

**MYRTUS COMMUNIS L. BİTKİSİNİN MEYVESİNDEN
ELDE EDİLEN UÇUCU YAĞIN HUVEC HÜCRE
HATTINDA LPS İLE İNDÜKLENEN ENDOTOKSEMİYE
BAĞLI HÜCRE HASARINA ETKİLERİNİN
BİYOKİMYASAL OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Zerrin KUTLU

Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Mine GÜLABOĞLU

Doktora Tezi – 2017

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***MYRTUS COMMUNIS L.* BİTKİSİNİN MEYVESİNDEN
ELDE EDİLEN UÇUCU YAĞIN HUVEC HÜCRE
HATTINDA LPS İLE İNDÜKLENEN ENDOTOKSEMİYE
BAĞLI HÜCRE HASARINA ETKİLERİNİN
BİYOKİMYASAL OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Zerrin KUTLU

Biyokimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mine GÜLABOĞLU

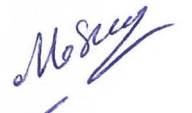
Erzurum
2017


T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**MYRTUS COMMUNIS L. BİTKİSİNİN MEYVESİNDEN
ELDE EDİLEN UÇUCU YAĞIN HUVEC HÜCRE
HATTINDA LPS İLE İNDÜKLENEN ENDOTOKSEMİYE
BAĞLI HÜCRE HASARINA ETKİLERİNİN
BİYOKİMYASAL OLARAK ARAŞTIRILMASI**


Zerrin KUTLU

Tez Savunma Tarihi : 26.12.2017

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mine GÜLABOĞLU (Atatürk Üniversitesi) 

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zekai HALICI (Atatürk Üniversitesi) 

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Nermin KILIÇ (19 Mayıs Üniversitesi) 

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Yasin BAYIR (Atatürk Üniversitesi) 

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Esra DİLEK (Erzincan Üniversitesi) 

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM - 2017

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
TABLOLAR DİZİNİ.....	XIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Bitkilerle Tedavi	3
2.2. <i>Myrtus communis</i> L. Türünün Bitki Sistematiğindeki Yeri.....	4
2.2.1. <i>Myrtus communis</i> L.	4
2.2.2. <i>Myrtus communis</i> L. Türünün Geleneksel Uygulaması.....	5
2.3. Uçucu Yağlar	6
2.3.1. <i>Myrtus communis</i> L. Türünden Elde Edilen Uçucu Yağın Kimyasal Bileşeni.....	8
2.3.2. <i>Myrtus communis</i> L. Türü Uçucu Yağ ve Bileşenleri Üzerine Yapılan	
2.3.2.1. Antiinflamatuar Etki	9
2.3.2.2. Antibakteriyel Etki.....	12
2.3.2.3. Antioksidan Etki	14
2.3.2.4. Diğer Biyolojik Etkileri	15
2.4. Sepsise İmmün Yanıt	17
2.4.1. İnflamatuar Yanıt.....	19
2.4.2. İnflamasyon	21
2.4.3. İmmün Sistem ve Sistemik İnflamatuar Yanıt Sendromu	22
2.4.4. Sistemik İnflamatuar Yanıt Sendromu Mediatorleri	22

2.5. Sepsis	23
2.5.1. Sepsisin Etiyolojisi	24
2.5.2. Sepsisin Epidemiyolojisi.....	25
2.5.3. Sepsis Fizyopatolojisi	25
2.6. Sitokinler.....	29
2.6.1. Tümör Nekrozis Faktör (TNF)	30
2.6.2. İnterlökin -1 (IL-1).....	30
2.6.3. İnterlökin -6 (IL-6).....	31
2.6.4. Nitrik Oksit (NO).....	31
2.7. Lipopolisakkarit Antijeni (LPS)	32
2.7.1. Endotoksin	34
2.7.2. LPS'nin Sinyal İletisi.....	35
3. MATERYAL VE METOT.....	36
3.1. Materyal.....	36
3.1.1. Bitki Materyali.....	36
3.1.2. Hücre Soyları	36
3.1.3. Kimyasal Maddeler ve Kitler.....	36
3.1.3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	37
3.1.4. Aletler ve Cihazlar	37
3.2. Metot.....	38
3.2.1. <i>Myrtus communis</i> L. Türünün Meyvesi Üzerinde Yapılan Uçucu Yağ Analiz Çalışmaları.....	38
3.2.2. Deney Protokolü ve Detayları.....	39
3.2.3. Hücre Kültürü ve Proliferasyon Analiz Protokolü	41
3.2.4. Moleküler İnceleme	43

3.2.4.1. Real-Time PCR.....	43
3.2.5. İstatistiksel Analiz.....	44
4. BULGULAR.....	46
4.1. IC50 Değerlerinin Hesaplanması.....	46
4.2. xCELLigence Analiz Bulguları	48
4.2.1. MC Uçucu Yağının HUVEC Proliferasyonuna Etkisi	48
4.2.2. 1.8 sineol'nin HUVEC Proliferasyonuna Etkisi	50
4.2.3. α -pinen'nin HUVEC Proliferasyonuna Etkisi	51
4.2.4. α -terpineol'nin HUVEC Proliferasyonuna Etkisi	52
4.3. Moleküler Bulgular.....	54
4.3.1. <i>Myrtus communis</i> L. Bitkisinin Meyvelerinden Elde Edilen Uçucu Yağa Ait Moleküler Bulgular.....	54
4.3.1.1. TNF- α 'nın mRNA Ekspresyonları	54
4.3.1.2. IL-1 β 'nin mRNA Ekspresyonları	55
4.3.1.3. IL-6'nin mRNA Ekspresyonları	55
4.3.1.4. eNOS'in mRNA Ekspresyonları.....	56
4.3.2. 1.8 sineol Bileşiğine Ait Moleküler Bulgular	57
4.3.2.1. TNF- α 'nın mRNA Ekspresyonları	57
4.3.2.2. IL-1 β 'nin mRNA Ekspresyonları	58
4.3.2.3. IL-6'nin mRNA Ekspresyonları	59
4.3.2.4. eNOS'in mRNA Ekspresyonları.....	60
4.3.3. α -pinenBileşiğine Ait Moleküler Bulgular	60
4.3.3.1. TNF- α 'nın mRNA Ekspresyonları	60
4.3.3.2. IL-1 β 'nin mRNA Ekspresyonları	61
4.3.3.3. IL-6'nin mRNA Ekspresyonları	62

4.3.3.4. eNOS'in mRNA Ekspresyonları.....	63
4.3.4. α -terpineol Bileşğine Ait Moleküler Bulgular.....	64
4.3.4.1. TNF- α 'nın mRNA Ekspresyonları	64
4.3.4.2. IL-1 β 'nin mRNA Ekspresyonları	65
4.3.4.3. IL-6'nin mRNA Ekspresyonları	66
4.3.4.4. eNOS'in mRNA Ekspresyonları.....	66
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	74
EKLER	87
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	87
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	88

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması, Bilimsel Araştırma Projesi olarak hazırlanması ve yazım aşamasında bilgi, birikim ve tecrübelerinden faydalandığım, desteklerini, emeğini, sabrını hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmanın planlanması ve yürütülmesi esnasında her an yanımda olan, saygı değer danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mine GÜLABOĞLU'na,

Eğitimim boyunca bana bilgi ve tecrübelerinden yararlanma olanağı veren, mesleki becerilerimin olgunlaşmasında büyük katkısı bulunan, bilimsel düşüncenin nasıl olması gerektiği hususunda bana çok şey katan, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Zekai HALICI'ya, çalıştığım bitkinin teşhisini yapan Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ali ASLAN'a, bitkiden uçucu yağ elde edilmesine yardımcı olan Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünden Uzman Ufuk Atmaca'ya, manevi desteğiyle her zaman yanımda olan Yrd. Doç. Dr. Başak TOĞAR'a akabinde tüm değerli hocalarıma ve Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda görev yapmakta olan, bu uzun ve yorucu süreçte birlikte çalışmaktan büyük zevk ve onur duyduğum asistan arkadaşlarım İrfan ÇINAR'a, Büşra DİYARBAKIR'a, ve Büşra DİNÇER'e, bu çalışmayı **2016/115 BAP** proje numaraları ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, hayatımın her anında desteği, sabrı ve yardımlarıyla yanımda olan anneme ve abim Fatih KUTLU'ya, en içten teşekkürlerimi sunarım. *Rahmetli babam Metin KUTLU'ya ithafen...*

Zerrin KUTLU

ÖZET

***Myrtus Communis L.* Bitkisinin Meyvesinden Elde Edilen Uçucu Yağın HUVEC Hücre Hattında LPS İle İndüklenen Endotoksemiye Bağlı Hücre Hasarına Etkilerinin Biyokimyasal Olarak Araştırılması**

Amaç: Bakteriyel enfeksiyonların neden olduğu sistemik inflamatuvar bir yanıt olan sepsisin patogeneğinde endotel hücre hasarının anahtar rol oynadığı *in-vivo* ve *in-vitro* çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, yüksek antiinflamatuvar etkiye sahip olan *Myrtus communis L.* (MC) bitkisinin meyvelerine ait uçucu yağ ve bileşenlerinin, antiinflamatuvar mediatörler üzerine de etkili olduğu da belirlenmiştir. Bu sebeple bu çalışmada, MC bitkisinin meyvelerine ait uçucu yağ ve bileşenlerinin; sepsisin neden olduğu endotel hücre hasarına olan etkileri *in vitro* sepsis modelinde moleküler ve hücresel açıdan incelenmiştir.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda, insan göbek kordonu veni endotel hücre hattı (HUVEC) kullanıldı. Lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen sepsis modelinde, gruplar kontrol, LPS, MC, MC+LPS, 1.8 sineol, 1.8 sineol+LPS, α -pinen, α -pinen+LPS, α -terpineol, α -terpineol+LPS olacak şekilde belirlendi. Hücre proliferasyonları xCELLigence® sistemi ile analiz edildi. Ayrıca, tümör nekrozis faktörü (TNF- α), interlökin-1 β (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6) ve eNOS (endotelial nitrik oksit) sitokinlerinin mRNA ekspresyonları kantitatif polimeraz zincir reaksiyon (qPCR) analizi kullanılarak tespit edildi.

Bulgular: Yaptığımız çalışmada, MC, terpineole, 1.8 sineol ve α -pinenbileşiklerinin HUVEC hücre hatlarına belirli dozlarda uygulanması kontrol grubuna göre hücresel indekste bir değişikliğe neden olmamıştır. HUVEC hücre hatlarına LPS uygulaması ise zamana bağlı olarak hücresel indekste anlamlı derecede azalmaya neden olmuştur. MC+LPS ve α -terpineol+LPS gruplarının LPS kontrol grubuna göre azalmış hücre indeksini düzeltmemiş; 1.8 sineol+LPS ve α -pinen+LPS bileşiklerinin ise LPS kontrol grubuna göre azalmış hücre indeksini anlamlı derecede artırdığını kontrole yaklaştırdığı tespit edilmiştir. qPCR analiz sonuçlarına göre; LPS ile indüklenmiş hücresel hasarda MC uçucu yağı ve α -terpineol bileşiklerinin uygulanması artmış olan TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve eNOS mRNA ekspresyonlarını anlamlı derecede düşüremezken; 1.8 sineol ve α -pinen bileşiklerinin uygulanması ise LPS ile indüklenmiş TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve eNOS mRNA ekspresyonlarını anlamlı derecede düşürdüğü gözlemlenmiştir.

Sonuç: MC bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağın ve MC bitkisinin meyvelerine ait bileşiklerden α -terpineol bileşiğinin LPS ile oluşturulmuş endotel hücre hasarına bağlı gelişen azalmış hücre indeksine ve artmış sitokin cevabına etkilerinin bulunmadığı gösterilmiştir. Bununla beraber MC bitkisinin meyvelerine ait diğer major bileşenlerden olan 1.8 sineol ve α -pinen moleküllerinin LPS ile oluşturulmuş HUVEC hücre hasarını hücresel indeks ve biyomoleküler seviyede (TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve eNOS) düzelttiği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: HUVEC, LPS, *myrtus communis L.*, sepsis, 1.8 sineol, α -pinen, α -terpineol

ABSTRACT

Biochemical Investigation of the Effects of Essential Oil Obtained from *Myrtus Communis* L. Plant Fruit on Endotoxemia-Induced Cell Damage Induced by LPS in HUVEC Cell Line

Aim: In-vivo and in-vitro studies have proved that endothelial cell damage plays a key role in the pathogenesis of sepsis, a systemic inflammatory response caused by bacterial infections. In addition to this, it has been determined that the essential oils and components of the fruits of *Myrtus communis* L. (MC) plant, which has a high antiinflammatory effect, are also effective on antiinflammatory mediators. For this reason, in this study, the effects of the essential oils and components of the fruits of the MC plant, on endothelial cell damage caused by sepsis were investigated in terms of molecular and cellular aspects in vitro sepsis model.

Material and Method: In our study, human umbilical cord vein endothelial cell line (HUVEC) was used. In the lipopolysaccharide (LPS) induced invitro sepsis model, groups were determined as control, LPS, MC, MC + LPS, 1.8 cineole, 1.8 cineole + LPS, α -pinene, α -pinene+ LPS, α -terpineole, α -terpineole + LPS. Cell proliferations were analyzed by the xCELLigence® system. In addition, mRNA expressions of tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and eNOS (endothelial nitric oxide) cytokines were determined using quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis.

Results: As a result, applicaiton of MC, terpineole, 1.8 sineol and α -pinencompounds at specific doses to HUVEC cell lines did not cause a cellular index change compared to the control group. The application of LPS to HUVEC cell lines led to a significant decrease in cellular index, depending on the time. It has been determined that MC + LPS and α -terpineole + LPS groups couldn't correct the cell index which is decreased compared to the LPS control group; 1.8 cineole + LPS and α -pinene+ LPS compounds increased the cell index which is decreased compared to the LPS control group significantly and brought it closer to control. According to qPCR analysis results; it was observed that the application of MC essential oil and α -terpineol compounds to LPS-induced cellular damage did not significantly reduce increased TNF- α , IL-1 β , IL-6 and eNOS mRNA expression; the application of 1.8 cineole and α -pinencompounds significantly reduced LPS-induced TNF- α , IL-1 β , IL-6 and eNOS mRNA expression.

Conclusion: It has been shown that α -terpineol compound one of the compounds of MC plant fruits and essential oil obtained from MC plant fruits have no effect on increased cytokine response and decreased cell index due to LPS-induced endothelial cell damage. In addition, it has been shown that 1.8 cineole and α -pinene molecules consist of the other major components of MC fruits, correct LPS-induced HUVEC cell damage at the cellular index and biomolecular level (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and eNOS).

Key Words: HUVEC, LPS, *myrtus communis* L., sepsis, 1.8 cineole, α -pinene, α -terpineole

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
CAM	: Hücre adhezyon molekülleri (Cell adhesion molecule)
CD	: Farklılaşma kümeleri (Cluster of differentiation)
cDNA	: Komplementer deoksiribonükleik asit
C'	: Kompleman sistem
COX-2	: Siklooksijenaz-2
Dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye edilmiş ortamı (Dulbecco's modified eagle's medium)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleotid trifosfat
DSÖ	: Dünya sağlık örgütü (endothelial cell)
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
FBS	: Fötal Sığır Serum (Fetal bovine serum)
g	: Gram
GM-CSF	: Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (Granulocyt-macrophage colony stimulating factor)
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HUVEC	: İnsan göbek kordonu veni endotel hücresi (Human umbilical vein)
IC50	: İnhibisyon konsantrasyonu (Inhibition concentration 50)
IFN-γ	: İnterferon-gamma
IL	: İnterlökin

IL-1β	: İnterlökin-1-beta
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit
kDa	: Kilodalton
LBP	: LPS bağlayan protein
LPS	: Lipopolisakkarit
LTB4	: Lökotrien B4
M	: Molar
MBL	: MannoZ bağlayan lektin yolağı
MC	: <i>Myrtus communis L.</i>
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MODS	: Çoklu organ fonksiyon bozukluğu (Multiple organ failure)
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit (Messenger ribonucleic acid)
MyD88	: Myeloid farklılaşma faktörü 88
NF-kB	: Nükleer faktör kappa B
NO	: Nitrik oksit
O₂\cdot^-	: Süperoksit anyonu
OH\cdot	: Hidroksil radikali
PAF	: Trombositleri aktive eden faktör
PAMPs	: Patojen ilişkili moleküler model (Pathogen associated molecular pattern)
PBS	: Fosfat tamponlu salin (Phosphate buffered saline)
PGE2	: Prostaglandin E2
PMNL	: Polimorf nüveli lökosit
PRR_s	: Örüntü tanıma reseptörleri (Pattern recognition receptors)

qPCR	: Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Quantitative polymerase chain reaction)
RNA	: Ribonükleik asit
RNase	: Ribonükleik asit parçalayan enzim
RPM	: Dakikadaki dönüş sayısı (Revolutions per minute)
RT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time polymerase chain reaction)
SIRS	: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (Systemic inflammatory response syndrome)
TF	: Doku faktörü (Tissue factor)
TLR	: Toll-benzeri reseptörler (Toll-like receptor)
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör α
TXA2	: Tromboksan A2

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Hastalıkları iyileştirmede kullanılan bazı bitkiler	3
Şekil 2.2. <i>Myrtus communis</i> L. bitkisinin doğal ortamdaki görüntüsü	5
Şekil 2.3. SIRS, sepsis ve enfeksiyon arasındaki ilişki	24
Şekil 2.4. Sepsiste etiyolojik etkenlerin dağılımı	25
Şekil 2.5. Gram-negatif bakteri duvarı ve LPS'nin şematik gösterimi	34
Şekil 3.1. MC uçucu yağı ve uçucu yağ bileşenlerinin IC50 değerinin hesaplanması için kullanılan dozlar.	39
Şekil 4.1. <i>Mrytus communis</i> L. bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağının farklı konsantrasyonlarının xCELLigence deney sonuçları.....	46
Şekil 4.2. 1.8 sineol bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının xCELLigence deney sonuçları.....	46
Şekil 4.3. α -pinenbileşiğinin farklı konsantrasyonlarının xCELLigence deney sonuçları	47
Şekil 4.4. α -terpineol bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının xCELLigence deney sonuçları.....	47
Şekil 4.5. MC bitkisinin meyvesinden elde edilen uçucu yağın HUVEC hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi.....	49
Şekil 4.6. MC bitkisinin meyvesine ait uçucu yağ ve LPS uygulanan hücrelerin 24. ve 48. saatteki proliferasyonu	49
Şekil 4.7. 1.8 sineol bileşiğinin HUVEC hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi.....	50
Şekil 4.8. 1.8 sineol ve LPS uygulanan hücrelerin 24. ve 48. saatteki proliferasyonu... 51	
Şekil 4.9 α -pinenbileşiğinin HUVEC hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi.....	51

Şekil 4.10. α -pinenve LPS uygulanan hücrelerin 24. saatteki proliferasyonu ve 48. saatteki proliferasyonu	52
Şekil 4.11. α -terpineol bileşiğinin HUVEC hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi.....	53
Şekil 4.12 α -terpineol ve LPS uygulanan hücrelerin 24. saatteki proliferasyonu ve 48. saatteki proliferasyonu	53
Şekil 4.13. <i>Myrtus communis L.</i> bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağın, TNF- α mRNA ekspresyonları.....	54
Şekil 4.14. <i>Myrtus communis L.</i> bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağın, IL-1 β mRNA ekspresyonları.....	55
Şekil 4.15. <i>Myrtus communis L.</i> bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağın, IL-6 mRNA ekspresyonları.....	56
Şekil 4.16. <i>Myrtus communis L.</i> bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağın, eNOS mRNA ekspresyonları.....	57
Şekil 4.17. 1.8 sineol bileşiğinin, TNF- α mRNA ekspresyonları.....	58
Şekil 4.18. 1.8 sineol bileşiğinin, IL-1 β mRNA ekspresyonları.	58
Şekil 4.19. 1.8 sineol bileşiğinin, IL-6 mRNA ekspresyonları.....	59
Şekil 4.20. 1.8 sineol bileşiğinin, eNOS mRNA ekspresyonları.....	60
Şekil 4.21. α -pinenbileşiğinin, TNF- α mRNA ekspresyonları.....	61
Şekil 4.22. α -pinenbileşiğinin, IL-1 β mRNA ekspresyonları.....	62
Şekil 4.23. α -pinenbileşiğinin, IL-6 mRNA ekspresyonları.....	63
Şekil 4.24. α -pinenbileşiğinin, eNOS mRNA ekspresyonları.	63
Şekil 4.25. α -terpineol bileşiğinin, TNF- α mRNA ekspresyonları.....	64
Şekil 4.27. α -terpineol bileşiğinin, IL-6 mRNA ekspresyonları.	66
Şekil 4.28. α -terpineol bileşiğinin, eNOS mRNA ekspresyonları.....	67

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. <i>Myrtus communis</i> L. meyvesinde bulunan uçucu yağların major bileşenleri ve biyoaktiviteleri.....	7
Tablo 2.2. <i>Myrtus communis</i> L. bitkisinin meyvesinin uçucu yağından elde edilen monoterpen yapısındaki bileşikler	8
Tablo 2.3. Sistemik inflamatuvar yanıt sendromunun klinik parametreleri.....	22
Tablo 3.1. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler	37
Tablo 3.2. Aletler ve cihazlar	38
Tablo 4.1. <i>Myrtus communis</i> L. bitkisinin meyvelerinde bulunan bileşiklerin IC50 değerleri	48

1. GİRİŞ

Günümüze kadar kullanılan ilaçların birçoğu, ya doğal ürünlerden ya da doğal ürünlerden üretilen bileşiklerden elde edilmektedir. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde geleneksel tıbbın önemi gittikçe artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verilerine göre, dünya popülasyonunun % 80'i birincil olarak geleneksel tıbbı tercih etmektedirler ve günümüzde kullanılan ilaçların % 50'si doğal kaynaklardan ve özellikle çeşitli bitkilerden elde edilmektedir. Ülkemizde genellikle yaban mersini olarak bilinen *Myrtus communis* L. (MC) bitkisinin meyveleri gıda ve tıbbi amaçla kullanımı çok uzun geçmişe sahiptir. Yapılan çalışmalarda bu bitkinin antioksidan, antiinflamatuvar ve antibakteriyel gibi birçok çeşitli biyolojik özellikleri tespit edilmiştir.¹

Sepsis; birçok organı harap edebilen ve sonunda ölümlü sonuçlanabilen yaygın inflamatuvar bir hastalıktır. Gelişen tedavi yöntemlerine rağmen mortalitesi oldukça yüksektir.^{2, 3} Mortalite oranını arttıran ise, sepsis esnasında vital organlarda meydana gelen yetmezliklerdir.⁴ Dünya çapında yıllık 19 milyon olgu, günlük olarak ise 1.400 ölüm ile sonuçlanmaktadır.⁵ Sepsis veya septik şokun patofizyolojisi, hipotansiyon, sistemik iltihabı cevap sendromu (SIRS), doku hasarı, birden fazla organ yetersizliği hatta ölümlü sonuçlanan bir süreçtir.⁶ Sepsisin patogeneğinde; inflamasyon, bozulmuş fibrinoliz ve koagülasyon, fizyopatolojisinde ise mikrobiyal ajanlar ve inflamatuvar yanıt yer almaktadır. Dokularda meydana gelen herhangi bir travmatik hasar veya enfeksiyon, organizmada humoral sistemi aktive ederek çeşitli sitokinlerin salınmasına neden olur. Sonuç olarak oluşan şiddetli inflamatuvar yanıt; hemostatik değişikliklere ve doku hasarına neden olur.^{7, 8} Sepsis sürecinde oluşan inflamatuvar yanıt; çeşitli molekül, mediatör ve sitokinlerle düzeltilmeye çalışılır. Endotoksinle aktive edilen monositlerden birçok sitokin salgılanmaktadır. Mikrobiyal ajan ve konakçının ilk karşılaşmasında

hücrel ve humoral immüneyi içeren geniş çapta bir aktivasyon başlar. Bu esnada mononükleer hücreler proinflamatuvar sitokinler olarak bilinen IL-1, IL-6 ve TNF salarak bu aktivasyonda anahtar rol oynarlar. TNF ve IL-1 sepsis sürecinin ilk aşamasında salınır ve diğer mediatörlerin salınımına neden olur.⁹

Sepsisin Türkiye’de ve dünyada bu kadar sık görülmesi ve ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda yer alması sebebiyle hastalığın artık bir sağlık sorunu olmasının dışında sosyal ve ekonomik açıdan da toplum için problem teşkil etmektedir. Bu derece önemli bir sağlık problemine çözüm bulunması hem birçok araştırmacı için öncelikli hedef olmakta hem de böyle bir hedefe ulaşmak sağlığını kaybetmiş veya giderek daha da kötüye giden hastalar için de önem arz etmektedir. Bu sebeple tedaviye yönelik birçok çalışma yapılmakta ve farklı bileşiklerin sepsis üzerindeki etkisi yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Çok yüksek antiinflamatuvar etkiye sahip olan MC bitkisinin meyvelerine ait uçucu yağ ve bileşenlerinin, sitokinler üzerine de etkili olduğu da bulunmuştur¹⁰⁻¹². MC bitkisi ile yapılan tüm çalışmaları bir arada incelediğimizde sepsis sürecinde meydana gelen güçlü inflamatuvar cevap ve buna bağlı olarak oluşan hasarı ortadan kaldıracak yeni bir çalışma kaynağı olduğunu düşünmekteyiz. Sepsisin ana hücre ve doku hasarında ve daha önemlisi kliniğin geri dönüşsüz safhaya girmesinde endotel hücre hasarının anahtar rol oynadığı *in-vivo* ve *in-vitro* çalışmalarla gösterilmiştir. Bu nedenle son yıllarda sepsis üzerine yapılan çalışmaların büyük kısmı endotel hasarı ve önlenmesi üzerine yapılmıştır.¹³

Bu tez kapsamında, MC bitkisinin meyvelerine ait uçucu yağ ve 1.8 sineol, α -pinen, α -terpineol bileşiklerinin sepsisin neden olduğu endotel hasarına olan etkilerini *in vitro* sepsis modelinde moleküler ve hücrel açıdan etkilerinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bitkilerle Tedavi

Ülkemiz, tıbbi ve aromatik bitkiler bakımından zengin bir flora sahiptir. İnsanlık tarihi ile birlikte, bitkiler de (Şekil 2.1) tedavi amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. İnsanlar binlerce yıl önce bitkilerin tedavi edici gücünü belirlemiş ve yaşamlarını sağlıklı bir şekilde sürdürmek için de bitkilerden yararlanmışlardır. Halk hekimliğinde çok sık rastlanan Anadolu’da halk ilaçları, uzun tecrübeler sonunda günümüze kadar ulaşmıştır.¹⁴ Günümüzde ilerleyen teknolojinin beraberinde getirdiği sağlık sorunlarından kaçınmak için doğaya ve doğala dönüş eğilimi gittikçe artmaktadır.¹⁵ DSÖ’nün verilerine göre dünya çapında yaklaşık 4 milyar insanın sağlık sorunlarını ilk önce bitkisel droglarla gidermeye çalıştıklarını bildirmektedir.¹⁴



Şekil 2.1. Hastalıkları iyileştirmede kullanılan bazı bitkiler¹⁶

Ülkemizde MC genellikle ‘mersin bitkisi olarak bilinmesiyle birlikte Güney sahillerimizde ise ‘murt’ ve adi mersin adlarıyla da bilinmektedir.¹⁶ Halk arasında özellikle antibakteriyel, antiinflamatuvar, idrar yolları iltihabında, hemoroid tedavisi, astım^{10, 17}, antiseptik, kabızlık, iştahsızlık, egzama, ağız ve göz hastalıklarında¹⁷, sinüzit, diyare yaraların iyileştirilmesi¹⁸ gibi birçok hastalığa iyi geldiği belirtilen mersin bitkisi

antik çağdan beri çeşitli toplumlar tarafından kullanılmış önemli bir bitkidir. Bu bitkinin kullanımı çoğu ülkede geleneksel hale gelmesine rağmen, bunların tüketimi ile ilgili riskler, terapötik uygulamalar, bitkisel ilaç bileşimi ile ilgili eksikliklerin olması bu alana ilginin artmasına neden olmaktadır.¹⁹

2.2. *Myrtus communis* L. Türünün Bitki Sistematığındeki Yeri

Alem: Bitkiler alemi

Bölüm: Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)

Sınıf: Magnoliopsida (İki çenekliler)

Takım: Myrtales (Mersinler)

Familya: Myrtaceae

Cins: *Myrtus*

Tür: *Myrtus communis* L.

2.2.1. *Myrtus communis* L.

