



**T.C.**

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**



**MAKROFAJ HÜCRELERİNDE KARABAŞ OTU (*LAVANDULA  
STOECHAS*) ÖZÜT VE İKİNCİL METABOLİTLERİNİN ANTI-  
İNFLAMATUAR ETKİSİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE  
İNCELENMESİ**

**Hande İPEK**

**Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı**

**ÇANAKKALE**

**Not: Tez kapağı yüksek lisans tezlerinde “Turkuaz”, doktora tezlerinde “Mavi” dir.**

**T.C.**  
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MAKROFAJ HÜCRELERİNDE KARABAŞ OTU  
(*LAVANDULA STOECHAS*) ÖZÜT VE İKİNCİL  
METABOLİTLERİNİN ANTI-İNFLAMATUAR  
ETKİSİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ**

**Hande İPEK**

**Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı**

Tezin Sunulduğu Tarih: **20/01/2017**

**Tez Danışmanı:**

**Doç. Dr. Tuğba BOYUNEĞMEZ TÜMER**

**ÇANAKKALE**

Hande İPEK tarafından Doç.Dr. Tuğba BOYUNEĞMEZ TÜMER yönetiminde hazırlanan ve 20/01/2017 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Makrofaj Hücrelerinde Karabaş Otu (*Lavandula stoechas*) Özüt ve İkincil Metabolitlerinin Anti-İnflamatuvar Etkisinin Moleküler Düzeyde İncelenmesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği**Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ**olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

**JÜRİ**

Prof. Dr. Mehmet AY .....

**Başkan**

Prof. Dr. Azra BOZCAARMUTLU .....

**Üye**

Doç. Dr. Tuğba BOYUNEĞMEZ TÜMER .....

**Üye**

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

Bu tez çalışması Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2015-434 numaralı projeden ve kısmi olarak TUBİTAK 112T442 numaralı proje tarafından desteklenmiştir.

## İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



**Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.**

Hande İPEK

## TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Tuğba BOYUNEGMEZ TÜMER, çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüslediği için sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Tezin düzenlenmesi ve değerlendirilmesi aşamasındaki yardımlarından ve katkılarından dolayı değerli jüri üyelerim sayın Prof. Dr. Azra BOZCAARMUTLU ve Prof. Dr. Mehmet AY'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ, Uzman Ali Rıza TÜFEKÇİ ve Fatih GÜL tarafından yapılan kimyasal çalışmalar için teşekkürlerimi sunuyorum.

Bazı deney çalışmalarında bana yardımcı olan, aynı zamanda laboratuvar arkadaşım olan doktora öğrencisi Seda SAVRANOĞLU KULABAŞ'a;

Tez dönemim süresince bana manevi destek veren çok sevgili arkadaşlarım İlkin KANTARCIOĞLU ve Uğur KULABAŞ'a;

teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca, her zaman benden inancını ve desteğini esirgemeyen, tüm eğitim hayatım boyunca göstermiş oldukları maddi ve manevi desteklerinden dolayı sevgili annem Arife İPEK, babam Recep İPEK, kardeşim Saim İPEK, kuzenlerim Nesrin DENGİZ, Neslihan DENGİZ ve anneannem Fatma DENGİZ'e sonsuz teşekkürlerimi, saygılarımı ve sevgilerimi sunuyorum.

Hande İPEK  
Çanakkale, Ocak 2017

## SİMGELER VE KISALTMALAR

BCA	Bikinkoninik Asit
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
COX-2	Siklooksijenaz 2
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EA	Etil Asetat
FBS	Fetal Sığır Serum
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IL-1 $\beta$	İnterlökin 1 Beta
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
LPS	Lipopolisakkarit
MTT	[3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium bromür]
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sodyum Bikarbonat
NO	Nitrik Oksit
PAJE	Poliakrilamit Jel Elektroforezi
PBS	FosfatTamponlu Tuzlu Su
RNA	Ribonükleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TEMED	N', N', N'-Tetrametil-etilen-diamin
Tris	2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol

## ÖZET

### MAKROFAJ HÜCRELERİNDE KARABAŞ OTU (*LAVANDULA STOECHAS*) ÖZÜT VE İKİNCİL METABOLİTLERİNİN ANTI-İNFLAMATUAR ETKİSİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ

