iridoitler, yağ asitleri ve fenolik asitler bulunmuştur [84]. *Stachys cretica* türü ile yapılan T ve NK hücreleri üzerine çalışma bulunmamaktadır.



Şekil 2-6: *Stachys cretica* türüne ait çiçek görüntüsü [85]

2.5.7. *Teucrium sandrasicum*

Teucrium cinsi özellikle Akdeniz'de ve ılıman bölgelerde doğal olarak yetişmektedir. Tıbbi bitki olarak 2000 yıldır kullanılmakta olup, *Teucrium* cinsine ait bazı türler halen halk tıbbında anti-septik, idrar söktürücü, diyabetik, ateş düşürücü, anti-spazmodik olarak ve kronik bronşit, astım, gut ve mide rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Bunun yanında hipoglisemik, hipolipidemik, hepatoprotektif, ateş düşürücü, anti-inflamatuvar, anti-ülser, anti-tümör, anti-oksidan, anti-fungal ve antibakteriyel aktivitelerine de sahiptir [86, 87]. Yemek sektöründe ise gıdaların bozulmasına sebep olan mikropların üremesini önlemek amaçlı olarak da kullanılmaktadır. İçerdikleri esansiyel yağlar oldukça çeşitli olup bu cinse ait üyeler en zengin diterpen içeren bitkilerden olup 220'den fazla diterpene sahiptirler [87]. *Teucrium sandrasicum* O. Schwarz türü Türkiye'de endemik olarak yetişen ve Ülper

olarak adlandırılan bir bitkidir [88]. Bu tür ile ilgili herhangi bir biyolojik aktivite ve kimyasal bileşen analizi çalışması henüz literatürde bulunmamaktadır.



Şekil 2-7: *Teucrium sandrasicum* türüne ait çiçek görüntüsü [89]

2.5.8. *Thymus* Cinsler

Thymus, Labiatae ailesine ait bir cinstir. Türkiye’de 39 tür ile temsil edilir[90]. *Thymus* türleri halk arasında soğuk algınlığı, grip, bronşit ve mide hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır [91]. *Thymus spathulifolius* türünün metanol metanol fraksiyonunun polar (su) ve non polar (kloroform) alt fraksiyonlarında orta derecede anti-bakteriyel aktivite saptanmıştır [92] *Thymus eigii* türünün non-polar ve polar fraksiyonlarının ise sırasıyla orta ve düşük derecelerde anti-mikrobiyel aktivite gösterdiği belirtilmiştir [93]. *Thymus vulgaris*’in metanol metanol fraksiyonunun çoğu patojene karşı anti-bakteriyel aktivite gösterdiğini ve bunun ekstre içeriğindeki fenolik bileşiklerden kaynaklanabileceğini bildirmiştir [94]. *Thymus praecox*, *Thymus pseudopulegioides*, *Thymus sipyleus* cinsleri ile T ve NK proliferasyonu ile ilişkili bir çalışma bulunmamaktadır.



Şekil 2-8: *Thymus praecox* türüne ait çiçek görüntüsü [95]



Şekil 2-9: *Thymus pseudopulegioides* türüne ait çiçek görüntüsü [96]



Şekil 2-10: *Thymus sipyleus* türüne ait çiçek görüntüsü [97]

2.5.9. *Origanum vulgare*

Origanum cinsi Labiatae familyasında yer alır. Türkiye’de 23 türü bulunmaktadır [58]. Fenolik bileşikler içeren *Origanum* türleri halk arasında da ekspektoran ve gaz giderici olarak ayrıca boğmaca, öksürük ve sindirim hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır [98]. *Origanum vulgare* metanol metanol fraksiyonunun bazı bakterilere ve cilt mantarlarına karşı anti-mikrobiyel etki gösterdiği saptanmıştır [99]. İmmünolojik etkileri ile ilgili çalışmalar olmasına rağmen T ve NK hücre proliferasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar bulunmamaktadır.



Şekil 2-11: *Origanum vulgare* bitkisinin çiçeklerine ait görüntü [100]

Bu çalışmada, 3 tanesi Türkiye'ye endemik olan toplam 11 bitki metanol fraksiyonunun uyarılmış periferik kan mononükleer hücreler içinde sitotoksik T hücreleri, yardımcı T hücreleri ve NK hücreleri üzerindeki etkilerini; mitokondriyal dehidrogenaz aktivite testi (MTT: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-II)-2,5-difenil tetrazolyum bromür), hücre çoğalmasını takip eden karboksi flöresein sukkinimidil ester (CFSE) boyama yöntemi, floresan işaretli antikolar ile boyama yöntemi ve IL-1 β , IL-2, IL-4 ve IL-10 genlerinin anlatım düzeyleri kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) ile saptayarak bitkilerin anti-enflamatuvar potansiyellerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgular

Çalışmanın yapılması için gereken, Etik Kurul İzni İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 19.06.2017 tarihinde 232803 sayılı belge ile alınmıştır. Herhangi bir kronik hastalığı bulunmayan, düzenli ilaç kullanımı olmayan ve yaş ve cinsiyetleri bakımından uyumlu sağlıklı bireyler çalışmaya dahil edilmiş, bireylere çalışmayla ilgili bilgi verilmesinin ardından “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur” formları imzalatılmıştır.

3.2. Kullanılan Kimyasal Malzemelerin Hazırlanması

3.2.1. Zenginleştirilmiş RPMI-1640 (Complete Roswell Park Memorial Institute 1640) Hazırlanması

435 mL sıvı RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) besiyerinin üzerine 50 mL serum, 2,5 mL penesilin stoptemisin karışımı, 2,5 mL gentamisin, 2,5 mL MEM vitamin, 2,5 mL non-essential amino asit ve 5 mL L-glutamin eklendi ve komple RPMI (cRPMI) besiyeri hazırlandı. 100 mL distile su içinde iyice çözününceye kadar karıştırıldı ve +4°C’de saklandı.

3.2.2. Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (DPBS) Hazırlanması

Toz halindeki DPBS (9.55 g) 1 L distile suda çözüldü. 121°C’de 1.2 bar basınç altında 15 dakika otoklavlanarak steril edildi.

3.2.3. MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-II)-2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür) Hazırlanması

Mililitrede 5 mg olacak şekilde 200 mL hazırlamak için, 1 g MTT, 200 mL DPBS’de ultrasonik su banyosu yardımıyla çözdürüldü. 0.22 µm’lik filtreden geçirilerek steril edildi. 15 mL’lik santrifüj tüplerine bölündü ve alüminyum folyo ile sarılıp -20°C’de saklandı.

3.2.4. CFDA, SE (Karboksi Flöresein Diasetat Sukkinimidil Ester) Hazırlanması

Bir flakon CFDA, üzerine firmanın talimatları doğrultusunda, 5 mM stok konsantrasyon hazırlamak için 18 µL steril dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi. Nazikçe pipetaj işlemi yapıldı ve +4°C’de saklandı.

3.3. Bitkilerin Eldesi Ve Fraksiyonların Hazırlanması

Tezde kullanılan bitkilerin toplanması, metanolik fraksiyonlarının hazırlanması İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı ve İ.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde gerçekleştirilmiş olup, ekstreler Doç. Dr. Çağlayan GÜNER tarafından temin edildi.

Kurutulmuş bitki materyalleri, oda sıcaklığında metanol (% 95) ile perkole edildi. Metanol ekstreleri 40 ile 50°C'de kuruyana kadar döner evaporatörde bekletildi. Daha sonra metanol ekstreleri 72 saat -80°C'de bekletilip donduruldu ve bu süre sonunda liyofilizasyon ile çözücü olan metanol uçurularak kuru ekstreler haline getirildi. Toplam ekstre miktarları hassas terazide tartılarak belirlendi ve her biri ayrı bir deney tüpüne aktarılıp karanlıkta +4°C'de muhafaza edildi.

Tüm fraksiyonların stok konsantrasyonları 2 mg/mL olacak şekilde vorteks ve ultrasonikatör ile su içinde tam olarak çözümleri sağlandı. Ana stoklar 0.45 µm çapındaki filtrelerden geçirilerek steril hale getirildi. Hazırlanan ekstre ana stokları (2 mg/mL) cRPMI besiyerleri ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda hazırlandı ve kültür ortamına aktarıldı.

3.4. Periferik Kan Örneklerinin Eldesi

Her bir bireyden 5 mL heparinize periferik kan örneği alındı. Kan toplama işlemi proje başlangıcından yeterli örnek sayısına ulaşıncaya kadar devam edildi. Uygulanacak bütün işlemler kan alma işlemini takiben 2-4 saat aralığında yapıldı.

3.5. Periferik Kan Mononükleer Hücrelerin Eldesi

Beş mL insan kanı, 20 U/mL heparin ihtiva eden steril 10 mL'lik bir tüpe toplandı. Heparinize kan örneğinin tamamı 1:1 oranında DPBS ile toplam hacim 10 mL olacak şekilde seyreltildi.

5 mL Ficoll-Paque Plus (oda sıcaklığında) başka bir steril 15 ml'e tüpe konuldu ve 10 ml seyreltilmiş hücre süspansiyonu, iki sıvı arasındaki ara yüzü bozmadan dikkatli bir şekilde 5 mL Ficoll-Paque Plus'ın üzerine eklendi.

Karışım 20-25 dakika boyunca 2000 devir / dakikada santrifüje tabi tutuldu.

Ara yüzde ince beyaz bir tabaka oluşturan mononükleer hücreler steril bir Pasteur pipeti kullanarak yeni bir 15 mL'lik tüpe aktarıldı. Hücrelerin plazma ve ayırma ortamı karışımı ile birlikte alınmamasına gayret edildi.

Eritrosit kontaminasyonunu engellemek için PKMH üzerine Amonyum klorür eklendi ve 5 dakika beklendi. DPBS eklenerek nazik bir şekilde hücreler pipetajlandı ve yıkandı. PKMH 1800 devir/dakika'da santrifüjlenerek hücreler çöktürüldü ve üst faz atılarak pelletin üzerine, 2-3 mL cRPMI ile süspansiyon edildi.

PKMH'ler kan sayım cihazı ile sayılarak ve uygun konsantrasyonda ayarlandı.

3.6. MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-II)-2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür) Yöntemi ile Hücre Çoğalmasının Belirlenmesi

Tez kapsamında kullanılan bitkisel fraksiyonların PKMH çoğalması üzerindeki etkilerini belirlemek için kolorimetrik bir yöntem olan MTT yöntemi kullanıldı.

MTT kolorimetrik yöntemi, hücrelerin sarı MTT'yi mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesi ile suda çözünmeyen koyu kahverengi formazan kristalleri şekline çevirmesi ve bu kristallerin de DMSO ile çözündürülerek hücre sayısı ile doğru orantılı olarak oluşan rengin spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda ölçümü temeline dayanır [101, 102].

Bu doğrultuda, 96 kuyucuklu kültür kaplarına 1000000 hücre/mL'lik %5 fitohemoglutinin (PHA) içeren hücre stoğundan 100 µL/kuyu olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. 24 saat süreyle karbondioksitli etüvde inkübe edildi. İnkübasyon periyodundan sonra ortamdan besiyerleri uzaklaştırılmadan kuyulara değişik konsantrasyonlarda ekstre içeren ve içermeyen (kontrol) besiyerleri 100 µL olarak eklendi. Kültür kaplarının etüvde 48 saatlik inkübasyonundan sonra, kültür kapları 20 dakika 300 g'de santrifüj edildi. Besiyerleri uzaklaştırıldı ve kuyulara (20 µL/kuyu) MTT eklendi ve 3 saat etüvde inkübe edildi. İnkübasyon periyodunun sonunda her kuyuya 150 µL DMSO eklendi ve kültür kapları 30 dakika oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için karıştırıldı. Daha sonra oluşan renk 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü. Absorbsiyon değerlerinden kontrole göre karşılaştırılarak % cinsinden hücrelerin canlılık ve inhibisyon değerleri aşağıdaki formüllere göre hesaplanarak belirlendi (Denklem 3.1 ve 3.2).

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{Örnek absorbansı} / \text{Kontrol absorbansı}) \times 100 \quad (3-1)$$

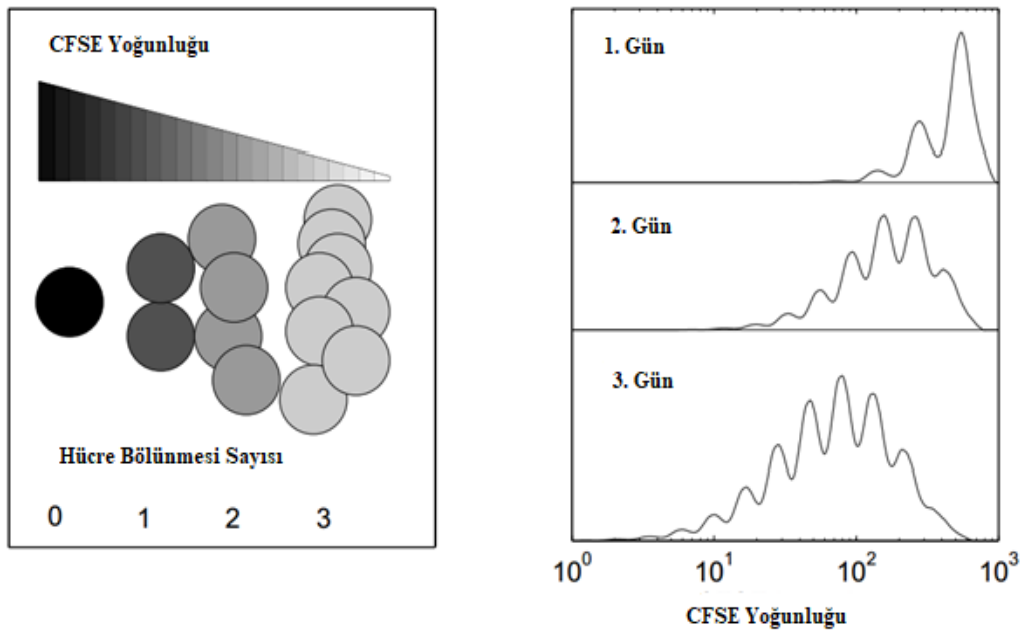
$$\% \text{ İnhibisyon} = (1 - (\text{Örnek absorbansı} / \text{Kontrol absorbansı})) \times 100 \quad (3-2)$$

Fraksiyonların PKMH hücreleri üzerindeki etkilerini ortaya koymak için hesaplanan % inhibisyon değerleri ile çizilen grafiklerden IC₅₀ değerleri belirlendi.

3.7. PKMH Proliferasyonunun CFSE Yöntemiyle Belirlenmesi

CFSE yöntemi, hücre bölünmesinin takibi için kullanılan floresan bir yöntemdir. Karboksi Flöresein Diasetat Sukkinimidil Ester (CFDA, SE) hücre içine girmeden önce floresan olmayan bir boyadır. Hücre içine girdikten sonra, hücre içi esterazlar tarafından asetat grupları kesilir bunun sonucunda karboksi flöresein molekülünün membran geçirgenliği engellenir ve floresan özellik kazanır. Sukkinimidil ester grubu ise hücre içi serbest amin gruplarına bağlanır ve her bir mitoz bölünmede sonraki nesillere miktarı azalarak aktarılan CFSE halini alır [103, 104].

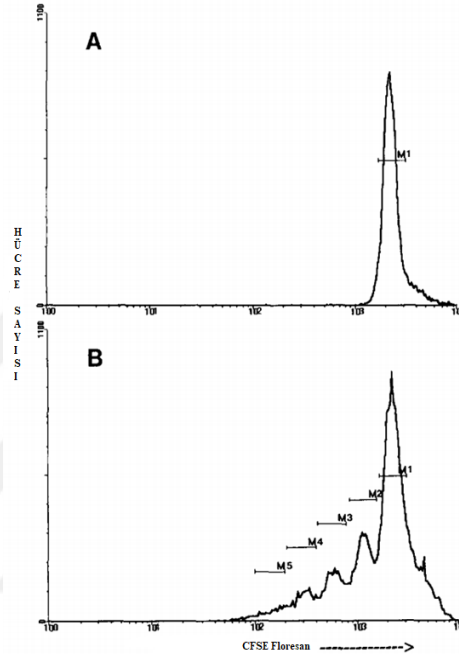
Bu hücre içindeki azalma, hücre başına düşen emisyon miktarının da azalmasına yol açarak akan hücre ölçer cihazında analiz edilir [105, 106].



Şekil 3-1: CFSE yoğunluğu ve bölünme sayısı ilişkisini gösteren grafik ve histogram [107]

Hücre bölünmesini takip etme amacıyla, izole edilen PKMH'ler 1 mL besiyeri ile süspansiyon edildi. Bu hücre süspansiyonunun içerisine, CFDA, SE 1 µL karanlık ortamda eklendi ve nazikçe pipetaj yapılarak hücre süspansiyonu karıştırıldı. 6 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra, fazla boyayı uzaklaştırmak için 5 mL serumlu besiyeri eklenerek nazikçe pipetaj yapıldı. 1800 devir/dakikada santrifüj yapıldı ve üst faz atıldı. Besiyeri ile yıkama işlemi 2 kez tekrarlandı. İkinci santrifüjden sonra hücreler uyarımlı grup için %5 PHA içeren, uyarımsız grup için PHA içermeyen besiyeri ile süspansiyon edildi ve 1000000 hücre/mL olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı ve 24 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına bu hücre süspansiyonundan kuyu

başına 500 µL ekildi. Hücreler 24 saat süreyle karbondioksitli etüvde inkübe edildi ve 24 saat sonunda, hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmadan değişik konsantrasyonlarda bitki fraksiyonlarını içeren ve içermeyen 500 µL taze besi yeri eklendi ve karbondioksitli etüvde 48 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler, eksitasyon/emisyon dalgaboyu 495 nm / 517 nm olacak şekilde BD FACSCalibur ile ölçüldü. Elde edilen veriler FlowJo programı ile analiz edildi.