Çoğunluğu Güney Amerika ve Avustralya'nın tropikal ve subtropikal bölgelerinde, ülkemizde ise Akdeniz bölgesinde bulunan çok yıllık, yaprak dökmeyen, endemik tedavi edici bir bitkidir.^{10,17} Myrtaceae familyası 100 cins ve 3000 türü ile büyük bir familyadır.²⁰ Myrtaceae familyası içerisinde tıbbi ve aromatik bitki olarak en iyi bilinen cinsi ise *Myrtus communis*'tir (Şekil 2.2.). MC'in yaklaşık 5500 türü, 145 cinsi bulunmaktadır.^{18, 19} Her daim yeşil kalan 1.8-2.4 m yüksekliğinde, genellikle asidik topraklarda yetişen, küçük ağaç veya odunsu bir bitkidir. Meyveleri siyahımsı mor renkli, üzüksü şekilde, oldukça sert, tadı ise buruktur. Bitkinin yaprakları; gallik asit, tanen, flavonoid, uçucu yağ, meyveleri ise tanen, şeker, uçucu yağ, fenolik bileşik, antosiyanin ve organik asit türevlerini içermektedir.^{18, 19, 21}



Şekil 2.2. *Myrtus communis* L. bitkisinin doğal ortamdaki görüntüsü²³

2.2.2. *Myrtus communis* L. Türünün Geleneksel Uygulaması

MC türünün meyveleri, dalları, yaprakları gibi bitkinin farklı kısımları uzun zamanlardan beri halk hekimliğinde, gıdalarda katkı maddesi ve parfüm endüstrisinde geniş çapta kullanılmaktadır.^{10, 17, 22-24} MC türü üzerine yapılan fitokimyasal çalışmalara göre, bitkinin farklı kısımları farklı bileşikleri içermektedir. Genellikle bitkinin dalları, yaprakları, çiçekleri ve meyveleri dekoksasyon veya infüzyon şeklinde farklı amaçlarla kullanılmaktadır. Yaprakları, dalları ve çiçekleri infüzyon yöntemi ile antiseptik, egzama, astım, üriner enfeksiyon da kullanılırken, dekoksasyon yöntemi ile de solunum sistemi hastalıklarında, ağız ve göz hastalıklarında, yeni doğanlarda deri kızarıklıkların da, hemoroid tedavisinde ve yaraları yıkamada kullanılmaktadır.^{17, 25} Genel olarak yaprak ve meyveleri mide ağrılarında, kabızlık, iştahsızlık,¹⁹ antiseptik, antiinflamatuvar, solunum sistemi ve üriner hastalıklarda,²⁵ peptik ülser, baş ağrısı, inflamasyon, hemoroid tedavisi, konjunktivit, ve deri rahatsızlıklarında kullanılmaktadır.²² MC türleri fenolik asit, flavonoid, tanin, uçucu yağlar ve yağ asitleri ile karakterize edilmektedir.²⁰

2.3. Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar, aromatik bitkiler tarafından sekonder metabolit olarak üretilen, halk arasında esansiyel yağ, eteri yağ ve esans yağı gibi farklı adlarla adlandırılan doğal kompleks bileşenlerdir.^{20, 26} Genellikle renksiz veya açık sarı renkli, oda sıcaklığında sıvı formda, kolayca kristalleşebilen, kuvvetli kokulu, sudan hafif doğal ürünlerdir. Hem suda çözünmeyip, yağlar, mumlar, zayıf polar çözücüler ve nonpolar çözücülerde çözündükleri için hem de su üzerinde bir tabaka oluşturdukları için yağ olarak tanımlanmalarına rağmen¹⁹ sabit yağlarla aralarında önemli farklılıklar vardır.²⁰

Günümüzde 3000'den fazla kimyasal olarak tanımlanmış uçucu yağ bilinmektedir ve bunların da yaklaşık 300 tanesi özellikle ilaç, kozmetik, sağlık endüstrisi, diş hekimliği ve gıda koruyucu maddesi olarak kullanılmaktadır. Bazı uçucu yağların tıbbi özelliklerinden dolayı organ disfonksiyonu ve sistemik düzensizliğin tedavisinde kullanıldığına dair bilgiler bulunmaktadır. Geçmişten günümüze kadar, antibakteriyel, antiviral, antifugal, antioksidan, antiseptik, diüretik, karminatif, antikanser etkileri çeşitli çalışmalarla rapor edilmiştir.^{26, 27}

Uçucu yağların bileşimi ve miktarları, bitkinin yetiştirildiği ortamın çevresel faktörlerine, üretim şekline, bitkinin cinsine ve de bitkinin hangi kısmından elde edildiğine göre değişiklik gösterir. Uçucu yağlar, yapısında 10 veya 15 karbon ihtiva eden, oksijen molekülü bulunan, düşük molekül ağırlıklı ve biyolojik özelliklerine göre farklı konsantrasyonlarda farklı bileşen içeren kompleks doğal karışımlardır.¹⁹ Bu bileşenler (Tablo 2.1) terpenler, terpenoidler, fenilpropanoidlerden oluşur.^{19, 28}

Terpenler; yapı ve fonksiyon olarak farklı sınıflar oluştururlar. Temelde 5 karbonlu (C5) izopren moleküllerin farklı kombinasyonlarında meydana gelen hidrokarbonlardır. Terpenler, bitki hücrelerinin sitoplazmasında, Asetil-KoA'dan başlayıp mevalonik asit yoluyla sentezlenirler.^{19, 23}

Terpenoidler; terpenlere enzimler aracılığıyla metil gruplarının eklenmesi, çıkarılması veya oksijen moleküllerinin eklenmesiyle oluşurlar.¹⁹ Terpenler yapısal ve işlevsel bakımdan hemiterpenler (C5), monoterpenler (C10), seskiterpenler (C15), diterpenler (C20), triterpenler (C30), tetraterpenler (C40) ve politerpenler (C5)n olarak sınıflandırılırlar.²⁷

Monoterpenler; iki izopren veya izopentan biriminin birleşmesi ile meydana gelmektedirler. Terpenler olarak adlandırılan geniş ve çeşitli bir kimyasal bileşik grubuna ait monoterpenler doğal olarak oluşan organik bileşiklerin bir grubunu temsil eder.²⁹

Bu sekonder metabolitler bazı hayvan ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilmelerine rağmen, genellikle bitkilerin yaprak ve meyvelerinin distilasyonu ya da çözücülerle çözüldürülmesi sonucu elde edilen uçucu yağ ürünleridirler.²⁷

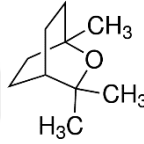
Tablo 2.1. *Myrtus communis* L. meyvesinde bulunan uçucu yağların major bileşenleri ve biyoaktiviteleri

Sınıfı	Alt sınıfı	Major Bileşenleri	Biyoaktivitesi
Terpenler	Monoterpen Hidrokarbonlar (C ₅ H ₁₀)	α -pinen α -terpineol Limonene Myrcene	Antimikrobiyal
	Seskiterpenler Hidrokarbonlar (C ₁₅ H ₂₄)	p-Ceymene α -Caryophyllene Germacrene-D	Antiviral
Terpenoidler	Oksijenli Monoterpenler	Linalool Mrytenol 1.8 sineol	Antibakteriyel
	Oksijenli Seskiterpenler	Geraniol Caryophyllene-oxide Spathulenol	Antimikrobiyal

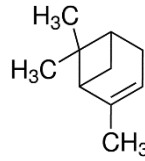
2.3.1. *Myrtus communis* L. Türünden Elde Edilen Uçucu Yağın Kimyasal Bileşeni

MC bitkisinin yaprak, dal, çiçek ve meyve gibi bitkinin farklı kısımlarından distilasyon yöntemi ile elde edilen yağa ‘myrtle oil’ denir.²¹ Yapılan çalışmalar bitkinin kökü, meyvesi ve yaprağındaki uçucu yağ bileşenlerinin farklı olduğunu rapor etmişlerdir.¹⁹ Yapılan bir diğer çalışmada, MC bitkisinin çok zengin uçucu yağ içeriğine sahip olduğunu ve de bitkinin uçucu yağının % 90’nını monoterpenlerin oluşturduğu tespit edilmiştir.^{18, 19, 29} MC meyvelerinin uçucu yağında bulunan 1.8 sineol, α -pinen ve α -terpineol (Tablo 2.2) monoterpenler arasındaki major bileşikler olduğu bildirilmektedir.^{19, 23}

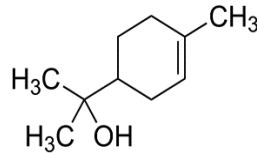
Tablo 2.2. *Myrtus communis* L. bitkisinin meyvesinin uçucu yağından elde edilen monoterpen yapısındaki bileşikler



Bileşik	Bitki
1.8 sineol	<i>Myrtus communis</i> L.



Bileşik	Bitki
α -pinen	<i>Myrtus communis</i> L.



Bileşik	Bitki
α -terpineol	<i>Myrtus communis</i> L.

1-8 sineol; birçok bitkinin uçucu yağında bulunan sineol olarakta adlandırılan major bir monoterpendir.^{12, 30} Genellikle sekretolitik özelliklerinden dolayı solunum sistemi hastalıklarında,^{11, 12} astım, bronşit, antioksidan, antiinflamatuvar,¹¹ burun spreyi, dezenfektan, romatizma tedavisinde, öksürük,^{12, 30, 31} antiaterosklerotik, antikanser, antimikrobiyal özelliklerinin olduğu, septik şokla ilgili patojenler için farmasötik preparat olarak kullanılmaktadır.^{12, 30, 31}

α -pinen; birçok bitki türünün uçucu yağında bulunan bisiklik monoterpendir.^{32,}
³³ α -pinenboya işleme, kağıt endüstrisinde, ilaç sektöründe, koku ve tat endüstrisinde kullanılmaktadır.^{27, 33} Ayrıca α -pinen'nin antioksidan, antiinflamatuvar,^{27, 33, 34} antikanser, antinosiseptif, analjezik ve antimikrobiyal gibi farmakolojik özellikleri de bulunmaktadır.^{33, 35}

α -terpineol; birçok bitki türünde bulunan major uçucu monoterpen alkoloiddir.³⁶ α -terpineol, terpinen-4-ol'ün bir izomeridir.³⁷ Monoterpenoidler arasında α -terpineol, üstün terapötik özelliklere sahip eşsiz bir moleküldür.³⁸ Genellikle antikonvülsan, sedatif, antinosiseptif ve hipotansif aktivitesi^{37, 38} antibakteriyel, antifugal, antiinflamatuvar, antioksidan^{39, 40} gibi farmakolojik özelliklere sahiptir.

2.3.2. *Myrtus communis* L. Türü Uçucu Yağ ve Bileşenleri Üzerine Yapılan Farmakolojik Çalışmalar

Yapılan birçok çalışmada MC türünün uçucu yağ ve bileşenlerinin antiinflamatuvar, antibakteriyel, antioksidan özelliklere sahip olduğuna dair bilgiler mevcuttur.

2.3.2.1. Antiinflamatuvar Etki

İnflamasyon, canlı dokuların ekzojen veya endojen uyaranlara karşı başlattığı, yaşamın devamı için gerekli fakat spesifik olmayan fizyolojik bir cevaptır. İnflamasyon koruyucu bir yanıttır ve temel amacı hem hücrenin hasar görmesine neden olan mikrop

ve toksinlerden korumak, hem de hücre hasarı sonrası oluşan nekrotik doku ve doku artıklarından temizlemektir.^{41, 42}

İnflamasyonun başlaması gerek infeksiyöz (gram-pozitif ve gram negatif bakteriler, virüs, mantar, parazit vb.) gerekse infeksiyöz olmayan (travma, yanık, yabancı cisim, iskemi vb.) birçok ajanlarla olsa da bu uyarılara verilen cevap aynıdır. Organizmada inflamasyonun tetiklenmesi ile birlikte bir dizi reaksiyon başlar. Bu sayede, hasar gören dokuda da bir taraftan tamir olayı başlar. Meydana gelen lokal inflamasyon sonucunda şu üç durum gelişir.⁴³

1. Tam rezolüsyon ile hasar gören dokuda hiçbir doku bozukluğu olmadan temizlenir,
2. Uyarı sınırlandırılarak apse oluşabilir,
3. Uyarının dokuda oluşturduğu hasar fibrozis ile iyileşebilir veya kronik inflamasyon gelişir.

Uyarılarla inflamasyon tetiklenirken belli bir eşik değeri aşılması durumunda, sistemik inflamasyon bulguları ortaya çıkar. Bu durum ise, organizmanın uyarıyı nötralize etmesi, organizmanın uyarıyı sınırlandırması, apse gelişim ve organizmada tetiklenen sistemik inflamasyon sonucu multiple organ yetmezliği ve ölüm ile sonuçlanabilir.⁴²

İnflamasyonun akut ve kronik olmak üzere iki tipi bilinmektedir. Akut inflamasyon; çok kısa zaman içinde gelişerek sıvı ve plazma proteinlerinin eksudasyonu ve nötrofillerin göçünü içeren olaylar zinciridir. Kronik inflamasyon ise; daha uzun süreler içinde lenfosit ve makrofajların hakim olduğu damar proliferasyonu, fibrozis, doku nekrozu ile karakterizdir.^{42, 44}

İnflamasyon sırasında; (1) vasküler damar yatağındaki çap değişiklikleri sonucu kan akımında artma, (2) mikrosirkülasyon yapısında meydana gelen değişiklikler

sonucunda plazma proteinleri ve lökositlerin dolaşımdan ayrılması, (3) lökositlerin migrasyonu, (4) kompleman, pıhtılaşma sistemi, kontakt aktivasyon sistemi ve kimyasal mediyatörlerin aktivasyonu gibi fizyopatolojik olaylar gelişir.⁴²

Yapılan bir çalışmada 1.8 sineol ve α -terpineol'ün IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin, siklooksijenaz-2 (COX-2), prostaglandin E2 (PGE2), IL-10, indüklenbilir nitrik oksit (iNOS) ve nükleer transkripsiyon faktörü kapp B (NF-kB) aktivasyonunu inhibe ettiği, ayrıca α -terpineol'ün proinflamatuvar sitokinlerin en güçlü engelleyici efektörü olduğu rapor edilmiştir.³⁴ İnsan organizması iyileşme sürecini başlatmak için zararlı hücreler, patojenler gibi zararlı sitümölanlara karşı tepki verir. İnflamatuvar hastalıklar PGE2, IL-8, IL-10, IL-1 β ve TNF- α gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınması ve nötrofil infiltrasyonu ile ilişkilidir. Yapılan bir çalışmada lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen *in vitro* modelinde 1.8 sineol ve α -pinen'nin antiinflamatuvar etkileri belirlenmiştir.¹⁰ Yapılan bir diğer çalışmada, 1.8 cineol'ün araşidonik asit metabolitlerinin azaltılması ve de araşidonik asit inhibisyonu yaparak antiinflamatuvar etki gösterdiği belirlenmiştir. 1.8 sineol'ün ile yapılan bir *in vitro* çalışmada araşidonik asit ve sitokin üretimi üzerine etkisi incelenmiş, 10^{-6} M 1.8 sineol'ün IL-1 β ve TNF- α inhibe ettiği fakat IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-8 üzerine herhangi bir inhibisyon yapmadığı, 10^{-5} M 1.8 cineol'ün PGE2, IL-1 β , IL-6, IL-8'i inhibe ettiği ve 10^{-4} M 1.8 sineol'ün lökotrien B4 üzerine inhibisyon etkisi gözlenmiştir. 1.8 sineol'ün TNF- α > TxB2 > IL-1 β > LTB4 sırasında inhibe ettiği tespit edilmiştir. 1.8 cineol'ün IL-1 β üzerine inhibisyonu Nf-kB aktivasyonu üzerinden yapmış olduğu ileri sürülmektedir.¹¹ Başka bir inceleme de 1.8 sineol'ün, LPS ile indüklenen monosit aktivasyonunu inhibe ettiği, LPS ile indüklenince TNF- α ve IL-1 β seviyesinin arttığını, 1.8 sineol'ün ise artan TNF- α ve IL-1 β seviyesini düşürdüğü, PGE2 ve LTB4 gibi sitokinlerin üretimini azalttığı tespit edilmiştir.¹²

α -pinen'nin NF-kB'nin nükleer translokasyonu üzerine yapılan bir deneysel çalışmada inhibitör etkisi olduğunu, bunun da inflamasyon sürecinde ağrı kontrolüne katkıda bulunduğu rapor edilmiştir.²⁹

α -terpineol'ün sitokin üretimini etkilemediği, süperoksit üretimini baskıladığı belirlenmiştir. α -terpineol'ün (Toll-benzeri reseptörler: TLR) TLR2/TLR4 ya da TLR4 stimülasyonundan sonra IL-1 β üretimi üzerine minör etkili veya hiç etki gözlenmediğine dair bilgiler mevcuttur. Ayrıca α -terpineol'ün IL-6 üzerine belirgin bir inhibisyon yapmadığı, IL-6 üretimini indükleyen TLR2/4'ü inhibe ettiği belirlenmiştir.⁴⁵ α -terpineol'ün NF-kB inhibitörü olduğu ve IL-1 β ve IL-6 oluşumunun down regülasyonunu teşvik ettiği, bu özelliklerin α -terpineol'ün antinosiseptif ve antiinflamatuvar özelliklere katkıda bulunabileceği tespit edilmiştir. Ayrıca TNF- α ve nitrik oksit (NO) üretimini azalttığı, COX-2 inhibisyonu yaptığını,^{29, 46} nötrofil akımını engellediğini ortaya koyan çalışmalar da mevcuttur.⁴⁶

2.3.2.2. Antibakteriyel Etki

Yüksek maliyet, yan etkiler, çevresel problemler, antimikrobiyal direnç içeren geleneksel antibiyotik uygulamaları ile ilişkili problemler doğal alternatif ajanlarla yer değiştirme eğilimini güçlendirmektedir. Bitki bazlı etken ürünler, geleneksel antibiyotiklerin yerini almak için incelenen ürünler arasında yer almaktadır.

Bu zamana kadar incelenen esansiyel yağların ve ekstraktlarının kimyasal profil ve miktar çeşitliliğinden dolayı farklı antibakteriyel mekanizmaya sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu bileşenler hücresel seviyede çeşitli etki mekanizması gösterirler. Bunlar; (1) sitoplazmik membran parçalanması, (2) membran proteinleri ile etkileşim (ATPaz ve diğerleri), (3) LPS'nin serbest kalması, (4) iyon sızıntısı ile proton yüzey iticiliğinin destabilizasyonu, (5) hücre içeriğinin koagülasyonu, (6) enzim sentez inhibisyonudur.¹⁹

Esansiyel yağ ve ekstraktlarının, en önemli özellikleri hidrofobik olmalarıdır.

Bakteri hücre membranının lipid kısmını etkileyerek, hücre dışında bulunan maddelerin kontrolsüz olarak intraselüler alana sızmasına neden olarak hücre membranının ve bakteri hücre duvarının permeabilitesini etkilemektedirler. Gram negatif bakteriler, Gram pozitif bakterilere göre esansiyel yağlar ve ekstraktlarına karşı daha dirençlidirler. Bunun nedeni ise, Gram negatif bakterilerin uçucu yağları ve hidrofobik bileşiklerin geçişini yavaşlatan dış membran kompleksine sahipken, Gram pozitif bakterilerde bu membran bulunmamaktadır.¹⁹

Yapılan çalışmalar MC esansiyel yağının patojen mikroorganizmaların büyümesini inhibe etme yeteneğine,²⁸ Gram pozitif bakteriler üzerine daha etkili olmak kaydıyla Gram negatif bakterilere karşı da antibakteriyel etkisi olduğu tespit edilmiştir.^{19, 23, 28}

Yapılan bir çalışmaya göre, 1.8 sineol'ün ve α -terpineol'ün Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı bakterisidal etkisi olduğu belirtilmiştir. *In vitro* testler terpenlerin tek bileşik olarak uygulandığında antimikrobiyal olarak yetersiz olduğunu, antimikrobiyal etkileri, içerdiği bileşiklerin sinerjisinden kaynakladığı tespit edilmiştir.¹⁹ Yapılan bir diğer çalışmaya göre, 1.8 sineol bileşeninin *Staphylococcus aureus* (Gram pozitif) ve *Escherichia coli* (Gram negatif) bakterilerine karşı sulandırma ve difüzyon tekniği kullanılarak antibakteriyel etkileri gösterilmiştir. MC bitkisinden elde edilen diğer bir uçucu yağ bileşeni olan α -pinen'nin, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ek olarak, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella enterica* bakterilerine karşı ise düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. MC bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağların *Streptococcus pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus epidermidis* bakteriler üzerine antibakteriyel etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.¹⁰ Yapılan bir çalışmada disk ve dilüsyon tekniği ile

1.8 cineol'ün ve α -pinen'nin *Staphylococcus aureus* *Bacillus sp*, *Citrobacter sp*, *E.coli*, *Klebsiella sp*, *Salmonella sp*, üzerine antibakteriyel etkisi araştırılmış ve 1.8 cineol'ün daha fazla antibakteriyel etkisi olduğu tespit edilmiştir.¹¹

2.3.2.3. Antioksidan Etki

Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek, insan vücuduna olan zararlı etkileri azaltan veya önleyen bileşiklerdir.¹⁸ Hücre içerisinde üretilen süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri (OH^\cdot) NO ile birleşerek reaktif nitrojen türevlerini oluştururlar. Bunların ekstraselüler olarak az miktarda salınması kemotaksis, sitokin ve endotel lökosit adezyon moleküllerinin ekspresyonuna neden olurken, aşırı miktarda salınması ise, organizma için zararlıdır. Endotel hücre hasarı ve vasküler permeabilite artışı, antiproteazların inaktivasyonu, hücrelerin zarar görmesine neden olur.⁴⁷

Tıbbi ve aromatik bitkiler arasında MC gibi bitkilerin, esansiyel yağlar ve fenilpropanoidler gibi sekonder metabolitlerinin aktivasyonu sayesinde doğal antioksidan kaynağı olduğu, MC bitkisinin meyvelerinin içerdiği tanenlerin de antikanser ve antioksidan etkisinin olduğu belirlenmiştir.¹⁹

Esansiyel yağların çoğunluğunu monoterpenler oluştururlar. Bu bileşenlerin ise çok iyi antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinir.¹⁸

Yapılan bir diğer çalışmada MC bitkisinden elde edilen uçucu yağların 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radikal süpürme aktivitesi belirlenip, bütilhidroksitolüen ve gallik asit ile karşılaştırıldığından daha düşük antioksidan kapasite gösterdikleri belirlenmiştir.¹⁰

1.8 cineol'ün 10^{-5} M dozu reaktif oksijen radikalleri, süperoksit dismutaz aktivitesi, H_2O_2 üretimi 8-isoP üretimini önemli ölçüde inhibe ettiği,¹¹ ayrıca 1.8 cineol ve α -terpineol'ün O_2^- üretiminin güçlü bir inhibitörü olduğu tespit edilmiştir.³⁹

α -terpineol'ün çekirdekte doza ve zamana bağımlı olarak Nf-kB JNK-1, JAK3, AKT, IKKbeta kinaz ve protein kinazları inhibe ettiği,³⁹ ve α -terpineol'ün güçlü bir antioksidan ve radikal süpürücü olduğu ve de nitrik oksit üretimini inhibe ettiği belirlenmiştir.³⁸

2.3.2.4. Diğer Biyolojik Etkileri

Yapılan bir çalışmada, MC bitkisinin uçucu yağlarının hepatoprotektif, yara iyileştirme, antihiperlisemi,¹⁸ antikanser,³³ antinosiseptif, nöron koruyucu etkisi antifugal, antiviral, gibi tıbbi, biyolojik ve farmakolojik etkiye sahip olduğu belirtilmiştir.¹⁸ MC bitkisinin uçucu yağının %90'nını monoterpenlerin oluşturduğu tespit edilmiştir.^{18, 19, 29} Monoterpenlerin, epilepsi, kemik erimesi, gastrik ülser ve osteoporoz gibi bazı hastalıkların tedavisinde etkili olduğu, ayrıca kan, prostat, göğüs, over ve karaciğer kanserine karşı antiproliferatif etkisinin olduğu rapor edilmiştir.³³

Yapılan bir çalışmada 1.8 sineol'ün çeşitli hayvan modellerinde hepatik nekroza, etanol kaynaklı gastrik yaralanmaya ve kolon hasarına karşı koruyucu olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir. Ayrıca 1.8 sineol histamin ile indüklenen kasılmada histamin reseptörlerinin yarışmalı antogonisti olarak görev yaptığı rapor edilmiştir.¹¹ Yapılan bir diğer çalışmada 1.8 sineol'ün duyu sinirlerine etki ettiği ve sinirleri bloke ettiğini, konsantrasyona bağlı bir şekilde uyarılabilme özelliği anestezi bir özelliğinin olduğunu, ayrıca opioid sistemin katılımı olmaksızın antinosiseptif yanıtı engellediği tespit edilmiştir. Bir diğer çalışmada ise 1.8 sineol'ün düşük dozlarının spinal ve supraspinal seviyelerde antinoseptif etki göstermiş olduğu ileri sürülmektedir.²⁹

α -pinen'nin ise antiiskemik aktiviteye sahip olduğu³⁴ ayrıca α -pinen'nin kontraksiyon arttıran ve doku tahriş edici özelliği tespit edilmiştir.¹¹ Ayrıca 12-dimetilbenz[a]anthrasenin ile indüklenen sıçan meme kanseri modelinde, α -pinen'nin meme kanserine karşı potansiyel bir kemopreventif ajan olabileceğini⁴⁸ , insan

eritrolökemik hücreleri (K562) üzerinde antiproliferatif etkiye sahip olabileceği tespit edilmiştir.⁴⁹ İnsan kan hücresi kültüründe α -pinen'nin 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) yöntemi ile sitotoksik etkisi belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, 200 mg/mL aşağısında canlı hücre sayısı üzerine herhangi bir değişiklik yapmadığı, 200 mg/mL dozunda ise sitotoksik etki gözlemlendiği belirlenmiştir.^{27, 33} Son zamanlarda ise α -pinen'nin antikanser etkisini değerlendiren çalışmalara hız verilmiştir. İnsan yumurtalık kanseri (SK-OV-3 ve HO8910) ve hepatosellüler karaciğer kanseri (Bel-7402) hücreleri üzerinde yapılan çalışmada α -pinen'nin artan konsantrasyona bağlı olarak canlı hücre sayısını azalttığı ve çok güçlü sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir.⁵⁰ Ayrıca α -terpineol'ün insan kolorektal kanser hücrelerinde protein kırılması, kaspaz aktivasyonu, mitokondriyal hasar (sitokrom c salınması) yoluyla apoptozis ve hücre siklusunun bloke olmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Önceki çalışmalarda α -terpineol'ün insan eritrolükemik hücreler üzerinde antiproliferatif etki gösterdiği gözlenmiştir.³⁹ α -terpineol'ün etkileri üzerine yapılan diğer çalışmada ise merkezi ve periferik olarak antinosiseptif aktivite gösterdiğini tespit edilmiştir. Bu periferik etkinin, muhtemelen peritoneal sıvı prostaglandin düzeylerindeki inhibisyon ile ilişkili olduğu, çünkü bu monoterpenin, COX enzimi ve IL üretimini inhibe etme özelliği olduğu bilinmektedir.²⁹ α -terpineol üzerine yapılan çalışmalarda, terpineol intestinal dokular üzerinde miyorelaksan özelliğinin olduğu, mide parasempatik sinirler üzerine etki ederek midenin geç boşalmasına neden olduğu ve sinirler üzerine inhibitör etkisi olduğu tespit edilmiştir.³⁶ Ayrıca, α -terpineol'ün gastroprotektif özelliğinin^{37, 38} ve küçük hücreli karsinoma hücre hattında önemli sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir³⁹

2.4. Sepsise İmmün Yanıt

İmmün yanıt, organizmanın antijene karşı dakikalar içerisinde başlattığı hücresel ve moleküler olayları içeren inflamatuvar bir süreçtir.¹³ İmmün sistemin birincil görevi insanı, çevresinde bulunan zararlı mikroorganizmalardan korumaktır. Enfeksiyon hastalıklarından korunma durumu olan bağışıklık, doğal ve adaptif olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.⁵¹

Doğal bağışık yanıt doğuştan var olduğu için, antijene karşı ilk savunma hattını oluşturur. Belirli bir patojene karşı özgül direnç mekanizması olmadığından, antijenle ilk ve sonraki karşılaşmalarında etkinlik dereceleri değişmediği ileri sürülmektedir. Doğal bağışık yanıtı oluşturan unsurlar ise; anatomik engeller, hücreler (monosit, makrofaj, polimorf nükleer hücreler, mast hücreleri ve doğal öldürücü hücreler), kompleman proteinler, akut faz proteinleri, sitokinler, antijen yüzey moleküllerini tanıma reseptörleri, fagositoz ve inflamatuvar yanıtıdır.⁵¹