Hande İPEK

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Doç. Dr. Tuğba BOYUNEGMEZ TÜMER

20/01/2017, 69

Tüm dünyada esansiyel yağı aromaterapide yaygın olarak kullanılan Karabaş otu (*Lavandula stoechas*) Anadolu halkı arasında farklı terapötik kullanımlara sahip bir lavanta türüdür. Anadolu’da bu türün sulu demlemesi metabolik sendromun tüm bileşenlerine karşı tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Metabolik sendromun bileşenleri ölümcül dörtlü olarak da bilinen obezite, insülin direnci, yüksek kolesterol ve tansiyon olarak sıralanmaktadır. Tüm bu bileşenlerin altında yatan ortak faktör kronik düşük seviye inflamasyondur. Bu çalışmada, karabaş otunun potansiyel anti-inflamataur etkisi ve etken anti-inflamatuar bileşenleri biyoaktivite rehberli fraksiyonlama yöntemi kullanılarak lipopolisakkarit (LPS) uygulaması ile inflamasyon modeli oluşturulan RAW 264.7 makrofaj hücre hattında ilk defa aydınlatılmıştır. Bu bileşenlerin biyoaktivite rehberli ayırmsallaştırılmasında kullanılan tüm moleküler biyolojik çalışmalar tez kapsamında gerçekleştirilmiştir. Kimyasal ayırmsallaştırma, saflaştırma ve yapı aydınlatma çalışmaları laboratuvarımızda yürütülmüş olan TUBİTAK 112T442 no’lu proje kapsamında Çankırı Karatekin Üniversitesi Kimya Bölümü’nde Prof. Dr. İbrahim Demirtaş ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir. Bitkiden hazırlanan sulu özüt ilk önce etil asetat (EA) ve n-bütanol kullanılarak ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra, bu iki özütün inflamasyon modeli oluşturulan RAW 264.7 hücre hattında nitrik oksit (NO) salınımı üzerine etkileri Griess yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, EA özütünün inflamasyonla indüklenen NO seviyesini baskılamada en etkin özüt olduğu belirlenmiştir. EA özütü kolon kromatografi yöntemi kullanılarak 11 fraksiyona (E1-E11) ayrılmıştır. NO tarama sonuçlarına göre E6 fraksiyonu en aktif fraksiyon olarak seçildi ve yapısında bulunan etken

maddelerin saflaştırılması için sephadeks kromatografisi tekniği kullanılmıştır. Saflaştırılan bileşiklerin yapı aydınlatma çalışmaları NMR, IR, ve UV analizleri kullanılarak yapılmıştır. Buna göre E6 fraksiyonundan apigenin, luteolin ve *p*-kumarik asit saflaştırılmıştır. *p*-kumarik asit NO üretimini baskılamada etkin bulunmazken apigenin ve luteolin bileşikleri için IC50 değerleri sırasıyla 56 ve 26 µM olarak hesaplanmıştır. Apigenin ve luteolin bileşikleri inflamatuvar şartlar altında, NO üretiminden sorumlu indüklenbilir NO sentaz (iNOS) enziminin ekspresyon seviyesini 50 µM dozda mRNA düzeyinde sırasıyla % 80 ve % 92 oranında baskılamakta, protein düzeyinde sırasıyla % 94 ve % 99 oranında baskılamıştır ( $p<0.05$ ). Ayrıca, apigenin ve luteolin düşük dozlarda (25-50 µM), inflamatuvar yanıtta anahtar rol oynayan COX-2 ve IL-1β moleküllerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı baskılamalara neden olmuştur. *L. stoechas* bitkisinin içeriğinde bulunan anti-inflamatuvar özellikte etken saf maddelerin tanımlanması yan etkisi düşük, yeni nesil terapötiklerin ve standardize diyetel takviye ürünlerinin geliştirilebilmesi için önemlidir.