Şekil 3-2: Hücre bölünmeleri ile CFSE miktarındaki azalmayı gösteren histogram A) Uyarılmamış splenosit kültürü B) anti-CD3 ile uyarılmış splenosit kültüründe meydana gelen değişim [103]

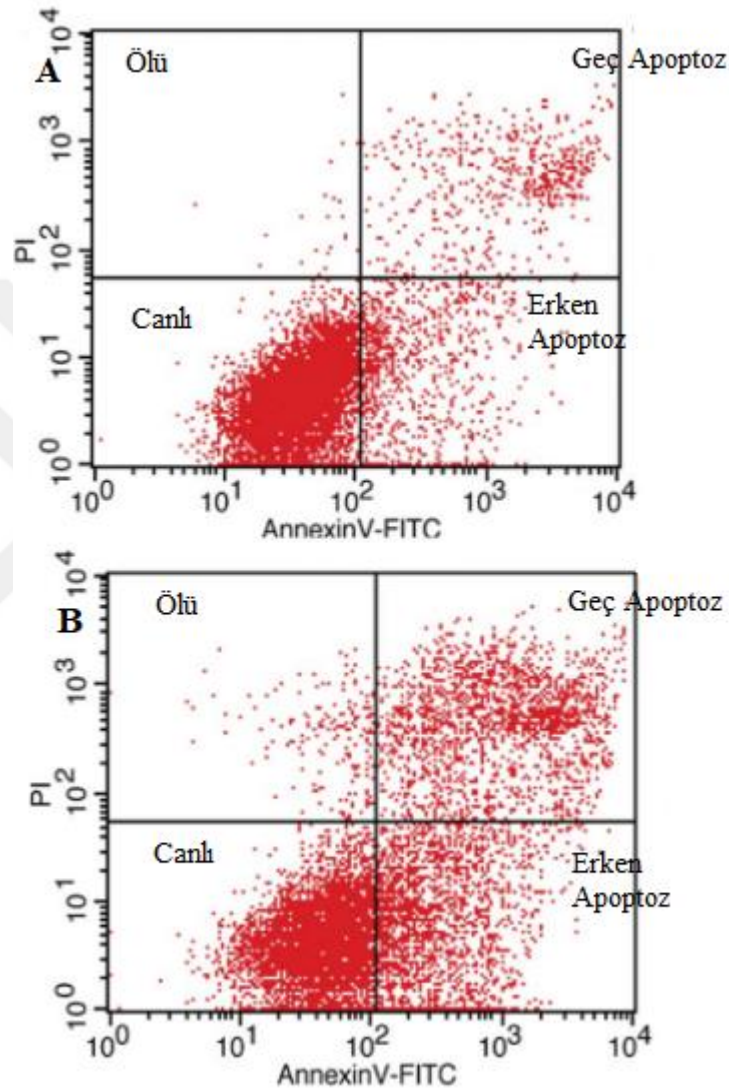
Analizler sonucunda, denklem 3-3'e göre uyarılma indeksi(Stimulation index= SI) hesaplandı.

$$SI = \frac{\text{Deney Gruplarının Proliferasyon Değeri}}{\text{PHA Uyarımlı Grup Proliferasyon Değeri}} \quad 3-3$$

3.8. Annexin V-Propidium İyodür (PI) Boyama ile Apoptozun Belirlenmesi

Apoptozun belirlenmesi amacıyla Annexin V-Propidium iyodür boyama en yaygın kullanılan yöntemlerden bir tanesidir. Annexin V proteini, hücre membranında bulunan fosfotidil serine bağlanan bir proteindir. Fosfotidil serin, normal fizyolojik şartlarda membran da asimetrik dağılım gösterir ve membranın sitozolik kısmında yer alır. Erken apoptozda ise, membran geçirgenliği bozulmadan, fosfotidil serin dağılımı bozulur. Annexin V, membranın dış yüzüne çıkan fosfotidil serine bağlanır ve erken

apoptozun belirlenmesi için kullanılabilir. Geç apoptoz ve nekroz durumlarında ise membran bütünlüğü bozulur ve Propidium İyodür'de (PI) hücre membranından içeri girerek çift zincirli DNA'ya bağlanır. Floresan boyalı annexin V ve PI birlikte kullanılarak yapılan ikili boyamalarda, hücre ölüm yolları akan hücre ölçeı kullanılarak kolayca belirlenebilir.



Şekil 3-3: Annexin V ve PI boyama ile Apoptozun belirlenmesi [108].

A: Canlı hücre grubu, B: Apoptotik hücre grubu

Apoptozu belirlemek amacıyla, PKMH'ler %5 PHA içeren c-RPMI besiyeri ile 1 000000 hücre/mL olacak şekilde süspansiyon edildi. Kırk sekiz kuyucuklu hücre kültür kaplarına bu süspansiyondan 500 µL eklendi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon periyodundan sonra kuyucuklara, değişen konsantrasyonlarda ekstre içeren ve ekstre içermeyen 500 µL besi yeri eklendi ve 72 saat daha inkübe edildi. İnkübasyon

sonunda, kuyucuklarda ki besi yerleri pipetaj yapılarak çekildi. 1800 devir/dakikada 5 dk santrifüj yapıldı. Üst faz atıldı, hücreler soğuk DPBS ile süspanse edildi. Tekrar santrifüj işlemi yapıldı, üst faz atıldı ve hücrelerin üzerine Annexin V bağlama solüsyonu eklendi. Hücre süspanسیونundan 100 µL alındı ve 5 µL Annexin V-FITC ve PI eklendi. On beş dakika oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra tekrar santrifüj yapıldı ve hücreler 100 µL bağlama solüsyonu ile süspanse edildi. BD FACSCalibur kullanılarak okuma işlemi gerçekleştirildi ve FlowJo ile analiz işlemi yapıldı.

3.9. Fraksiyonların T ve NK Hücrelerinin Proliferasyonları Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

T ve NK hücre proliferasyonunun belirlenmesi amacıyla PKMH'ler öncelikle Bölüm 3.1.2'de anlatıldığı şekilde CFSE ile boyandı. Doksan altıncı saat sonunda PKMH'ler 48 kuyucuklu hücre kültür kaplarından, pipetaj işlemiyle akan hücre ölçer tüplerine aktarıldı, 1800 devir/dakikada santrifüj yapıldı ve üst faz döküldü. Hücreler, 1 kez DPBS ile yıkandı ve 200 µL akan hücre ölçer sıvısı ile süspanse edildi. Floresan işaretli antikorlar eklendi, hücreler nazikçe vortekslendi ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Kullanılan anikörlara ait bilgiler Tablo 3.1'de verilmiştir. İnkübasyondan sonra tekrar santrifüj yapıldı ve üst faz uzaklaştırıldı. Üzerine tekrar 200 µL akan hücre ölçer sıvısı eklendi. Vorteks işleminden sonra BD FACSAria II ile ölçüm yapıldı. Analiz için, FlowJo v7.00 programı kullanıldı.

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan antikorlara ait bilgiler

Antikor	İşaret	Marka	Hacim (µL)
Anti-human CD3	PerCP	BioLegend, San Diego, CA	2,5
Anti-human CD4	PE/Cy7	BioLegend, San Diego, CA	2,5
Anti-human CD8	APC	BioLegend, San Diego, CA	2,5
Anti-human CD56	PE	BioLegend, San Diego, CA	2,5

3.10. Rna İzolasyonu ve Kontrolü

3.10.1. RNA İzolasyonu

PKMH'lerden total RNA izolasyonu yapılmasında sırasıyla şu işlemler uygulandı. RNA izolasyonunda oluşabilecek RNaz kontaminasyonunu engellemek için izolasyonda kullanılacak pipet uçları, mikro tüpler gibi plastik ve diğer malzemeler iki kez otoklavlanarak steril hale getirildi. RNA izolasyonu "Genemark Total RNA İzolasyon Kit" kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde yapıldı.

RNA izolasyonu amacıyla 1000000 hücre/mL olacak şekilde PKMH'ler %5 PHA içeren besiyeri ile süspansiyon edildi. Altı kuyucuklu hücre kültürü kaplarına, kuyu başına 2 mL olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon periyodundan sonra, 2 mL çeşitli konsantrasyonlarda ekstre içeren ve içermeyen besiyeri her bir kuyucuga eklendi ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler pipetaj yapılarak 15 mL'lik santrifüj tüplerine alındı, 1800 devir/dakikada 5 dakika santrifüj yapıldı ve üst faz uzaklaştırıldı.

Kit içeriğindeki total RNA lizis solüsyonuna 10 µL/mL olacak şekilde β-merkaptoetanol (AppliChem, A1108) eklendi ve çöktürülmüş PKMH'lerin üzerine 4000000 hücre başına 350 µL lizis solüsyonundan (Lysis solution for total RNA kit) konuldu. 1 mL'lik insülin şırıngası ile santrifüj tüplerinden örnekler toplandı ve mikro santrifüj tüplerine alındı. İnsülin şırıngası ile pipetaj işlemi yapıldıktan hücrelerin parçalanması sağlandı. Lizatın üzerine 350 µL %70'lik soğuk etanol eklendi ve pipetaj yapıldı. Karışım, "Filtration Column" tüpüne aktarıldı ve 14000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi (Sigma 3-30K). Santrifüj sonrası tüpte bulunan kolon çıkarıldı ve altta kalan sıvıya %70'lik etanolden (EtOH) 1 mL eklendi ve karıştırıldı. Bu karışım "Nucleic Acid Binding Column" tüpüne yüklendi ve 14000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi. Tüpte bulunan filtreli kolona 250 µL kit içeriğindeki yıkama solüsyonu I (Wash Solution I) eklendi ve ardından 14000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Tüpte bulunan filtreli kolon yeni bir tüpe alındı ve kolona "Wash Solution II Concentrate" solüsyonundan 500 µL aktararak 14000 rpm hızda 1 dakika santrifüjlendi. Bu son işlem bir kez daha tekrar edildi. Filtreli kolon en son olarak yeni bir steril 1.5 mL'lik santrifüj tüpüne yerleştirildi ve üzerine kitin elüsyon solüsyonundan (Elution solution) 20 µL eklendi. Daha sonra 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 14000 rpm hızda 1 dakika santrifüjlendi. 1.5 mL'lik tüpte bulunan filtreli kolon atıldı ve alttan sıvıya geçen

RNA çözeltilisi, miktar ve saflık ölçümünü takiben elektroforetik analiz yapıldıktan sonra kullanılmaya kadar -80°C 'da saklandı.

3.10.2. İzole Edilen RNA'ların Konsantrasyon, Saflık Kontrolü

İzole edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflıklarının kontrolü spektrofotometrede (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbansları ölçülerek yapıldı. Konsantrasyon tayini için 260 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değeri (Denklem 3.1) yerine konularak hesaplama yapıldı. Saflık kontrolünde ise A260/A280 oranı kullanıldı. A260/A280 oranı 1.8-2.0 olan RNA'lar saf olarak kabul edildi.

$$\text{RNA } (\mu\text{g/mL}) = \text{A260} \times \text{sulandırım kat sayısı} \times 40 \quad (3-4)$$

3.10.3. cDNA Sentezi

PKMH'lerden elde edilen total RNA'lardan cDNA kütüphanesi oluşturmak için ticari bir kit olan "High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, 4368814)" kullanıldı ve prosedür üretici firmanın önerdiği şekilde uygulandı. Total RNA konsantrasyonu $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ olacak şekilde sulandırıldı ve reaksiyon $2 \mu\text{g}$ total RNA ile başlatıldı. cDNA sentezi sırasında kit içeriğinde yer alan RT Random Primer'ler kullanıldı. cDNA sentezinde kullanılan bileşenler Tablo 3.1'de ve reaksiyon koşulları Tablo 3.2'de verildi. cDNA analizi için Bölüm 3.4.2'de anlatılan spektrofotometrik ölçüm ve analiz yapıldı.

Tablo 3-2: Total RNA'dan cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	Hacim (μL)
RT Tamponu	10X	1X	2 μL
dNTP Mix	100 mM	4 mM	0.8 μL
RT Random Primer'leri	10X	1X	2 μL
MultiScribe™ Ters Transkriptaz	50 U/ μL	50 U	1 μL
RNA	2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	100 ng/ μL	2 μL
dH ₂ O	-	-	12.2 μL
TOPLAM HACİM			→ 20 μL

Tablo 3-3: Total RNA'dan cDNA sentezi için reaksiyon koşulları

	1. Basamak	2. Basamak	3. Basamak
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C
Süre	10 dakika	120 dakika	5 dakika

3.11. Primerlerin Tasarlanması ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR) ile Gen Anlatım Düzeylerinin Belirlenmesi

3.11.1. Primerlerin Tasarlanması

Gen anlatımı düzeylerini belirlemek amacıyla IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10ve β -aktin genlerinin primerleri IDT OligoAnalizer 3.1 ve NCBI Primer Blast Tool programları ile tasarlandı. Primerler 100 μ M olacak şekilde, 2 kez otoklavlanmış ultra saf su ile sulandırıldı ve ana stok olarak saklandı. Reaksiyonlarda kullanılacak primerler bu ana stoktan 10 μ M olacak şekilde dilue edildi. Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (qPZR) geçmeden önce, primerler ile klasik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yapıldı ve oluşan ürünlerin %1'lik agaroz jelde tek bant görünümünde olduğu kontrol edildi. Tasarlanan primerlere ait bilgiler Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3-4: Genlerin qPZR ile çoğaltımı için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları

Primerin Kısa Gösterimi	G+C Oranı (%)	Primerin Dizisi
Act-F	52,9	5' CTGGAGAAGAGCTACGA 3'
Act-R	47,1	5' AGGTAGTTTCGTGGATG 3'
IL-1F	47,1	5' AGCTGGAGAGTG TAGAT 3'
IL-1R	47,1	5' TTTCTGCTTGAGAGGTG 3'
IL-2F	52,9	5' CCCAGGGACTTAATCAG 3'
IL-2R	47,1	5' CTACAATGGTTGCTGTC 3'
IL-4F	47,1	5' GCTTGAATTCCTGTCCT 3'
IL-4R	42,1	5' CTCTCTCATGATCGTCTTT 3'
IL-10F	47,1	5' CAAGCTGAGAACCAAGA 3'
IL-10R	47,1	5' AAGGCATTCTTCACCTG 3'

3.11.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR) ile Gen Anlatım Düzeylerinin Belirlenmesi

Kantitatif gerçek zamanlı PZR teknolojisi, gen anlatımın belirlenmesi için kullanılan, uygulaması kolay, hassasiyet yüksek ve düşük maliyetli bir yöntemdir. qPZR yönteminde reaksiyona ve analize harcanan zaman klasik PZR yöntemlerine göre daha kısadır. Temel olarak amplifikasyonun ürünlerini aynı zamanda sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek ve devam eden PCR reaksiyonunu ekranda izleyerek reaksiyonun gidişini ölçmeye dayanmaktadır. Bu amaçla, floresans bazı boya ya da probalar ile oluşan floresansı saptayabilen ısı döngü aygıtları (thermal cycler) kullanılır. Boyalar arasında en sık kullanılanı çift iplikli DNA'ya bağlanan SYBR Green'dir. Reaksiyon sırasında hedef 52 nükleik asit dizilerinin sayısı arttıkça, oluşan çift iplikli DNA moleküllerine giderek daha fazla sayıda SYBR Green molekülü bağlanır ve daha fazla floresans oluşur. Oluşan floresans eş zamanlı olarak okunur [109].

qPZR reaksiyonu "GeneMark SYBR Master Mix Kit" kullanılarak gerçekleştirildi. Isıl döngü cihazı olarak Bio-rad CFX96 kullanıldı. Analizler Bio-rad Precision Melt Analysis v1.2 programı ile yapıldı. qPZR reaksiyonuna ait reaksiyon bileşenleri Tablo 3.4'de verilmiştir. Reaksiyon döngüsüne ait bilgiler ise Tablo 3.5'de verilmiştir.