Adaptif bağışık yanıt ise, çok sayıda ve çok farklı antijenleri tanıyabilme ve yanıt verme yeteneğine sahiptir. Birbirine çok yakın olan antijenleri dahi ayırt edebildiğinden ‘özgül bağışıklık’ veya ‘kazanılmış bağışıklık’ olarak isimlendirilmektedir. Kazanılmış yanıtlar başlıca T ve B lenfositlerinin membranında bulunan antijene özgül reseptörler aracılığı ile oluşur. Kazanılmış bağışık yanıtın en önemli özelliği tek bir antijene özgül olmasıdır.⁵¹

Kompleman sistem, doğal ve adaptif bağışık yanıtının kanda bulunan enzimatik ve protein efektörüdür. Kompleman sistem (C’), serum ve hücre yüzeyinde bulunan, en az 30 proteinden oluşur. Bu proteinlerin büyük bir çoğunluğu karaciğerde az bir miktarı ise mononükleer fagositlerde sentezlenir. C’ proteinleri proteaz yapısında olup, proteolitik parçalanma ile aktifleşirler. Böyle enzimlere ise ‘zimojen enzim’ denir.⁵¹ C’ sistemde yer alan proteinler vücut sıvılarından inaktif halde bulunurlar.¹³ Enfeksiyon

bölgesinde ise lokal olarak aktifleşirler. C' sistem enzimleri zincirleme şekilde aktifleşir. Kùçùk ölçeklerle başlayan aktivasyon daha büyük ölçekli reaksiyonlara dönüşür. C' sistem, klasik, mannoz bağlayan (MBL) ve alternatif yolaklarının herhangi birisi ile aktifleşir. Hangi yolakla aktifleşirse aktifleşsin, bu sistemin aktivasyonu aynı efektör fonksiyonların oluşmasına neden olur. C' sistemin işlevi ise, antijen opsonizasyonu, fagositlerin enfekte bölgeye göçü ve bakteriyolizdir.^{51, 52}

Klasik yol, C' sistemin ilk proteini olan C1q'nun antijen yüzeyine bağlanması ile başlar. C1q'nun antijen yüzeyine bağlanması üç şekilde olmaktadır. Bazı bakterilerin lipoteoik asit gibi yüzey unsurlarına doğrudan bağlanabilir, bakteri polisakkaritlerindeki fosfokolin rezidülerine bağlanan C-reaktif proteine bağlanabilir ya da antijen antikor kompleksine bağlanabilir. MBL, bakteri ve virüsler üzerinde bulunan mannoz içeren karbonhidratlara bağlanması ile başlar. Alternatif yol ise, plazmada bulunan ve normalde az miktarlarda kendiliğinden aktifleşen C3 komponentinin antijen ile bağlanması ile başlar. Oluşan bu komponent C3 konvertaz olarak adlandırılır. C' sistemin erken tepkimeleri olan bu olaylar, inaktif zimojenlerin birbiri ardı sıra iki kısma ayrılmalarını içerir. Bu iki kısımdan büyük olan serin proteaz yapısındadır ve antijen yüzeyinde kalarak, sonraki zimojenleri parçalayarak aktifleşmesini sağlar. Diğer küçük olan kısım ise tepkimenin olduğu bölgeden ayrılarak opsonin olarak görev görür.^{51, 52}

Aktivasyonun erken döneminde oluşun C3 konvertaz enzimi, C3 parçalayarak inflamasyonun zayıf ana bileşeni olan C3a ve C' sistemin başlıca efektörü olan C3b'nin oluşmasını sağlar. Opsonin olarak görev yapan C3b molekùlü, antijenlere kovalan olarak bağlanır ve C3b reseptörleri içeren fagositler için hedef molekùl haline gelir. C3b, C3 konvertaz enzimine bağlanarak C5 konvertazını oluşturur. Bu enzimde, inflamasyonun en önemli aracı molekùllerinden C5a ve C5b'yi oluşturur.⁵¹

C' sistemin en önemli fonksiyonu, opsonizasyondur. Bu ise, antijenlerin membranına bağlı C' komponentlerine fagositlerin üzerindeki kompleman reseptörleri ile bağlanması ile olur. C' sistemin aktivasyonu esnasında oluşan C3b ve C4b komponentleri opsonin olarak görev yaparlar. Antijen membranına bağlı C' sistem komponentleri için tanımlanmış altı tip reseptör bulunmaktadır. Bunlar arasından en iyi bilinen ise C3b'nin reseptörü CD35'dir. Bu reseptör hem makrofaj hem de PMNL membranlarında bulunur. CD35, antijen yüzeyinde bağlı olarak bulunan C3b'yi inaktif parçalarına ayırarak, C' aktivasyonunu yavaşlatır.⁵¹

2.4.1. İnflamatuvar Yanıt

Aktivasyon esnasında oluşan C' sistem komponentlerinden, C3a, C4a, C5a özgül reseptörlerine etki ederek lokal inflamatuvar yanıt oluştururlar. Bu üç peptid, anafilaktik reaksiyonlara özgü mast hücre degranülasyonunu başlattıkları için 'anafilatoksin' olarak isimlendirilirler. Bu üç anafilatoksin, düz kas kasılmasını indükler ve damar geçirgenliğini artırır. Ayrıca C3a ve C5a mukoza altı dokularda yoğun bir şekilde bulunan mast hücrelerini aktiveleştirerek, TNF- α ve histamin gibi moleküllerin salınmasını ve endotel hücrelerine etki ederek, adhezyon moleküllerinin ifadenmesini indükler. C5a komponenti, nötrofil ve monositler üzerinde de etki ederek, damar duvarına aderenslerini artırır, antijenin bulunduğu bölgelere göçünü sağlar ve partikülleri yutma yeteneklerini artırır.^{51, 52}

Fagositlerin enfeksiyon bölgesine göç etmesi çok basamaklı bir süreçtir. Akut enfekte olmuş dokulardaki küçük damarların endotel hücreleri, enfeksiyon bölgesinden salgılanan sitokinler, yağ asidi türevleri ve mikrop ürünleri ile aktiveleşir. Aktifleşen endotel hücrelerin yüzeylerinde hücre adhezyon moleküllerinden (CAM) E selektin ve P selektinler oluşur. Dolaşımda bulunan monosit, lenfosit ve nötrofillerde CAM'a bağlanan reseptörler bulunmaktadır. Bu selektinler fagositler üzerinde yapısal olarak

bulunan E ve P selektin reseptörlerine bağlanırlar. Lökosit göçünün yapışma aşamasının başlangıcında oluşan bağlanmalar zayıftır. Kan akımının etkisiyle kolayca çözünür ve nötrofillerin yavaşlamasına neden olur. Yeni ifadelemiş ICAM-1 birkaç saat içerisinde endotel yüzeyinde oluşur. Endotel hücrelerinden salgılanan IL-8 gibi kemokinlerle aktifleşen nötrofillerden integrin ekspresyonu ile ICAM-1 bağlanma aviditeleri artar. Bu bağlanma daha önceki bağlanmaya göre oldukça güçlüdür. Enfeksiyon bölgesinden salınan C5a komponenti, bakteri oligopeptidleri ve lökotrienler gibi kemoatraktanlar PMN'leri daha da aktifleştirerek, hücrelerin damar endotelinden dışarı çıkarak dokulara göçünü gerçekleştirir.^{13, 51 52}

Aktifleşen PMN'ler, enfeksiyon bölgesinde antijenleri tanır ve yutma işlemini gerçekleştirir. Fagositozu kolaylaştıran proteinlerle kaplanma olayına 'opsonizasyon' antijeni kaplayan proteine ise 'opsonin'denir. C' komponentleri, lektinler ve antikolar opsoninlere örnektir. Fagosit reseptörleri, opsoninlerle kaplanan antijen ile bağlanınca, hücre iskeleti, kasılma elemanlarını aktifleştirerek invajinasyonun oluşmasına neden olur.⁵¹

Adaptif immün sistem gibi doğal bağışık sistemde, kendine ait olmayanı ayırt edebilir. Fakat bunu adaptif immün sistemde olduğu gibi antijene özgül reseptörler aracılığı ile değil de, tüm antijenlerde korunmuş olarak bulunan genel yapılara bağlanan reseptörler aracılığı ile sağlar. Antijenlerin yüzeyleri ve nükleik asitleri tekrarlayan yapılar sergiler.^{13, 51, 52} Bu yapılara ise patojen ilişkili moleküler paternler (PAMPs) denir. Doğal immün sistem hücreleri ise PAMPs'lara bağlanan kalıp patern hatırlayıcı reseptör (PRRs)'lere sahiptir.⁵³ Doğal immün sistem reseptörlerinin birkaç farklı görevleri vardır. MBL sürfaktan proteinleri, makrofaj mannoz reseptörleri, çöpçü reseptörler gibi birçoğu fagositik reseptörlerdir ve tanıdıkları antijenlerin yutulması için sinyal verirler. Bazıları kemotaktik reseptörlerdir, nötrofillerin enfeksiyon bölgesine göç

etmesini sağlar, bazı fagositik reseptörler ve özelleşmiş sinyal iletim reseptörleri (TLR) ise doğal immün yanıtın efektör molekülleri ile adaptif immün yanıtı başlatan ve doğasını etkileyen moleküllerin üretimini indükler.^{13, 51 52}

2.4.2. İnflamasyon

Doğal immün sistemin önemli koruyucu mekanizmalarından biri olan inflamasyon, doku hasarlanmasına vücudun verdiği fizyolojik yanıtıdır. Akut inflamatuvar yanıt lokal veya sistemik olabilir. Dokuda hasar meydana geldikten birkaç dakika sonra damar çapında genişleme sonucu kan haciminde artış ve kan akım hızında yavaşlamadan dolayı o bölgede kızarıklık ve ısı artışı meydana gelir. Damar geçirgenliğinin artması sonucu, damar dışına sıvı geçişi olur ki bu da ödem oluşumuna yol açar. Damar dışına sıvı çıkması ile kinin, koagülasyon ve fibrinolitik sistem de aktifleşir. Damar değişikliklerinin başlamasından sonraki birkaç saat içerisinde nötrofiller endotel hücrelerine yapışarak, damar dışına çıkarlar ve kemokinlerin etkisiyle enfeksiyon bölgesine göç ederler. İnflamatuvar yanıtın başlamasından 5-6 saat sonra ise, makrofajlar hasarlı bölgeye yerleşirler. Aktive makrofajlar IL-1, IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinleri üretirler ve bu sitokinlerin etkisi ile sistemik inflamatuvar yanıtta gözlenen değişiklikler meydana gelir. Bu sitokinlerin hepsi koagülasyonu tetikler ve damar geçirgenliğini artırır.⁵¹

Organizma inflamasyonun şiddetine göre, farklı yanıtlar verir. İnflamasyonun şiddeti hafif ise normal inflamatuvar yanıtla iyileştirir, fakat inflamasyon şiddetli ise inflamasyon o bölge ile sınırlı kalmaz, sistemik inflamasyon halini alır daha da ilerleyerek organları etkileyerek SIRS, sepsis, ağır sepsis, septik şok ve sonuçta çoklu organ yetmezliğine yol açar.⁵⁴⁻⁵⁸

2.4.3. İmmün Sistem ve Sistemik İnflamatuar Yanıt Sendromu

SIRS, fizyopatolojisinde hem doğal hem de adaptif immün sistem önemli rol oynamaktadır.⁵⁸ SIRS, infeksiyöz veya noninfeksiyöz bir tetikleme mekanizmasıyla ortaya çıkan geniş çaplı inflamatuvar yanıttır. SIRS'da Tablo 2.3'de belirtilen kriterlerden iki tanesinin olması gerekir.^{13, 59-61}

Tablo 2.3. Sistemik inflamatuvar yanıt sendromunun klinik parametreleri

Vücut ısısı: $\leq 36^{\circ} \text{C}$ veya $\geq 38^{\circ} \text{C}$

Taşikardi: >90 atım/dk,

Takipne: solunum sayısı >20 /dk veya $\text{PaCO}_2 \leq 32$ mmHg,

Lökosit sayısı $\geq 12000/\text{mm}^3$ veya $<4000/\text{mm}^3$

% 10 immatür bant formu varlığı

SIRS'in insidansı oldukça yüksektir ve gelişimi 3 aşamadan oluşmaktadır.¹³

Birinci aşaması; infeksiyöz veya noninfeksiyöz ajanların uyarımı sonucu lokal sitokin salınımıyla beraber inflamatuvar cevap başlar, retikuloendotelial sistem hücreleriyle onarılır ve yara iyileşmesi hızlanır.¹³

İkinci aşaması; lokal yanıtı güçlendirmek amacıyla az miktarda sitokinler dolaşıma geçer, makrofaj ve trombositler inflamasyonlu bölgeye göç ederek büyüme faktörlerinin üretimi uyarılır.¹³

Üçüncü aşaması; proinflamatuvar mediatörler ve endojen antagonistler aracılığıyla akut faz yanıtı kontrol edilir. Bu süreç homeostazın sağlanması ve inflamasyonun ortadan kaldırılmasına kadar devam eder. Eğer homeostaz sağlanamazsa üçüncü aşamada SIRS gelişir.¹³

2.4.4. Sistemik İnflamatuar Yanıt Sendromu Mediatörleri

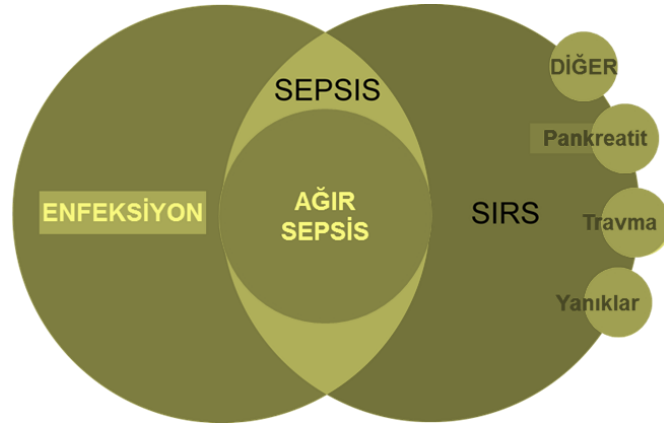
SIRS'ı tetikleyen en güçlü uyarıcı bakterilerin çoğalması veya ölmesi esnasında salınan endotoksindir. SIRS'ın ve sepsis fizyopatolojisinde birçok mediatör rol

oynamasının yanısıra TNF- α , IL-1 ve IL-6 en etkili mediatörlerdir. Organizmaya antijenin girmesinden 1-2 saat sonra TNF- α , IL-1 β ve bunlarla birlikte, IL-6, IL-8 Nötrofil Aktive Edici Peptit, Makrofaj Migrasyon Faktör, Yüksek Motiliteli Grup Protein-1 (HMG-1), IL-12, IL-18, IFN γ gibi önemli proinflamatuvar sitokinlerde salınır.

İnflamasyon esnasında siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzim yolları da aktive olur.⁵⁹ Siklooksijenaz yolu ile oluşanlar arasında en güçlü vazodilatör olarak bilinen prostasiklin, düz kas hücrelerinde adenilat siklazı aktive ederek vazodilatasyona neden olur. Ayrıca platelet agregasyonu, adhezyonunu inhibe ederek trombus oluşumunu da azaltır. Vasküler permeabilityyi arttıran diğer vazoaaktif aminler ise serotonin ve bradikininidir. Endotel hücrelerinden, nötrofillerin inflamasyonlu alanda birikmesini uyaran, trombosit agregasyonunu sağlayan, vasküler permeabilityyi arttıran tromboksan A2 (TXA2) ve PGI2'de üretilmektedir.^{58, 62} Lipooksijenaz yolu ile oluşan lökotrienlerden LTB4, nötrofil kemotaksisini ve endotele yapışmasını sağlamakta, vasküler geçirgenliği artırmaktadır.¹³

2.5. Sepsis

Sepsis, enfeksiyonlara karşı konağın aşırı ve düzensiz yanıtı ile meydana gelen tüm organ sistemlerinin rol oynadığı, klinik, hemodinamik, hematolojik, biyokimyasal ve inflamatuvar yanıtın oluşturduğu bulguları içeren heterojen klinik bir tablodur.^{5, 61, 63} 1992 yılında American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine' tarafından gerçekleştirilen konsensüs toplantısında sepsisle ilgili tanımlamalar ve sınıflandırılma yapılmıştır.⁵⁹



Şekil 2.3. SIRS, sepsis ve enfeksiyon arasındaki ilişki⁷

Sepsis: İnfeksiyon varlığında en az 2 SIRS bulgusunun bulunduğu (Şekil 2.3) sistemik inflamatuvar yanıttır. ^{59, 60}

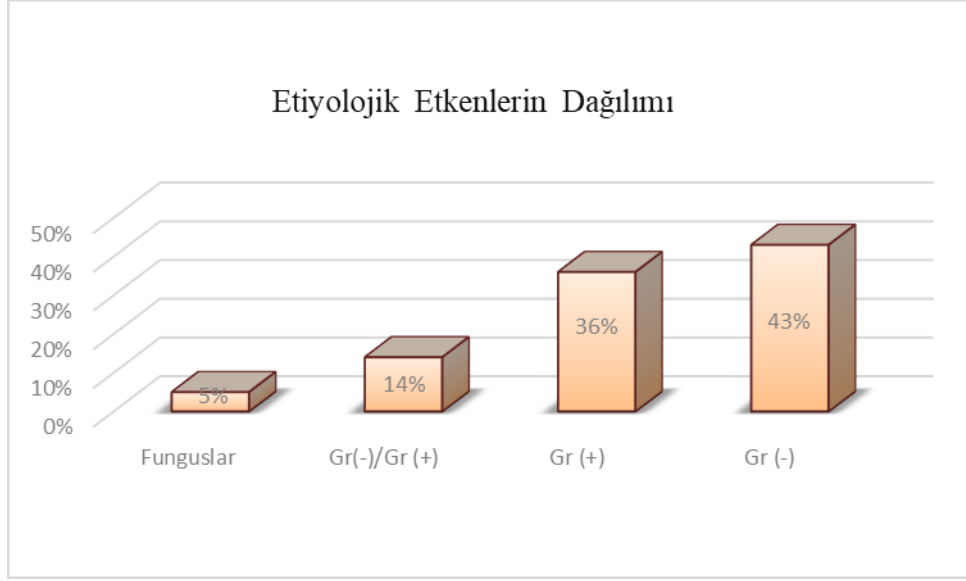
Şiddetli sepsis: Sepsis varlığında bir organ sisteminin perfüzyon ve fonksiyon bozukluğu ile ilişkili durumların görülmesidir. ^{59,60}

Septik Şok: Yeterli sıvı resüsitasyonuna yanıt vermeyen organ disfonksiyonu ve hipoperfüzyonun eşlik ettiği sepsis kaynaklı hipotansiyondur. ^{59, 60}

Multiple Organ Yetersizliği Sendromu (MODS): Homeostazis'in müdahale olmadan sağlanamadığı akut vakalarda iki veya daha fazla organ ya da organ sisteminde oluşan fizyolojik fonksiyon bozukluğudur. ^{59, 60}

2.5.1. Sepsisin Etiyolojisi

Sepsis, bakteriyel, viral, fungal, paraziter gibi enfeksiyöz ajanlarla meydana gelebildiği gibi nonenfeksiyöz olaylarla da meydana gelebilir (Şekil 2.4). Olguların büyük bir çoğunluğunda sorumlu etken gösterilmemesine rağmen, antibiyotik tedavilerine cevap vermesi bu durumlarda da enfeksiyöz bir ajanın varlığını düşündürmektedir. ^{59, 60, 63}



Şekil 2.4. Sepsiste etiyolojik etkenlerin dağılımı⁵⁹

Gram negatif sepsiste, Escherichia coli (% 22), *Streptococcus pneumoniae* (% 16) gram pozitif sepsiste *Staphylacoccus aureus* (% 12), fungal sepsislerde ise kandida türleri ön plana çıkmaktadır.⁶⁰ Sepsise neden olan organizmalar arasında insanlarda gram pozitif bakteriler ve mantarlar gözlenirken, gram negatif bakteriler ise hayvan çalışmalarında gözlenir.⁵⁹

2.5.2. Sepsisin Epidemiyolojisi

Sepsis gelişen tedavi yöntemlerine karşın yüksek mortalite ile seyreden, artan insidansa sahip hastalık özelliğini korumaktadır.^{61, 63} 2002 yılında 24 Avrupa ülkesinin 198 yoğun bakımında yapılan çalışmanın verilerine göre sepsis insidansı % 37 olarak tespit edilmiştir. Enfeksiyon odağı olarak ta % 68 akciğer, % 22 batın, % 20 kan ve % 14 üriner sistem tespit edilmiştir.⁶⁰ Dünya çapında yıllık 19 milyon olgu, günlük olarak ise 1.400 ölüm ile sonuçlanmaktadır.⁵

2.5.3. Sepsis Fizyopatolojisi

İnvazif mikroorganizmaların deri, respiratuvar sistem, gastrointestinal sistem veya genitoüriner sistem gibi⁶³ yani damar dışı enfeksiyon odağından⁶⁴ belli bir eşik değerini aşarak kan dolaşımına yüksek miktarda bakteriyel antijenlerin⁵⁹ katılmasıyla

sepsis başlar. Antijen ve konağın savunma sistemi arasındaki etkileşim sonucu mikroorganizmaların yok edilmesini sağlayan proinflamatuvar mediatörlerin salınması ve bununla birlikte inflamatuvar yanıtı kontrol etmek amacıyla antiinflamatuvar mediyatörlerin salınımında artışı gerçekleşir. İnflamatuvar yanıtların artmasıyla dokuda hasar oluşmaya başlar ve artan antiinflamatuvar yanıtlar lökositlerin aktifleşmesine neden olur. İnflamatuvar yolların etkinleşmesiyle proinflamatuvar ve antiinflamatuvar mediatörler arasındaki etkileşim sepsis ve septik şok patogenezinde önemli rol oynar.⁶³ Sepsis, enfeksiyon odağına karşı hücresel immünolojik yanıtla başlayan, ilerleyen aşamasında organ ve sistemler düzeyinde organizmaya zarar veren karmaşık mekanizmalar bütünüdür.⁶⁰

Sepsis fizyopatolojisinde; mikrobiyal patojenler, inflamatuvar yanıt, triadında ise sistemik inflamasyon, koagülasyon ve bozulmuş fibrinoliz yer almaktadır.^{13, 65} Mikrobiyal ajanlar; bakterilere ait por oluşturan toksinler, lipoteikoik asit, gram pozitif bakterilerin süperantijenleri, lipopeptitler, peptidoglikanlar, gram negatif bakterilerin hücre duvarı komponentleridir.^{13, 65} Bu ajanlar içerisinde sepsisi tetikleyen en önemli molekül ise gram negatif bakterilerin hücre duvarı komponentleridir.^{13, 59, 61, 63}

PAMP'lar vücudun doğal immünitesi tarafından tanınma özelliğine sahiptir.^{60, 66} LPS ise bilinen en iyi PAMP örneğidir. Bakteri hücresinin lizizi sonucunda açığa çıkan LPS veya toksik hücre duvar komponentleri, kan dolaşımına geçer. LPS, çözünebilir protein olarak veya plazma membranında bulunan LPS bağlayan protein (LBP) tarafından bağlanır.^{51, 60, 66} LBP, LPS'yi gram negatif bakterinin dış membranından CD14'e taşır.^{59, 60, 66} CD14'ün görevi de LPS'yi TLR4/MD2 kompleksine aktarmaktır. MD2, reseptör kompleksinin ligand bağlayan kısmıdır. Komplekse bağlanan LPS, TLR4'ün oligomerizasyonuna yol açar. Oligomerize olan TLR4,⁵¹ sitokin ve diğer mediatörlerin salınımına neden olan yolakları ve NF-kB'yı aktive eder.^{13, 59, 60, 66}

Antijen ve konakçının ilk karşılaşmasından sonra, doğal immün sistem aktivasyonu başlar. Aktive makrofajlardan TNF, IL-1, IL-6, IL-8 ve PAF gibi proinflatuar sitokinler salınmaktadır.^{13, 59, 60, 63, 65, 66} IL-1 ve IL-6 T hücrelerini aktive ederek IFN- γ , IL-2, IL-4 ve granüosit-monosit koloni stimulan faktör salınmasına neden olur.^{13, 60, 66} TNF, nötrofillerin yüzeyindeki adhezyon moleküllerini aktive ederek, nötrofillerin endotele yapışmasına neden olur. Nötrofillerin degranülasyonu sonucu meydana gelen proteazlar ve oksijen radikalleri endotel hücrelerinin hasar görmesine neden olur.⁵⁹ LPS'nin ortaya çıkmasından hemen sonra TNF- α ve IL-1 gibi medyatörler ardından ise ikincil sitokinlerin, lipid medyatörlerinin ve sepsiste önemli olan araşidonik asit metabolitlerinin oluşur.⁶⁰ Siklooksijenaz yoluyla vazodilatör olan^{60, 66} prostaglandinler^{59, 60, 66} ve vazokonstriktör olan⁶⁰ TXA2,^{60, 66} lipooksijenaz yoluyla⁶⁰ ise lökotrienler oluşur.^{59, 66} Araşidonik asit metabolitleri, TNF- α , IL-1, PAF, NO,⁶⁷ bradikinin, histamin⁵⁹ vasküler permeabilitenin artmasına,⁶⁵ kanın vasküler yatakta göllenmesine, genel dolaşımdaki kan hacminin azalmasına ve organ yetmezliğine neden olur. Ayrıca C' aktivasyonu sonucu oluşan C3a ve C5a komplemanları mast hücrelerini uyarak, başta histamin olmak üzere vazoaktif aminlerin salınmasına ve nötrofillerin aktivasyonuna neden olur. Aktive nötrofiller, endotel hücrelerine yapışır ve endotel hücre hasarına neden olur. Bundan dolayı, sepsiste ana hedef organ damar endotelidir.^{64, 65, 67}

Endotoksin etkisi ile aktive olan sistemlerden bir diğeri ise koagülasyon kaskadıdır.⁶⁷ IL-1, IL-6,¹³ TNF⁵⁹ gibi proinflatuar sitokinlerin etkisiyle endotel hücre yüzeyi zarar görür ve koagülasyon kaskadını başlatan¹³ doku faktörü (TF) salınmasına neden olur.⁵⁹ Monositlerden TF salınımını inhibe eden IL-10, IL-6 ile birlikte⁵⁹ TNF- α sentezini önler. Ayrıca akut faz reaktanları ve immunoglobulinlerin etkisini artırarak T lenfositlerin ve makrofajların fonksiyonlarını inhibe ederek sepsiste

antiinflamatuvar rol oynar.^{59, 60} Monositlerden salınan IL-10 prokoagülan aktiviteyi baskılar.⁵⁹ Mononükleer ve endotel hücrelerinde bulunan TF, LPS veya diğer mikrobiyal ajanlarla aktive edilmektedir.¹³ Aktive TF plazma fibrinojenini, fibrine dönüştürerek pıhtı oluşumuna neden olan trombin üretimini artırır.⁵⁹ İlk önce ekstrinsek yol ve daha sonra faktör XII aktivasyonu ile intrinsek yolda aktive olur^{13, 60,} ⁶⁷ ve fibrinojenden fibrin oluşumu gerçekleşir.¹³ Sonuç olarak fibrin yapımında artış, yıkımında ise azalma meydana gelir.^{13, 60} Fibrin yapımındaki artış, küçük kan damarlarındaki fibrin tıkaçlarının oluşmasına neden olur.¹³ Dokulara oksijen iletilmesi, yetersiz sıvı replasmanından dolayı engellenir.⁵⁹ Bu tıaçlarda doku perfüzyonunu bozarak organ yetersizliğinin gelişmesine olanak sağlar.^{13, 65} Proinflamatuvar sitokinlerden IL-1 ve IL-6 koagülasyon kaskadını tetikler, monositlerden TF salınmasını inhibe eden IL-10 ise koagülasyonu düzenlemektedir.¹³