**Anahtar sözcükler:** RAW 264.7, *Lavandula stoechas*, İnflamasyon, Nitrik Oksit, Apigenin, Luteolin.



## ABSTRACT

### INVESTIGATING ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF *LAVANDULA STOECHAS* EXTRACT AND ITS SECONDARY METABOLITES IN MACROPHAGE CELLS AT THE MOLECULAR LEVEL

Hande İPEK

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Bioengineering and Materials Engineering

Advisor : Assoc. Dr. Tuğba BOYUNEĞMEZ TÜMER

20/01/2017, 69

*Lavandula stoechas*, in the genus of lavender, has distinct therapeutic uses among Anatolian people. Rather than worldwide use of its essential oil in aromatherapy, specifically the aqueous portion has been traditionally used in Anatolia against the components of metabolic syndrome, all of which share a state of chronic inflammation as an underlying cause. In the current study, the anti-inflammatory constituents of *L. stoechas* were isolated by using a bioassay guided fractionation techniques in lipopolysaccharide (LPS) inflamed RAW 264.7 macrophage cell line for the first time. All the molecular biology studies used in bioactivity guided separation were carried out in the scope of current thesis. Chemical separation, purification and identification studies were carried out in the scope of a TÜBİTAK (112T442) project in Çankırı Karatekin University, Department of Chemistry, by Prof. Dr. İbrahim Demirtaş and his team. An aqueous extract was partitioned into ethyl acetate (EA) and n-butanol fractions. The EA, determined as bioactive extract, was separated into 11 subfractions by column chromatography. E6 was identified as active sub-fraction subjected to sephadex column to get pure compounds which were then applied to NMR, IR, and UV analyses for structure determination. In RAW 264.7 cells, the effects of extracts/fractions/subfractions/compounds on LPS induced NO (nitric oxide) production was determined by using Griess method. The potential inhibitory effects of each compound on LPS induced iNOS expression were determined by qPCR and Western blot. *p*-coumaric acid, apigenin and luteoline were found in the E6, and the last two compounds appeared to be primarily responsible for the anti-inflammatory activity. Apigenin and luteoline at 50  $\mu$ M decreased NO production 66 and 80%- IC<sub>50</sub>: 56

and 26  $\mu\text{M}$ -by inhibiting iNOS gene expression 84 and 88% as well as protein expression 94 and 99%, respectively ( $p < 0,05$ ). Besides, both apigenin and luteoline at low concentrations caused significant downregulations at the mRNA levels of COX-2 and IL-1 $\beta$ . Identifying active anti-inflammatory compounds among the constituents of effective folk medicines is important task for the development of new generation therapeutic agents with multi-target properties and less side effects as well for the development of standardized dietary supplements.

**Keywords:** RAW 264.7, *Lavandula stoechas*, Inflammation, Nitric Oxide, Apigenin, Luteoline.



# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	v
ÖZET .....	vi
ABSTRACT.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
BÖLÜM 1 .....	1
GİRİŞ.....	1
1.1. Karabaş Otu ( <i>Lavandula stoechas</i> ) .....	3
1.1.1. Bitkinin Sınıflandırılması .....	4
1.1.2. Lavandula Türleri ve Tıbbi Kullanımları .....	5
1.1.3. Lavandula Türleri İçeriğinde Bulunan Potansiyel Aktif Kimyasal Bileşenler.....	5
1.1.4. <i>Lavandula stoechas</i> Türünün Tıbbi Kullanımı.....	5
1.1.5. <i>Lavandula stoechas</i> İçeriğinde Bulunan Fitokimyasallar .....	6
1.2. Metabolik Hastalıkların Gelişiminde İnflamasyonun Önemi.....	6
1.3. İnflamasyonda Nitrik Oksit Salınımı ve Nitrik Oksit Sentaz Enzimi .....	8
1.4. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz Enzimi .....	10
1.5. İnterlökin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) .....	12
1.6. Siklooksijenazlar (COX-1, COX-2) .....	12
1.7. İnflamasyonda Korunmada ve Tedavi Sürecinde Doğal Ürünlerin Önleyici, Tamamlayıcı ve Terapötik Önemi.....	13
Çalışmanın Amacı .....	14
BÖLÜM 2 .....	16
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	16
BÖLÜM 3 .....	18
MATERYAL VE METOT .....	18
3.1. Materyal.....	18
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler.....	18
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	19
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Bitki Materyalinin Temini ve Teşhisi.....	19
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı.....	19
3.2. Yöntem .....	20