Tablo 3-5: qPZR reaksiyon bileşenleri ve miktarları

Reaksiyon Bileşenleri	Konsantrasyon	Son Konsanstrasyon	Hacim (µL)
2X Syber Green Master Mix	2X	1X	10 µL
Primer F1	10 µM	500 nM	1 µL
Primer R1	10 µM	500 nM	1 µL
Kalıp			1 µL
dH₂O			7 µL
TOPLAM HACİM			→ 20 µL

Tablo 3-6: qPZR için reaksiyon koşulları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95	2 dk.	1
Denatürasyon	95	30 sn.	} 35
Bağlanma	52	30 sn.	
Uzama	72	30 sn.	
Son Uzama	72	5 dk.	1

3.12. İstatistiksel Analizler

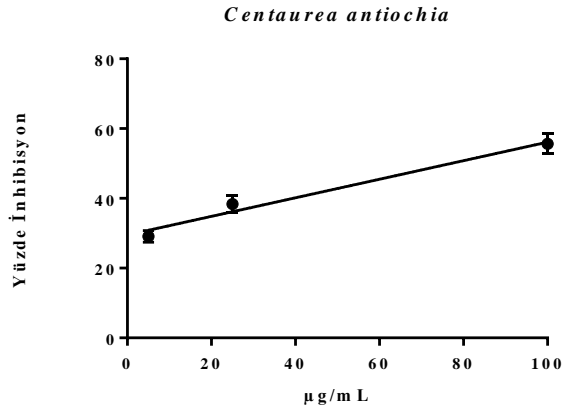
Deneylere ait tüm sayısal veriler kontrole ve birbirlerine göre istatistiksel olarak GraphPad Prism yazılım programı (GraphPad Prism version 7.0, GraphPad Software, San Diego California USA, Anonim-c) kullanılarak değerlendirildi. Grupların kontrol grubuna göre anlamlılıkları Krustal-Wallis testi ile değerlendirildi. Anlamlılık değeri olarak $P < 0.05$ seviyesi temel alındı.

4. BULGULAR

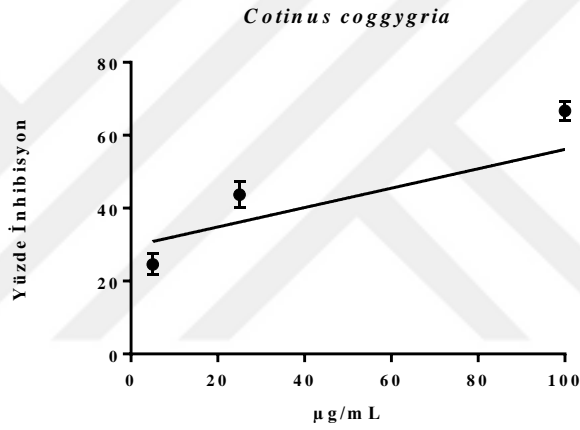
On bir metanolik bitki fraksiyonunun, insan periferik kan T ve NK hücreleri proliferasyonu üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla öncelikle 11 metanolik fraksiyon MTT yöntemi ile uyarılmış PKMH'ler üzerinde 3 farklı doz da denendi. Burada amaç, daha pahalı olan sonraki basamaklara geçmeden önce kolay ve nispeten ucuz bir yöntem olan MTT yöntemi ile fraksiyon sayısını azaltmaktı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda T ve NK hücre proliferasyonunu inhibe edebileceği görülen 4 metanolik bitki fraksiyonunun CFSE işaretli PKMH'ler de proliferatif yanıtı incelenmiş ve istatistiki olarak en yüksek anlamlılığı veren *Cotinus coggygia* metanolik fraksiyonu ile çalışmanın ilerleyen basamaklarına devam edilmiştir. *Cotinus coggygia* metanolik fraksiyonunun PKMH'ler üzerindeki etkilerini belirleyebilmek için Annexin V-PI boyama ile apoptozu uyarıp/uyarmadığı araştırılmıştır. Bu basamaktan sonra, *Cotinus coggygia* metanolik fraksiyonunun T ve NK hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri çok renkli boyama yöntemi ile Akan Hücre Ölçer cihazında incelendi ve *Cotinus coggygia* metanolik fraksiyonunun PKMH'lerinde IL-1 β , IL-2, IL-4 ve IL-10 genlerinin anlatım düzeylerini nasıl etkilediği qPZR yöntemi ile saptandı.

4.1. MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-II)-2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür) Yöntemi ile Hücre Çoğalmasının Belirlenmesi

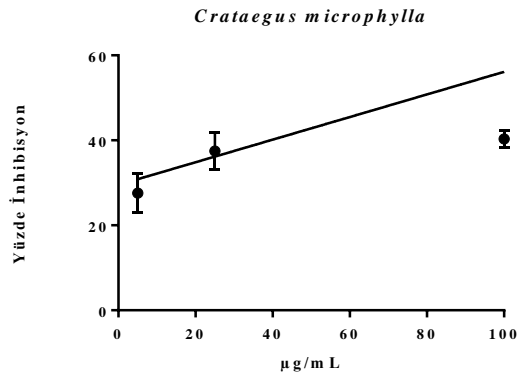
Çalışmamızda 11 metanolik bitki methanol fraksiyonunun değişen konsantrasyon değerlerine göre PHA ile aktive edilmiş PKMH'ler üzerindeki inhibe edici aktiviteleri MTT yöntemi ile saptanmıştır. Farklı konsantrasyonlara (5, 25, 100 μ g/mL) karşı % inhibisyon değerlerine göre hazırlanan grafikler Şekil 4.1-11'de gösterilmektedir. Bu grafiklere ait inhibisyon değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir.



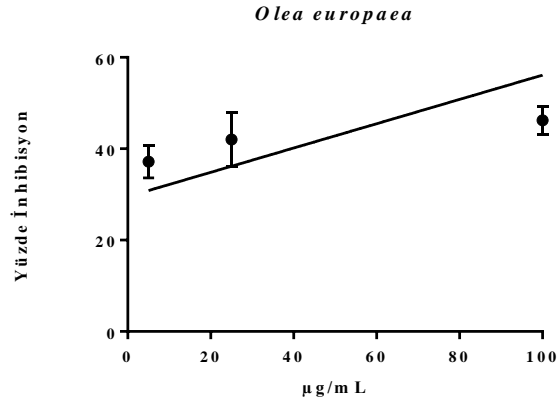
Şekil 4-1: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine *Centaurea antiiochia* metanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değışimi



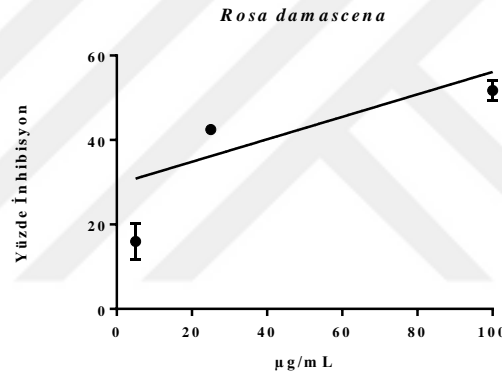
Şekil 4-2: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine *Cotinus coggyria* metanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değışimi



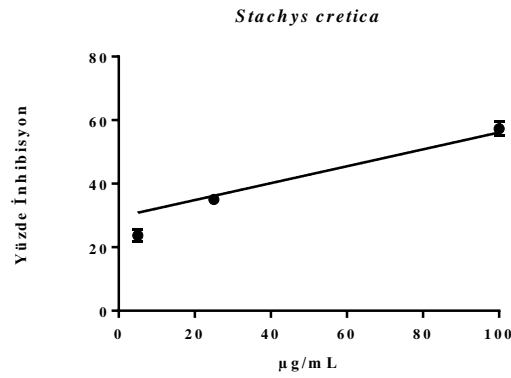
Şekil 4-3: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine *Crataegus microphylla* metanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değışimi



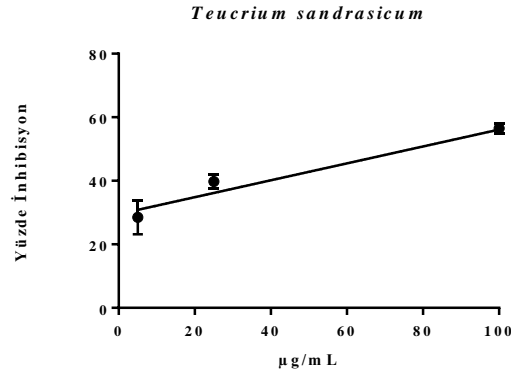
Şekil 4-4: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine *Olea europaea* metanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi



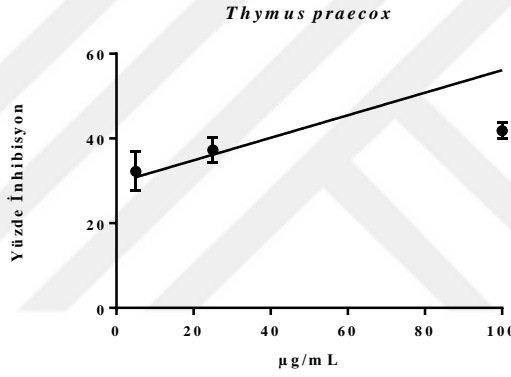
Şekil 4-5: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine *Rosa damascena* metanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi



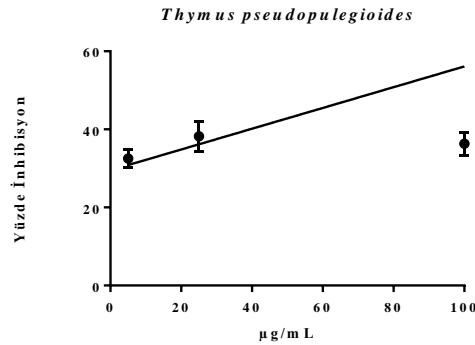
Şekil 4-6: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine *Stachys cretica* metanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi



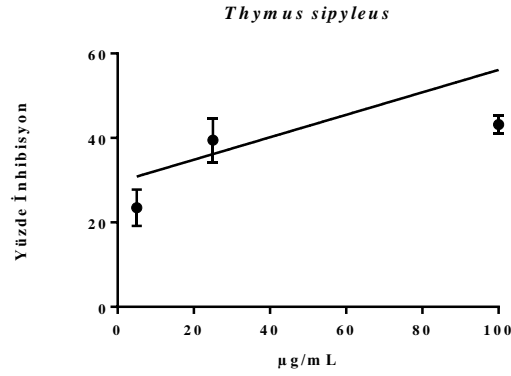
Şekil 4-7: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine *Teucrium sandrasicum* metanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değışimi



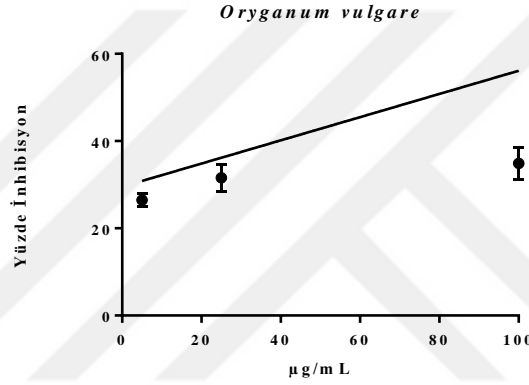
Şekil 4-8: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine *Thymus praecox* metanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değışimi



Şekil 4-9: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine *Thymus pseudopulegioides* metanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değışimi



Şekil 4-10: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine *Thymus sipyleus* metanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi



Şekil 4-11: PHA ile uyarılmış PKMH hücrelerinin çoğalması üzerine *Oryganum vulgare* metanol fraksiyonunun konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi

Tablo 4-1: Fraksiyonların PKMH üzerinde MTT yöntemi ile belirlenen inhibisyon değerleri (n=3) (ns= not significant(anlamli değil), * p<0,05, ** p<0,01 *** p<0,001 **** p<0,0001)

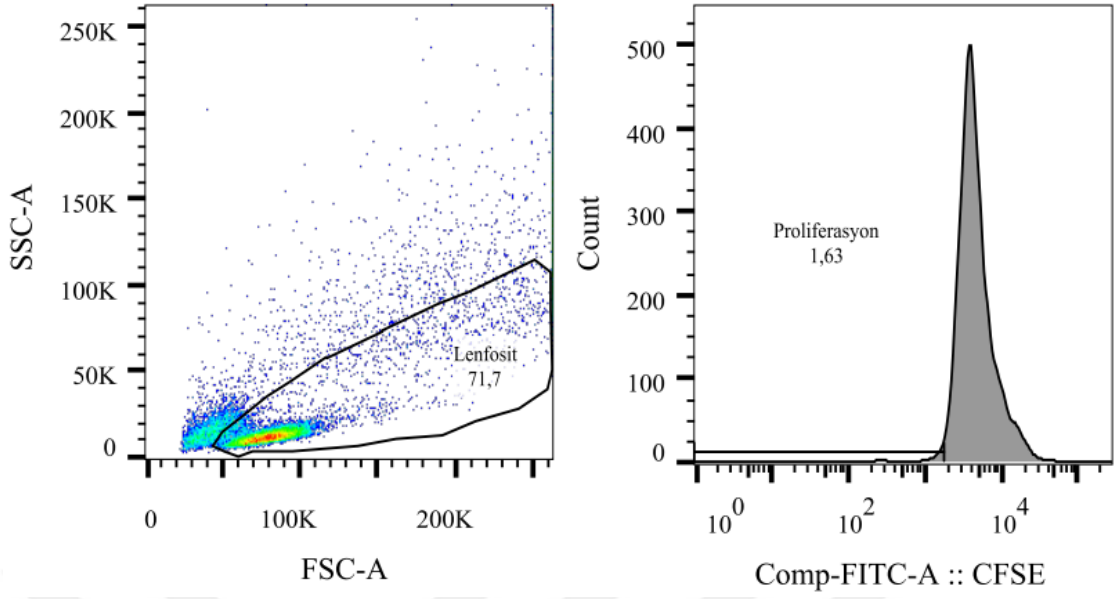
	% İnhibisyon		
	5 µg/mL	25 µg/mL	100 µg/mL
<i>Centaurea antiochia</i>	29,13	38,34	55,66
<i>Cotinus coggygia</i>	24,57	43,70	56,70
<i>Crataegus microphylla</i>	27,56	37,49	40,34
<i>Olea europaea</i>	37,18	42,03	46,24
<i>Rosa damascena</i>	15,99	42,47	51,72
<i>Stachys cretica</i>	18,73	35,02	38,94
<i>Teucrium sandrasicum</i>	28,47	39,77	46,92
<i>Thymus praecox</i>	32,20	37,29	41,81
<i>Thymus pseudopulegioides</i>	32,54	38,23	36,33
<i>Thymus sipyleus</i>	23,46	39,48	58,53
<i>Oryganum vulgare</i>	26,50	31,56	34,85

MTT yöntemi ile belirlenen, konsantrasyona bağlı inhibisyon değerleri kullanılarak oluşturulan grafikler göz önüne alındığında, doza bağımlı inhibisyon artışı gösteren fraksiyonların *Centaurea antiochia*, *Cotinus coggygia*, *Stachys cretica* ve *Teucrium sandrasicum* olduğu saptanmıştır. Bu fraksiyonların düşük konsantrasyonlarda PHA ile uyarılmış PHMH'ler üzerinde gösterdikleri yüksek aktivite sebebiyle, bu bitkilerin potansiyel anti-enflamatuar etkili olabileceği düşünülmektedir.

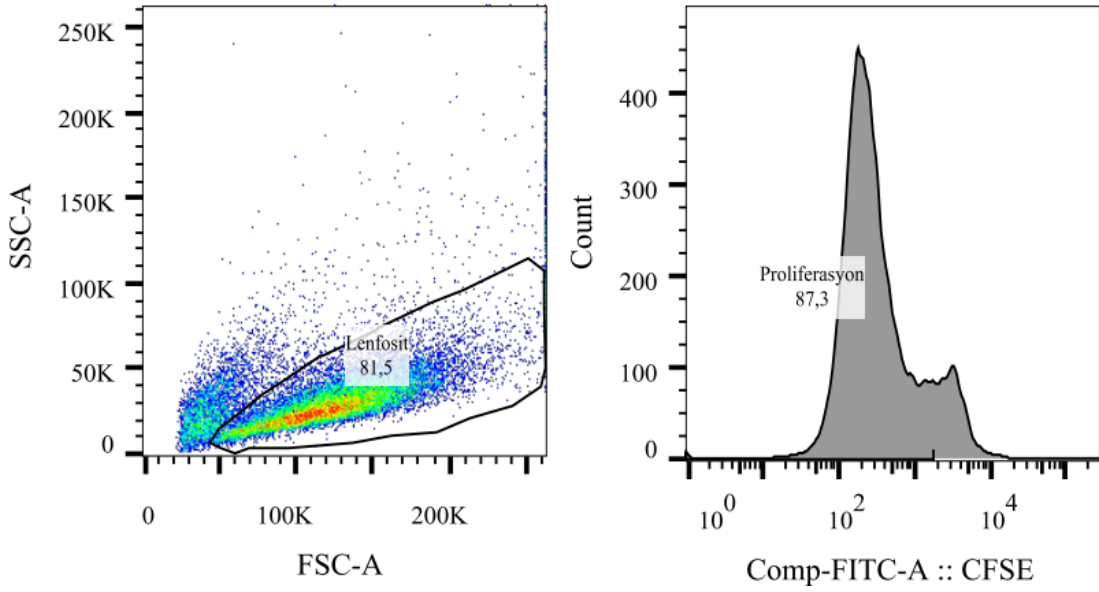
4.2. PKMH Proliferasyonunun CFSE Yöntemiyle Belirlenmesi

MTT yöntemi ile elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda, doza bağlı inhibisyon artışına sahip *Centaurea antiochia*, *Cotinus coggygia*, *Stachys cretica* ve *Teucrium sandrasicum* fraksiyonlarının uyarılmış PKMH proliferasyonlarını nasıl etkilediği daha iyi anlayabilmek için CFSE boyama yöntemi kullanıldı [110]. Akan Hücre Ölçer cihazında 96. saat sonunda elde edilen verilerin FlowJo programı ile yapılan analiz sonuçları Tablo 4.2'de, uygulanan kapılama stratejisi ise Şekil 4.12-13'de gösterilmektedir.