Organ yetersizliği patogenezinde birçok faktör etkili olduğu bilinmesine rağmen, sebebi tam olarak açıklanamamıştır. Medyatörlerin salınması ile koagülasyon, fibrinolizis ve kinin sistemi aktive olur^{59, 60, 67} Koagülasyon kaskadının ve kompleman sistemin tetiklenmesi fagositler, endotel hücreleri ve diğer hücrelerin aktivasyonları üzerinden gerçekleştirilir.⁶⁰ Plazminojenin plazmine dönüşümünden sorumlu olan doku plazminojen aktivatörü, fibrinolizden sorumlu primer enzimdir. Plazmin ise fibrin yumaklarının çözülmesinden sorumludur. Fibrinolizin aşırı oluşmasını engelleyen doğal koruyucu maddeler ise, plazminojen aktivatör inhibitör-1 ve trombin aktive fibrinoliz inhibitör'dür. Enfeksiyon esnasında plazminojen aktivatör inhibitör-1 normal fibrinolitik cevabı bozar.⁵⁹ Fibrin birikimine bağlı olarak mikrovasküler oklüzyon, doku eksüdasının birikmesi, doku oksijenizasyonun bozulması ve PAF, histaminler, prostaglandiler gibi vazoaktif aminlerin mikrovasküler homeostazisi bozması temel sebep olarak görülmektedir. C' aktivasyonu, damar premeabilitesini ya doğrudan ya da

nötrofiller üzerinden aktive etmek suretiyle bozarak endotel hasarı oluşturur.⁶⁰ Nötrofillerden salınan lizozomal enzimler⁶⁷ ve serbest oksijen radikalleri de dokuya zarar verir. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enzimi (iNOS), NO yapımını artırır. Artan NO salınımı vasküler instabiliteye neden olur. Damar endotelinde meydana gelen bu değişiklikler ekstravazyon ve mikrotrombüs oluşumunu kolaylaştırarak organ perfüzyon bozukluklarına sebep olarak organ yetmezliğinin oluşmasına neden olurlar.^{60, 67} Sepsiste en çok akciğer, böbrek, karaciğer ve kalp yetmezlikleri görülür. Sepsiste oluşan mikrosirkülatuar perfüzyon bozukluğu oksijen yetersizliğine ve mitokondriyal disfonksiyon gelişimine neden olur. Mitokondriyal disfonksiyon artmış oksijen ve nitrojen radikalleri ve azalmış glutatyon seviyeleri, oksidatif fosforilasyonu ve ATP üretiminde azalmayla birlikte sepsiste mortalitenin artmasına neden olur.⁶⁰

2.6. Sitokinler

Sitokinler noninfeksiyöz immün sistemde hücreler arası haberleşmeyi sağlayan⁶¹ glikoprotein veya protein yapısındaki moleküllerdir.⁶⁸ Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan sitokinler, gen transkripsiyonunda düzenleme yaparak, immün sistem hücrelerinin çoğalmalarına, farklılaşmalarına ve yaşam sürelerine etki ederler.¹³

Uyarı sonucu sitokinleri kodlayan mRNA transkriptleri yapılmakta ve bunun sonucunda sitokinler sentezlenmektedir. LPS gibi mikrobiyal ajanlar mononükleer fagositleri uyararak özgül sitokinlerini salgılatırlar. Sitokin sentezi ve salgılanması yaklaşık olarak birkaç saat veya gün sürebilir ve bağışıklık yanıtına göre de miktarı azaltılabilir veya arttırılabilir. Birçok farklı hücre tipine göre etki ederler.¹³ Sitokinler hidrojen peroksit, nitrik oksit, hidroksil radikali ve süper oksit radikali gibi oksidan moleküllerin sentezini de stimüle eder. Stimüle olan bu oksidan moleküller mikroorganizmanın hücresel bütünlüğünü bozar.⁶¹

2.6.1. Tümör Nekrozis Faktör (TNF)

Nonglikolize transmembran bir protein olan TNF, proinflamatuvar sitokinler arasında konakçı cevabındaki en güçlü ve en erken salınan mediatördür.¹³ TNF ‘ün aktif makrofajlardan salınan TNF- α (Kaşektin) ve aktif T hücrelerinden salınan TNF- β (Lenfotoksin) olmak üzere iki formu bulunmaktadır.^{13, 59} İnsanda 6. kromozomun kısa kolu üzerinde bulunan TNF- α geni, 17 kilodalton (kDa) ağırlığında^{13, 69} ve 157 aminoasit içermektedir. Yarılanma ömrü 14-18 dakika kadar kısa bir süre olup, cilt, gastrointestinal sistem ve böbreklerde metabolize olmaktadır. TNF- α ’nın;

- a) Nötrofillerin kemik iliğinden salınmasını sağlama,
- b) Nötrofil migrasyonunu başlatan adhezyon moleküllerini salma,
- c) Nötrofillerin transendotelyal geçişlerini ve degranülasyonunu sağlama,
- d) Süperoksit üretimi ve lizozimlerin salınmasına neden olma,
- e) Koagülasyon ve kompleman kaskadının aktivasyonunu ve akut faz proteinlerin sentezini yapma,
- f) Trombomodulin ekspresyonunu inhibe etme,

gibi görevleri vardır.¹³

2.6.2. İnterlökin -1 (IL-1)

Nötrofiller, B lenfositler, endotel hücreleri,^{13, 70} doku makrofajlarından⁶¹ prohormon olarak salınan^{13, 70} 18 kDa ağırlığındaki IL-1,⁶⁹ kaspas 1 enzim sistemi ile aktif forma dönüşmektedir.^{13, 69, 70} Kaspaz enzimi inflamasyon sinyalleri ile uyarılır.⁶⁹ IL-1 yapısal olarak birbirleri ile ilişkili iki temel polipeptidten oluşmaktadır. Bunlardan biri, çoğunluğu prekürsör olarak sitozolde veya aktif form olarak hücre membranında bulunan IL-1 α , diğer ise 2q13-q21 kromozomu üzerinde lokalize IL-1 β ’dir. IL-1 α ve IL-1 β , molekül ağırlıkları 175 kDa olup,¹³ aynı hücre yüzey reseptörlerine bağlanıp, aynı etkiyi oluştururlar.^{13, 59} IL-1 β , daha çok sistemik yangısal olaylarda, IL-1 α ise daha

çok lokal inflamasyonlarda rol oynarlar. IL-1 vazodilatasyon, ateş, hipotansiyon, lenfositlerin aktivasyonunda artış, karaciğerde akut faz proteinlerinin ve prostaglandinlerin sentezinin uyarılmasına sebep olur. Sepsis hastalarında IL-1 düzeyi yüksektir ayrıca TNF- α 'nın etkilerini destekler.⁷¹

2.6.3. İnterlökin -6 (IL-6)

Glikoprotein yapıda olan IL-6,⁵⁹ B hücreleri,¹³ T hücreleri⁶¹ timusun stroma hücreleri, endotelial hücreler ve fibroblastlardan sentezlenir. Molekül ağırlığı 24 kDa'dur.¹³ Pro-inflamatuar, anti-inflamatuar ve endokrin fonksiyonları olan pleiotropik bir sitokindir.^{13, 59} IL-6 reseptörünün 80 kDa ağırlığında protein bağlayan ve 130 kDa ağırlığında sinyal iletimini sağlayan alt birimden oluşur. Bu reseptörlerin diğer sitokin reseptörlerinden farkı ise IL-6 etkisini artırmaktır.⁵⁹ Tümör nekroz faktör reseptörü ve IL-1 reseptör antagonistlerinin sentezini artırarak proinflamatuar yanıtın düzenlenmesine neden olurlar.¹³ Ayrıca antiinflamatuar^{13, 65} özellikleri de bulunmaktadır. İnflamatuar uyarılara yanıt olarak en kısa sürede sentezlenir. IL-6 sentezini ve salınımını IL-1, TNF- α , IFN- γ , Trombosit kaynaklı büyüme faktörü tarafından indüklerken, IL-4, IL-10 ve IL-13 ile de inhibe edilmektedir. IL-6, T hücrelerinin yapımı, aktivasyonu, farklılaşmasını, nötrofillerin harekete geçmesini uyarır ve nötrofil apoptozisini inhibe ederler. IL-1 ile birlikte T hücre proliferasyonu ve PMNL aktivasyonunu sağlarlar.¹³ Ayrıca hücre büyümesinde de etkili olduğu belirlenmiştir.⁶⁵ Kinetiği oldukça hızlı olup 1-2 saat içerisinde artıp, daha sonra tekrar düşmektedir.⁶⁷

2.6.4. Nitrik Oksit (NO)

Hücre membranlarından kolayca geçebilen, yağda çözünebilme özelliğine sahip⁶⁹ NO gaz yapısında kısa ömürlü bir moleküldür.^{69, 72, 73} Plazma membranını geçtikten sonra, direkt veya guanilat siklaz aktivasyonu ile siklik guanozin monofosfat (cGMP)

oluşumunu hızlandırarak olayların hızına katkı sağlar.^{69, 72} NO sentazlar aracılığıyla L-arjininin L-sitruiline dönüşümünü esnasında ara ürün olarak sentezlenir. İki konstitütif biri indüklenebilir olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır.⁷³ Bunlar, düz kas ve kalp kasında, kadın ve erkek üreme yollarında bulunan endotelial NOS (eNOS), spinal kord, parasempatik gangliyonlar, mide epitel hücreleri, akciğer, periferel sinirler ve iskelet kasında bulunan eNOS ve hücre aracılı immun cevapta etkili iNOS enzimidir. iNOS, LPS ve proinflatuar sitokinler tarafından indüklenerek, makrofajlar, hepatositler, nötrofiller, endotel hücreleri^{69, 72} ve kan beyin bariyeri gibi birçok hücreden⁶⁹ NO üretimine neden olur.^{69, 73} Organizmaya antijen girmesi sonucu iNOS aktivasyonu ve yüksek düzeydeki NO sentezinin görüldüğü hücrelerin başında makrofajlar gelmektedir. Makrofajlar tarafından sentezlenen NO, makrofajlardan difüzyon yoluyla DNA sentez inhibisyonuna, glikoliz ve sitrik asit siklusunun bazı enzimlerinde bozulmaya, elektron taşıma zincirinin inhibisyonu aracılığıyla tümör hücrelerinin öldürülmesinde önemli rol oynarlar.⁷³ Üretilen NO, kısa bir zaman sonra nitrite ve ardından da nitrate dönüşür.^{69, 72} Sepsis ve mukozal inflamasyon esnasında NO, sitotoksik düzeye ulaşır.⁷²

eNOS ilk olarak endotelial hücrelerde tanımlanmıştır ve % 90'dan fazlası membranaldır^{74, 75}. Farklı tipte arteriyel ve venöz endotelial hücrelerde,^{74, 76} insan plasenta hücrelerinde,^{74, 77}, böbrek tübüler epitel hücrelerinde^{74, 78} gibi farklı kısımlarda lokalize edilmiştir. Ca^{2+} kalmodulin bağımlı bir enzim gibi intrasellüler serbest Ca^{2+} konsantrasyonlarının artması sonucu aktive olur.⁷⁴

2.7. Lipopolisakkarit Antijeni (LPS)

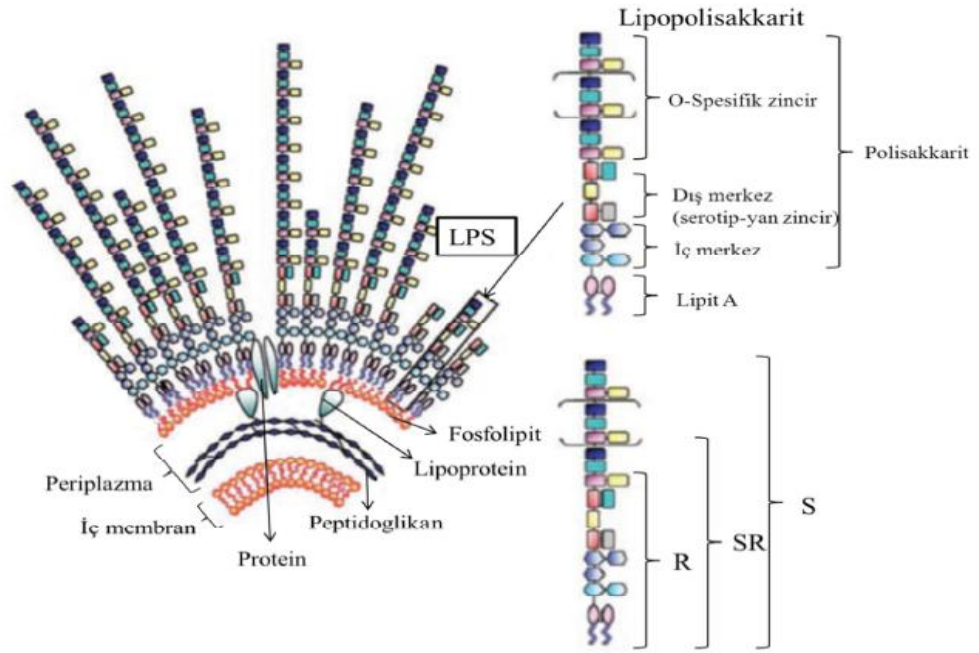
Bakteriler sağlıklı bireylerde gastrointestinal sistemde bulunur. Bakterilerin barsak duvarını aşarak kan dolaşımına geçmesine 'bakteri translokasyonu' denir. Bağırsak duvarının intakt olduğu zaman bakterilerin kan dolaşımına translokasyonu gerçekleşmez. Bakterinin çoğaldığı durumlarda ise, immün sistemde bozulma gibi buna

benzer sebeplerden dolayı epitelyal hücrelerin membran permeabilitesi bozulur ve bakterinin kan dolaşımına translokasyonu gerçekleşir. Kan dolaşımına gram negatif bakterilerin LPS veya diğer hücre duvarı komponentlerinin geçmesi lökositleri ve diğer parankimal hücreleri aktive ederek inflamasyon sürecini başlatır.⁶⁸ LPS, gram negatif bakteriler için yaşamsal önemi olan bir hücre duvarı komponentidir.^{68, 72} Bakteriler öldüğü veya bölündüğü zaman bu hücre duvarı komponenti açığa çıkar.⁶⁸

LPS immünokimyasal olarak, etkin bir lipid A,^{68, 69, 79} O-polisakkarit yan zincir ve R-kor oligosakkarit^{68, 69} olmak üzere birbirlerine kovalanet olarak bağlanmış moleküle polar ve amfipatik özellik kazandıran üç bölümden oluşur (**Şekil 2.5**). Lipid A kısmı, gram negatif sepsiste gözlenen toksik etkiden^{63, 72, 79} sorumlu endotoksin molekülüdür⁶³ ve başlıca etkileri, makrofajları etkinleştirmek ve inflamatuvar süreci başlatmaktır.⁷⁹ O-polisakkarit yan zinciri, tekrarlayan oligosakkarit ünitelerinden oluşur ve bu kısım, endotoksine serotip denilen bakteriyel köken oluşturur ve karakteristik özellik kazandırır. Aynı zamanda O-polisakkarit kısmı bakteriyel virülans etkenidir.^{68, 69}

Bakterilerin, konakçının immün sistem mediatörlerinin etkisi ve antibiyotik uygulaması sonucu parçalanmasıyla LPS açığa çıkar. LPS kan dolaşım sistemine geçer ve hedef hücreleri aktive ederek inflamasyon sürecini başlatır. Karaciğerde sentezlenen LBP,^{63, 68, 69, 72, 79} akut inflamasyon aşamasında konsantrasyonu artar. LBP, LPS'nin lipid A kısmına bağlanan lipid transferaz etkinliğine sahip bir serum glikoproteinidir.⁶³ Lipit transferaz etkinliği ile LPS'nin CD14 reseptörüne transferi sağlanarak⁶³ Lipid A kısmı ile kompleks oluşturur.^{63, 68} Bu kompleks hem opsonizasyonu artırır hemde TNF- α uyarılmasını sadece LPS'ye göre daha çok artırır.⁶⁸ Makrofajların yüzeyinde bulunan CD14 reseptörüne LPS-LBP kompleksi bağlanır.^{68, 69, 72, 79} CD14 reseptörü ise, polimorf nükleer lökositlerden ve makrofajlardan eksprese edilen ve glikozil-fosfatidilinozitol ile bağlı olarak bulunan veya dolaşımda çözülebilir halde bulunan

protein formunda LPS sinyal iletilisinde görevli 50 kDa ağırlığında bir glikoproteindir.⁶³ Lökositlerde bulunan bakterisidal permeabilite artırıcı protein LPS ve CD14 etkileşimini kompetitif olarak inhibe eder.^{68, 79} LPS ile indüklenen inflamasyon sürecinin ilk yanıtını IL-1 β ve TNF- α oluşturur.^{68, 72, 79} Bu sitokinler ise koagülasyon kaskadını, kompleman kaskadını, araşidonik asit metabolizmasının aktive olmasına ve nitrik oksit sentezi indüksiyonuna neden olurlar.^{68, 79}



Şekil 2.5. Gram-negatif bakteri duvarı ve LPS'nin şematik gösterimi.⁶⁹

2.7.1. Endotoksin

Gram negatif bakterilerin hücre duvarları iki tabakadan oluşur.⁶⁸ Dış tabaka bakteriyemide toksisiteden sorumlu LPS ve protein ihtiva eder.^{68, 79} LPS kan dolaşımına kolayca geçip monosit ve makrofajları aktive ederek sitokinlerin salınımına⁶⁸ ve akut yangının başlamasına neden olur.⁷⁹ Lipopolisakkarit tabakada bulunan endotoksin molekülü, hücre membranında bulunduğu sürece inaktif haldedir. Hücrenin büyümesi veya yıkımı sonucunda açığa çıkan endotoksin sepsis/endotoksemi olaylarının başlamasında önemli bir moleküldür.⁷⁹

2.7.2. LPS'nin Sinyal İletisi

LPS, serumda LBP tarafından taşınarak, immün sistem hücrelerinin membranında bulunan glikozil-fosfotidilinozitol ile bağlı halde bulunan CD14 reseptörlerine transfer edilir. Bu reseptörlerin hücre içi bölgesi bulunmadığı için sinyal iletisini gerçekleştiremezler. CD14 reseptörü, LPS'yi TLR-4/MD-2 kompleksine sunarak, bu kompleksin etkileştirir ve ikinci bir TLR-4/MD-2 reseptör kompleksi ile dimerize olmasını sağlar.⁶³ Bu bağlanma sonucunda çekirdekte lokalize olan NF-kB'nin aktive olur ve TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-8 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimine neden olur. Bu sitokinler ise gram negatif bakterilerin neden olduğu zararlı etkiye katkı sağlayan NO, prostaglandin (PG), kemokin gibi mediyatörlerin salınımını sağlarlar.⁶⁹

3. MATERYAL VE METOT

Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenen 2016/115 nolu ‘*Myrtus Communis* L. Bitkisinin Meyvesinden Elde Edilen Uçucu Yağın HUVEC Hücre Hattında LPS ile İndüklenen Endotoksemiye Bağlı Hücre Hasarına Etkilerinin Biyokimyasal Olarak Araştırılması’ adlı çalışma Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Etik Alt Kurulunun 93722986.12 sayılı ve 92 nolu kararıyla etik kurallara uygun olduğuna karar verilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali

MC örneği, Akdeniz Bölgesi Finike Yöresi’nden temin edilmiştir.

Bitki materyalleri Atatürk Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ali ASLAN’ın yardımıyla uluslararası teşhis yöntemleri kullanılarak teşhis edilmiştir.

3.1.2. Hücre Soyları

Bu çalışmada *Myrtus communis* L. bitkisinin meyvesinden elde edilen uçucu yağın HUVEC (PCS-100-013TM) hücre hattında LPS ile indüklenen endotoksemiye bağlı hücre hasarına etkilerinin değerlendirmek amacıyla HUVEC hattı kullanılmıştır. HUVEC hattı American Type Culture Collection (ATCC, USA)’dan satın alındı ve üniversitemizin Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı’na bağlı Hücre Kültürü Laboratuvarında bulunan mevcut stoklardan çoğaltılarak kullanıldı.

3.1.3. Kimyasal Maddeler ve Kitler

Kullanılan tüm kimyasallar ve çözücüler piyasada bulunan en yüksek saflığa sahiptir.

3.1.3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler Tablo 3.1’de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler

Kimyasal Maddeler ve Kitler	Firma
cDNA analizi	Applied Biosystems [®] , Foster City, California
DMEM	Gibco [®] , New York, USA
Etanol (≥ % 99.5)	Sigma-Aldrich [®] , St. Louis, USA
L-glutamin (CAS No: 56-85-9)	Sigma-Aldrich [®] , St. Louis, USA
LPS (E. Coli O55:B5)	Sigma-Aldrich [®] , St. Louis, USA
Penisillin/streptomisin	Gibco [®] , New York, USA
TaqMan’ın primer problrarı	Primer Design [®] , Southampton, UK
Total RNA analizi	Qiagen [®] , Hilden, Germany
Tripsin	Gibco [®] , New York, USA
Tween 80	Sigma-Aldrich [®] , St. Louis, USA
1.8 sineol (CAS No: 470-82-6, % 99)	Sigma-Aldrich [®] , St. Louis, USA
α-pinen(CAS No: 7785-70-8, % 98)	Sigma-Aldrich [®] , St. Louis, USA
α-terpineol (CAS No: 98-55-5, % 90)	Sigma-Aldrich [®] , St. Louis, USA

3.1.3.2. Moleküler Analizler

eNOS, TNF-α, IL-1β, IL-6 mRNA ekspresyon analizi HUVEC RNA’sından sentezlenen cDNA kullanılarak StepOne Plus Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) sistem (Applied Biosystems Foster City, CA) ile yapıldı.

3.1.4. Aletler ve Cihazlar

Tez kapsamında yapılan fitokimyasal, hücre kültürü ve biyokimyasal analizler esnasında kullanılan alet ve cihazlar Tablo 3.2’de sunulmuştur.

Tablo 3.2. Aletler ve cihazlar

Adı /Modeli	Firma
Buzdolabı (+4 °C ve -20 °C)	Vestel [®] , Türkiye
Clevenger cihazı	Biokim [®] , Türkiye
Class II Biyogüvenlik Kabini	ESCO [®] , Singapur
Çalkalayıcı su banyosu	Memmert [®] , Almanya
Derin dondurucu (-80 °C)	GLACIER [®] ,
Elisa Sistemi Epoch+Take3+Pc	Roche [®] , İsviçre
Hassas terazi	Shimadzu [®] , Japonya
Hücre sayım cihazı	INNOVATIS [®] , Virjinya
“Inverted” ışık mikroskobu	Leica [®] , Almanya
İnkübatör	NuAire [®] , Amerika
Kültür kabı (75 cm ²)	Gibco [®] , İngiltere
pH metre	Schott CG 842 [®] , Filipinler
Pipet seti	Eppendorf [®] , Almanya
RTCA DP	Roche [®] , İsviçre
PCR cihazı	Applied Biosystems [®] , Amerika
Santrifüj	Hettich UNIVERSAL 32R [®] , İngiltere
Spin attırıcı	Grant-bio [®] , İngiltere
Steril cam pipetler (5,10 mL)	Gibco [®] , İngiltere
Şırınga filtreleri (0,22 µm)	Gibco [®] , İngiltere
TissueLyser II	QIAGEN [®] , Almanya
QIAcube	QIAGEN [®] , Almanya

3.2. Metot

3.2.1. *Myrtus communis* L. Türünün Meyvesi Üzerinde Yapılan Uçucu Yağ

Analiz Çalışmaları

Myrtus communis L. bitkisinin meyveleri hidrodistilasyon tekniğiyle clevenger

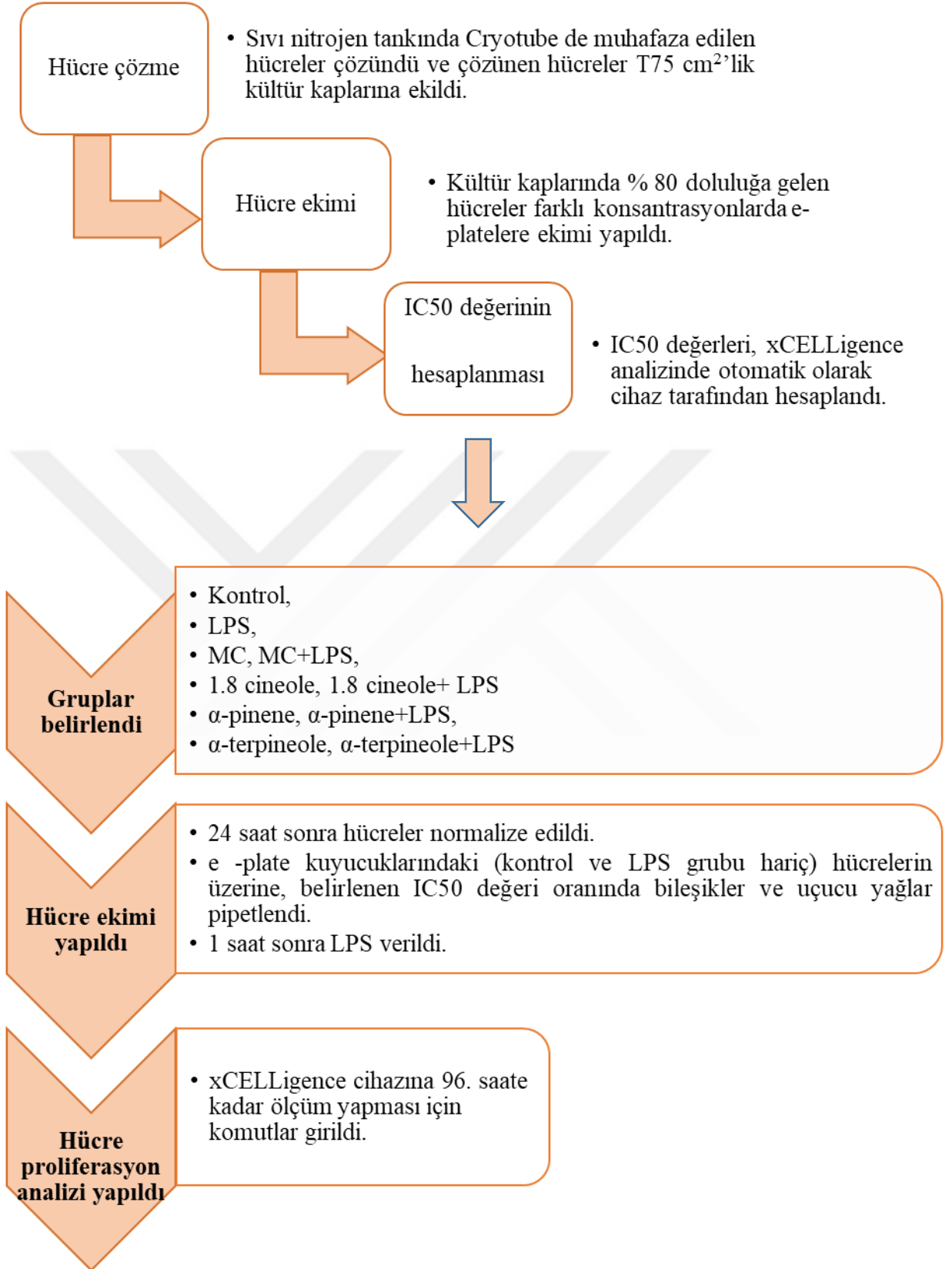
cihazı kullanılarak 120 dakika uçucu yağ elde edilmiştir. 100 g meyve örneği 1000 mL su ile clevenger cihazının cam balonunda 120 dakika ısıtılmıştır. Elde edilen uçucu yağ, cihaz tarafından soğutulup yoğunlaştırarak, cihazın dereceli borusunda birikmiştir. Son ürün susuz sodyum sülfat üzerinde kurutuldu ve test edilinceye kadar 4°C’de muhafaza edildi.

3.2.2. Deney Protokolü ve Detayları

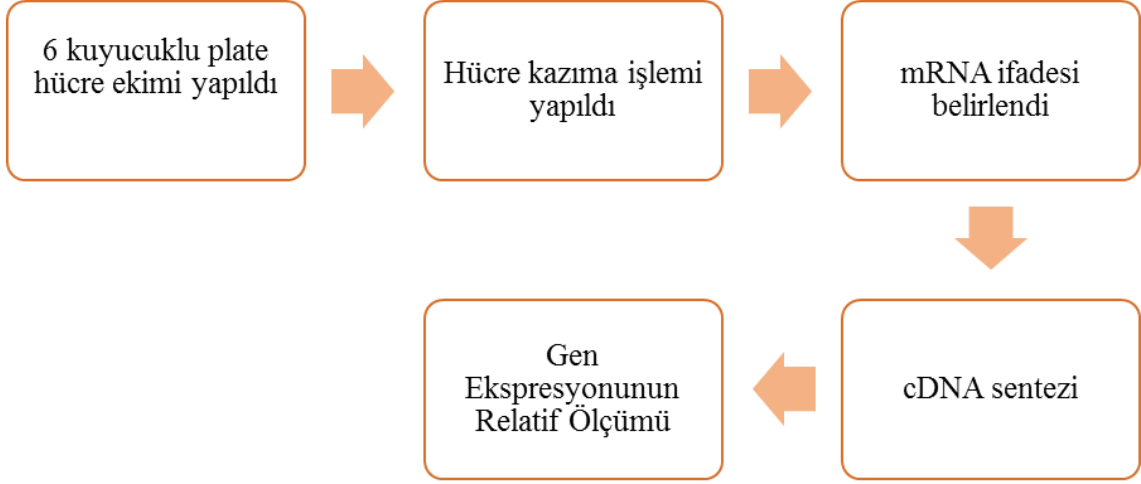
Bu çalışma Üniversitemiz bünyesinde bulunan Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı’na bağlı Hücre Kültürü Laboratuvarında yürütülmüştür. İlk önce MC uçucu yağı ve uçucu yağ bileşenlerinin IC50 değerinin hesaplanması için farklı konsantrasyonlarda dozlar belirlendi (Şekil 3.1), ardından hücre çözme, hücre ekimi ve IC50 değerleri hesaplandı (Şekil 3.2).