3.2.1. Kimyasal Yöntemler: Özütleme, Fraksiyonlandırma, Saflaştırma ve Yapı Analizi.....	20
3.2.1.1. Özütleme İşlemleri.....	20
3.2.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi-İTK (Thin Layer Chromatography-TLC) .....	21
3.2.1.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC- TOF/MS) .....	22
3.2.1.4. EA Özütünün Kolon Kromatografisi ile Ayrıştırılması.....	24
3.2.1.5. Aktif Fraksiyonun Flash Kromatografisi ile Ayrıştırılması.....	26
3.2.1.6. E6 Fraksiyonun İzolasyon Çalışması.....	26
3.2.1.7. E6 Fraksiyonunun Yapı Analizleri .....	27
3.2.2. Karabaş Otundan Elde Edilen Özütlerin Total Polifenol Miktarlarının Belirlenmesi .....	28
3.2.3. Hücre Kültürü.....	28
3.2.4. RAW 264.7 Makrofaj Hücre Hattında İnflamasyon Modelinin Oluşturulması .	28
3.2.5. Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	29
3.2.6. Besiyerinde Nitrik Oksit (NO) Ölçümü .....	29
3.2.7. Hücre Lizatlarında Total Protein Miktarının Tayini .....	30
3.2.8. Protein Düzeyinde Ekspresyon Seviyelerinin Tayin Edilmesi.....	30
3.2.8.1. Hücre Lizatı Hazırlanması .....	31
3.2.8.2. SDS-PAJE ile Proteinlerin Ayrıştırılması.....	31
3.2.8.3. Western Blot Analizi.....	33
3.2.9. mRNA Düzeyinde Ekspresyon Seviyelerinin Tayin Edilmesi.....	34
3.2.9.1. Total RNA İzolasyonu .....	34
3.2.9.2. RNA'nın Spektrofotometrik Analizi.....	34
3.2.9.3. Total RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi .....	35
3.2.9.4. cDNA Sentezi .....	35
3.2.9.5. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu : qPCR.....	36
3.2.10. İstatistiksel Analizler .....	37
BÖLÜM 4 .....	38
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	38
4.1. Araştırma Bulguları .....	38
4.1.1. Karabaş Otundan Farklı Organik Çözücüler ile Hazırlanan Özütlerde Polifenol Miktar Tayini .....	38
4.1.2. Karabaş Otundan Elde Edilen Özütlerle Yapılan Tarama Çalışmaları .....	38
4.1.2.1. Karabaş Otundan Elde Edilen Özütlerle Yapılan Hücre Canlılığı Sonuçları .....	39
4.1.2.2. LPS Uygulaması ile İndüklenerek İnflamasyon Modeli Oluşturulan RAW 264.7 Makrofaj Hücre Hattında Özütlerin NO Üretimi Üzerine Etkileri ile Yapılan Taramalar .....	40

4.1.3. Etkin Olarak Belirlenen EA Özütünün Fraksiyonlanması ve Tarama Çalışmaları	41
4.1.3.1. EA Özütünden Elde Edilen Fraksiyonlarla Yapılan Hücre Canlılığı Sonuçları	41
4.1.3.2. NO İnhibisyonu ile Tarama Çalışmaları	43
4.1.4. Etkin Olarak Belirlenen E6 Fraksiyonundaki Etkin Maddelerin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Biyoaktivite Çalışmaları	44
4.1.4.1. Saf Maddelerin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu	45
4.1.4.2. E6 Fraksiyonundan Elde Edilen Saf Maddelerle Yapılan Hücre Canlılığı Sonuçları	45
4.1.4.3. NO İnhibisyonu ile Tarama Çalışmaları	46
4.1.4.4. Apigenin ve Luteolinin İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS) Enziminin Protein Seviyelerindeki Değişimleri	48
4.1.4.5. Apigenin ve Luteolinin iNOS Enziminin mRNA Seviyesinde Ekspresyonu	49
4.1.4.6. Siklooksijenaz-2 (COX-2) ve İnterlökin-1β (IL-1β)'nin Gen Seviyesindeki Değişimleri	50
4.2. Tartışma	52
BÖLÜM 5	60
SONUÇ VE ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR	61
EKLERİ	I
EK 1. Yapısı belirlenen saf maddelere ait NMR spektrumları	II
ÖZGEÇMİŞ	X