Şekil 4.12-13'de verilen, histogramda yer alan eğrinin uyarımsız lenfositlere göre uyarımlı lenfositlerde X eksenini üzerinde sol tarafa kayması bölünen hücrelerde, her yeni nesilde hücre içinde azalan CFSE miktarına paralel olarak yarıya düşmesi ve 517 nm'de meydana gelen emisyonun azalması ile açıklanmaktadır. Proliferasyon değeri ise uyarımsız lenfositlere göre uyarımlı lenfositlerin yüzde kaçlık diliminin bölündüğünü göstermektedir. Analiz basamağında uyarımsız lenfositlerin histogramından elde edilen sınır, değiştirilmeden tüm gruplara uygulanmış ve her bir grup için proliferasyon değerleri elde edilmiştir. Bu değerlerin normalizasyon işlemi için ise, Uyarılma İndeksi (Stimulation Index= SI) kullanılmıştır. SI değerinin hesaplanmasında kullanılan Denklem 3-3'de verilmiştir. Her bir grup, uyarımlı grubun proliferasyon değeri ile normalize edilmiş ve uyarımda meydana gelen azalma/artma hesaplanmıştır.



Şekil 4-12: FSC-SSC grafiğinde uyarımsız PKMH'in dağılımı, kapılama stratejisi ve % proliferasyon değerleri



Şekil 4-13: FSC-SSC grafiğinde PHA ile uyarılan PKMH'lerin dağılımı, kapılama stratejisi ve % proliferasyon değeri

Tablo 4-2: *Centaurea antiiochia* ve *Cotinus coggygria* fraksiyonlarına ait CFSE yöntemiyle elde edilen SI değerleri ve anlamlılık düzeyleri (n=5) (ns= not significant(anlamli değil), * p<0,05, ** p<0,01 * p<0,001 **** p<0,0001)**

Örnek No	PHA	<i>Centaurea antiiochia</i>			<i>Cotinus coggygria</i>		
		100 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL	100 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL
1	1,00	0,72	0,94	0,96	0,10	0,66	0,93
2	1,00	0,87	0,97	0,99	0,07	0,78	1,01
3	1,00	0,94	1,00	1,00	0,15	0,92	1,00
4	1,00	0,78	0,84	0,89	0,07	0,68	0,86
5	1,00	0,86	0,94	0,95	0,13	0,78	0,94
Ortalama	1,00	0,83	0,94	0,96	0,11	0,76	0,95
Krustal-Wallis Testi Sonuçları		***	ns	ns	****	****	ns

Tablo 4-3: *Stachys cretica* ve *Teucrium sandrasicum* fraksiyonlarına ait CFSE yöntemiyle elde edilen SI değerleri ve anlamlılık düzeyleri (n=5)) (ns= not significant(anlamli değil), * p<0,05, ** p<0,01 * p<0,001 **** p<0,0001)**

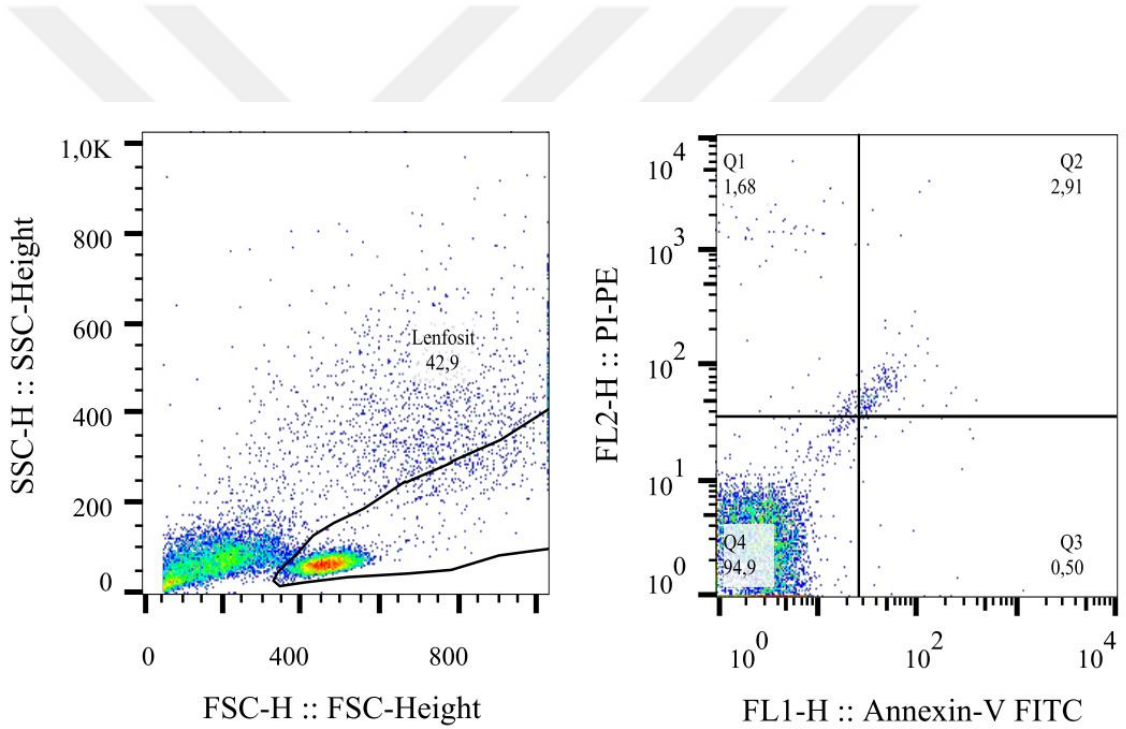
Örnek No	PHA	<i>Stachys cretica</i>			<i>Teucrium sandrasicum</i>		
		100 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL	100 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL
1	1,00	0,67	0,97	0,98	1,05	1,01	1,02
2	1,00	0,91	0,96	1,00	0,85	1,00	0,99
3	1,00	0,92	1,00	1,00	0,92	1,00	1,00
4	1,00	0,54	0,85	0,88	0,60	0,79	0,87
5	1,00	0,76	0,94	0,95	0,79	0,94	0,95
Ortalama	1,00	0,76	0,94	0,96	0,84	0,95	0,97
Krustal-Wallis Testi Sonuçları		***	ns	ns	*	ns	ns

CFSE yöntemi ile elde edilen sonuçlar *Centaurea antiiochia*, *Stachys cretica*, *Teucrium sandrasicum* fraksiyonlarının 100 µg/mL konsantrasyonunda, 5 biyolojik tekrarlı deneylerde, uyarılmış PKMH'leri istatistiksel olarak anlamlı derecede inhibe ettiği saptanmıştır. *Cotinus coggygria* ekstresi ise, 10 µg/mL konsantrasyonunda bile PHA uyarımını kısmi oranda engellemekte ve istatistiki olarak anlamlı sonuçlar vermektedir. *Cotinus coggygria* methanol fraksiyonunun 100 µg/mL'si ise PHA uyarımını büyük oranda durdurmaktadır. Kuvvetli bir non spesifik mitojen olan PHA

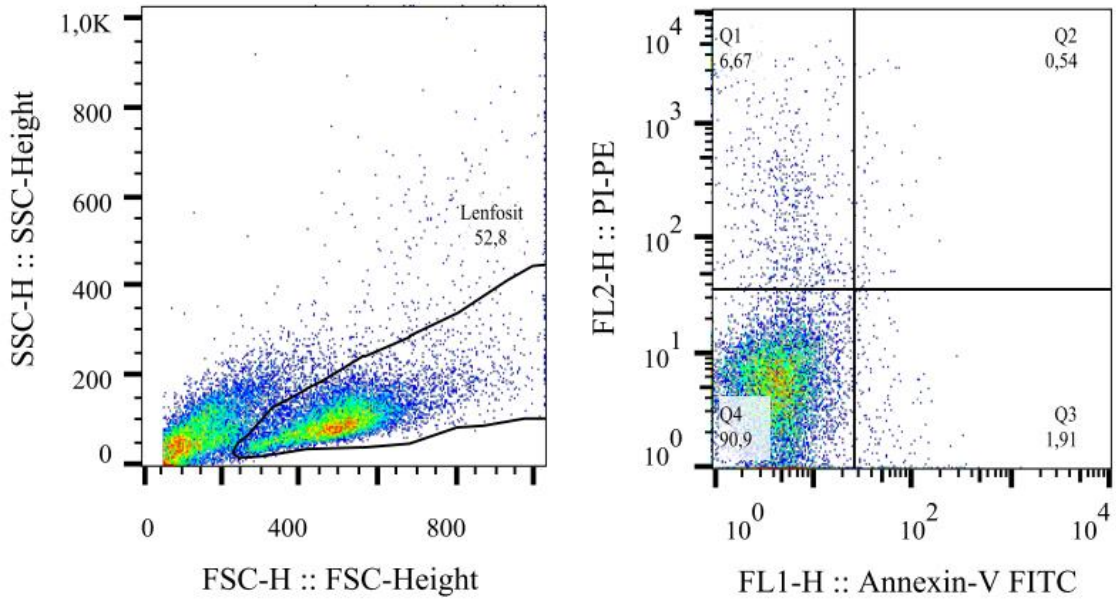
uyarımını büyük oranda durdurması, metanol fraksiyonunun anti-enflamatuvar ajanlar taşıyabileceği fikrini destekler niteliktedir.

4.3. Annexin V-Propidium İyodür (PI) Boyama ile Apoptozun Belirlenmesi

MTT ve CFSE yöntemi ile elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda, *Cotinus coggygia* metanol fraksiyonunun uyarılmış PKMH proliferasyonunu anlamlı şekilde durdurduğu gösterilmiştir. Annexin V-PI boyama yöntemi ile ekstrenin PKMH'ler üzerindeki apoptatik etki mekanizması araştırılmış ve 96. saat sonunda Akan Hücre Ölçer'den elde edilen verilerin FlowJo programı ile yapılan analiz sonuçları Tablo 4.4'de verilmiştir. Uygulanan kapılama stratejisi ise Şekil 4.14-16'de gösterilmektedir.

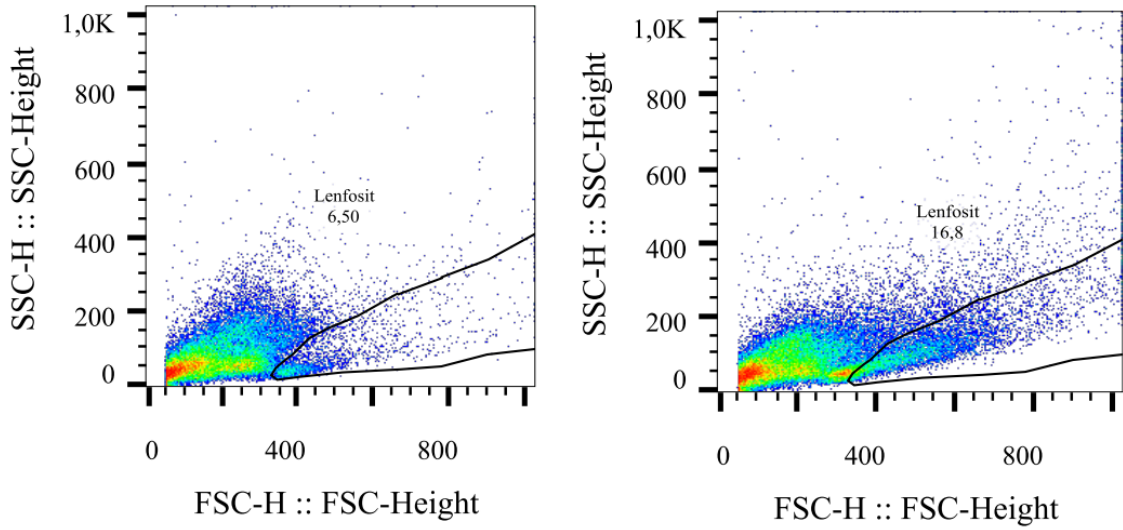


Şekil 4-14: Uyarımsız PKMH'lerde apoptozun saptanması için kullanılan kapılama stratejisi ve hücrelerin dağılımı



Şekil 4-15: PHA uyarısı sonrası PKMH'lerde apoptozun saptanması

Şekil 4.14-15'de verilen Annexin V-PI şekillerin'de Q1 olarak ifade edilen bölge, Annexin V boyanma açısından negatif PI boyanma açısından pozitif hücreleri ifade etmektedir. Bu bölgedeki hücrelerin ölü veya nekrotik oldukları düşünülmektedir. Q2 bölgesindeki hücreler, Annexin V boyanma açısından ve PI boyanma açısından pozitif hücrelerdir ve geç apoptoz evresindedirler. Q3 bölgesi ise, Annexin V boyanma açısından pozitif ve PI boyanma açısından negatif hücreleri ifade etmektedir ve erken apoptotik hücrelerdir. Q4 bölgesinde yer alan hücreler ise iki boya açısından da negatiftirler ve canlı hücrelerdir.



Şekil 4-16: *Cotinus coggygia* methanol fraksiyonunun, 100 µg/mL (solda) ve 25 µg/mL (sağda) konsantrasyonlarının lenfosit kapısı içindeki hücre oranı değişimleri

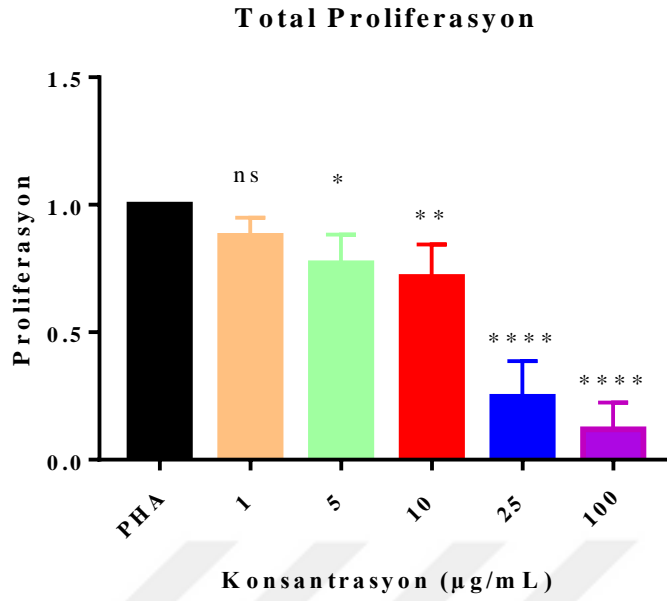
Tablo 4-4: Değişen konsantrasyonlarda *Cotinus coggygia* ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış PKMH'lerin, Annexin V-PI boyama sonucunda bölgelere göre dağılımları (n=3) (ns= not significant(anlamalı değil), * p<0,05, ** p<0,01 *** p<0,001 **** p<0,0001)

Konsantrasyon (µg/mL)	% Q ₁	% Q ₂	% Q ₃	%Q ₄	Kruskal-Wallis Test Sonuçları
PHA	6,81	1,37	2,87	88,93	ns
1	4,95	1,52	3,46	90,07	ns
5	4,36	1,57	4,22	89,83	ns
10	9,06	2,93	3,87	84,17	ns
25	13,69	4,31	6,19	75,80	ns
100	10,2	9,31	4,71	75,7	ns

Üç biyolojik tekrarlı yapılan çalışmalar sonucunda, *Cotinus coggygia* methanol fraksiyonunun PKMH'ler üzerindeki apoptatik etkileri incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ekstrenin uyarılmış PKMH proliferasyonunu, farklı mekanizmalar ile durdurduğu düşünülmektedir. Farklı ekstre konsantrasyonlarının (25 ve 100 µg/mL) hücreleri apoptoza yönlendirmemesine rağmen SSC-FSC grafiğinde lenfosit kapısı içindeki hücre sayısını anlamlı oranda baskıladığı Şekil 4.16'da görülmektedir.

4.4. *Cotinus coggygia* Methanol fraksiyonunun T ve NK Hücrelerinin Proliferasyonları Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

Cotinus coggygia methanol fraksiyonunun CFSE proliferasyon testi sonuçlarına göre gösterdiği yüksek anti-proliferatif etki ve bu etkinin apoptotik yollardan kaynaklanmaması sebebiyle çalışmanın bundan sonraki basamaklarına *Cotinus coggygia* ekstresi ile devam edilmiştir. Öncelikle, *Cotinus coggygia* methanol fraksiyonunun total PKMH üzerindeki anti-proliferatif etkileri CFSE boyama yöntemi ile daha ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir. Bu veri Tablo 4.5’de sunulmuştur. Bu verilerden elde edilen SI değerleri grafiği ise Şekil 4.17’de verilmiştir. *Cotinus coggygia* methanol fraksiyonunun, T ve NK hücre proliferasyonuna etkilerinin araştırılması için CFSE ile birlikte anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 ve anti-CD56 antikorları kullanılarak çok renkli (multicolor) boyama yapılmıştır. T hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmak için yapılan kapılama stratejisi Şekil 4.18’de gösterilmiştir. Ekstrenin T hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisi ise Tablo 4.6-7’de ve hesaplanan SI değerleri Şekil 4.19-21’de verilmiştir. NK hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmak için yapılan kapılama stratejisi Şekil 4.22’de gösterilmiştir. Ekstrenin NK hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisi ise Tablo 4.8-9’da ve SI değerleri ise Şekil 4.23-25’de verilmiştir.