MC uçucu yağı	1,8 cineole	α -pinene	α -terpineole
<ul style="list-style-type: none">• 4 mg/ml• 2 mg/ml• 1 mg/ml• 100 μg/ml	<ul style="list-style-type: none">• 10^{-3} M• 10^{-4} M• 10^{-5} M• 10^{-6} M	<ul style="list-style-type: none">• 10^{-3} M• 10^{-4} M• 10^{-5} M• 10^{-6} M	<ul style="list-style-type: none">• 10^{-3} M• 10^{-4} M• 10^{-5} M• 10^{-6} M

Şekil 3.1. MC uçucu yağı ve uçucu yağ bileşenlerinin IC50 değerinin hesaplanması için kullanılan dozlar.



Şekil 3.2 Deney protokolünün süresi ve detayları



Şekil 3.2 Deney protokolünün süresi ve detayları

3.2.3. Hücre Kültürü ve Proliferasyon Analiz Protokolü

3.2.3.1. Hücrelerin Çözülmesi

Sıvı nitrojen tankında Cryotube de muhafaza edilen hücreler, DMEM, PSA ve FBS 37°C'lik su banyosunda çözünene kadar bekletildi. Daha sonra çözünen 1 mL hacmindeki hücreler T75 cm²'lik kültür kabında bulunan, 10 mL'lik medium (DMEM) üzerine yavaş pipetaj işlemi ile eklendi. Kültür kabına ekilen hücreler inkübatöre konuldu ve hücre ekimi işleminin ertesi günü hücre kültür kabındaki medyum değiştirildi.

3.2.3.2. Hücrelerin Yetiştirilmesi ve Pasajlanması

Farklı hücre hatları farklı ortamlarda yetişirler. HUVEC hücre hattı ise, %89 DMEM, %10 FBS, %1 PSA ve %2 L-Glutamin içeren mediumda büyütülmektedir.

Hücre kültür kaplarındaki hücrelerin çoğalma hızları zamanla azalmakta hatta tamamen durmaktadır. Bunun nedenlerinden biri çoğalan hücreler, kültür kabındaki besleyici ajanları tükenmiş olması, diğeri ise üreme yüzeyini tamamen kullanmış

olmalarıdır. Bu dönemde ise hücre kültürünün bölünmesi gerekir ki buna da 'pasajlama' adı verilir.

3.2.3.3. Hücre Sayımı ve Ekimi

100 µL tripan mavisi, 90 µL PBS, 10 µL mediumlu hücre mikro eppendorf tüpünde karıştırılır. Bu karışımdan 10 µL alınarak hücre sayım cihazında canlı hücre sayısı belirlendi. Gerekli hesaplamalar yapıldıktan sonra grup sayısı kadar her kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı.

3.2.3.4. Hücre Proliferasyonunun xCELLigence RTCA ile Belirlenmesi

xCELLigence sistemi; hücre indeksini, akım esasına göre hesaplayan ve gerçek zamanlı olarak analiz edebilen cihazdır.^{80, 81}

Temel olarak hücre membranı çift lipit tabakası ve bu tabaka içerisinde bulunan protein moleküllerinden oluşur. Lipitlerin hidrofilik kısımları akuatik çevreye bakarken, hidrofobik kısımları membranın iç kısmına bakacak şekilde yerleşmişlerdir. Hücrenin iç kısmı membranla çevrili organellerden dolayı oldukça kompleks bir yapıya sahiptir. Bundan dolayı hücrenin membranı yalıtkan, hücrenin iç kısmı ise iletkenidir. Hücreler büyüme esnasında ortamdaki yüksüz veya zayıf yüklü maddeleri, yüklü maddelere dönüştürerek hücre iletkenliği artırılmaktadır. Artan bu iletkenlik ortamla ilişkili olan elektrodlarla ölçülerek empedans hesaplanır.⁸⁰

Çalışmamızda kullanılan hücrelerin (HUVEC), proliferasyonunu incelemek için gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) kullanılmıştır. Bu amaçla 16 kuyucuklu e-plakanın her bir kuyucuğuna 50 µL medium konulur ve e-plaka inkübatör içerisinde bulunan RTCA cihazına yerleştirilir.^{80 81}

Plaka ile cihaz aynı sıcaklığa gelmesi için, e-plaka 10 dakika cihazda bekletildikten sonra, e-plaka cihazdan çıkarılarak kuyucuklara hücrelerin ekimi yapıldı ve tekrar cihaza yerleştirildi. Hücrelerin e-plakaya tutunması ve çoğalması için yaklaşık

24 saat bekletildi, 24 saat sonunda hücreler büyüme fazına geçtiği esnada belirlenen IC50 değeri oranında uçucu yağ, 1.8 cineol, α -pinenve α -terpineol bileşikleri hücrelerin üzerine ilave edildi. Plaka inkübatöre yerleştirildi ve sistem 15 dk aralıklarla gerçek zamanlı empedans ölçümü alınacak şekilde ayarlanıp 96 saat süresince kültürü yapılmak üzere bırakıldı. Sonuç olarak hücrelerin zamana bağlı proliferasyonunu gösteren bir grafik elde edildi.⁸⁰

xCELLigence sistemi, diğer metotlara göre anlık veri alınabilmesi ve de bu sistemde bileşik ya da renk girişimine sebep verebilecek şeylerden kaçınılmış olması bu yöntemim avantajlarındandır.⁸¹

3.2.4. Moleküler İnceleme

3.2.4.1. Real-Time PCR

mRNA İfadesinin Belirlenmesi:

Uçucu yağların HUVEC hücre hattı için, xCELLigence kullanılarak IC50 belirlendikten sonra, 6 kuyucuklu platalere her doz için hücre ekim yapıldı. İnkübatörde 24 saat inkübe edildikten sonra, IC50 değeri oranında MC bitkisi uçucu yağı, 1.8 sineol, α -pinenve α -terpineol bileşikleri eklendi. Bileşikler eklendikten 1 saat sonra belirlenen kuyucuklara 1 μ g/mL LPS eklendi. LPS eklenmesinden sonraki 2 ve 4. saat her kuyucuğa sırasıyla şu işlemler uygulandı. Kuyucuklarda bulunan medium çekildi ve PBS ile her kuyucuk yıkandı. Ardından 0.5 mL tripsin eklenerek 1-2 dk inkübatörde inkübe edildi. Bu süre sonunda tripsin etkisini yok etmek için 1 mL medium eklendi. Kuyucuklardaki hücreler Cell Scraper yardımı kazınarak steril falkona alınıp 4 °C'de 1000 rpm 2 dk santrifüjlendi. Pellet kısmına 350 μ L β -merkaptoetanol ve RLT karışımından eklendi ve pipetaj yapıldı. Pipetaj yapılan numuneden tüplere alınarak TissueLyser yardımıyla homojenize edildi. Homojenizasyon işleminin ardından 12000 rpm'de 3 dk 4°C'de tekrar santrifüjlenerek süpernatant kısmından 350 μ L alınıp

NanoDrop'ta ölçülerek optik dansiteleri ve konsantrasyonları belirlendi. Elde edilen RNA'lar diğer analizler yapıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

Revers Transkriptaz Reaksiyonu ve cDNA Sentezi:

cDNA analizi için 4.2 mL dietilpirokarbonatlı su, 2 µL RT buffer, 2 µL Randomize primer, 1 µL MultiScribe ters transkriptaz, 0.8 µL dNTP'den oluşan karışımı hazırlandı. Hazırlanan bu karışımdan 10 µL, 10 µL'de mRNA numune tüplerine pipetlendi. Pipetleme işleminden sonra 1-2 sn numunelere spin atırıldı. RT, 37 °C'de 120 dk, 25 °C'de 10 dk süresince inkübe edildikten sonra Veriti 96 kuyucuklu termal döngü kullanılarak 85 °C'de 5 dk bekletildi. cDNA konsantrasyonu Epoch Spektrofotometre Sistemi ve Take3 Plate kullanılarak değerlendirildi.

Gen Ekspresyonunun Relatif Ölçümü:

eNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6 mRNA ekspresyon analizi HUVEC RNA'sından sentezlenen cDNA kullanılarak StepOne Plus Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) sistem (Applied Biosystems) ile yapıldı.

Sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldı ve relatif kat olarak açıklandı. Kontrol gen olarak β -actin kullanılarak elde edilen tüm cDNA örnekleri üç tekerrür yapıldı. RT-PCR reaksiyonu 9 µl cDNA, 1 µL Primer Perfect Probe miks ve 10 µL QuantiTect Probe PCR Master miks hazırlanarak son hacim 20 µL'ye tamamlandı. -qPCR hazırlanan reaksiyon plağı 50 °C 2 dk, 95 °C'de 10 dk bir döngü ve 94 °C'de 15 sn, 60 °C'de 60 sn 40 döngü şeklinde belirlendi ve sonuçlar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduna göre hesaplandı.⁸²

3.2.5. İstatistiksel Analiz

Veri analizleri ve grafik çizimi için GraphPad 5.0 Prism (La Jolla, CA) yazılımı kullanıldı. Veriler ortalama \pm SD olarak gösterilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar, tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey'nin post-hoc testi ile analiz edildi. İstatistiksel analizlerde (*: 24. saat kontrol grubuna göre, *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 δ : 48.

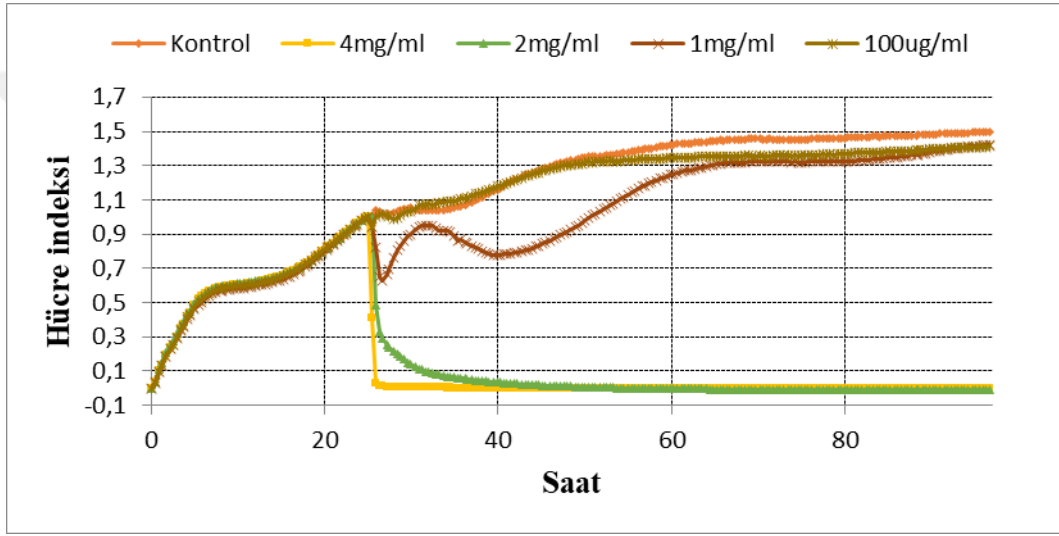
saat kontrol grubuna göre, δ $p < 0.05$, $\delta\delta$ $p < 0.01$, $\delta\delta\delta$ $p < 0.001$ σ : 24. saat LPS grubuna göre, σ $p < 0.05$, $\sigma\sigma$ $p < 0.01$, $\sigma\sigma\sigma$ $p < 0.001$; Θ : 48. saat LPS grubuna göre, Θ $p < 0.05$, $\Theta\Theta$ $p < 0.01$, $\Theta\Theta\Theta$ $p < 0.001$ Φ : 2. saat kontrol grubuna göre, Φ $p < 0.05$, $\Phi\Phi$ $p < 0.01$, $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0.001$ φ : 4. saat kontrol grubuna göre φ $p < 0.05$, $\varphi\varphi$ $p < 0.01$, $\varphi\varphi\varphi$ $p < 0.001$ Ψ : 2. saat LPS grubuna göre, Ψ $p < 0.05$, $\Psi\Psi$ $p < 0.01$, $\Psi\Psi\Psi$ $p < 0.001$ α : 4. saat LPS grubuna göre; α $p < 0.05$, $\alpha\alpha$ $p < 0.01$, $\alpha\alpha\alpha$ $p < 0.001$) kabul edildi.



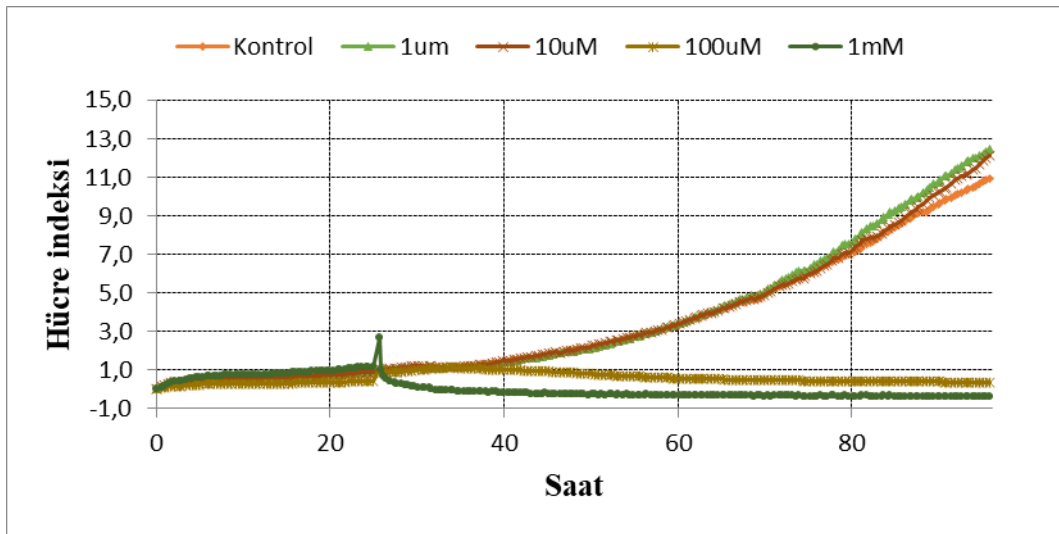
4. BULGULAR

4.1. IC50 Değerlerinin Hesaplanması

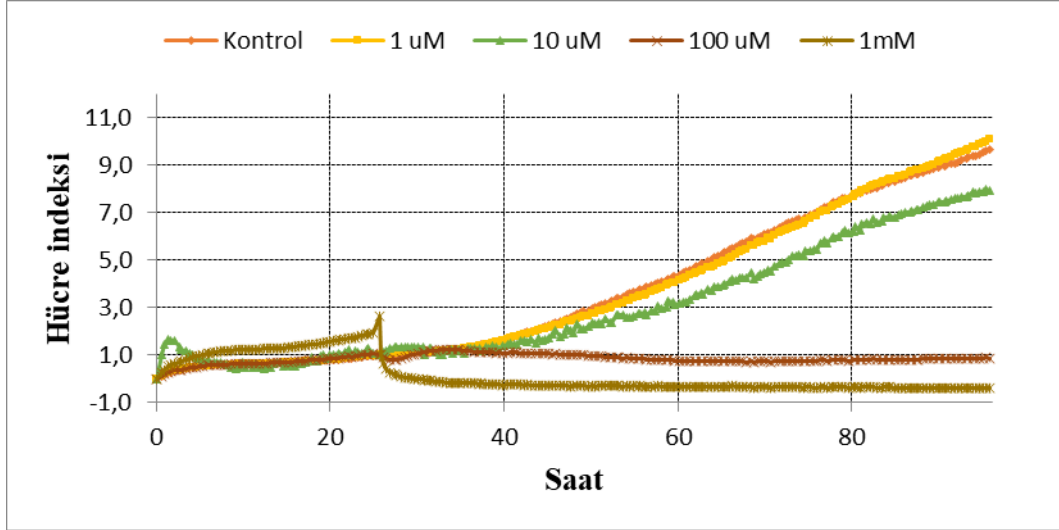
HUVEC hücre hattı üzerine en etkin dozu belirlemek amacıyla, farklı konsantrasyonlarda MC bitkisinin meyvelerinde elde edilen uçucu yağ (Şekil 4.1), 1.8 sineol (Şekil 4.2), α -pinen (Şekil 4.3), α -terpineol (Şekil 4.4) bileşikleri ve LPS (Şekil 4.5) uygulandı. Bu bileşiklerin farklı konsantrasyonlarının HUVEC hücrelerinin in vitro şartlarda % 50'sinin proliferasyonunu inhibe eden IC50 değerleri belirlendi.



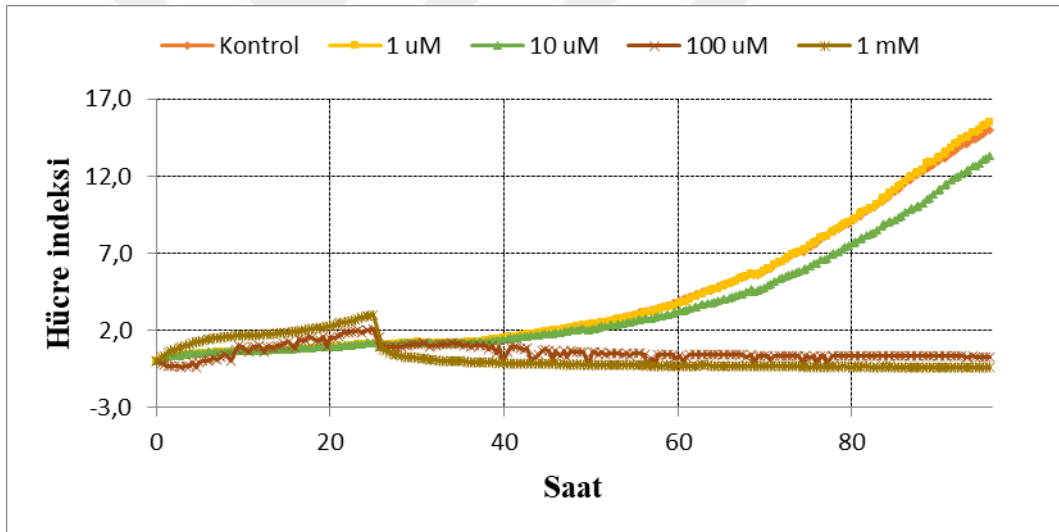
Şekil 4.1. *Mrytus communis L.* bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağın farklı konsantrasyonlarının xCELLigence deney sonuçları



Şekil 4.2. 1.8 sineol bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının xCELLigence deney sonuçları



Şekil 4.3. α-pinen bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının xCELLigence deney sonuçları



Şekil 4.4. α-terpineol bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının xCELLigence deney sonuçları

Myrtus communis L. uçucu yağı ve bileşenlerinin, HUVEC hücrelerinin in vitro şartlarda % 50'sinin proliferasyonunu inhibe eden IC50 değerleri, xCELLigence analizinde otomatik olarak cihaz tarafından hesaplanmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. *Myrtus communis* L. bitkisinin meyvelerinde bulunan bileşiklerin IC50 değerleri

Bileşik Adı	IC50 Değeri
<i>Myrtus communis</i> L. uçucu yağı	100 µg/mL
1.8 sineol	10 ⁻⁵ M
α-pinen	10 ⁻⁵ M
α-terpineol	10 ⁻⁵ M
LPS	1 µg/mL

4.2. xCELLigence Analiz Bulguları

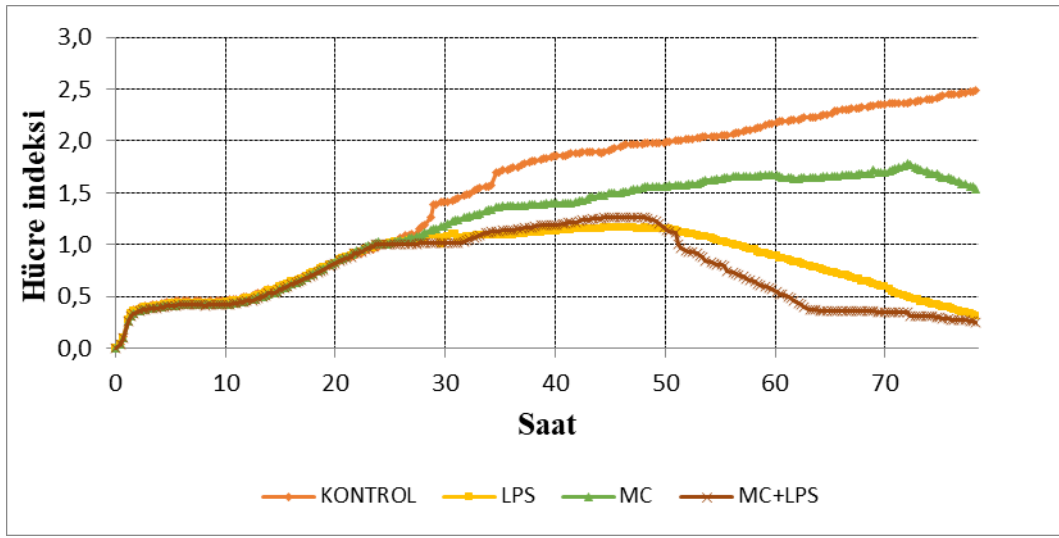
4.2.1. MC Uçucu Yağının HUVEC Proliferasyonuna Etkisi

Kontrol grubunun hücre canlılığı %100 olarak kabul edildi. MC bitkisinin meyvelerinden elde edilen 100 µg/mL dozundaki uçucu yağının, HUVEC hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MC uçucu yağının, 24. saatten sonra HUVEC hücrelerinin proliferasyonunu kontrole göre yaklaşık % 21.19 oranında engellerken, 48. saatte % 24.18 oranında engellediği tespit edildi. LPS grubunda ise 24. saatte % 41.13 oranında inhibisyon gözlenirken, 48. saatte % 78.85 oranında inhibisyon gözlendi (Şekil 4.5).

MC+LPS uygulanan hücreler kontrol grubuyla kıyaslandığında 24. saatte %36.05, 48. saatte % 85.47 oranında hücreleri inhibe ettiği tespit edildi. Sonuçlarımıza göre, 100 µg/mL dozundaki MC uçucu yağının LPS ile oluşturulan HUVEC hücre hasarını engelleyemediği belirlenmiştir, HUVEC hücrelerini zamana bağımlı olarak, LPS ile oluşmuş inhibisyonu düzeltememiş veya azaltamamış olduğu belirlendi (Şekil 4.5).

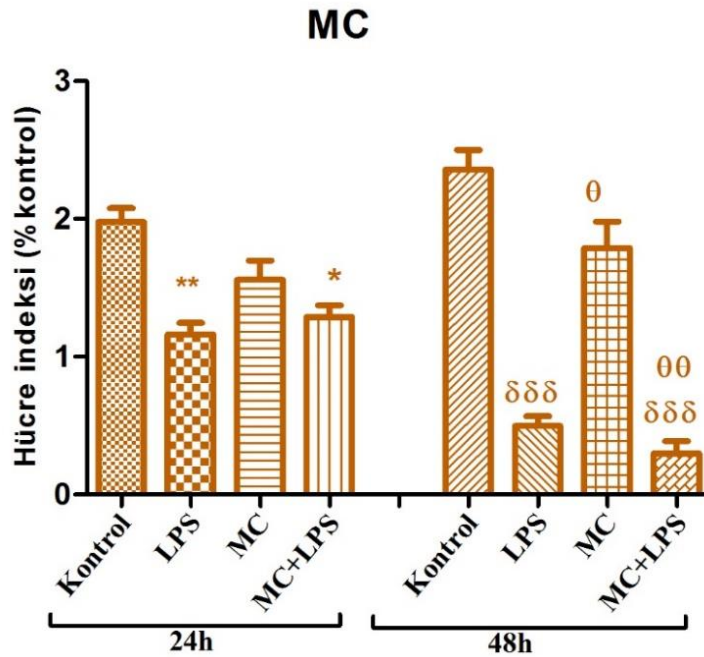
MC ve MC+LPS uygulanan hücrelerde, 24. saat ve 48. saatteki (Şekil 4.6) proliferasyonlarına bakıldığında 24. saatte MC+LPS grubundaki hücre inhibisyonu MC grubuna göre istatistiksel anlamlılık ($p < 0.05$) göstermekle beraber, 48. saatte ise çok

yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık tespit edildi ($p < 0.001$).



Şekil 4.5. MC bitkisinin meyvesinden elde edilen uçucu yağın HUVEC hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi

MC grubunun 24. ve 48. saatteki hücre proliferasyonları incelendiğinde, kontrol grubuna göre anlamlı farklılık tespit edilmemiş olup MC tek başına HUVEC hücrelerine toksik etkili olmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.6, $p > 0.05$).

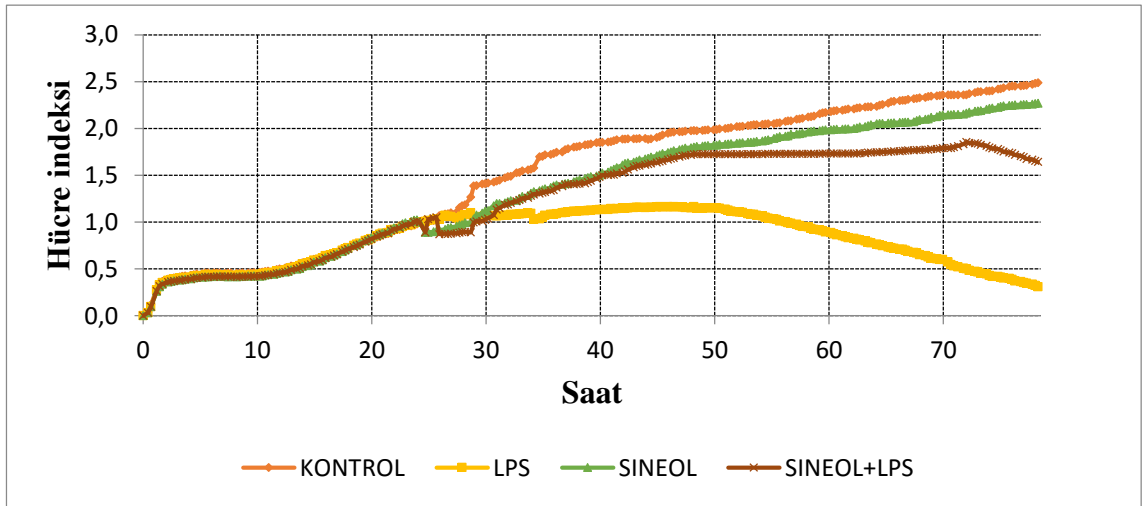


Şekil 4.6. MC bitkisinin meyvesine ait uçucu yağ ve LPS uygulanan hücrelerin 24. ve 48. saatteki proliferasyonu

4.2.2. 1.8 sineol'nin HUVEC Proliferasyonuna Etkisi

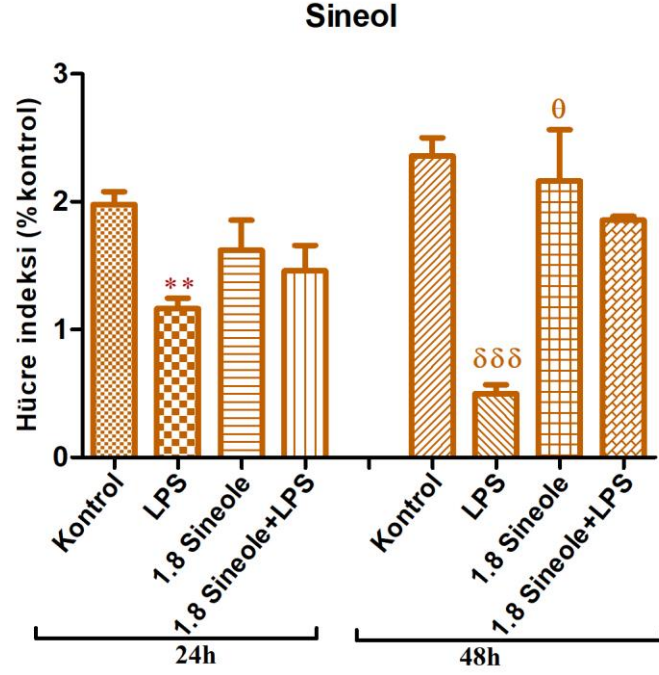
HUVEC hücrelerinde gerçekleştirilen RTCA analiz sonuçlarımıza göre, 1.8 sineol bileşiğinin uygulandığı hücrelerde, hücre canlılığı indeksi, kontrole yakın bir çoğalma eğrisi tespit edildi (Şekil 4.7).