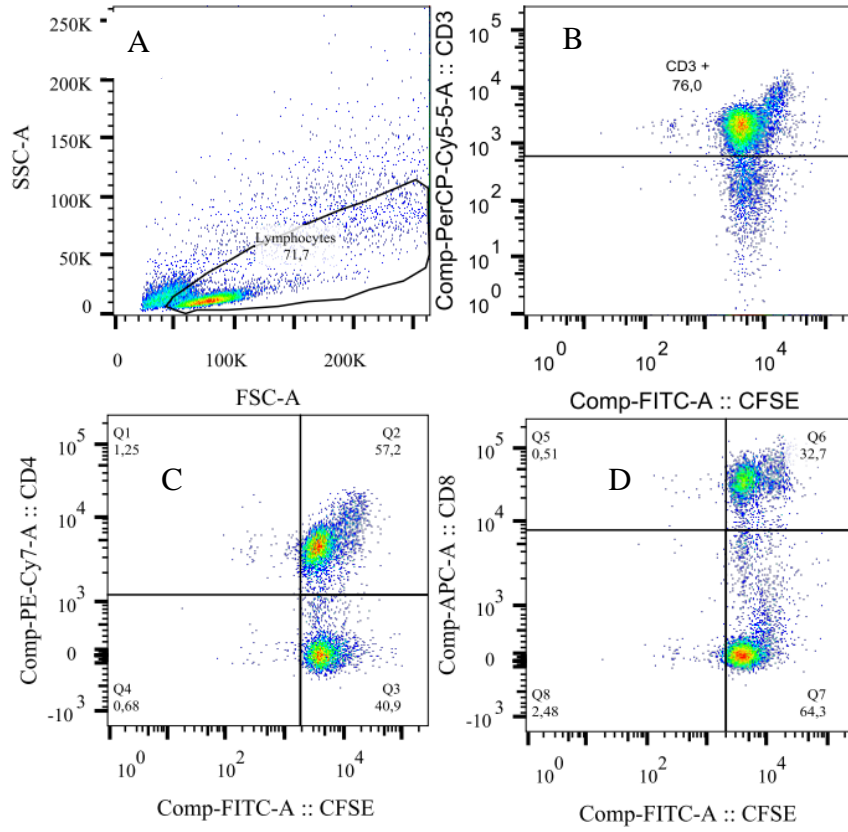


Şekil 4-17: Değişen konsantrasyonlarda *Cotinus coggygia* ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış PKMH'nin CFSE yöntemi ile ölçülen SI verileri (n=9) (ns= not significant(anlamalı değil), * p<0,05, ** p<0,01 *** p<0,001 **** p<0,0001)

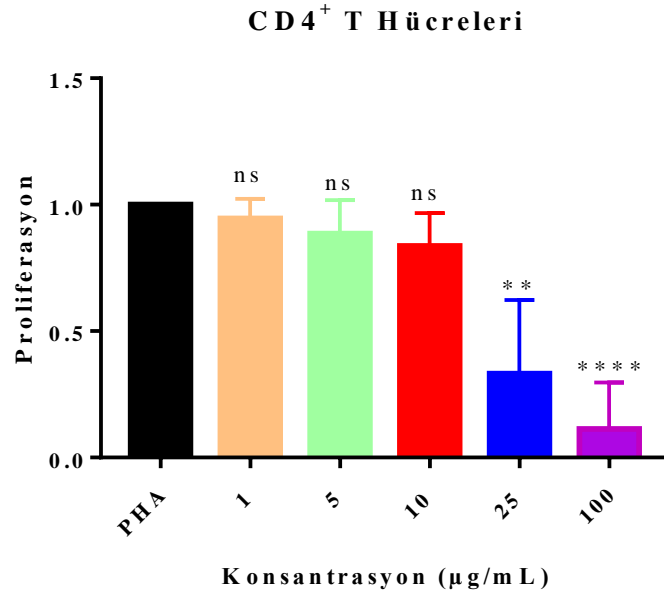
Tablo 4-5: *Cotinus coggygia* fraksiyonunun PBMC'ler üzerindeki SI değerine etkileri

	Konsantrasyonlar (µg/mL)					
	PHA	1	5	10	25	100
Proliferasyon	1	0,88	0,77	0,72	0,25	0,12

Dokuz biyolojik tekrarlı ve sadece CFSE boyama kullanılarak yapılan proliferasyon testi sonuçlarına göre *Cotinus coggygia* metanol fraksiyonunun 1 µg/mL konsantrasyonunun total proliferasyon üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı (proliferasyon değeri 0,88), 5 µg/mL konsantrasyonundan sonra ise anlamlı etkilerin başladığı görülmüştür (proliferasyon değeri 0,77).



Şekil 4-18: CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin proliferasyon verilerini ölçmek için kullanılan kapılama stratejisi (A: Lenfosit kapısı B: Lenfosit kapısı içerisindeki CD3⁺ ve CD3⁻ hücreler C: CD3⁺ hücreler içerisinde CD4⁺ hücreleri D: CD3⁺ içerisinde CD8⁺ hücreleri)

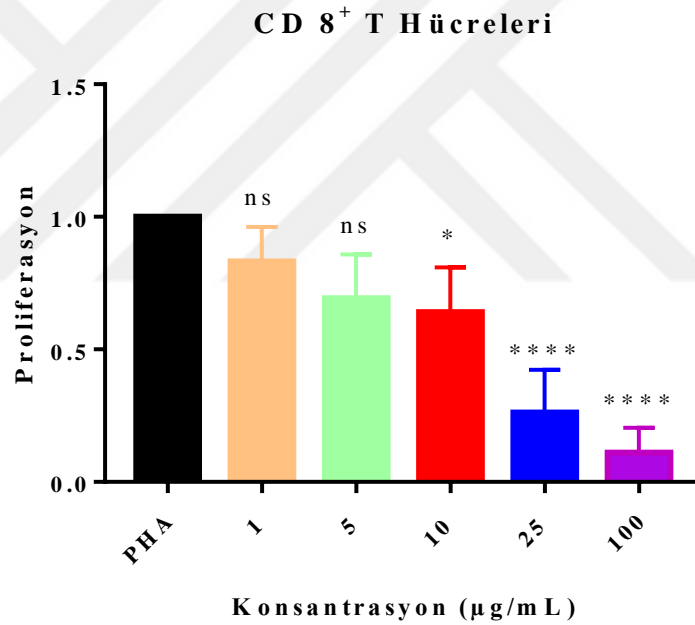


Şekil 4-19: Değişen konsantrasyonlarda *Cotinus coggygia* ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış CD4⁺ T hücrelerinin CFSE yöntemi ile ölçülen SI değerleri (n=9) (ns= not significant(anlamalı değil), * p<0,05, ** p<0,01 *** p<0,001 **** p<0,0001)

Tablo 4-6: *Cotinus coggygia* fraksiyonunun CD4⁺ler üzerindeki SI değerine etkisi

	Konsantrasyonlar ($\mu\text{g/mL}$)					
	PHA	1	5	10	25	100
Proliferasyon	1	0,95	0,89	0,84	0,33	0,11

Cotinus coggygia ekstresi, PHA ile uyarılmış CD4⁺ T hücre proliferasyonunu artan konsantrasyona bağlı olarak engellemektedir. Farklı konsantrasyonlarda (1, 5 ve 10 $\mu\text{g/mL}$) anlamlı bir değişim olmamasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı olan, 25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu bölünen hücre miktarı PHA uyarımlı gruba göre %67 azalmaktadır. En yüksek konsantrasyon olan, 100 $\mu\text{g/mL}$ 'de ise sadece %11 oranında hücre bölünmektedir.

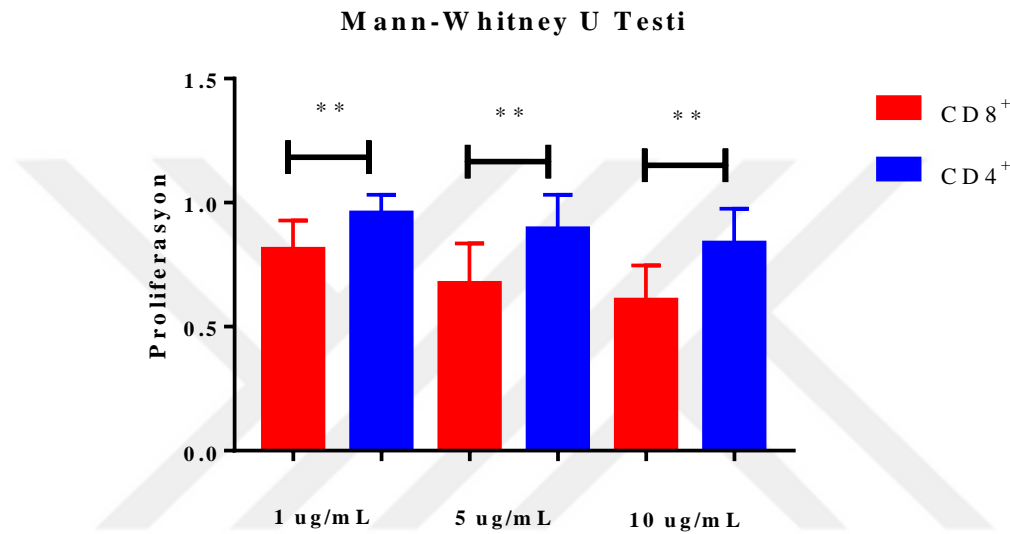


Şekil 4-20: Değişen konsantrasyonlarda *Cotinus coggygia* ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış CD8⁺ T hücrelerinin CFSE yöntemi ile hesaplanan SI verileri (n=9)) (ns= not significant(anlamlı değil), * p<0,05, ** p<0,01 * p<0,001 **** p<0,0001)**

Tablo 4.7: *Cotinus coggygia* fraksiyonunun CD8⁺ler üzerindeki SI değerine etkileri

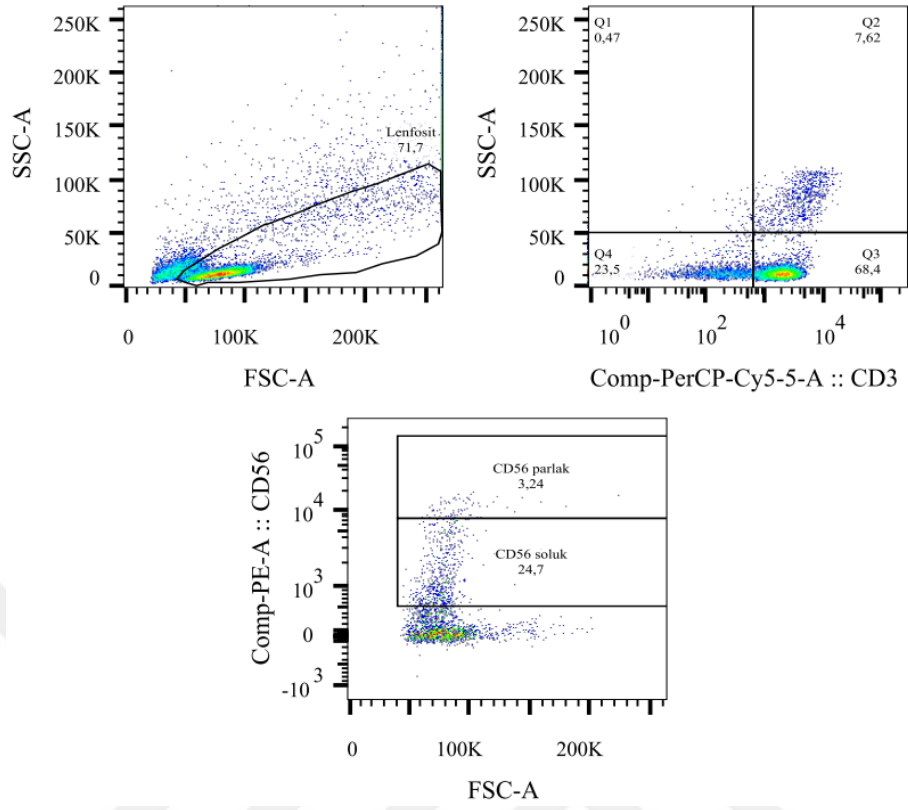
	Konsantrasyonlar ($\mu\text{g/mL}$)					
	PHA	1	5	10	25	100
Proliferasyon	1	0,83	0,69	0,64	0,26	0,11

Cotinus coggygia ekstresi, PHA ile uyarılmış CD8⁺ T hücreproliferasyonunu artan konsantrasyona bağlı olarak engellemektedir. Farklı konsantrasyonlarda (1 ve 5 µg/mL) anlamlı bir değişim olmamasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı olan, 10 µg/mL konsantrasyonu bölünen hücre mikrarı PHA uyarımlı gruba göre %36 azalmakta, 25 µg/mL konsantrasyonu ise %74 oranında proliferasyonu inhibe etmektedir. En yüksek konsantrasyon olan, 100 µg/mL'de ise sadece %11 oranında hücre bölünmektedir.

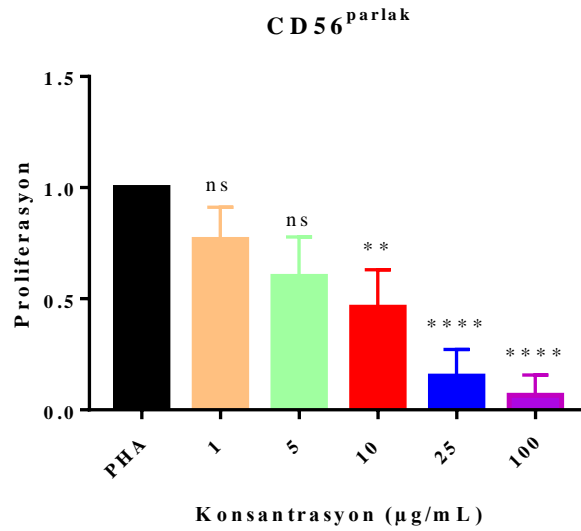


Şekil 4-21: CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre proliferasyon yanıtlarının konsantrasyona bağlı karşılaştırılması (ns= not significant(anlamlı değil), * p<0,05, ** p<0,01 * p<0,001 **** p<0,0001)**

CD8⁺ ve CD4⁺ T hücreleri ile yapılan proliferasyon testleri sonucunda her 2 hücre tipi içinde doza bağımlı inhibisyon görülmüştür. CD8⁺ T hücreleri için 10 µg/mL konsantrasyonu istatistiksel olarak anlamlı fark oluştururken, CD4⁺ T hücreleri için 25 µg/mL konsantrasyonu istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar vermektedir.



Şekil 4-22: CD 56^{parlak} ve CD 56^{soluk} NK hücrelerinin proliferasyon verilerini ölçmek için kullanılan kapılama stratejisi (A: Lenfosit kapısı B: Lenfosit kapısı içerisindeki CD3⁺ ve CD3⁻ hücreler C: CD3⁻ hücreler içerisinde CD56^{parlak} ve CD56^{soluk} hücreler)

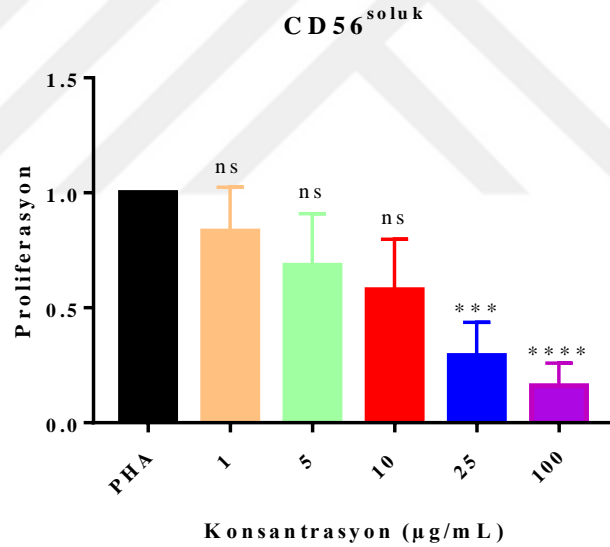


Şekil 4-23: Değişen konsantrasyonlarda *Cotinus coggygia* ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış CD 56^{parlak} T hücrelerinin CFSE yöntemi ile ölçülen SI verileri (n=9) (ns= not significant(anlamalı değil), * p<0,05, ** p<0,01 *** p<0,001 **** p<0,0001)

Tablo 4-8: *Cotinus coggygia* fraksiyonunun CD56^{parlak} NK hücreleri üzerindeki SI değerine etkisi

	Konsantrasyonlar ($\mu\text{g/mL}$)					
	PHA	1	5	10	25	100
Proliferasyon	1	0,77	0,60	0,49	0,14	0,04

Cotinus coggygia ekstresi, PHA ile uyarılmış CD56^{parlak} NK hücre proliferasyonunu artan konsantrasyona bağlı olarak engellemektedir. 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda proliferasyon değeri uyarımlı grubun değeri olan 1'den %51 oranında azalarak 0,49 olmuştur. 25 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında ise, proliferasyon değeri sırası ile 0,24 ve 0,04 olarak hesaplanmıştır.

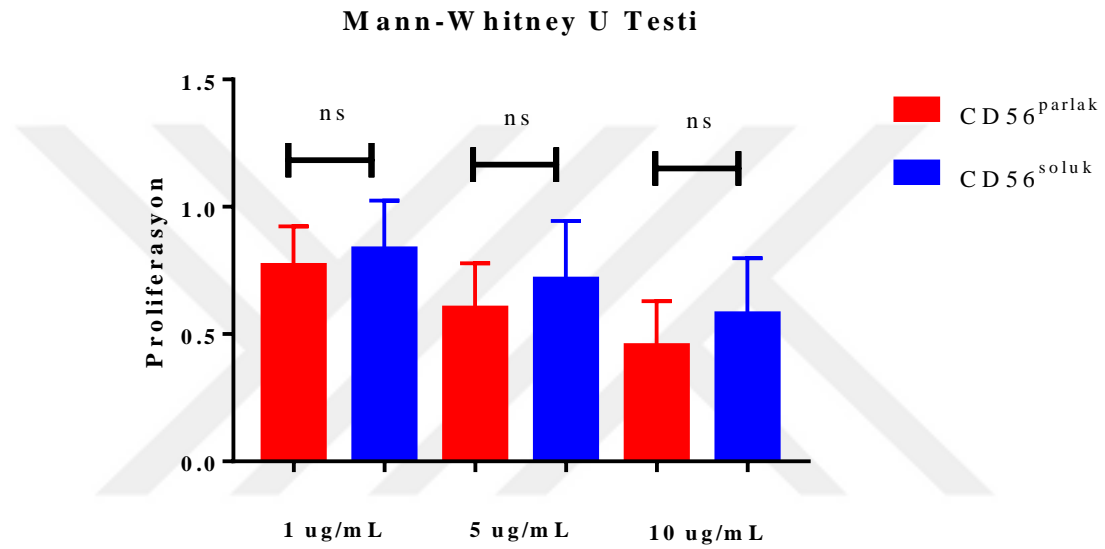


Şekil 4-24: Değişen konsantrasyonlarda *Cotinus coggygia* ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış CD 56^{soluk} NK hücrelerinin CFSE yöntemi ile ölçülen proliferasyon verileri (n=9)) (ns= not significant(anlamalı değil), * p<0,05, ** p<0,01 * p<0,001 **** p<0,0001)**

Tablo 4-9: *Cotinus coggygia* fraksiyonunun CD56^{soluk} NK hücreler üzerindeki SI değerine etkisi

	Konsantrasyonlar ($\mu\text{g/mL}$)					
	PHA	1	5	10	25	100
Proliferasyon	1	0,79	0,68	0,62	0,29	0,16

Cotinus coggygia ekstresi, PHA ile uyarılmış CD56^{soluk} NK hücre proliferasyonu artan konsantrasyonda engellemektedir. Farklı konsantrasyonlarda (1, 5 ve 10 µg/mL) gözlenen inhibisyon istatistiksel olarak anlamlı değildir. 10 µg/mL konsantrasyonda bölünen hücre miktarı %38 azalarak proliferasyon değeri 0,62 dir. İstatistiksel olarak anlamlı olan, 25 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında ise, proliferasyon değeri 0,29 ve 0,16 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4-25 CD56^{parlak} ve CD56^{soluk} NK hücrelerinin proliferasyon yanıtlarının ekstre dozuna bağlı karşılaştırılması) (ns= not significant(anlamlı değil), * p<0,05, ** p<0,01 * p<0,001 **** p<0,0001)**

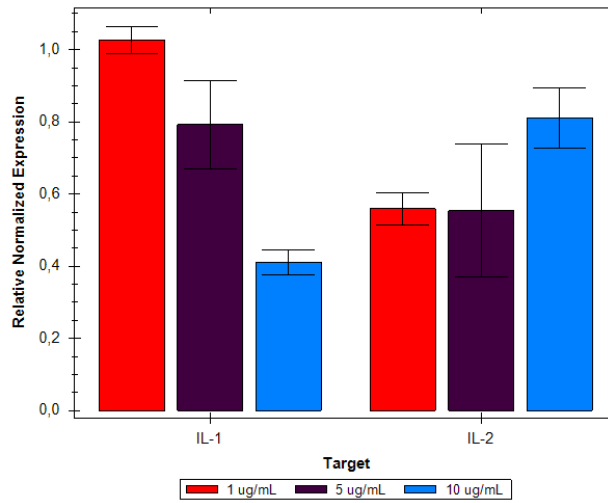
CD56^{parlak} NK hücreleri ve CD56^{soluk} NK hücreleri ile yapılan proliferasyon testleri sonucunda her 2 hücre tipi içinde doza bağımlı inhibisyon meydana geldiği görülmüştür. CD56^{parlak} NK hücreleri için 10 µg/mL konsantrasyonu istatistiksel olarak anlamlı fark oluştururken, CD56^{soluk} NK hücreleri için 25 µg/mL konsantrasyonu istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar oluşturmaktadır.

Tüm deney gruplarından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde 25 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarının proliferasyonları yüksek oranda engellediği görülmektedir. Bununla birlikte, Annexin V-PI boyama sonuçlarından elde edilen, 25 ve 100 µg/mL konsantrasyonun lenfosit kapısı içerisinde yer alan hücre miktarını yüksek oranda azalttığı bulgusunda göz önüne alındığında çalışmanın bundan sonraki basamağına

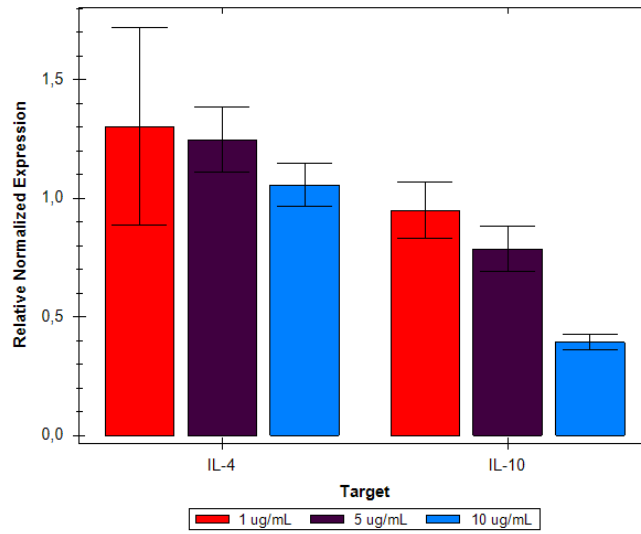
Cotinus coggygia methanol fraksiyonunun 3 konsantrasyonu (1, 5 ve 10 µg/mL) ile devam edilmiştir.

4.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR) ile Gen Anlatım Düzeylerinin Belirlenmesi

Cotinus coggygia methanol fraksiyonunun, CD4⁺ ve CD8⁺ T, CD56^{parlak} ve CD56^{soluk} NK hücre grupları üzerindeki konsantrasyona bağlı anti-proliferatif etkinin mekanizmasını aydınlatılmak için, pro-enflamatuvar (IL-1β, IL-2 ve IL-4) ve anti-enflamatuvar (IL-10) genlerin anlatım düzeylerine qPCR yöntemi ile saptanmıştır. Gen anlatım düzeylerine ilişkin elde edilen sonuçlar sonuçlar Tablo 4.11’de verilmiştir. Bu veriler kullanılarak oluşturulan göreceli gen anlatım düzeylerini gösteren grafikler ise Şekil 4.24-25’de sunulmuştur.



Şekil 4-26: Değişen konsantrasyonlarda *Cotinus coggygia* ekstresi uygulanan ve uygulanmayan PHA ile uyarılmış PKMH’lerinin IL-1β ve IL-2 gen ekspresyon düzeyleri (n=3)



Şekil 4-27: Değişen konsantrasyonlarda *Cotinus coggygia* ekstresi uygulanan ve uygulanmayan PHA ile uyarılmış PKMH'lerinin IL-4 ve IL-10 gen ekspresyon düzeyleri (n=3)

Tablo 4-10: Değişen konsantrasyonlarda *Cotinus coggygia* ekstresi uygulanan ve uygulanmayan PHA ile uyarılmış PKMH'lerinin IL-1 β , IL-2 IL-4 ve IL-10 gen ekspresyon düzeyleri) (ns= not significant(anlamalı değil), * p<0,05, ** p<0,01 *** p<0,001 **** p<0,0001)

Hedef Gen	Örnek	Ortalama Cq	Normalize Anlatım	Göreceli Normalize Anlatım	Kruskal-Wallis Test Sonuçları
IL-1 β	PHA	19,11	0,08526	1,00000	-
	1 µg/mL	19,49	0,08746	1,02578	ns
	5 µg/mL	20,38	0,06758	0,79271	**
	10 µg/mL	20,90	0,03505	0,41106	****
IL-2	PHA	27,74	0,00022	1,00000	-
	1 µg/mL	28,99	0,00012	0,55925	***
	5 µg/mL	29,52	0,00012	0,55404	***
	10 µg/mL	28,55	0,00018	0,81100	**
IL-4	PHA	28,85	0,00010	1,00000	-
	1 µg/mL	28,89	0,00013	1,30180	***
	5 µg/mL	29,47	0,00012	1,24700	***
	10 µg/mL	29,28	0,00011	1,05622	ns
IL-10	PHA	26,55	0,00049	1,00000	-
	1 µg/mL	27,04	0,00047	0,94930	ns
	5 µg/mL	27,83	0,00039	0,78606	**
	10 µg/mL	28,40	0,00019	0,39336	****

Cotinus coggygia fraksiyonu, PHA ile uyarılmış PKMH'lerde IL-1 β gen anlatım düzeyini, 1 μ g/mL konsantrasyonda anlamlı olarak etkilememekte, 5 ve 10 μ g/mL konsantrasyonlarda ise anlamlı olarak bu genin anlatımını azaltmaktadır. IL-2 gen anlatım düzeyini, 1 ve 5 μ g/mL konsantrasyonunda %50 civarında azaltmakta, 10 μ g/mL konsantrasyonunda ise %20 civarında azaltmaktadır. IL-4 anlatımını 1 ve 5 μ g/mL konsantrasyonunda, anlamlı olarak arttırmakta, 10 μ g/mL konsantrasyonunda gen anlatımı miktarına anlamlı bir etkisi olmamaktadır. IL-10 geninin anlatımını ise, doza bağımlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir.



5. TARTIŞMA

Allerji, astım ve otoimmünite gibi immün sistem hastalıkları son yıllarda insanlığın ciddi sorunlarından biri haline gelmişlerdir. Günümüzde, 300 milyondan fazla insanın astımdan muzdarip olduğu tahmin edilmektedir [111]. Otoimmün hastalık oranının Amerikan Birleşik devletlerinde 50 milyon civarında olduğu bilinmektedir [8].

Bu hastalıkların tedavisinde kullanılan kimyasal ilaçların çoğunun sadece semptomatik tedavi yapması ve bu ilaçların ciddi yan etkilerinin olması hastalıktan muzdarip olan insanların yaşam kalitelerini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu sebeple immün sistem hastalıklarının tedavisi için yeni yaklaşımlarının geliştirilmesine olanak sağlayacak yeni moleküllerin geliştirilmesi önem arz etmektedir [112-114]. Günümüzde kullanılan anti-enflamatuvar ajanlarının büyük kısmı doğal bitkisel ürünlerin sentetik formlarından oluşmaktadır [115].

Günümüzde anti-enflamatuvar etkili yeni moleküller keşfetmenin en genel yöntemi bitkisel ekstraktları deney hayvanları üzerinde deneyerek yapılan çalışmalardır. Bitkisel kaynaklı kumarinin sıçanlara diyet yolu ile verilmiş ve bu hayvanlarda kolonic enflamasyonu azalttığı gösterilmiştir [116]. Başka bir çalışmada, Akdeniz bitkilerinin kroton yağı ile fareler üzerinde oluşturulmuş kulak ödemi üzerindeki etkileri araştırılmış ve kulak da meydana gelen ödemi ciddi azalttığı, bu azalmanında anti-enflamatuvar etkiden kaynaklandığı sonucuna ulaşılmıştır [117]. Diğer bir çalışmada ise, sıçanlarda adjuvan ile oluşturulan artrit modelinde rutin, karsitin hesperidin moleküllerinin, oluşan pedal ödemi azalttığı gösterilmiştir [118].

Uyarıcı bir moleküle maruz kalmayan PKMH hücreler, hücre kültüründe hücre döngüsünün G_0 fazında olurlar ve metabolik aktiviteleri dolayısıyla enerji metabolizmaları sıfıra yakındır. Bu sebeple MTT testinde formazan kristali oluşumu uyarılmamış PKMH'de gözlenmez. Uyarılmış hücreler ise aktive olan mitokondriyel dehidrojenaz enzimleri aracılığıyla formazan kristalleri oluştururlar ve metabolik aktiviteleri dolaylı olarak da kültür ortamında çoğalmaları, ucuz ve kolay uygulanabilir bir yöntem olan MTT ile değerlendirilebilir. MTT yöntemi çalışmamızda, fazla olan bitki ekstresi sayısını azaltma amacıyla ön deneme yöntemi olarak kullanılmıştır. MTT yöntemi ile belirlenen, % inhibisyon göz önüne alındığında 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda inhibisyonu en fazla sağlayan fraksiyonların *Cotinus coggygia*,

Centaurea antiochia, *Teucrium sandrasicum*, *Stachys cretica* olduğu görülmektedir. Bu 4 ekstre PHA uyarımına karşı %50'nin üzerinde inhibisyona neden olduğu için çalışmanın bundan sonraki basamaklarına bu ekstreler ile devam edilmiştir.

MTT testi sonuçlarını doğrulamak amacıyla CFSE boyama yöntemi kullanılmıştır. Enerji metabolizması yerine direk hücre bölünmesini ölçen bir yöntem olması CFSE boyama yönteminin daha güvenilir olmasına neden olmaktadır. Kuvvetli bir antioksidan olan Vitamin E ve Vitamin A üzerine yapılan çalışmalarda, Vitamin E'nin MTT'yi formazana indirgediği ve hatalı pozitif sonuçlar verebileceği ileri sürülmektedir [119, 120]. Bunu destekler şekilde çeşitli antioksidan moleküllerin MTT'yi indirgediği başka çalışmalar da yer almaktadır [121]. CFSE yöntemi ile elde edilen sonuçlar *Centaurea antiochia*, *Stachys cretica*, *Teucrium sandrasicum* fraksiyonlarının 100 µg/mL konsantrasyonunda uyarılmış PKMH'leri anlamlı derecede inhibe ettiği, *Cotinus coggygria* ekstresinin 10 µg/mL konsantrasyonunda bile PHA uyarımını kısmi oranda inhibe ettiği, 100 µg/mL'sinin ise PHA uyarımını büyük oranda durdurduğu saptanmıştır. Kuvvetli bir non spesifik mitojen olan PHA uyarımını büyük oranda baskılaması, fraksiyonların anti-enflamatuvar etkili ajanlar taşıyabileceği fikrini desteklemektedir.

Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, *Cotinus coggygria* metanol fraksiyonunun 10 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında diğer *Cotinus coggygria*, *Teucrium sandrasicum*, *Stachys cretica* fraksiyonların aynı konsantrasyonlarına göre daha yüksek oranda PHA uyarımını inhibe ettiği görülmüştür. Bu bağlamda çalışmanın devam eden basamaklarına *Cotinus coggygria* ekstresi ile devam edilmiştir.

Cotinus coggygria ekstresi için MTT testi ve CFSE boyama sonuçları karşılaştırıldığında CFSE sonuçlarının MTT'ye göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun sebebinin, *Cotinus coggygria* metanol fraksiyonunun sahip olduğu yüksek anti-oksidan aktiviteden dolayı mitokondri aktivitesi olmaksızın MTT'yi formazana indirgediği düşünülmektedir [122, 123]. Bu sebeple CFSE sonuçlarının daha güvenilir olduğu düşünülmektedir.

Cotinus coggygria metanol fraksiyonunun uyarılmış PKMH'ler üzerindeki inhibe edici etkisi belirlendikten sonra bu etkinin apoptotik mekanizmalardan kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemek amacıyla Annexin V-PI boyama ile apoptoz belirlenmeye çalışılmıştır. Annexin V(-)/PI(-) Q₄ bölgesi canlı hücreler olarak kabul

edilmektedir ve bu bölgede yer alan hücre miktarı denenen bütün dozlar için anlamlı bir fark oluşturmamaktadır. Sadece PHA uyarımı ile hücrelerin %89'u bu bölgede yer almakta iken, artan ekstre miktarı ile birlikte bu oran %78 civarına düşmektedir. *Cotinus coggygia* metanol fraksiyonunun 100 µg/mL'ye kadar olan konsantrasyonlarının apoptozu uyarıcı bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Bu ekstrenin, PHA uyarımını durdurucu etkisinin apoptozdan kaynaklanmadığını göstermektedir [124].