Bu sonucumuza göre, 1.8 sineol bileşiğinin HUVEC hücrelerinde çoğalmayı engelleyen bir etkisi olmamasının yanısıra, sitotoksik olmadığını da kanıttır. LPS ile toksisite oluşturulmuş hücrelere 1.8 sineol uygulaması yapıldığında sadece LPS uygulanmış hücrelerde görülen yüksek derecede hücre inhibisyonu durdurulmuş ve hücre proliferasyonunun devam ettiği belirlenmiştir.



Şekil 4.7. 1.8 sineol bileşiğinin HUVEC hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi

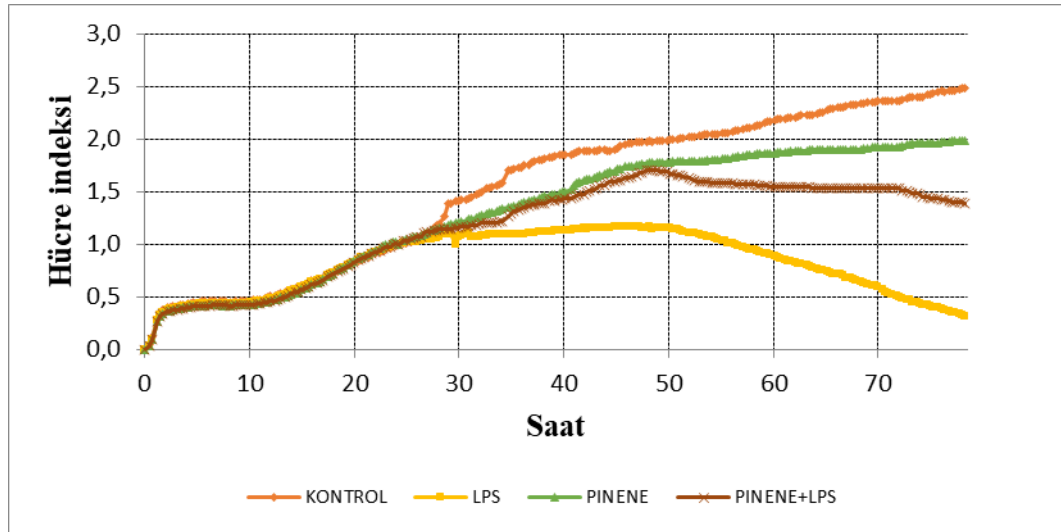
1.8 sineol ve LPS uygulanan hücrelerde 24. saatteki hücre proliferasyonları kontrole kıyaslandığında, 1.8 sineol ve 1.8 sineol+LPS uygulanan hücrelerde anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (Şekil 4.8, $p>0.05$).



Şekil 4.8. 1.8 sineol ve LPS uygulanan hücrelerin 24. ve 48. saatteki proliferasyonu.

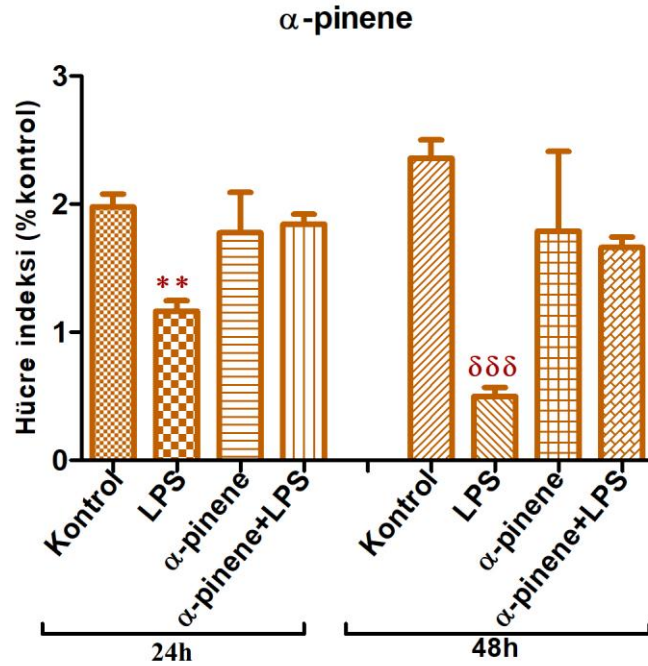
4.2.3. α -pinen'nin HUVEC Proliferasyonuna Etkisi

α -pinenuygulanan HUVEC hücrelerinde, hücre canlılığında kontrole göre çok fazla bir değişiklik meydana gelmediği gözlemlendi. α -pinen+LPS uygulanan hücrelerde ise, hücre indeksi değerini biraz aşağılara çekmesine rağmen sadece LPS uygulanan hücrelerde görülen hücre indeksi azalması görülmemiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 α -pinenbileşiğinin HUVEC hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi

α -pinene ve α -pinene+LPS gruplarında, 24. ve 48. saatteki hücre proliferasyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilmedi (Şekil 4.10, $p>0.05$).

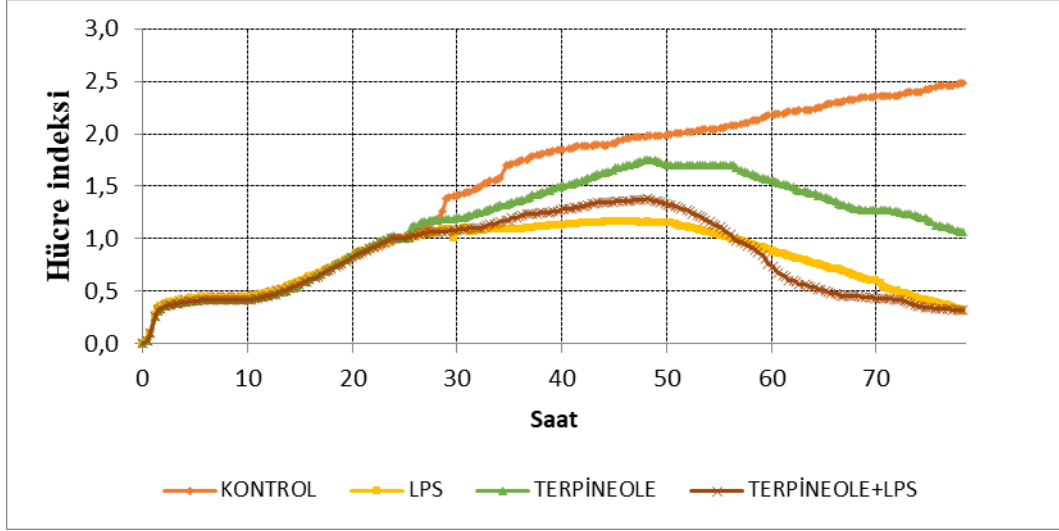


Şekil 4.10. α -pinene ve LPS uygulanan hücrelerin 24. saatteki proliferasyonu ve 48. saatteki proliferasyonu

4.2.4. α -terpineol'nin HUVEC Proliferasyonuna Etkisi

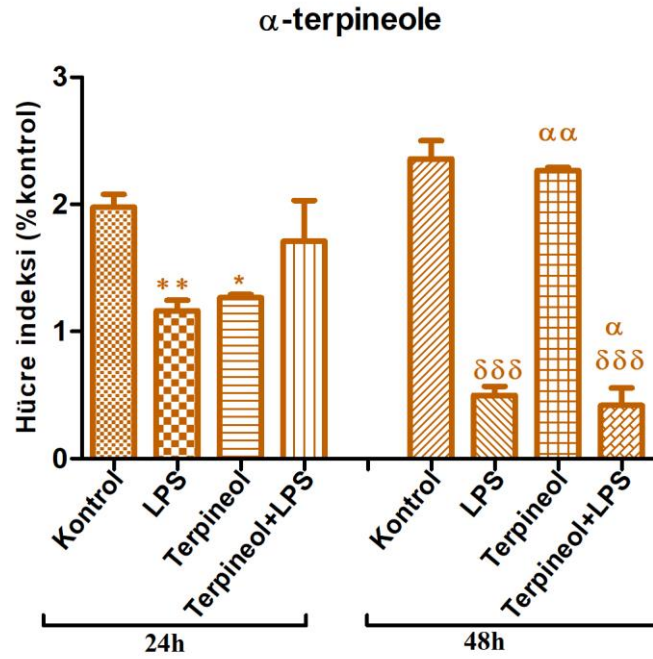
α -terpineol uygulanan hücrelerde hücre indeksi değerinde özellikle 48. saatte önemli oranda düşüş gözlemlendi. α -terpineol sağlıklı HUVEC hücrelerinde toksik etki yaptığı ve hücre proliferasyonunu azalttığı gözlemlendi (Şekil 4.11). α -terpineol+LPS uygulanan HUVEC hücrelerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında HUVEC hücrelerini zamana bağımlı olarak anlamlı şekilde inhibe ettiği tespit edildi ($p<0.001$).

48. saatten sonra α -terpineol, HUVEC hücrelerinin proliferasyonunu kontrole göre yaklaşık % 46.35 oranında engellerken, α -terpineol+LPS uygulanan hücrelerde ise % 82.25 oranında engellemiş olduğu belirlendi.



Şekil 4.11. α -terpineol bileşiğinin HUVEC hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi

α -terpineol+LPS grubunun 24. ve 48. saatindeki hücre proliferasyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 24. saatte anlamlı farklılık tespit edilmedi (Şekil 4.12, $p>0.05$), 48. saatte ise çok yüksek bir hücresel inhibisyon etkisi istatistiksel olarak tespit edildi (Şekil 4.12, $p<0.001$).



Şekil 4.12 α -terpineol ve LPS uygulanan hücrelerin 24. saatteki proliferasyonu ve 48. saatteki proliferasyonu

4.3. Moleküler Bulgular

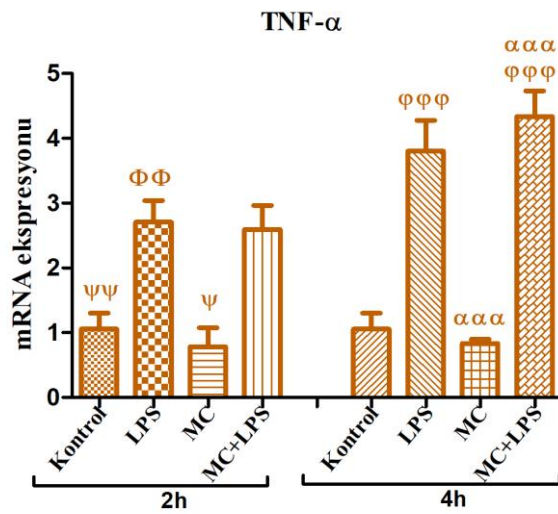
HUVEC'lerinde LPS ile indüklenmiş endotoksemi modelinde, LPS uygulamasından sonraki 2. ve 4. saatlerdeki TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve eNOS sitokinlerinin mRNA ekspresyonları qPCR analiz kullanılarak tespit edildi. Referans gen olarak β -aktin kullanıldı.

4.3.1. *Myrtus communis* L. Bitkisinin Meyvelerinden Elde Edilen Uçucu Yağa Ait Moleküler Bulgular

4.3.1.1. TNF- α 'nın mRNA Ekspresyonları

MC bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağın uygulandığı hücrelerin 2. ve 4. saatte ki TNF- α mRNA ekspresyonları kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

LPS grubunda ise 2. saatte ve daha çok miktarda olmak üzere 4. saatte TNF- α mRNA ekspresyonları istatistiksel olarak arttığı tespit edildi (Şekil 4.13, $p < 0.001$). LPS ile toksisite oluşturulmuş HUVEC hücrelerine MC uygulamasının TNF- α mRNA ekspresyonlarını üzerine olan etkisi 2. ve 4 saatlerde LPS uygulanmış gruplardan anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (Şekil 4.13, $p > 0.05$).

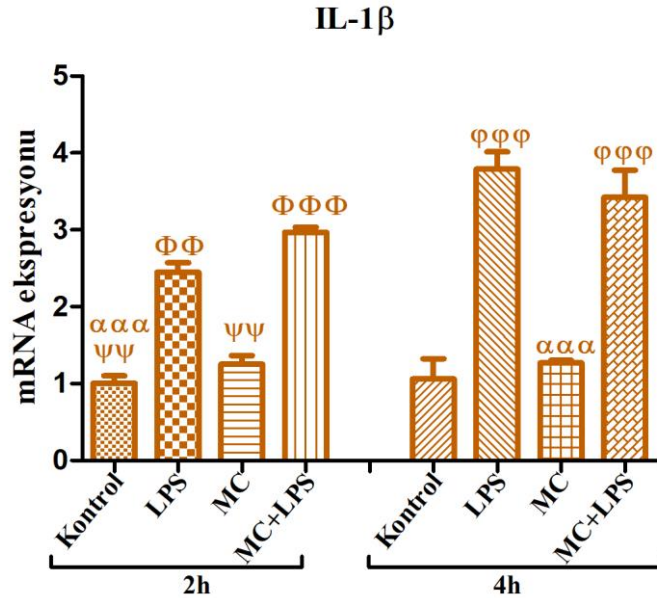


Şekil 4.13. *Myrtus communis* L. bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağın, TNF- α mRNA ekspresyonları.

4.3.1.2. IL-1 β 'nin mRNA Ekspresyonları

MC bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağın uygulandığı hücrelerin 2. ve 4. saatte ki IL-1 β mRNA ekspresyonları kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.14, $p>0.05$).

LPS grubunda ise 2. saatte ve daha çok miktarda olmak üzere 4. saatte IL-1 β mRNA ekspresyonlarının arttığı tespit edildi (Şekil 4.14, $p<0.001$). LPS ile toksisite oluşturulmuş HUVEC hücrelerine MC uygulamasının IL-1 β mRNA ekspresyonları üzerine olan etkisi 2. ve 4 saatlerde LPS uygulanmış gruplarda anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.14, $p>0.05$).

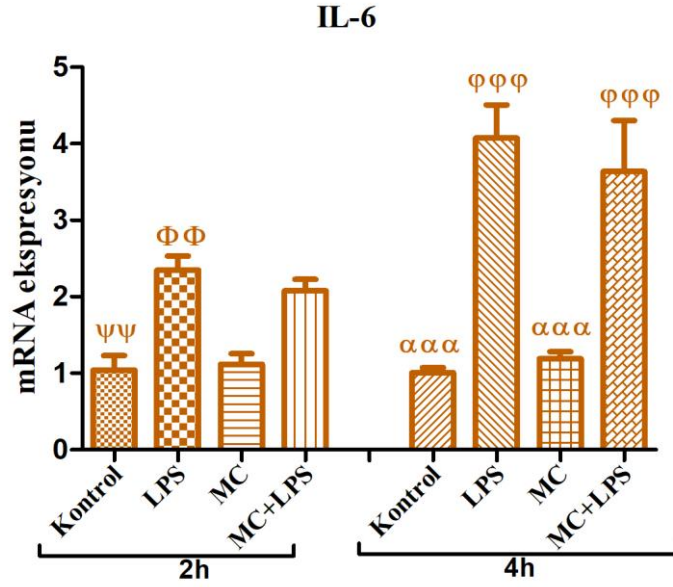


Şekil 4.14. *Myrtus communis* L. bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağın, IL-1 β mRNA ekspresyonları.

4.3.1.3. IL-6'nın mRNA Ekspresyonları

MC bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağın uygulandığı hücrelerin 2. ve 4. saatte ki IL-6 mRNA ekspresyonları kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.15, $p>0.05$). LPS grubunda ise 2. saatte ve daha çok miktarda olmak üzere 4. saatte IL-6 mRNA ekspresyonlarının arttığı tespit edildi (Şekil

4.15, $p < 0.001$). LPS ile toksisite oluşturulmuş HUVEC hücrelerine MC uygulamasının IL-6 mRNA ekspresyonları üzerine olan etkisi 2. ve 4 saatlerde LPS uygulanmış gruplardan anlamlı bir fark olmadığı belirlendi (Şekil 4.15, $p > 0.05$).



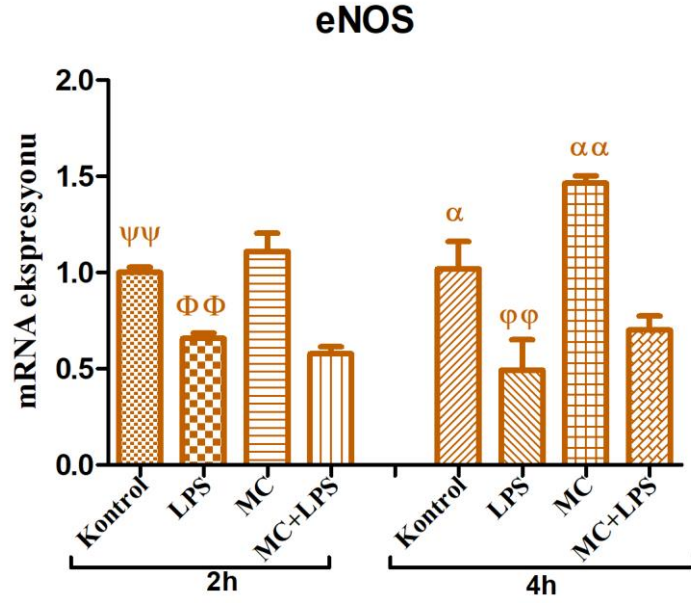
Şekil 4.15. *Myrtus communis* L. bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağın, IL-6 mRNA ekspresyonları.

4.3.1.4. eNOS'in mRNA Ekspresyonları

MC bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağın uygulandığı hücrelerin 2. ve 4. saatte ki eNOS mRNA ekspresyonları kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.16, $p > 0.05$).

LPS grubunda ise 2. saatte ve daha çok miktarda olmak üzere 4. saatte eNOS mRNA ekspresyonları azaldığı tespit edildi (Şekil 4.16).

LPS ile toksisite oluşturulmuş HUVEC hücrelerine MC uygulamasının eNOS mRNA ekspresyonları üzerine olan etkisi 2. ve 4. saatlerde LPS uygulanmış gruplardan anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.16, $p > 0.05$).



Şekil 4.16. *Myrtus communis* L. bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağın, eNOS mRNA ekspresyonları.

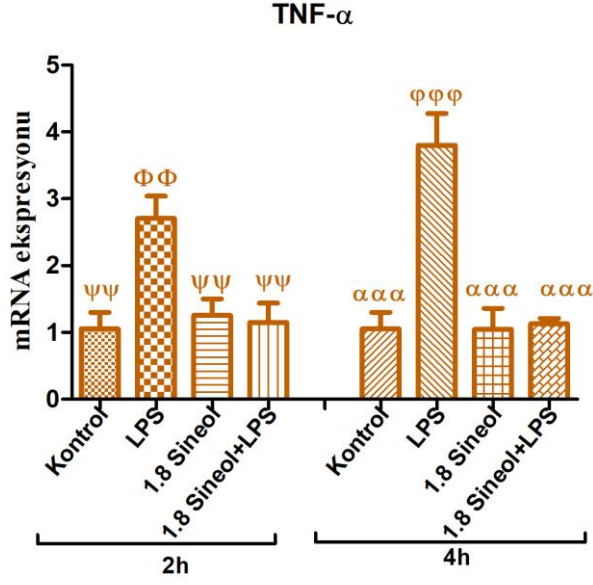
4.3.2. 1.8 sineol Bileşiğine Ait Moleküler Bulgular

4.3.2.1. TNF- α 'nın mRNA Ekspresyonları

MC bitkisinin meyvelerinin uçucu yağına ait major bileşiklerden biri olan 1.8 sineol bileşiğinin uygulandığı hücrelerin 2. ve 4. saatte ki TNF- α mRNA ekspresyonları kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.17, $p>0.05$).

LPS grubunda ise 2. saatte ve daha çok miktarda olmak üzere 4. saatte TNF- α mRNA ekspresyonlarının arttığı tespit edildi (Şekil 4.17, $p<0.001$).

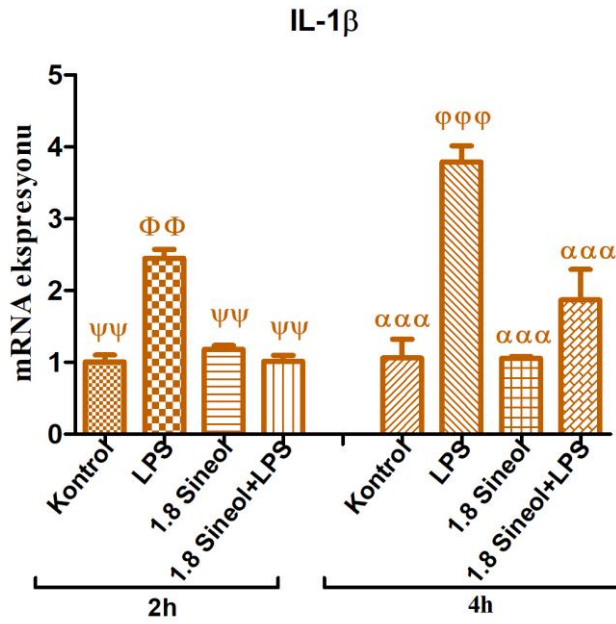
LPS ile toksisite oluşturulmuş HUVEC hücrelerine 1.8 sineol bileşiğinin uygulamasının TNF- α mRNA ekspresyonları üzerine olan etkisi 2. ve 4 saatlerde LPS uygulanmış gruplardan anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Şekil 4.17, $p>0.05$).



Şekil 4.17. 1.8 sineol bileşiğinin, TNF- α mRNA ekspresyonları.

4.3.2.2. IL-1 β 'nin mRNA Ekspresyonları

MC bitkisinin meyvelerinin uçucu yağına ait major bileşiklerden biri olan 1.8 sineol bileşiğinin uygulandığı hücrelerin 2. ve 4. saatte ki IL-1 β mRNA ekspresyonları kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.18, $p>0.05$).

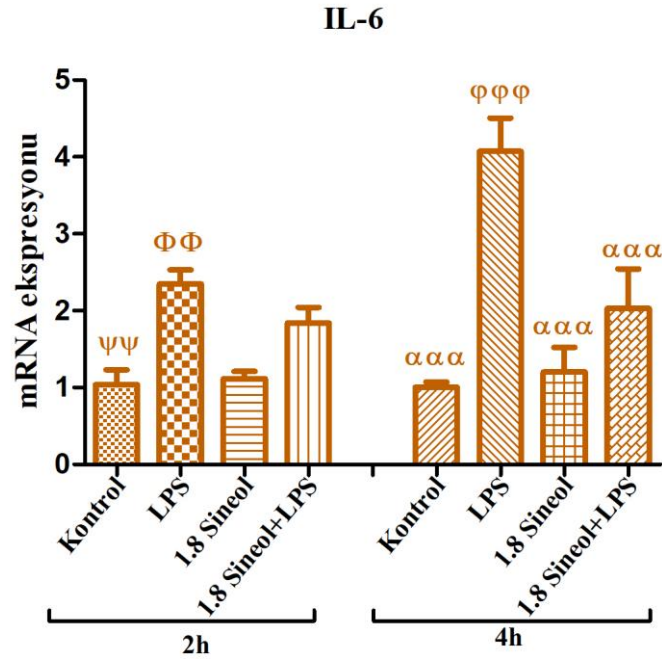


Şekil 4.18. 1.8 sineol bileşiğinin, IL-1 β mRNA ekspresyonları.

LPS grubunda ise 2. saatte ve daha çok miktarda olmak üzere 4. saatte IL-1 β mRNA ekspresyonlarının arttığı tespit edildi (Şekil 4.18, $p < 0.001$). LPS ile toksisite oluşturulmuş HUVEC hücrelerine 1.8 sineol bileşiğinin uygulamasının IL-1 β mRNA ekspresyonları üzerine olan etkisi 2. ve 4 saatlerde LPS uygulanmış gruplardan anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.18, $p > 0.05$).

4.3.2.3. IL-6'nın mRNA Ekspresyonları

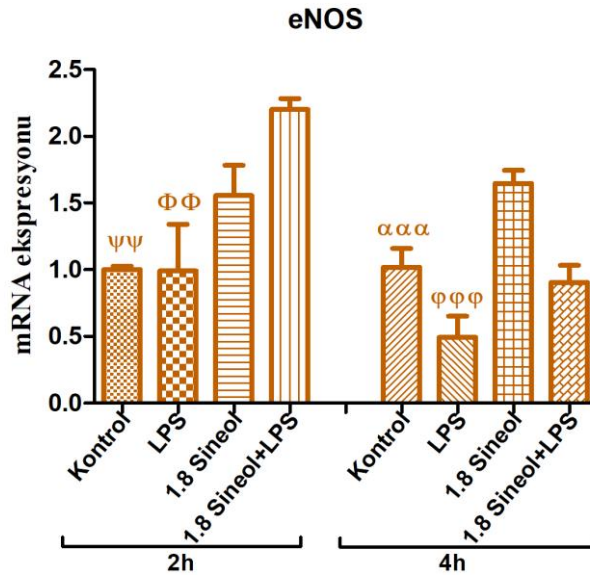
MC bitkisinin meyvelerinin uçucu yağına ait major bileşiklerden biri olan 1.8 sineol bileşiğinin uygulandığı hücrelerin 2. ve 4. saatte ki IL-6 mRNA ekspresyonları kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.19, $p > 0.05$). LPS grubunda ise 2. saatte ve daha çok miktarda olmak üzere 4. saatte IL-6 mRNA ekspresyonlarının arttığı tespit edildi (Şekil 4.19, $p < 0.001$). LPS ile toksisite oluşturulmuş HUVEC hücrelerine 1.8 sineol bileşiğinin uygulamasının IL-6 mRNA ekspresyonları üzerine olan etkisi 2. ve 4 saatlerde LPS uygulanmış gruplardan anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.19, $p > 0.05$).



Şekil 4.19. 1.8 sineol bileşiğinin, IL-6 mRNA ekspresyonları.

4.3.2.4. eNOS'in mRNA Ekspresyonları

MC bitkisinin meyvelerinin uçucu yağına ait major bileşiklerden biri olan 1.8 sineol bileşiğinin uygulandığı hücrelerin 2. ve 4. saatte ki eNOS mRNA ekspresyonları kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.20, $p>0.05$). LPS grubunda ise 2. saatte belirli oranda ve daha fazla oranda 4. saatte eNOS mRNA ekspresyonlarının azaldığı tespit edildi (Şekil 4.20). LPS ile toksisite oluşturulmuş HUVEC hücrelerine 1.8 sineol bileşiğinin uygulamasının eNOS mRNA ekspresyonları üzerine olan etkisi 2. saatte istatistiksel olarak anlamlı olmak kaydıyla ($p<0.01$); 4 saatte de LPS uygulanmış gruptan anlamlı bir artış bulunmuştur (Şekil 4.20).



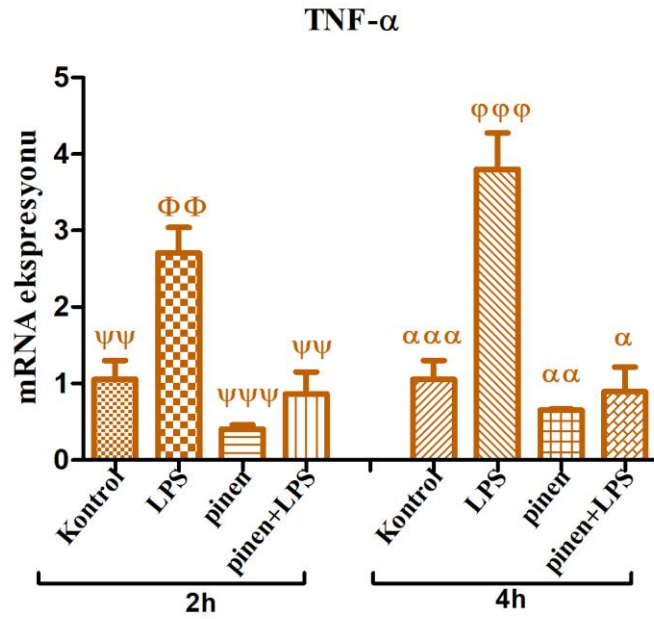
Şekil 4.20. 1.8 sineol bileşiğinin, eNOS mRNA ekspresyonları.