Cotinus coggygia metanol fraksiyonunun PKMH'ler üzerindeki anti-proliferatif etkisini aydınlatılabilmek için T ve NK hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. *Cotinus coggygia* metanol fraksiyonunun, yardımcı T hücreleri üzerinde uyarımı durdurucu etkisinin sitotoksik T hücrelerine oranla 1, 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarında daha az olduğu dikkat çekicidir. NK hücrelerin de ise konsantrasyona bağımlı CD56^{parlak} ve CD56^{soluk} alt gruplar arasında bir fark saptanmamıştır. CD8⁺ T hücrelerinin otoimmün hastalıklardaki rolü farklı çalışmalarda gösterilmiştir [125, 126]. Bu bağlamda, *Cotinus coggygia* metanol fraksiyonunun etkisiyle, CD4⁺ T lenfositleri ile karşılaştırıldığında CD8⁺ T lenfositlerinin proliferatif yanıtının daha yüksek oranda inhibisyona neden olması bu fraksiyonun İmmün sistemi baskılayıcı etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

IL-1β'nin, Behçet hastalığı ve romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklar ile ilişkisi daha önce yapılan pek çok çalışmada gösterilmiştir [127-130]. Bu bağlamda, IL-1β gen anlatım düzeyindeki azalma *Cotinus coggygia* metanol fraksiyonunun baskılayıcı etkisini desteklemektedir. IL-2 gen ekspresyonundaki azalma ve IL-4 gen anlatımında ki artma ise stokin profilinin TH1 yönünden TH2 yönüne kaydığını göstermektedir. TH1 profilinin pek çok otoimmün hastalıkta baskın olduğu bilinmektedir [131]. Bu bağlamda TH2 profiline yönelme otoimmün hastalıkların tedavisi için önemli bir bulgu olarak görülmektedir. IL-10 miktarındaki azalma ise, düzenleyici T hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı ve/veya bu hücrelerdeki IL-10 gen ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığını göstermektedir. IL-10 genel baskılayıcı sitokin olarak işlev görmektedir. IL-10 miktarındaki azalma ise, T_{reg} hücrelerde azalmayı düşündürmektedir.

Cotinus coggygia metanol fraksiyonunun STL proliferasyonu, IL-1β ve IL-2 gen anlatım düzeylerindeki baskılayıcı etkisinin, sistemik lupus eritematozus, multipl

skleroz gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılabilir anti-enflamatuvar moleküller taşıdığı düşünmektedir.

Üç tanesi Türkiye'ye endemik 11 metanolik bitki fraksiyonunun T ve NK hücre proliferatif yanıtı üzerine etkilerini saptamak amacıyla yapılan çalışmamızda, *Cotinus coggygia* bitkisinin uyarılmış PKMH kültüründe T ve NK hücre proliferasyonunu diğer fraksiyonlara oranla anlamlı derecede baskıladığı saptanmıştır. Aynı zamanda IL-1 β ve IL-2 gen anlatım düzeylerinde azalma, IL-4 gen anlatım düzeyinde ise artış gözlenmiştir. Bulgularımız, *Cotinus coggygia* fraksiyonunun anti-enflamatuvar moleküller taşıyabileceğini düşündürmektedir. Bundan sonraki çalışmalarda, *Cotinus coggygia* bitki metanolik fraksiyonu oluşturan aktviteden sorumlu molekül ve/veya moleküllerin ayrıştırılarak bu moleküllerin etki mekanizmalarının ortaya konulması planlanmaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. NIAAD. *Disorders of the Immune System*. [web page on the Internet], Erişim 6.8.2018, <https://www.niaid.nih.gov/research/immune-system-disorders1>.
2. *Astma Facts*. [web page on the Internet], Erişim 1.8.2018, <http://www.aafa.org/page/asthma-facts.aspx>.
3. Bragazzi N.L., A. Watad, F. Brigo, M. Adawi, H. Amital ve Y. Shoenfeld. Public health awareness of autoimmune diseases after the death of a celebrity. *Clin Rheumatol*. 2017; **36**(8): 1911-1917.
4. Manjusha C., K. Vipin, M. Hitesh ve S. Surender. Medicinal plants with potential antiarthritic activity. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology* 2015: 147-179.
5. Turker A. ve H. Koyluoglu. Biological activities of some endemic plants in Turkey. *Romanian Biotechnological Letters* 2012: 6949-6961.
6. Salehi A., A. Kariminik ve Z. Hasanabadi. Antibacterial activity of methanol extracts of 4 plants used in traditional herbal medicine of Kerman. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences* 2013: 911-914.
7. Ponni V., S. Thenmozhi ve S. Rajan. Screening of bioactive potentials and phytochemical nature of Solanum trilobatum extracts. *Journal of Basic Applied Biology* 2009: 134-139.
8. *Autoimmune Disease Statistics*, in *American Autoimmune Related Diseases Association Web sitesi*. 2018.
9. Janeway C.A., P. Travers ve M. Walport, *Immunobiology*. New York: Garland; 2001.
10. Adams W. ve J.L. Nelson. Autoimmune disease during pregnancy and the microchimerism legacy of pregnancy. *Immunol Invest* 2008; **37**(5): 631-644.
11. Rajan T.V. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends in Immunology* 2003; **24**(7): 376-379.
12. Garfield E. Allergies are nothing to sneeze at: Part 1. Epidemiology and Etiology. *Essays of an Information Scientist* 1985; **8**: 119-131.
13. Peebles R.S., M.K. Church ve S.R. Durham, *Principles of allergy diagnosis*. China: Elsevier; 2012.
14. Abbas A., A.H. Lichtman ve S. Pillai, *Basic Immunology*. Cambridge: Elsevier; 2012.
15. Mothes N., R. Valenta ve S. Spitzauer, ,, 44 (2), 125-132. Allergy testing: the role of recombinant allergens. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2006; **44**(2): 125-132.
16. Deniz G. NK ve NKT hücreler. *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2007; **3**(43): 18-25.
17. Cooper M.A., T.A. Fehniger ve M.A. Caligiuri. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; **22**(11): 633-640.

18. Fehniger T.A., M.A. Cooper, G.J. Nuovo, M. Cella, F. Facchetti, M. Colonna, ve ark. . CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 2003; **101**(8): 3052-3057.
19. Aktas E., G. Erten, U.C. Kucuksezer ve G. Deniz. Natural killer cells: versatile roles in autoimmune and infectious diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 2009; **4**(5): 405-420.
20. Steinman L. Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nat Immunol* 2001; **2**(9): 762-766.
21. Deniz G., M. Akdis, E. Aktas, K. Blaser ve C.A. Akdis. Human NK1 and NK2 subsets determined by purification of IFN-gamma-secreting and IFN-gamma-nonsecreting NK cells. *Eur J Immunol* 2002; **32**(3): 879-884.
22. Chanvillard C., R.F. Jacolik, C. Infante-Duarte ve R.C. Nayak. The role of natural killer cells in multiple sclerosis and their therapeutic implications. *Front Immunol* 2013; **4**: 63.
23. Ferlazzo G., D. Thomas, S.L. Lin, K. Goodman, B. Morandi, W.A. Muller, ve ark. . The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* 2004; **172**(3): 1455-1462.
24. Dalbeth N., R. Gundle, R.J. Davies, Y.C. Lee, A.J. McMichael ve M.F. Callan. CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *J Immunol* 2004; **173**(10): 6418-6426.
25. Lunemann J.D. ve C. Munz. Do natural killer cells accelerate or prevent autoimmunity in multiple sclerosis? *Brain* 2008; **131**(7): 1681-1683.
26. Peakman M. ve D. Vergani, *Basic and Clinical Immunology (2.bs)*. New York: Churchill Livingstone; 2009
27. Moss R.B., T. Moll, M. El-Kalay, C. Kohne, W. Soo Hoo ve J. Encinas. Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: therapeutic implications. *Expert Opin Biol Ther* 2004; **4**(12): 1887-1896.
28. Coffman R.L. Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. *Nature Immunology* 2006; **7**(6): 539-541.
29. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; **22**: 531-562.
30. Takahashi T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh ve M. Iwata. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998; **10**(12): 1969-1980.
31. Levings M.K. ve M.G. Roncarolo. T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties. *J Allergy Clin Immunol* 2000; **106**(1): 109-112.

32. Pathak S., E. Goldofsky, E.X. Vivas, V.R. Bonagura ve A. Vambutas. IL-1b Is Overexpressed and Aberrantly Regulated in Corticosteroid Nonresponders with Autoimmune Inner Ear Disease. *The Journal of Immunology* 2011; **186**(3): 1870-1879.
33. Wan C.-K., C. He, L. Sun, C.E. Egwuagu ve W.J. Leonard. Interleukin-1 Receptor Signaling is Critical for the Development of Autoimmune Uveitis. *Journal of immunology* 2015; **196**(2): 543-546.
34. Krause K., M. Metza, M. Makrisb, T. Zuberbier ve M. Maurer. The role of interleukin-1 in allergy-related disorders. *Current Opinion* 2012; **12**(5): 477-484.
35. Heesen C., D.C. Mohr, I. Huitinga, F.T. Bergh, J. Gaab, C. Otte, ve ark. . Stress regulation in multiple sclerosis: current issues and concepts. *Mult Scler* 2007; **13**(2): 143-148.
36. Martinelli V. Trauma, stress and multiple sclerosis. *Neurol Sci* 2000; **21**(4): 849-852.
37. Marrie R.A. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol* 2004; **3**(12): 709-718.
38. Siegel J.P., M. Sharon, P.L. Smith ve W.J. Leonard. The IL-2 receptor beta chain (p70): role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities. *Science* 1987; **238**(4823): 75-78.
39. Mingari M.C., F. Gerosa, G. Carra, R.S. Accolla, A. Moretta, R.H. Zubler, ve ark. . Human interleukin-2 promotes proliferation of activated B cells via surface receptors similar to those of activated T cells. *Nature* 1984; **312**(5995): 641-643.
40. Liao W., J.X. Lin ve W.J. Leonard. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity* 2013; **38**(1): 1720-1725.
41. Haas H., F. Falcone, H. M., S. G., H. K., G. B., ve ark. . Early Interleukin-4: Its Role in the Switch towards a Th2 Response and IgE-Mediated Allergy. *Allergy and Immunology* 1999; **119**(2): 86-94.
42. Borish L.C., H.S. Nelson, M.J. Lanz, L. Claussen, J.B. Whitmore, J.M. Agosti, ve ark. . Interleukin-4 Receptor in Moderate Atopic Asthma A Phase I/II Randomized, Placebo-controlled Trial. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1999; **160**(6): 1816-1823.
43. Sallusto F. ve A. Lanzavecchia. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *Journal of Experimental Medicine* 1994; **179**(4): 1109-1118.
44. Li X., J. Mai, A. Virtue, Y. Yin, R. Gong, X. Sha, ve ark. . IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine--a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines. *PLoS One* 2012; **7**(3): 33628.

45. Eskdale J., D. Kube, H. Tesch ve G. Gallagher. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics* 1997; **46**(2): 120-128.
46. Mosser D.M. ve X. Zhang. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* 2008; **226**: 205-218.
47. Polat R., U. Cakilcioglu ve F. Satil. Traditional use of medicinal plants in Solhan (Bingöl-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology* 2013: 951-963.
48. Sagnia B., D. Fedeli, R. Casetti, C. Montesano, G. Falcioni ve V. Colizzi. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Extracts from *Cassia alata*, *Eleusine indica*, *Eremomastax speciosa*, *Carica papaya* and *Polyscia fulva* Medicinal Plants Collected in Cameroon. *Plos One* 2014: 1-10.
49. Turker A.U. ve A.B. Yildirim. Evaluation of Antibacterial and Antitumor Activities of Some Turkish Endemic Plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2013: 1003-1010.
50. Raja R.D.A., S. Jeeva, J. Prakash, J.M. Antosinamy ve V. Irudayaraj. Antibacterial activity of selected ethnomedicinal plants from South India. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2011: 375-378.
51. Zarinah Z., A. Maaruf, R. Nazaruddin, W. Wong ve X. Xuebing. Antioxidant, antimicrobial activity and in-vitro cytotoxicity screening study of Pili nut oil. *International Food Research Journal* 2014: 309-316.
52. Mann A., O. Ifarajimi, A. Adewoye, C. Ukam, E. Udemé, I. Okorie, ve ark. . In vivo antitrypanosomal effects of some ethnomedicinal plants from Nupeland of North Central Nigeria. *Journal of Traditional Complementary Alternative Medicine* 2011: 15-21.
53. Uddin S., I. Grice ve E. Tiralongo. Cytotoxic effects of Bangladeshi Medicinal Plant Extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2009: 1-7.
54. Askari V.R., R.V. Baradaran, R. , S.A. ve M.H. Boskabady. Auraptene regulates Th1/Th2/TReg balances, NF- κ B nuclear localization and nitric oxide production in normal and Th2 provoked situations in human isolated lymphocytes. *Phytomedicine* 2018(43): 1-10.
55. Ahluwalia B., M.K. Magnusson, S. Isaksson, F. Larsson ve L. Öhman. Effects of *Aloe barbadensis* Mill. extract (AVH200®) on human blood T cell activity in vitro. *Journal of Ethnopharmacology* 2016(179): 301-310.
56. Baytop T., *Türkiye'de Bitkilerle Tedavi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 1999.
57. Sen A., S.O. Turan ve L. Bitis. Bioactivity-guided isolation of anti-proliferative compounds from endemic *Centaurea kilaea*. *Pharmaceutical Biology* 2017: 541-546.
58. Davis P., *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh: Edinburgh University Press; 1975.
59. Guner A., N. Ozhatay, T. Ekim ve K. Baser, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh: Edinburgh University Press; 2000.

60. Tuzlacı E., D. İsbilen ve G. Bulut. Turkish folk medicinal plants,. *Marmara Pharm J.* 2010: 47-52.
61. Kültür Ş. *Centaurea nerimaniae* sp. nov.(Asteraceae) from south Anatolia, Turkey. *Nordic Journal of Botany* 2010; **28**(5): 613-616.
62. Bona M. An overview to *Centaurea* s.p. (Asteraceae) based on Herbarium specimens of ISTE. *Journal of Faculty Pharmacy of Istanbul University* 2013; **43**(2): 121-137.
63. Karagöz A. ve F.T. Artun. In vitro evaluation of antioxidant activity of some plant methanol extracts. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2015; **29**(6): 1-6.
64. Artun F.T., A. Karagoz, G. Özcan ve N. Sutlupinar. In Vitro Anticancer and Cytotoxic Activities of Some Plant Extracts on HeLa and Vero Cell Lines. *Journal of B.U.ON* 2016; **21**(3): 720-725.
65. Artun F.T., A. Karagoz, Z. Zeybek ve Ş. Kültür. Evaluation of antibacterial activity of some plant methanolic extracts. *Fresenius Environmental Bulletin* 2016; **25**(12): 5419-5423.
66. Bitkileri T. *Centaurea behen* [web page on the Internet], Erişim 10.8.2018, <https://www.turkiyebitkileri.com/tr/fotoğraf-galerisi/view-photo/1009/3516.html>.
67. Marčetić M., D. Božić, M. Milenković, N. Malešević, S. Radulović ve N. Kovačević. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activity of young shoots of the smoke tree *Cotinus coggygria* Scop.,. 2013; **27**(11).
68. Matic S., S. Stanić, D. Bogojević, M. Vidaković, N. Grdović, S. Dinić, ve ark. . Methanol extract from the stem of *Cotinus coggygria* Scop., and its major bioactive phytochemical constituent myricetin modulate pyrogallol-induced DNA damage and liver injury. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2013; **755**(2): 81-89.
69. Bitkileri T. *Cotinus coggygria* [web page on the Internet], Erişim 2.8.2018, <https://www.turkiyebitkileri.com/tr/fotoğraf-galerisi/view-photo/5337/23794.html>.
70. Edwards J.E., P.N. Brown, Talent, N., T.A. Dickinson ve P.R. Shipley. A Review of the Chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry* 2012; **79**: 5-26.
71. Kumar D., V. Arya, Z.A. Bhat, N.A. Khan ve D.N. Prasad. The genus *Crataegus*: chemical and pharmacological perspectives. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2012; **22**(5): 1187-1200.
72. Özyürek M., M. Bener, K. Güçlü, A.A. Dönmez, S. Süzgeç-Selçuk, S. Pırıldar, ve ark. . Evaluation of antioxidant activity of *Crataegus* species collected from different regions of Turkey. *Records of Natural Products* 2012; **6**(3): 263-277.
73. Melikoğlu G., L. Bitiş ve A.H. Meriçli. Flavonoids of *Crataegus microphylla*, Natural Product Research. 2004; **18**(3): 211-213.
74. Bitkileri T. *Crataegus microphylla* [web page on the Internet], Erişim 4.8.2018, <https://www.turkiyebitkileri.com/tr/fotoğraf-galerisi/view-album/5337.html>.