4.3.3. α-pinenBileşiğine Ait Moleküler Bulgular

4.3.3.1. TNF-α'nın mRNA Ekspresyonları

MC bitkisinin meyvelerinin uçucu yağına ait bileşiklerden biri olan α-pinenbileşiğinin HUVEC hücrelerindeki 2. ve 4. saatte ki TNF-α mRNA ekspresyonları kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.21, $p>0.05$). LPS grubunda ise 2. saatte ve daha çok miktarda olmak üzere 4. saatte TNF-α mRNA

ekspresyonlarının arttığı tespit edildi (Şekil 4.21, $p < 0.001$). LPS ile toksisite oluşturulmuş HUVEC hücrelerine α -pinenbileşiğinin uygulamasının TNF- α mRNA ekspresyonları üzerine olan etkisi 2. ve 4 saatlerde LPS uygulanmış gruplardan anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Şekil 4.21, $p > 0.05$). Bulgularımıza göre, α -pinenbileşiğinin uygulamasının LPS ile artmış TNF- α mRNA ekspresyonlarını nerdeyse sağlıklı kontrol grubuna yaklaştırmış olduğu tespit edildi.

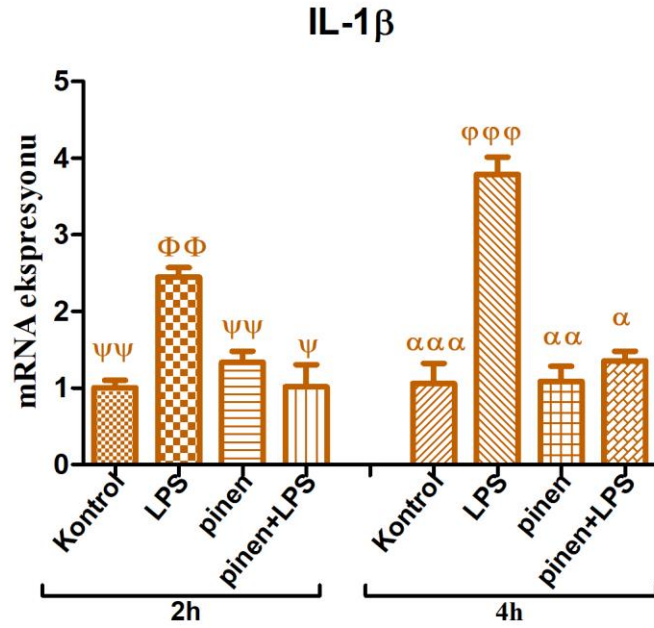


Şekil 4.21. α -pinenbileşiğinin, TNF- α mRNA ekspresyonları.

4.3.3.2. IL-1 β 'nin mRNA Ekspresyonları

MC bitkisinin meyvelerinin uçucu yağına ait bileşiklerden biri olan α -pinenbileşiğinin HUVEC hücrelerindeki 2. ve 4. saatte ki IL-1 β mRNA ekspresyonları kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.22, $p > 0.05$). LPS grubunda ise 2. saatte ve daha çok miktarda olmak üzere 4. saatte IL-1 β mRNA ekspresyonlarının arttığı tespit edildi (Şekil 4.22, $p < 0.001$). LPS ile toksisite oluşturulmuş HUVEC hücrelerine α -pinenbileşiğinin uygulamasının IL-1 β mRNA

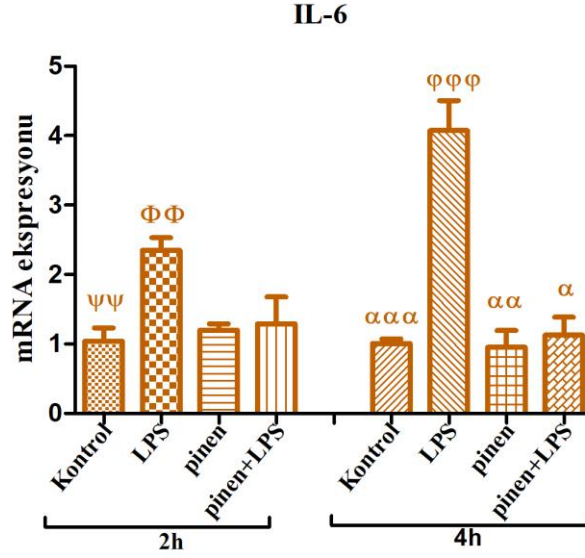
ekspresyonları üzerine olan etkisi 2. ve 4 saatlerde LPS uygulanmış gruplardan anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi (Şekil 4.22, $p < 0.01$).



Şekil 4.22. α -pinenbileşiğinin, IL-1 β mRNA ekspresyonları.

4.3.3.3. IL-6'nın mRNA Ekspresyonları

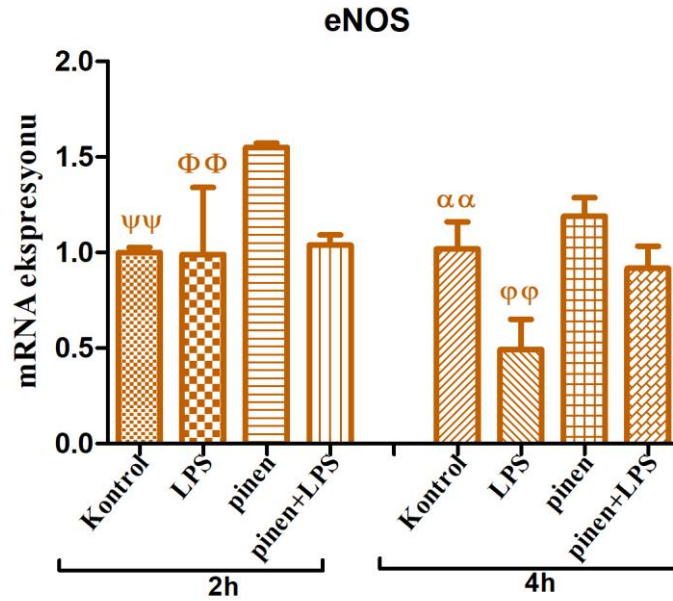
MC bitkisinin meyvelerinin uçucu yağına ait bileşiklerden biri olan α -pinenbileşiğinin HUVEC hücrelerindeki 2. ve 4. saatte ki IL-6 mRNA ekspresyonları kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.23, $p > 0.05$). LPS grubunda ise 2. saatte ve daha çok miktarda olmak üzere 4. saatte IL-6 mRNA ekspresyonlarının arttığı tespit edildi (Şekil 4.23, $p < 0.001$). LPS ile toksisite oluşturulmuş HUVEC hücrelerine α -pinenbileşiğinin uygulamasının IL-6 mRNA ekspresyonları üzerine olan etkisi 2. ve 4 saatlerde LPS uygulanmış gruplardan anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi (Şekil 4.23, $p > 0.05$).



Şekil 4.23. α -pinenbileşiğinin, IL-6 mRNA ekspresyonları.

4.3.3.4. eNOS'in mRNA Ekspresyonları

MC bitkisinin meyvelerinin uçucu yağına ait bileşiklerden biri olan α -pinenbileşiğinin HUVEC hücrelerindeki 2. ve 4. saatte ki eNOS mRNA ekspresyonları kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.24, $p>0.05$).



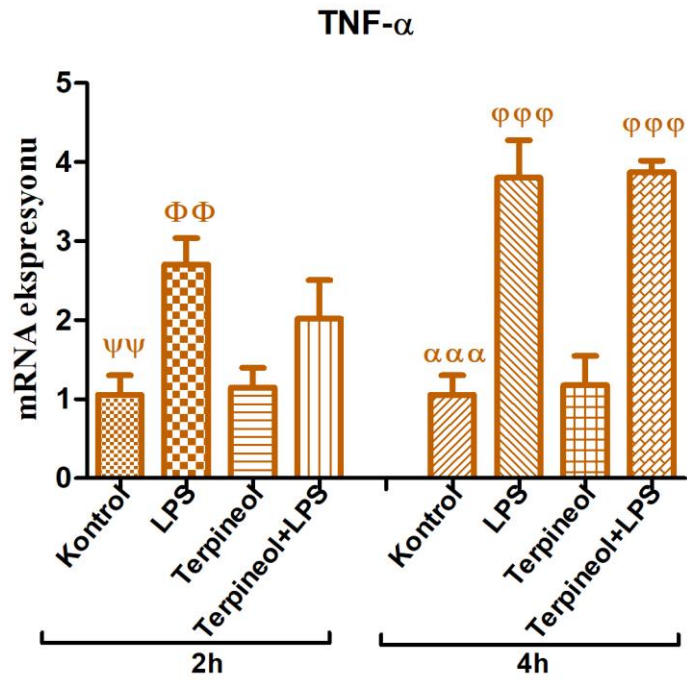
Şekil 4.24. α -pinenbileşiğinin, eNOS mRNA ekspresyonları.

LPS grubunda ise 2. saatte ve daha çok miktarda olmak üzere 4. saatte eNOS mRNA ekspresyonlarının azaldığı tespit edildi (Şekil 4.24, $p < 0.05$). LPS ile toksisite oluşturulmuş HUVEC hücrelerine α -pinenbileşiğinin uygulamasının eNOS mRNA ekspresyonları üzerine olan etkisi 2. ve 4 saatlerde LPS uygulanmış gruplardan anlamlı bir fark görülememiştir (Şekil 4.24, $p > 0.05$).

4.3.4. α -terpineol Bileşiğine Ait Moleküler Bulgular

4.3.4.1. TNF- α 'nın mRNA Ekspresyonları

MC bitkisinin meyvelerinin uçucu yağına ait bileşiklerden biri olan α -terpineol bileşiğinin HUVEC hücrelerindeki 2. ve 4. saatte ki TNF- α mRNA ekspresyonları kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.25, $p > 0.05$). LPS grubunda ise 2. saatte ve daha çok miktarda olmak üzere 4. saatte TNF- α mRNA ekspresyonlarının arttığı tespit edildi (Şekil 4.25, $p < 0.001$).



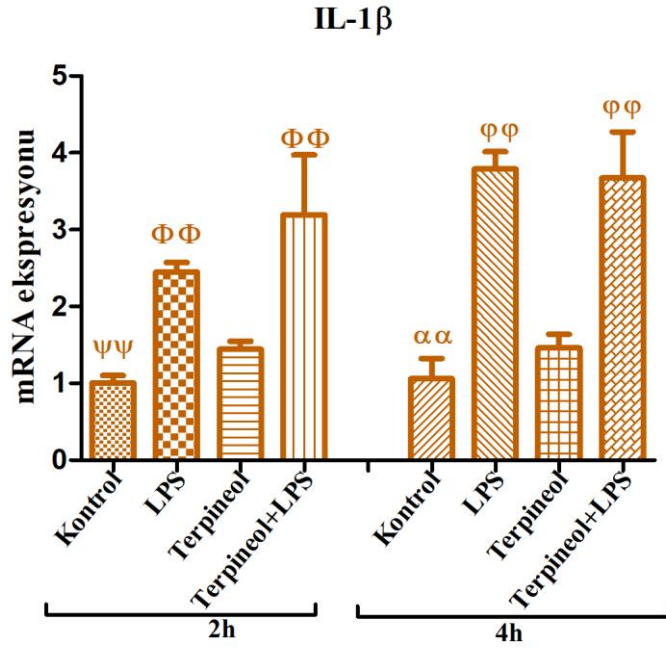
Şekil 4.25. α -terpineol bileşiğinin, TNF- α mRNA ekspresyonları.

LPS ile toksisite oluşturulmuş HUVEC hücrelerine α -terpineol bileşiğinin uygulamasının TNF- α mRNA ekspresyonları üzerine olan etkisi 2. ve 4 saatlerde LPS

uygulanmış gruplardan anlamlı bir fark olmadığı belirlendi (Şekil 4.25, $p>0.05$). Bulgularımızı incelediğimizde α -terpineol bileşiğinin uygulamasının LPS ile artmış TNF- α mRNA ekspresyonlarını değiştiremediğini belirlenmiştir.

4.3.4.2. IL-1 β 'nin mRNA Ekspresyonları

MC bitkisinin meyvelerinin uçucu yağına ait bileşiklerden biri olan α -terpineol bileşiğinin HUVEC hücrelerindeki 2. ve 4. saatte ki IL-1 β mRNA ekspresyonları kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.26, $p>0.05$). LPS grubunda ise 2. saatte ve daha çok miktarda olmak üzere 4. saatte IL-1 β mRNA ekspresyonlarının arttığı tespit edildi (Şekil 4.26, $p<0.01$).

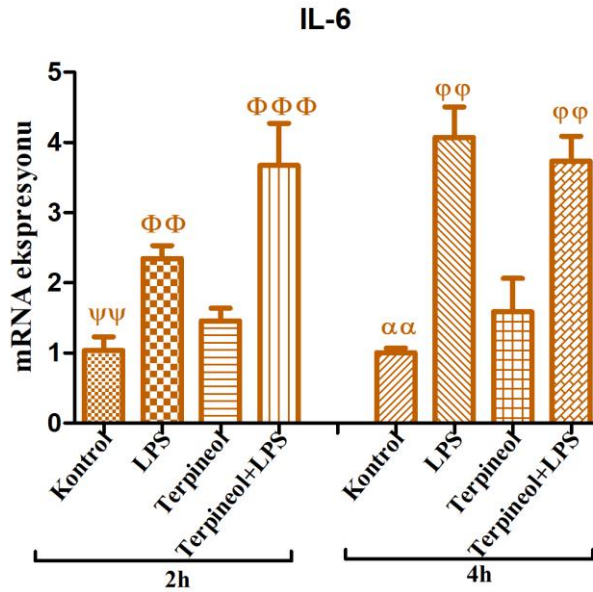


Şekil 4.26. α -terpineol bileşiğinin, IL-1 β mRNA ekspresyonları.

LPS ile toksisite oluşturulmuş HUVEC hücrelerine α -terpineol bileşiğinin uygulamasının IL-1 β mRNA ekspresyonları üzerine olan etkisi 2. ve 4 saatlerde LPS uygulanmış gruplardan anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.26, $p>0.05$). Bulgularımıza göre α -terpineol bileşiğinin uygulamasının LPS ile artmış IL-1 β mRNA ekspresyonlarını değiştiremediğini belirlenmiştir.

4.3.4.3. IL-6'nın mRNA Ekspresyonları

MC bitkisinin meyvelerinin uçucu yağına ait bileşiklerden biri olan α -terpineol bileşiğinin HUVEC hücrelerindeki 2. ve 4. saatte ki IL-6 mRNA ekspresyonları kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.27, $p>0.05$). LPS grubunda ise 2. saatte ve daha çok miktarda olmak üzere 4. saatte IL-6 mRNA ekspresyonlarının arttığı tespit edildi (Şekil 4.27, $p<0.01$). LPS ile toksisite oluşturulmuş HUVEC hücrelerine α -terpineol bileşiğinin uygulamasının IL-6 mRNA ekspresyonları üzerine olan etkisi 2. ve 4 saatlerde LPS uygulanmış gruplardan anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.27, $p>0.05$). Sonuçlarımıza göre, α -terpineol bileşiğinin uygulamasının LPS ile artmış IL-6 mRNA ekspresyonlarını değiştiremediğini tespit edilmiştir.

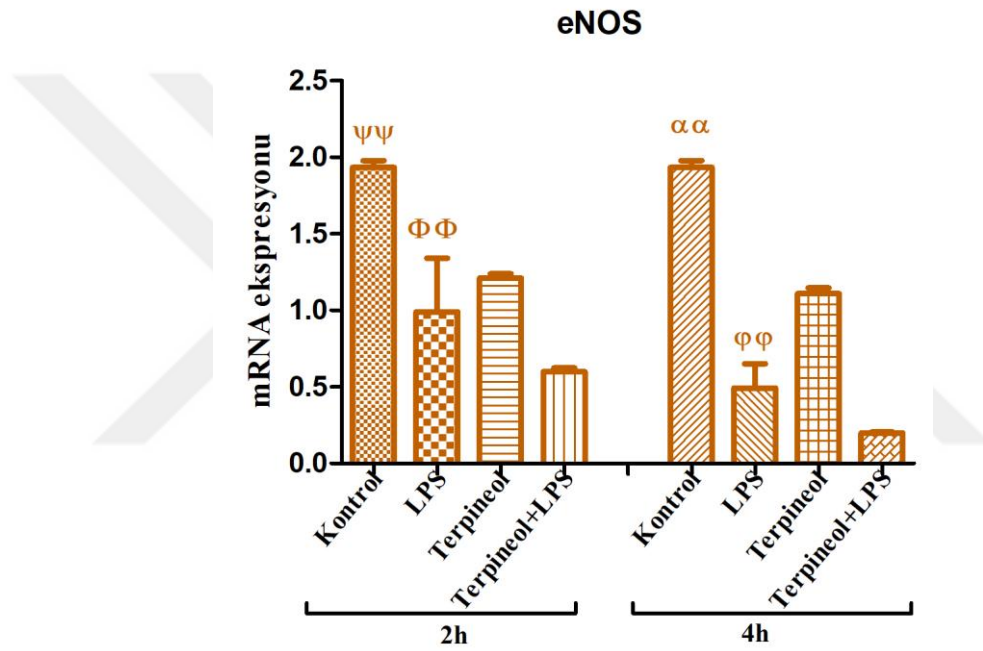


Şekil 4.27. α -terpineol bileşiğinin, IL-6 mRNA ekspresyonları.

4.3.4.4. eNOS'in mRNA Ekspresyonları

MC bitkisinin meyvelerinin uçucu yağına ait bileşiklerden biri olan α -terpineol bileşiğinin HUVEC hücrelerindeki 2. ve 4. saatte ki eNOS mRNA ekspresyonları kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.28, $p>0.05$).

LPS grubunda ise 2. saatte ve daha çok miktarda olmak üzere 4. saatte eNOS mRNA ekspresyonlarının azaldığı tespit edildi (Şekil 4.28, $p < 0.05$). LPS ile toksisite oluşturulmuş HUVEC hücrelerine α -terpineol bileşiğinin uygulamasının eNOS mRNA ekspresyonları üzerine olan etkisi 2. saatte anlamlı bir fark olmamasına rağmen; 4 saatlerde LPS uygulanmış gruplardan anlamlı bir düşüş göstermiştir (Şekil 4.28, $p < 0.01$). Bulgularımıza göre, α -terpineol bileşiğinin uygulamasının LPS ile artmış eNOS mRNA ekspresyonlarını değiştiremediği belirlenmiştir.



Şekil 4.28. α -terpineol bileşiğinin, eNOS mRNA ekspresyonları.

5. TARTIŞMA

Sepsis, toksinlere ve mikroorganizmalara yanıt olarak, eş zamanlı inflamasyon ve koagülasyon aktivasyonu ile karakterize bir durumdur.^{83, 84} Sepsis üzerine umut vaat eden çalışmaların olmasına rağmen, hala yüksek mortalite ve yüksek insidansa sahip bir hastalıktır.⁸³ Bu nedenle sepsisle ilişkili birçok farklı modellerde, farklı bileşikler ve ilaçlar uygulanarak sepsisin mekanizması açıklanmaya çalışılmaktadır.⁸⁵ Yapılan son çalışmalara göre; ana hücre ve doku hasarında ve daha önemlisi kliniğin geri dönüşüz safhaya girmesinde endotel hücre hasarının anahtar rol oynadığı *in-vivo* ve *in-vitro* çalışmalarla gösterilmiştir.¹³ LPS ile indüklenen *in vitro* sepsis modeli, sepsisin moleküler düzeyde incelenmesinde en çok tercih edilen modellerden biridir.^{85, 86} Bu çalışmada; daha önce tespit edilmiş çok yüksek antiinflamatuvar, antioksidan ve antibakteriyel etkiye sahip olan MC bitkisinin meyvelerine ait uçucu yağ ve bileşenlerinin; sepsisin neden olduğu endotel hasarına olan etkilerini *in vitro* sepsis modelinde moleküler ve hücresel açıdan incelenmiştir. Çalışmamızda LPS uygulaması ile oluşan hücre hasarı, MC bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağ ile düzeltilemediği belirlenmiştir. Gerek hücre indeksine baktığımızda, gerekse sepsise bağlı hücre hasarında artan sitokin seviyelerinde herhangi bir düzelme tespit edilememiştir. Bu bulgular literatüre uygun olmadığı görünse de MC bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağ bileşenleri 1.8 sineol, α -pinen ve α -terpineol tek tek incelendiğinde ilginç sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmamızda α -terpineol'un LPS ile indüklenmiş hasarda herhangi bir etkisi olmamakla beraber LPS ile oluşan sitokin hasarını daha artırabileceğini tespit edildi. Bununla beraber 1.8 sineol, α -pinen tek başlarına incelendiğinde sepsise bağlı oluşan hücre toksisitesini ve artmış sitokin seviyelerini düzeltebileceği ileri sürülmektedir.

MC bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağın ve MC bitkisinin

meyvelerine ait bileşiklerden α -terpineol bileşiğinin, HUVEC hücreleri üzerindeki 24. ve 48. saatteki etkileri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında herhangi bir toksik etki göstermezlerken; LPS gruplarında oluşan azalmış hücre indeks miktarını MC ve α -terpineol uygulamasının düzeltilmediği, hatta oluşan hücre hasarını daha da artırabilecekleri tespit edilmiştir. Aksine; MC bitkisinin meyvelerine ait diğer major bileşenlerden olan 1.8 cineol ve α -pinenuygulanan HUVEC hücrelerinin proliferatif etkileri incelendiğinde, kontrol grubuna göre herhangi bir toksik etkileri gözlenmezken; LPS verilen gruplara uygulandıklarında 1.8 sineol ve α -pinen'nin LPS ile oluşan azalmış hücre indeksini tekrar düzeltebileceklerini hatta kontrol grubuna yakın seviyeye getirebilecekleri gösterilmiştir.

Çalışmamızda oluşturulan *in vitro* sepsis modelinde yukarıda belirttiğimiz sonuçlara paralel olarak MC uçucu yağı ve α -terpineol uygulamasının LPS ile artmış sitokin seviyelerini düzeltilmediği yalnız 1.8 cineol ve α -pinenuygulamasının LPS uygulaması ile artmış sitokin seviyelerini anlamlı derecede düşürdüğünü belirledik.

LPS olarak bilinen endotoksin, Gram negatif bakterilerin dış yüzey membranının ana bileşenidir ve insanlardaki doğal bağışık yanıtın kuvvetli bir uyarıcısıdır.⁸⁷ LPS'nin TLR-4 reseptörüne bağlanmasıyla^{87, 88} Nf-kB yolağı aktive olur ve TNF- α , IL-1ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin genleri aktive edilir.⁸⁵ Bu üç inflamatuvar mediatörün eşgüdümlü yükselişi⁸⁹ ve ardından gelen immün yanıt, patojenik mikroorganizmalara karşı etkili, konakçı savunma sistemi oluşturur. Bununla birlikte bağışık sistemin aşırı aktivasyonu, sitokinlerin kontrolsüz salınmasına, dolayısıyla inflamasyon ve SIRS' a yol açar^{87, 88}

TNF- α , monosit ve makrofajlardan ilk salınan ve sepsis patogeneğinde tespit edilen en potent mediatördür.⁹⁰ TNF- α , nötrofilleri, endotel hücreleri, monosit ve

makrofajları aktive eder, kontrolsüz inflamatuvar kaskadı, doku hasarı, organ işlev bozukluğu ve hatta ölümle sonuçlanır.^{87, 91}

Yapılan çalışmalara göre^{11, 12, 34} *in vitro* insan monosit hücrelerinde¹¹, LPS ile indüklenince, TNF- α mRNA ekspresyonunun arttığını, 1.8 sineol bileşiği ise artan TNF- α mRNA ekspresyonunu düşürdüğü tespit edilmiştir.

α -pinenbileşiği üzerine yapılan çalışmaların sonuçlarına göre¹⁰, α -pinenbileşiğinin TNF- α inhibe ettiği, bir diğer çalışmaya göre²⁹ ise, α -pinenbileşiğinin Nf- κ B üzerine inhibitör etkisinin olduğunu, bununda inflamasyon sürecinde ağrı kontrolüne katkıda bulunduğu rapor edilmiştir. NF- κ B tüm hücre tiplerinde bulunan ve inflamasyon gibi patolojik olaylarda genlerin regülasyonu ile ilgili transkripsiyon faktörüdür.^{85, 92} Proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu düzenleyerek hücrel yanıtın oluşmasını sağlar.^{85, 92} Yapılan bu çalışmalar bizim çalışmamızı destekler niteliktedir.

Yapılan diğer bir çalışmada⁴⁶ α -terpineol bileşiğininde, TNF- α mRNA ekspresyon miktarını azalttığını tespit etmiştir.

Septik şok ve çoklu organ yetmezliğinin patogenezinde önemli rol oynayan bir diğer sitokin de IL-1 β 'dir.^{85, 93} İmmün sistem tarafından, sepsise yanıt olarak organizmada NF- κ B, TNF- α ve IL-1 β seviyeleri artar. Bu durum endotoksemiye bağlı hasarın etkilerini azaltmak için organizmanın gösterdiği doğal savunmadır. IL-1 β daha çok lokal inflamasyonlarda rol oynar⁷⁰

Çalışmamızda MC uçucu yağının uygulandığı hücrelerde, IL-1 β mRNA ekspresyonları incelendiğinde, 2. ve 4. saatteki MC+LPS grubunda oldukça yüksek miktarlarda olduğu tespit edildi.

Bu çalışmada 1.8 sineol ve 1.8 sineol+LPS gruplarındaki IL-1 β mRNA ekspresyon miktarlarının 2. ve 4. saatte kontrol grubu ile aynı seviyede olduğu tespit

edildi. Yapılan bir çalışmada ³⁴ 1.8 sineol bileşiğinin IL-1 β üzerine inhibisyonu Nf-kB aktivasyonu üzerinden yaptığı, yapılan bir diğer çalışmada da ¹², LPS ile indüklenince artan IL-1 β seviyesini düşürdüğün rapor edilmiştir.

Bulgularımızda α -pinenbileşiğinin uygulandığı HUVEC'lerin 2. ve 4. saatteki IL-1 β mRNA ekspresyon miktarları incelendiğinde, ekspresyon miktarlarında kontrol grubuna yakın değerlerde olduğu belirlendi. Yapılan bir çalışmada ²⁹ α -pinenbileşiğinin Nf-kB transkripsiyon faktörü üzerine inhibisyon etkisinin olduğu, ve bunun üzerinden de IL-1 β 'yı inhibe ettiği tespit edilmiştir.

α -terpineol ve α -terpineol+LPS gruplarının 2. saatteki IL-1 β mRNA ekspresyon miktarları kontrol grubuna göre biraz yükseldiği, 4. saatte ki ekspresyon miktarları ise 2. saate göre biraz daha arttığı tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmaya göre, ⁴⁵ α -terpineol bileşiğinin IL-1 β üzerine minör etkili olduğu tespit edilmiştir. Bir diğer çalışmaya göre, ⁴⁶ α -terpineol bileşiğinin Nf-kB transkripsiyon faktörünün inhibitörü olduğu, IL-1 β oluşumunun down regülasyonunu teşvik ettiği gösterilmiştir. ⁴⁶

Yapılan diğer çalışmalara göre, ^{87,94-97} IL-1 β , TNF- α 'nın toksik etkilerini artırdığını belirlemişlerdir.

IL-6, hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar özelliğe sahip bir sitokindir. ^{13,} ⁶⁵ İnflamasyon esnasında en kısa sürede sentezlenir ve sentezi ve salınımı IL-1, TNF- α tarafından indüklenir. IL-6'nın görevleri ise, nötrofillerin harekete geçmesini uyarır ve nötrofillerin apoptozisini inhibe eder. ¹³

Çalışmamızda, LPS ile indüklenmiş *in vitro* sepsis modelinde, MC uçucu yağının uygulandığı HUVEC hücrelerindeki IL-6 mRNA ekspresyonları incelendiğinde, MC ve MC+LPS gruplarında 2. saatte kontrole göre az bir yükselme gözlenirken, 4. saatte ise bu gruplarda çok yüksek seviyelere yükseldiği tespit edildi.

Ayrıca 1.8 sineol bileşiğinin uygulandığı HUVEC'de, gruplar arası IL-6 mRNA

ekspresyonları karşılaştırıldığında 1.8 sineol ve 1.8 sineol+LPS gruplarında 2. ve 4. saatte saatte ki gen ekspresyonların da kontrole göre bir artış gözlenmedi. Yapılan çalışmalarda; ^{10, 11, 34} 1.8 sineol bileşiğinin IL-6 inflamatuvar mediatörünü inhibe ettiğini tespit edilmiştir.