75. Ghanbari R., F. Anwar, K.M. Alkharfy, A.H. Gilani ve N. Saari. Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.) a review. *International Journal of Molecular Sciences*; **13**(3): 3291-3340.
76. Omer S.A., M.A. Elobeid, M.H. Elamin, Z.K. Hassan, P. Virk, M.H. Daghestani, ve ark. . Toxicity of olive leaves (*Olea europaea* L.) in Wistar Albino rats. . *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 2012; **7**(11): 1175-1182.
77. Gonzàles M.S., G. Lozano-Mena, M.E. Juan, A. Garcìa-Granados ve J.M. Planas. Assessment of the safety of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L. *Molecular Nutrition & Food Research* 2013; **51**(2): 339-346.
78. Marino S., C. Festa, F. Zollo, A. Nini, L. Antenucci, G. Raimo, ve ark. . Antioxidant Activity and Chemical Components as Potential Anticancer Agents in the olive leaf (*Olea europaea* ev Leccino). *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2014; **14**(10): 1376-1385.
79. Bitkileri T. *Olea europaea* [web page on the Internet], Erişim 28.7.2018, <https://www.turkiyebitkileri.com/tr/fotoğraf-galerisi/view-photo/1036/3700.html>.
80. Rusanov K., N. Kovacheva, M. Rusanova ve I. Atanassov. Traditional Rosa damascena flower harvesting practices evaluated through GC/MS metabolite profiling of flower volatiles,. *Food Chemistry* 2011; **129**(4): 1851-1859.
81. Basim E. ve H. Basim. Antibacterial activity of Rosa damascena essential oil. *Fitoterapia* 2003; **74**(4): 394-396.
82. Bitkileri T. *Rosa damascene*. [web page on the Internet], Erişim <https://www.turkiyebitkileri.com/tr/fotoğraf-galerisi/view-album/5395.html>.
83. Gören A.C. Use of Stachys Species (Mountain Tea) as Herbal Tea and Food. *Records of Natural Products* 2014; **8**(2): 71-82.
84. Tundis R., L. Peruzzi ve F. Menichini. Phytochemical and Biological Studies of Stachys species in Relation to Chemotaxonomy: A Review. *Phytochemistry* 2014; **102**: 7-39.
85. Bitkileri T. *Stachys cretica*. [web page on the Internet], Erişim 7.8.2018, <https://www.turkiyebitkileri.com/tr/fotoğraf-galerisi/view-album/4075.html>.
86. Kaya A., B. Demirci ve K.H.C. Başer. Compositions of Essential Oils and Trichomes of *Teucrium chamaedrys* L. subsp. *Trapezunticum* Rech. fil. and subsp. *sypsiense* (C. Koch) Rech. fil.,. *Chemistry & Biodiversity*, 2009; **6**(1): 96-104.
87. Kılıç Ö. Essential oil composition of four *Teucrium* L. taxa from Turkey, their chemotaxonomy and potential usefulness. *International Journal of Pharmacy Education and Research* 2014; **1**(2): 68-73.
88. Özcan N.T., T. Dırmancı, E. Martin ve F. Altınordu. Cytotaxonomical study in five taxa of the genus *Teucrium* L.(Lamiaceae). *Caryologia* 2015; **68**(1): 1-8.
89. Bitkileri T. *Teucrium sandrasicum*. [web page on the Internet], Erişim 7.8.2018, <https://www.turkiyebitkileri.com/tr/fotoğraf-galerisi/view-album/4122.html>.

90. Öztürk S. ve S. Ercisli. Broad-spectrum antibacterial properties of *Thymus fallax*. *Pharmaceutical Biology* 2005; **43**(7): 609-613.
91. Tuzlacı E., *Şifa Niyetine Türkiye'nin Bitkisel Halk İlaçları*. İstanbul: Alfa Yayınları; 2006.
92. Sökmen A., M. Güllüce, H.A. Akpulat, D. Daferera, B. Tepe, M. Polissiou, ve ark. . The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control* 2004; **15**(8): 627-634.
93. Tepe B., D. Daferera, M. Sökmen, M. Polissiou ve A. Sökmen. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; **52**: 1132–1137.
94. Al-Bayati F. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 2008; **116**: 403-406.
95. Bitkileri T. *Thymus praecox*. [web page on the Internet], Erişim <https://www.turkiyebitkileri.com/tr/fotoğraf-galerisi/view-album/4137.html>.
96. Plantarium. *Thymus pseudopulegioides*. [web page on the Internet], Erişim <http://www.plantarium.ru/page/image/id/146586.html>.
97. Bitkileri T. *Thymus sipyleus*. [web page on the Internet], Erişim <https://www.turkiyebitkileri.com/tr/fotoğraf-galerisi/view-album/4140.html>.
98. Sahin F., M. Güllüce, D. Daferera, A. Sökmen, M. Sökmen, P. M., ve ark. . Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control* 2004; **15** 549–557.
99. Kürşat M. ve P.T.A.A.o.M.E.o.S. Erecevit. The Antimicrobial Activities of Methanolic Extracts of Some Lamiaceae Members Collected from Turkey. *Turkish Journal of Science & Technology* 2009; **4**(1): 81-85.
100. Bitkileri T. *Origanum vulgare*. [web page on the Internet], Erişim <https://www.turkiyebitkileri.com/tr/fotoğraf-galerisi/view-album/3924.html>.
101. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983: 55-63.
102. Ostad S.N., A. Rajabi, R. Khademi, F. Farjadmand, M. Eftekhari, A. Hadjiakhoondi, ve ark. . Cytotoxic Potential of *Centaurea bruguierana* ssp. *belangerana*: The MTT Assay. *Acta Medica Iranica* 2016: 583-589.
103. Lyons A.B. ve C.R. Parish. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 1994: 131-137.
104. Lyons A.B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *Journal of Immunological Methods* 2000: 147-154.
105. Banks H.T., K.L. Sutton, W.C. Thompson, G. Bocharov, M. Doumic, T. Schenkel, ve ark. . A New Model for the Estimation of Cell Proliferation

- Dynamics Using CFSE Data. *Journal of Immunological Methods* 2012: 143-160.
106. Luzyanina T., D. Roose, T. Schenkel, M. Sester, S. Ehl, A. Meyerhans, ve ark. . Numerical modelling of label-structured cell population growth using CFSE distribution data. *Theoretical Biology and Medical Modelling* 2007: 26-40.
 107. Luzyanina T., S. Mrusek, J.T. Edwards, D. Roose, S. Ehl ve G. Bocharov. Computational analysis of CFSE proliferation assay. *Mathematics Subject Classification* 2006: 1-35.
 108. Zhaoxia W., W. Yang, C. Yunfei ve L. Jiyuan. The IL-24 gene protects human umbilical vein endothelial cells against H₂O₂-induced injury and may be useful as a treatment for cardiovascular disease. *International Journal of Molecular Medicine* 2016; **37**(3): 581-592.
 109. Bustin S.A., V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, ve ark. . The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; **55**(4): 611-622.
 110. Merluzzi S., B. Frossi, G. Gri, S. Paruss, C. Tripodo ve C. Pucill. Mast cells enhance proliferation of B lymphocytes and drive their differentiation. *BLOOD* 2010: 2810-2819.
 111. Masoli M., D. Fabian, S. Holt ve R. Beasley. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy* 2004; **59**: 469-478.
 112. Ohnishi S. ve H. Takeda. Herbal medicines for the treatment of cancer chemotherapy-induced side effects. *Front Pharmacol.* 2015: 6-14.
 113. Gewirtz D., M. Bristol ve J. Yalowich. Toxicity issues in cancer drug development. *Curr Opin Investig Drugs* 2010: 612-616.
 114. Alfarouk K.O., C.-M. Stock, S. Taylor, M. Walsh, A.K. Muddathir, D. Verduzco, ve ark. . Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell Int.* 2015: 71-83.
 115. Cragg G.M. ve D.J. Newman. Natural Product Drug Discovery in the Next Millennium. *Pharmaceutical Biology* 2001: 8-17.
 116. Witacenis A., L.N. Seito, A.d.S. Chagas, L.D.d.A. Junior, A.C. Luchini, P. Rodrigues-Orsi, ve ark. . Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. *Phytomedicine* 2014; **21**(3): 240-246.
 117. Conforti F., S. Sosa, M. Marrelli, F. Menichini, G. A.Statti, D. Uzunov, ve ark. . In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of Ethnopharmacology* 2008; **116**(1): 144-151.
 118. Guardia T., A.E. Rotelli, A.O. Juarez ve L. EugeniaPelzer. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il Farmaco* 2001; **56**(9): 683-687.
 119. Chakrabarti R., S. Kundu, S. Kumar ve R. Chakrabarti. Vitamin A as an enzyme that catalyzes the reduction of MTT to formazan by vitamin C. *J. Cell. Biochem* 2000: 133-138.

120. Lim S.-W., H.-S. Loh, K.-N. Ting, T.D. Bradshaw ve Z.N. Allaudin. Reduction of MTT to Purple Formazan by Vitamin E Isomers in the Absence of Cells. *Tropical Life Sciences Research* 2015: 111-120.
121. Natarajan M., S. Mohan, M. B.R., M. M.L. ve T.S. Herman. Antioxidant compounds interfere with the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide cytotoxicity assay. *Cancer Detect. Prev* 2000: 405-414.
122. Šavikin K., G. Zdunić, T. Janković, T. Stanojković, Z. Juranić ve N. Menković. In vitro cytotoxic and antioxidative activity of *Cornus mas* and *Cotinus coggygia*. *Natural Product Research* 2009; **23**(18): 1731-1739.
123. Marčetić M., D. Božić, M. Milenković, N. Malešević, S. Radulović ve N. Kovačević. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activity of young shoots of the smoke tree, *Cotinus coggygia* Scop. *Phytotherapy Research*; **27**(11): 1658-1663.
124. Ahluwalia B., M.K. Magnusson, S. Isaksson, F. Larsson ve L. Öhman. Effects of *Aloe barbadensis* Mill. extract (AVH200®) on human blood T cell activity in vitro. *J Ethnopharmacol* 2016; **179**: 301-309.
125. Walter U. ve P. Santamaria. CD8+ T cells in autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* 2005; **17**(6).
126. G.X. Zhang B.G.X., M. Bakhiet, P. van der Meide, H. Wigzell, H. Link, T. Olsson. Both CD4+ and CD8+ T cells are essential to induce experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Exp Med.* 1996; **184**(349-356).
127. Alten R., J. Gomez-Reino ve P. Durez. Efficacy and safety of the human anti-IL-1beta monoclonal antibody canakinumab in rheumatoid arthritis: results of a 12-week, phase II, dose-finding study. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2011; **12**(153).
128. Navarro-Sarabia F., R. Ariza-Ariza, B. Hernandez-Cruz ve I. Villanueva. Adalimumab for treating rheumatoid arthritis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2005; **3**.
129. Hamzaoui K., M. Hamza ve K. Ayed. Production of TNF- α and IL-1 in active Behcet's disease. *The Journal of Rheumatology* 1990; **17**(10): 1428-1429.
130. Cantarini L., A. Vitale, M. Borri, M. Galeazzi ve R. Franceschini. Successful use of canakinumab in a patient with resistant Behçet's disease. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2012; **30**(3): 115-120.
131. Whitacre C.C., S.C. Reingold, P.A. O'Looney, E. Blankenhorn, F. Brinley, E. Collier, ve ark. . A Gender Gap in Autoimmunity. *Science* 1999; **283**(5406): 1277-1278.

HAM VERİLER



FORMLAR

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bu form, İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı, Prof. Dr. Günnur Deniz tarafından hazırlanan “Çeşitli Bitkisel Fraksiyonların İnsan Periferik Kan T ve NK Hücre Çoğalması Üzerine Etkileri” konulu proje ile ilgilidir.

Günümüzde doğal ürünler yeni ilaçların kaynağı olarak büyük önem taşımaktadır. Anti-kanser bileşiklerinin yaklaşık %60'ı ve bulaşıcı hastalıklar için kullanılan ilaçların %75'i doğal ürünlerden veya bunların türevlerinden elde edilmektedir. Bitki türevi bileşikler ve bunların yarı sentetik veya sentetik analogları, insan hastalıkları için farmasötik maddelerin başlıca kaynağıdır. İlaç geliştirmenin en önemli adımlarından bir tanesi de bu doğal ürünlerdeki biyoaktif moleküllerin keşfedilmesi ve biyoaktivitelerin tanımlanmasıdır. Bu amaçla günümüzde bitkisel fraksiyonlar ve bu fraksiyonlardan elde edilen saf maddeler üzerinde yoğun olarak çalışılmakta, bu fraksiyonlar ve saf maddelerin antiinflamatuvar, antiviral, antibakteriyel, antitümoral ve antioksidan aktiviteleri ortaya konmaktadır. Özellikle son yıllarda allerji ve otoimmünite kaynaklı hastalıkların giderek artması, enflamasyonun kontrol edilmesinin önemini göstermekte ve antiinflamatuvar etkili yeni maddelerin bulunmasını gerektirmektedir. Bu sebeple endemik olan bitkisel fraksiyonların ve bitkisel saf maddelerin immün sistem üzerine olan etkilerinin iyi araştırılması ve bu etki mekanizmalarının tanımlanması önem arz etmektedir.

Litaratürde henüz yeri olmayan ülkemize ait endemik bitkilerden elde edilecek fraksiyonların ve bitkisel ürünlerin insan periferik kan hücreleri üzerindeki antiinflamatuvar potansiyelleri ortaya konacaktır. Sağlıklı bireylerden elde edilen kan örneklerinden ficoll yardımıyla periferik kan mononükleer hücreler (PKMH) izole edilecek ve bitkisel fraksiyonların PKMH'ler üzerindeki CD50 dozu belirlenecektir. Daha sonrasında, kontrol grubunda PKMH'ler hücre kültürü ortamında Fitohemaglutin (PHA) ile uyarılacak ve maksimum çoğalma değeri elde edilecektir. PHA'ya ek olarak, farklı bitkisel fraksiyonlar denenerek T ve NK hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkilerine (antiinflamatuvar etkileri) akan hücre ölçer ile değerlendirilecektir.

Proje kapsamında;

Sizin üzerinizde herhangi bir tedavi veya bir işlem denenmeyecek, herhangi bir madde verilmeyecektir. Sizden bir hekim tarafından 10 ml kan alınacaktır. Alınacak kan laboratuvar ortamında taranacaktır.

Ayrıca, sizlerden yapılan işlemler nedeniyle ücret alınmayacak ve ödeme yapılmayacaktır. Çalışmaya katılmayı kabul etmezseniz veya ayrılmak isterseniz bu durum olağan tıbbi bakımlarınızı etkilemeyecektir.

Ayrıca test öncesi ve sonrası tüm sorunlarınızda Prof. Dr. Günnur Deniz'i 0212 414 20 97 nolu telefondan arayabilirsiniz. Araştırmanın herhangi bir aşamasında çalışmayı terk edebilirsiniz.

Tüm yukarıdaki bilgiler tarafıma Prof. Dr. Günnur Deniz tarafından anlatıldı.

Şahsıma İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü laboratuvarında yukarıda adı geçen tüm ilaçlı--ilaçsız tetkik yöntemlerinin hepsinin yapılmasını ve her türlü sonucunu kabul ediyorum.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün

Adı-Soyadı,..... Tarih:.....

Adresi: Telefon no:.....

İmzası.....:

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin

Adı-Soyadı:..... Tarih:.....

Adresi: Telefon no:.....

İmzası.....:

Sorumlu Araştırmacı

Adı Soyadı: Prof. Dr. Günnur Deniz

İmza:

Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü

Tarih:

İmmünoloji Anabilim Dalı

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 821

Konu: Prof. Dr. Günnur DENİZ hk.

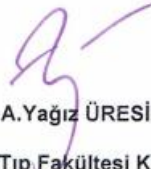
Tarih : 30.06.2017

Sayın Prof. Dr. Günnur DENİZ
İmmünoloji Anabilim Dalı

İlgi : İmmünoloji Anabilim Dalının 19/06/2017 gün ve 232803 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Araş. Gör. Utku GÜNEŞ' in yürüteceği 2017/747 dosya numaralı "Çeşitli Bitkisel Fraksiyonların İnsan Periferik Kan T ve NK Hücre Çoğalması Üzerine Etkileri" başlıklı çalışma kurulumuzun 23/06/2017 gün ve 12 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurul Başkanı

PATENT HAKKI İZİNİ



TELİF HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ÇEŞİTLİ BİTKİSEL FRAKSİYONLARIN İNSAN PERİFERİK KAN T VE NK HÜCRE ÇOĞALMASI ÜZERİNE ETKİLERİ

ORJİNALLIK RAPORU

%3 BENZERLİK ENDEKSİ	%2 İNTERNET KAYNAKLARI	%0 YAYINLAR	%1 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	-------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
2	mikrobiyoloji.info İnternet Kaynağı	<%1
3	dbimmun.turkiyeklinikleri.com İnternet Kaynağı	<%1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
5	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to Middle East Technical University Öğrenci Ödevi	<%1
7	OĞUZKAN, Sibel Bayıl, UZUN, Serpil UĞRAŞ, CAN, Merve, UZUN, Ayşe, ÜLGER, Sultan, ÜZMEZ, Şebnem, KARAGÜL, Bora, KILIÇ, Halil İbrahim, ÖZASLAN1, Mehmet and UĞRAŞ, Halil İbrahim. "Fındık (Corylus avellana L.) Yeşil	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Utku	Soyadı	Güneş
Doğ.Yeri	Denizli	Doğ.Tar.	17.03.1988
Uyruğu	TC	TC Kim No	37381179278
Email	utkugunes@istanbul.edu.tr	Tel	05547310193

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi Moleküler Biy. ve Genetik Bölümü	2014
Lise	Özel Bostancı Doğa Koleji	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevli	İstanbul Üniversitesi	2016-devam
2.	Memur	Boğaziçi Üniversitesi	2009-2016
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	YDS Puanı	Yök-DİL Puanı
İngilizce	Çok iyi	Orta	İyi	79	82

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	87	-	-
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