α -pinenbileşiğinin uygulandığı hücrelerin 2. ve 4. saatindeki IL-6 mRNA ekspresyonlarının miktarları kontrol grubuyla aynı seviyede olduğu tespit edildi. Yapılan çalışmalarda, ²⁹ α -pinenbileşiğinin Nf-kB yolağı üzerinden IL-6 mediatörünü inhibe ettiği rapor edilmiştir.

Bulgularımızdan α -terpineol bileşiğinin IL-6 mRNA ekspresyon miktarları 2. ve 4. saatte sadece α -terpineol+LPS grubunda yükseldiği gözlemlendi. Yapılan bir çalışmaya göre, ⁴⁵ IL-6 üzerine belirgin bir inhibisyon yapmadığı, IL-6 üretimini indükleyen TLR2/4'ü inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca α -terpineol bileşiğinin Nf-kB inhibitörü olduğu ve IL-6 üretiminin down regülasyonunu teşvik ettiği rapor edilmiştir. ⁴⁶

Organizmanın inflamasyona karşı oluşturduğu ilk yanıt makrofajlardan NO sentezlenmesidir. Endotoksinle uyarılan makrofajlardan iNOS üretilir, bakteri veya virüs hücreleri üzerine, bazı enzimleri inhibe ederek sitotoksik etki yapar. ^{85, 98-101} iNOS tarafından üretilen NO, hasar yapıcı ve toksik etkilere sahip olduğu belirtilse de, eNOS tarafından üretilen NO ise endotel fonksiyonunun korunması için gereklidir. ⁸⁵

Yapılan çalışmalarda, eNOS miktarının artmasının vasküler inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir. Bununla beraber vasküler hasar arttıkça eNOS miktarının azaldığı gösterilmiştir. Vasküler yapıların düzenli ve sağlıklı bir durumda bulunmasında eNOS'un çok önemli fonksiyonlarının olduğu artık açıkça bilinen bir gerçektir ^{102, 103}

Sepsise bağlı olarak eNOS miktarı düşmektedir. Sepsiste düşen eNOS miktarı ile prognoz arasında korelasyonun olabileceği düşünülmektedir. ^{104, 105} Bizim çalışmamızda da LPS uygulanmış HUVEC hücre hatlarında eNOS protein ekspresyon miktarlarının

düştüğü gösterilmiştir. MC bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağın ve MC bitkisinin meyvelerine ait bileşiklerden α -terpineol bileşiğinin LPS uygulanmış HUVEC hücre hattındaki azalmış eNOS miktarında bir düzeltme yapamamıştır. Bu sonuçların paralelinde hücre indeksinde de artış olmadığı belirlenmiştir. MC bitkisinin meyvelerine ait diğer major bileşenlerden olan 1.8 cineol ve α -pinenmoleküllerinin LPS ile oluşturulmuş HUVEC hücre hattında ise LPS grubuna göre eNOS protein ekspresyonunda önemli artışlar yapmıştır. Bu bulgulara paralel olarak LPS grubunda azalmış olan hücre indeksi bu moleküllerle tedavi edilen LPS gruplarında normale yakın kalmıştır.

Sonuçlarımızı bir bütün olarak incelediğimizde; HUVEC hücre hatlarına LPS uygulamasının 24. ve 48. saatlerde hücre proliferasyonunu önemli derecede azaltarak endotel hücre hasarı yaptığını ve sitokin seviyelerini anlamlı derecede artırdığını göstermiştir. MC bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağın ve MC bitkisinin meyvelerine ait bileşiklerden α -terpineol bileşiğinin ise LPS ile oluşturulmuş endotel hücre hasarında etkilerinin bulunmadığı hem hücresel hem de biyomoleküler seviye de gösterilmiştir. Bu sonuçların aksine ilginç olarak MC bitkisinin meyvelerine ait diğer major bileşenlerden olan 1.8 cineol ve α -pinenmoleküllerinin LPS ile oluşturulmuş HUVEC hücre hasarını hücresel ve biyomoleküler seviyede düzelttiği belirlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada;

1. Gram negatif bakterilerin primer antijeni olan ve sepsisin fizyopatolojik sonuçlarından sorumlu olan LPS HUVEC hücre hattında hücre indeksini azaltmıştır. Bu sonuçlar daha önce yapılan çalışmaları destekler nitelikte olup LPS'nin sepsise bağlı endotel hasarından primer sorumlu olabileceğini göstermiştir.
2. MC bitkisinin meyvelerinden elde edilen uçucu yağın ve MC bitkisinin meyvelerine ait bileşiklerden α -terpineol bileşiğinin ise LPS ile oluşturulmuş endotel hücre hasarında etkilerinin bulunmadığı gösterilmiştir.
3. MC bitkisinin meyvelerine ait diğer major bileşenlerden olan 1.8 cineol ve α -pinenmoleküllerinin LPS ile oluşturulmuş HUVEC hücre hasarını hücreSEL ve biyomoleküler seviyede düzelttiği gösterilmiştir.

MC bitkisinden elde edilen uçucu yağın sepsise bağlı oluşan hücre hasarında etkisiz olmasının nedenini içeriğinde bulunan çeşitli aktif maddelerin sinerjisine bağlamak mümkündür. Bu uçucu yağda 3 major bileşen bulunmakta olup bir tanesi sepsise bağlı hücre hasarını daha da artırmaktadır. Diğer iki aktif molekül ise tek başlarına oldukça önemli tedavi edici etkileri vardır. Üç bileşenin birarada bulunması çok önemli olabilecek biyolojik aktiviteyi maskeleyebilecek kanaatindeyiz. Bundan sonra yapılacak çalışmaların bu moleküller üzerinde tek tek veya bunların karışımı olarak yapılmasının gerekli olduğunu ileri sürmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Koca HB. Prostat kanser hücre kültürü üzerinde acorus calamus bitki ekstraktının etkisi. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı. Doktora tezi, Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2013.
2. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A. Epidemiology of sepsis and infection in icu patients from an international multicenter cohort study. *Intensive Care Med*, 2002, 28: 108-121.
3. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the united states: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 2001, 29: 1303-1310.
4. Russell JA. Management of sepsis. *N Engl J Med*, 2006, 355: 1699-1713.
5. Lakshmikanth CL, Jacob SP, Kudva AK, Latchoumycandane C, Yashaswini PS, Sumanth MS, Goncalves-de-Albuquerque CF, Silva AR, Singh SA, Castro-Faria-Neto HC, Prabhu SK, McIntyre TM, Marathe GK. Escherichia coli Braun Lipoprotein (BLP) exhibits endotoxemia - like pathology in Swiss albino mice. *Sci Rep*, 2016, 6: 34666.
6. Ozdulger A, Cinel I, Koksel O, Cinel L, Avlan D, Unlu A, Okcu H, Dikmengil M, Oral U. The protective effect of N-acetylcysteine on apoptotic lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis model. *Shock*, 2003, 19: 366-372.
7. Bone RC. Sepsis syndrome. New insights into its pathogenesis and treatment. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 1991, 5(4): 793-805.
8. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 2003, 348.
9. Yorganci K. Sepsis Patofizyolojisi. *Yoğun Bakım Dergisi*, 2005, 5: 80-84.

10. Bouzabata A, Casanova J, Bighelli A, Cavaleiro C, Salgueiro L, Tomi F. The genus *Myrtus* L. in Algeria: Composition and biological aspects of essential oils from *M. communis* and *M. nivellei*: A Review. *Chem Biodivers*, 2016, 13: 672-680.
11. Juergens UR. Anti-inflammatory Properties of the monoterpene 1,8-cineole: Current evidence for co-medication in inflammatory airway diseases. *Drug Res*, 2014, 64: 638-646.
12. Zhao C, Sun J, Fang CFT. 1,8-Cineol attenuates lps-induced acute pulmonary inflammation in mice. *Inflamm*, 2013, 37: 9770-9774.
13. Dağlı E. Multipl vücut travmalı ve izole kafa travmalı hastalarda sistemik inflamatuvar cevap sendromu ve sepsis gelişiminde PCT, CRP-D-Dimer, Laktat, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 düzeylerinin karşılaştırılması. Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı. Uzmanlık tezi, Mersin: Mersin Üniversitesi, 2011.
14. Faydaođlu E, Sürücüođlu MS. Geçmisten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu Üniv Orman Fak Derg*, 2011, 11(19): 52-67.
15. Erdem S, Eren AP. Tedavi amaçlı kullanılan bitkiler ve bitkisel ürünlerin yan etkileri. *Turk Hij Den Biol Derg*, 2009, 66(3): 133-141.
16. Medikal Akademi, Hastalıkların Tedavisinde Kullanılan Bitkiler.
https://www.google.com.tr/search?q=hastal%C4%B1klar%C4%B1+iyile%C5%9Ftirmede+kullan%C4%B1lan+baz%C4%B1+bitkiler&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjshbOwtqbVAhVJmBoKHbNCC68Q_AUICigB&biw=1366&bih=662#imgsrc=icG2d_2pXX-eYM: 26 Temmuz 2017.
17. Kafkas E, Güney M, Sadighazadi S, Yıldırım H, Kefayati S. Volatile compounds of selected white and black myrtle (*Myrtus communis* L.) types from mediterranean region of Turkey. *J Appl Res Med Plants*, 2012, 7(18) 1244-1248.

18. Bouzabata A, Cabral C, Goncalves MJ, Cruz MT, Bighelli A, Cavaleiro C, Casanova J, Tomi F, Salgueiro L. *Myrtus communis* L. as source of a bioactive and safe essential oil. *Food Chem Toxicol*, 2015, 75: 166-172.
19. Asgarpanah J, Ariamnes A. Phytochemistry and pharmacological properties of *Myrtus communis* L. *Indian J of Trad Knowldg*, 2015, 1(1): 82-87.
20. Aleksic V, Knezevic P. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiol Res*, 2014, 169: 240-254.
21. Yıldırım E. Melisa, adaçayı ve nane yağlarının bilimsel olarak incelenmesi, piyasa analizi ve kalite tayini. Farmakognozi Anabilim Dalı. Yüksek lisans tezi, Kayseri: Erciyes Üniversitesi, 2014.
22. Sümbül S, Ahmad MA, Asif M, Akhtar M. *Myrtus communis* Linn. *Indian J Nat Prod Resour*, 2011, 2(4): 395-402.
23. https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=662&tbm=isch&sa=1&q=Myrtus+communis+L.+bitkisi&oq=Myrtus+communis+L.+bitkisi&gs_l=psyab:26
Temmuz 2017.
24. Alipour G, Dashti S, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Myrtus communis* L. and its active constituents. *Phytother Res*, 2014, 28: 1125-1136.
25. Ben Hsouna A, Hamdi N, Miladi R, Abdelkafi S. *Myrtus communis* essential oil: chemical composition and antimicrobial activities against food spoilage pathogens. *Chem Biodivers*, 2014, 11: 571-580.
26. Belmimoun A, Meddah B, Meddah AT, Sonnet P. Antibacterial and antioxidant activities of the essential oils and phenolic extracts of *myrtus communis* and *zygophy'um album* from algeria. *J Fundam Appl Sci* 2016, 8(2): 510-514.

27. Hennia AM, Miguel MG, Brada M, Nemmiche SA. Composition, chemical variability and effect of distillation time on leaf and fruits essential oils of *Myrtus communis* from north western Algeria. *J Essent Oil Res*, 2016, 28(2): 146-156.
28. Bayaz M. Esansiyel yağlar: antimikrobiyal, antioksidan ve antimutajenik aktiviteleri. *Academic Food J*, 2014 12(3): 45-53.
29. Aydın E. Monosiklik ve bisiklik monoterpen uygulamasının deneysel beyin tümör modeli üzerine potansiyel etkilerinin in vitro yöntemlerle araştırılması. Biyoloji Anabilim Dalı. Doktora tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2013.
30. Touaibia M. Antimicrobial activity of the essential oil of *Myrtus communis* l. berries growing wild in algeria. *J Fundam Appl Sci* 2015, 7(2): 150-162.
31. Adriana GG, Jullyana SS, Quintans LJ. Monoterpenes with analgesic activity—a systematic review. *Phytother Res* 2013, 27: 1-15.
32. Xu J, Hu ZO, Wang C, Yin ZQ, Wei Q. Acute and subacute toxicity study of 1,8-cineole in mice. *Int J Clin Exp Pathol* 2014, 7(4): 1495-1501.
33. 1,8-cineole protected human lipoproteins from modification by oxidation and glycation and exhibited serum lipid-lowering and anti-inflammatory activity in zebrafish, *Direct Open Access J*, 2012: 565-570.
34. Silva ACR, Lopes PM, Azevedo MMB, Costa DCM, Alviano CS. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules*, 2012, 17: 6305-6316.
35. Türkez H, Aydın E. In vitro assessment of cytogenetic and oxidative effects of α -pinene. *Toxicol Ind Health*, 2016, 32(1) 168-176.
36. Silveira RC, Andrade LN. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules*, 2013, 18: 1227-1254.
37. Aydın E, Türkez H. Antioxidative, Anticancer and Genotoxic Properties of α -pinenon N2a Neuroblastoma Cells. *Sect Cell Mol Biol* 2013, 65(3): 1009-2013.

38. Silva MTB, Marques RB, Lima FJB, Soares MA, Santos AA, Magalhães PJC, Oliveira FA, FRC. α -terpineol induces gastric retention of liquids by inhibiting vagal parasympathetic pathways in rats. *Planta Med*, 2016, 82: 1329-1334.
39. Souza RHL, Cardoso MSP, Menezes CT, Silva JP, De Sousa DP. Gastroprotective activity of α -terpineol in two experimental models of gastric ulcer in rats. *Daru*, 2011, 19(4): 277-281.
40. Parvardeh S, Moghimi M, Eslami P, Masoudi A. Alpha-terpineol attenuates morphine-induced physical dependence and tolerance in mice: role of nitric oxide. *Iran J Basic Med Sci*, 2016, 19: 201-208.
41. Hassan SB, Muhtasib HG, Göransson HRL. Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing nf-kb signalling. *Anticancer res*, 2010, 30: 1911-1920.
42. Park SN, Lim YK, Freire MO, Cho E, Jin D. Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe*, 2012, 18: 369-372.
43. Timmermans WMC, Laar JAM, Hagen PM. Immunopathogenesis of granulomas in chronic autoinflammatory diseases. *Clin & Transl Immunology*, 2016, 5: 118.
44. Kuzu MA. İnflamasyon, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu ve peritonitin fizyopatolojisi. *Hastane infeksiyonları Dergisi*, 2001, 5: 69-83.
45. Manjo G. The healing hand: Man and wound in the ancient world. *Cambridge: Harvard University Press*, 1975.
46. Nogueira MNM, Aquino SG, Junior CR. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1 β , IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflamm Res*, 2014, 63: 769-778.

47. Barreto RSS, Albuquerque-Júnior RLC , Araújo AAS. A systematic review of the wound-healing effects of monoterpenes and iridoid derivatives. *Molecules*, 2014, 19: 846-862.
48. Ward PA. Oxygen radicals, inflammation and tissue injury. *Free Rad Bio Med*, 1998, 77: 110-117.
49. Russin WA, Hoesly JD, Elson CE, Tanner MA. Inhibition of rat mammary carcinogenesis by monoterpenoids. *Carcinogenesis*, 1989, 10 (11): 2161-2164.
50. Lampronti I, Saab AM. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the magnoliophyta division. *Int J Oncol*, 2006, 29(4): 989-995.
51. Wang W, Li N, Luo M, Zu YTE. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. . *Molecules*, 2012, 17(3): 2704-2713.
52. Topçu AW, Söyletir GMD. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, 1. Baskı. İstanbul, Nobel tıp kitabevi, 2008: 57-67.
53. Hall, JE. *Tıbbi Fizyoloji*. Baskı. 2013: 423-430.
54. James HW, David AP. The inflammatory response to injury in children. *Curr Opin Pediatr*, 2010, 22: 315-320.
55. Karabay AZ. Metilsülfonilmetan glukozamin ve kondroitin sülfatın lps/ifn- γ ile uyarılmış raw 264.7 makrofaj hücrelerinde apoptoz üzerine etkileri. Biyokimya Anabilim Dalı. Doktora tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2011.
56. Patrick KK. Inflammatory responses and mediators. *Surg Clin North Am*, 2000, 8: 885-894.
57. Napolitano LM, Faist E. Immune Dysfunction in Trauma. *Surg Clin North Am*, 1999, 79: 1385-1416.

58. Deitch EA. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Annals Surg*, 1992, 216: 117-134.
59. Davies MG. Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Br J Surg* 1997, 84: 920-935.
60. Charles M, Robertson M. The systemic inflammatory response syndrome. *Microbes Infect*, 2006, 8: 1382-1389.
61. Özkanlar S. Deneysel sepsis oluşturulan sıçanlarda antibiyotik, kortikosteroid ve vitamin k kullanımlarının inflamatuvar belirteçler, hematolojik parametreler ve yaşam süreleri üzerine etkilerinin araştırılması. Biyokimya Anabilim Dalı. Doktora tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2011.
62. Kocabıyık M. Lipopolisakkarit ile sepsis oluşturulan ratların kalp dokularında serbest radikal metabolizmasının incelenmesi; D vitamininin etkisi. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı. Uzmanlık tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi, 2015.
63. Bakır BO. Enteral glutamin ve arjinin desteğinin sıçanlarda lipopolisakkarit ile oluşturulan sepsise etkisi. Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı. Doktora tezi, Ankara: Başkent Üniversitesi, 2015.
64. Marius KTO. Pathophysiology of polytrauma. *Int J Inj Contr Saf Promot*, 2005, 36: 691-709.
65. Temiz M. Sıçanlarda lipopolisakkaridin neden olduğu hipotansiyon ve enflamasyona mtor'nin katkısının araştırılması. Farmakoloji Anabilim Dalı. Yüksek lisans tezi, Mersin: Mersin Üniversitesi, 2014.
66. Ayan M. Deneysel sepsis modelinde glutatyon, myeloperoksidaz, plazma ve dokuda mda düzeylerine n-asetilsistein ve erdosterin'in etkilerinin karşılaştırılması. Acil Tıp Anabilim Dalı. Uzmanlık tezi, Konya: Selçuk Üniversitesi, 2006.

67. Özcan N. Ağır sepsis erken tanısında c-reaktif protein, prokalsitonin ve interlökin-6 düzeylerinin tanısal değeri. Çocuk Sağlığı ve Hastalığı Anabilim Dalı. Uzmanlık tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2014.
68. Ekici F. Ratlarda endotoksinle oluşturulan sepsis modelinde toll-like reseptör-4 antagonistinin (eritoran) retinokoroidal inflamatuvar hasara etkisi. Göz Hastalıkları Anabilim Dalı. Uzmanlık tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi, 2011.
69. Tutak E. Sepsis tanısında bilirubin düzeyleriyle sitokinler arasındaki ilişki. Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı. Uzmanlık tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, 2011.
70. Yıldız A. Lipopolisakkarit ile indüklenen endotoksemik rat modelinde ketamin, propofol ve ketofol kullanımının inflamasyon ve oksidatif stres üzerine etkisi. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı. Yüksek lisans, Ankara: Gazi Üniversitesi, 2012.
71. Tapan T. Neonatal LPS uygulaması ve üremenin uzun vadeli programlanması: nos ve kaspaz-1 inhibisyonlarının rolü. Fizyoloji Anabilim Dalı. Yüksek lisans tezi, Malatya: İnönü Üniversitesi, 2012.
72. Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG. Systemic inflammation after trauma. *Injury*, 2007, 38: 1336-1345.
73. Yurt AÖ. Endotoksemide meloksikam uygulamasının serum vitamin düzeylerine etkisi. Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı. Yüksek lisans tezi, Konya: Selçuk Üniversitesi, 2012.
74. Akça H. L-Karnitin'in deneysel olarak lipopolisakkarit (LPS) ile oluşturulan sepsis modelinde kolon anastomozunun iyileşmesi üzerine etkileri. Genel Cerrahi Anabilim Dalı. Uzmanlık tezi, Mersin: Mersin Üniversitesi, 2010.

75. Tiftik RN. Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre kültüründe rho/rho-kinaz yolağı ve nitrik oksit ilişkisi. Farmakoloji Anabilim Dalı. Yüksek lisans tezi, Mersin: Mersin Üniversitesi, 2005.
76. Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HHHW, Heller MFM. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Procd Nat Academy Sci*, 1991, 88: 1788-1792.
77. Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmitd HHHW, Nakane MFM. Purification and characterisation of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Procd Nat Academy Sci*, 1991, 88: 10480-10484.
78. Myatt L, Brockman DE, Eis AL. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the human placenta. *Placenta*, 1993, 14: 487-495.
79. Tracey WR, Pollock JS, Murad F, Nakane MUF. Identification of A type III (endothelial-like) particulate nitric oxide synthase in llc-pk1 kidney tubuler epithelial cells. *Am J Physiol*, 1994, 266: 22-26.
80. Doğanyığıt Z. Endotoksemi oluşturulmuş sıçanlarda propolisin karaciğer koruyucu etkinliğinin araştırılması. Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora tezi, Kayseri: Erciyes Üniversitesi, 2012.
81. Tuncer S. Çoklu İlaça dirençli kanser hücre hattına nanopartiküllerle ilaç aktarımı. Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı. Yüksek lisans tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2014.
82. Yalçın GT. Flavonoidlerin kanser hücreleri üzerine etkisi. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı. Yüksek lisans tezi, Konya: Selçuk Üniversitesi, 2013.

83. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ method. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
84. Albayrak A, Halici Z, Polat B, Karakus E, Cadirci E, Bayir Y, Kunak S, Karcioglu SS, Yigit S, Unal D. Protective effects of lithium: a new look at an old drug with potential antioxidative and anti-inflammatory effects in an animal model of sepsis. *Int Immunopharmacol*, 2013, 16: 35-40.
85. Polat G, Ugan RA, Cadirci E, Halici Z. Sepsis and septic shock: current treatment strategies and new approaches. *Eurasian J Med*, 2017, 49: 53-58.
86. Ayaz G, Halici Z, Albayrak A, Karakus E, Cadirci E. Evaluation of 5-HT₇ receptor trafficking on in vivo and in vitro model of lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory cell injury in rats and lps-treated a549 cells. *Biochem Genet*, 2017, 55: 34-47.
87. Kang Q, Chen Y, Zhang X, Yu G, Wan XJW. Heat shock protein A12B protects against sepsis-induced impairment in vascular endothelial permeability. *J Surl Res*, 2015, 202: 87-94.
88. Liu J, Wang J, Luo H, Li Z, Zhong TJT. Screening cytokine/chemokine profiles in serum and organs from an endotoxic shock mouse model by liquichip. *Sci China*, 2017: 60.
89. Cantaluppi V, Quercia AD, Dellepiane S, Ferrario S, Camussi GLB. Interaction between systemic inflammation and renal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant*, 2014, 29: 2004-2011.
90. Chee ME, Majumder KYM. Intervention of dietary dipeptide gamma- L- glutamyl- L- valine (γ -ev) ameliorates inflammatory response in a mouse model of lpsinduced sepsis. *J Agric Food Chem*, 2017, 65: 5953–5960.

91. Özcan C, Hasanoğlu AMG. Sepsis ve inflamasyon mediatörleri. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 1996, 3: 4.
92. Qiu P, Cui X, Sun J, Welsh J, Natanson C. Antitumor necrosis factor therapy is associated with improved survival in clinical sepsis trials. *Crit Care Med*, 2013, 41: 2419-2429.
93. Baeuerle PA. Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF- κ B puzzle? *Curr Biol*. 1998, 8: 19-22.
94. Bhatia MSM. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol*, 2004, 202: 145-156.
95. Cuschieri J, Bulger E, Schaeffer V, Sakr S, Nathens AB, Hennessy L, Minei J, Moore EE, O'Keefe G, Sperry J, Remick D, Tompkins R, Maier RV. Early elevation in random plasma IL-6 after severe injury is associated with development of organ failure. *Shock*, 2010, 34: 346-351.
96. Jawa RS, Anillo S, Huntoon K, Baumann H. Interleukin-6 in surgery, trauma, and critical Care Part II: clinical implications. *J Intsv Care Medicine*, 2011, 26: 73-87.
97. Panacek EA, Marshall JC, Albertson TE, Johnson DH, Johnson S, MacArthur RD, Miller M, Barchuk WT, Fischkoff S, Kaul M, Teoh L, Van Meter L, Daum L, Lemeshow S, Hicklin GCD. Efficacy and Safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody f(ab')₂ fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels. *Crit Care Med*, 2004, 32: 2173-2182.
98. Takahashi W, Nakada TA, Yazaki MSO. Interleukin-6 levels act as a diagnostic marker for infection and prognostic marker in patients with organ dysfunction in intensive care units. *Shock*, 2016, 46: 254-260.

99. Lepoivre M, Fieschi F, Coves J, Thelander L, Fontecave M. Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 179: 442-448.
100. Türköz Y, Özerol E. Nitrik oksit'in etkileri ve patolojik rolleri. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 1997, 4: 453-461.
101. Aladağ MA, Türköz Y, Özerol İH. Nitrik oksit ve nörofizyopatolojik etkileri. *J Med Sci*, 2000, 20: 107-111.
102. Özkan C, Akgül Y. Deneysel nefrotoksisite oluşturulan tavşanlarda nitrik oksit donörü (l-arginin) ve nitrik oksit sentaz inhibitörlerinin (aminoguanidin, l-name) bazı biyokimyasal parametrelere etkileri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2010, 21: 35-41.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
<p>Adı Soyadı: Zerrin KUTLU Doğum tarihi: 21.01.1983 Doğum yeri: Erzurum Medeni hali: Bekar Uyruğu: T.C.27253665916 Adres: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, ERZURUM Tel: 04422315231 Faks: 04422315201 E-mail: kutluzerrin@atauni.edu.tr</p>
Eğitim
<p>Lise: Atatürk Lisesi (2002) Lisans: Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi (2003-2007) Yüksek lisans: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı (2011-2013) Doktora: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı (2013-2017)</p>
Yabancı Dil Bilgisi
<p>İngilizce: Orta derecede (ÜDS 65.00, Aralık 2008)</p> <p>Metin girmek için burayı tıklatın.</p> <p>Metin girmek için burayı tıklatın.</p>
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
<p>Türk Biyokimya Derneği Metin girmek için burayı tıklatın.</p>
İlgi Alanları ve Hobiler
<p>Kitap okumak Metin girmek için burayı tıklatın.</p>

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
Etik Alt Kurulu



Sayı : 93722986.12/ 92
Konu: Etik Alt Kurul Kararı


18/07/2016

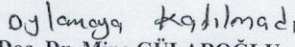
Sayın Doç. Dr. Mine GÜLABOĞLU

İlgi: 18.07.2016 tarih ve 244 sayılı dilekçeniz.

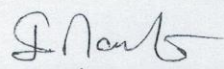
Fakültemiz Alt Etik Kurulunun 18.07.2016 tarihinde almış olduğu 7 numaralı karar ile danışmanı olduğunuz doktora öğrencisi Zerrin KUTLU'nun "Myrtus communis L. Bitkisinin Meyvesinden Elde Edilen Uçucu Yağın HUCEV Hücre Hattında LPS ile İndüklenen Endotoksemiye Bağlı Hücre Hasarına Etkilerinin Biyokimyasal Olarak Araştırılması" başlıklı çalışması etik kurulumuz tarafından kabul edilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Doç. Dr. Meltem ÇETİN
Başkan


Doç. Dr. Mine GÜLABOĞLU
Üye

İzinli
(Katılmadı)
Doç. Dr. Bilal YILMAZ
Üye


Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU
Üye

İzinli
(Katılmadı)
Yrd. Doç. Dr. Kaan KÜÇÜKOĞLU
Üye

Karar-7-Eczacılık Fakültesi-Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Mine GÜLABOĞLU'nun danışmanı olduğu doktora öğrencisi Zerrin KUTLU'nun Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında ve Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yürüteceği "Myrtus communis L. Bitkisinin Meyvesinden Elde Edilen Uçucu Yağın HUCEV Hücre Hattında LPS ile İndüklenen Endotoksemiye Bağlı Hücre Hasarına Etkilerinin Biyokimyasal Olarak Araştırılması" başlıklı çalışma ile ilgili 18.07.2016 tarih ve 244 sayılı yazı ile ekleri görüşülmüştür.

Yapılan görüşmelerden sonra; söz konusu çalışmanın yürütülmesinin etik kurallara uygun olduğu mevcut oybirliği ile (Doç. Dr. Mine GÜLABOĞLU oylamaya katılmamıştır) kabul edilmiştir.