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1.1.	Karabaş otu ( <i>Lavandula stoechas</i> ).....	4
Şekil 1.2.	Kronik inflamasyonun hastalıklarla ilişkisi .....	7
Şekil 1.3.	Kronik inflamasyonun insülin direnciyle ilişkisi.....	8
Şekil 1.4.	Nitrik oksit sentezi .....	9
Şekil 1.5.	NOS enziminin moleküler yapısı.....	10
Şekil 1.6.	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin moleküler yapısı.....	11
Şekil 1.7.	Araşidonik asitin prostoglandinlere ve diğer eikosanoidlere dönüşümü .....	13
Şekil 1.8.	Biyoaktivite rehberli fraksiyonlama .....	15
Şekil 3.1.	a) Neo-clavenger aparatında su ile kaynatma işlemi, b) Özütleme işlemi.....	21
Şekil 3.2.	EA özütünün İTK görünümleri.....	22
Şekil 3.3.	Ekstraktların HPLC-TOF/MS analizi için hazırlanma aşamaları .....	23
Şekil 3.4.	Karabaş otu EA özütüne ait HPLC-TOF kromatogramı.....	24
Şekil 3.5.	Özütün Sephadex LH-20 kolon dolgu maddesine tatbik edilmesi.....	25
Şekil 3.6.	a) EA fraksiyonun ayrıştırılması için kullanılan flash kromatografisi, b) Flash kromatografisi kolonları (kartuşları), c) Bitki özütü.....	26
Şekil 3.7.	a) Flash Kromatografisi kromatogramları ve benzer fraksiyonlar (1. Program), b) Flash kromatografisi kromatogramları ve benzer fraksiyonlar (2. Program) .....	27
Şekil 3.8.	Proteinlerin immünolojik olarak belirlenmesi .....	30
Şekil 3.9.	Western blot için sandwich yöntemi.....	33
Şekil 4.1.	Karabaş otu ( <i>Lavandula stoechas</i> ) sulu demlemesinden elde edilen n-bütanol ve Etil asetat (EA) özütlerinin total polifenol miktarları .....	38
Şekil 4.2.	Farklı dozlarda uygulanan EA ve n-bütanol özütlerinin LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarının hücre canlılığı üzerine etkisi.....	39
Şekil 4.3.	Farklı dozlarda uygulanan EA ve n-bütanol özütlerinin LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında NO üretimi üzerine etkisi.....	40
Şekil 4.4.	Farklı dozlarda uygulanan EA fraksiyonlarının LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarının hücre canlılığı üzerine etkisi .....	413
Şekil 4.5.	Tek dozda taranan fraksiyonların LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında NO üretimi üzerine etkileri.....	43
Şekil 4.6.	Farklı dozlarda uygulanan E6 fraksiyonunun LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında NO üretimi üzerine etkileri.....	44
Şekil 4.7.	Yapısı belirlenen bileşikler .....	45
Şekil 4.8.	Farklı dozlarda uygulanan saf maddelerin LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarına hücre canlılığı üzerine etkileri .....	46
Şekil 4.9.	Farklı dozlarda uygulanan saf maddelerin LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında NO üretimi üzerine etkileri.....	47
Şekil 4.10.	Apigenin ve luteolinin IC50 değerini hesaplamada kullanılan dozlarının LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarındaki NO üretimi üzerine etkileri .....	48
Şekil 4.11.	Farklı dozlarda uygulanan E6 fraksiyonu ile apigenin ve luteolin maddelerinin a) LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında iNOS enziminin protein ekspresyonu üzerine etkileri, b) iNOS seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması .....	49
Şekil 4.12.	Farklı dozlarda uygulanan E6 fraksiyonu ile apigenin ve luteolin maddelerinin LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında iNOS enziminin mRNA ekspresyonu üzerine etkileri .....	50
Şekil 4.13.	Farklı dozlarda uygulanan E6 fraksiyonu ile apigenin ve luteolin maddelerinin	

LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında COX-2 enziminin gen ekspresyonu üzerine etkileri .....	51
Şekil 4.14. Farklı dozlarda uygulanan E6 fraksiyonu ile apigenin ve luteolin maddelerinin LPS ile RAW 264.7 makrofajlarında IL-1 $\beta$ ' nın gen ekspresyonu üzerine etkileri .....	52
Şekil 4.15. iNOS aracılı NO sentezi ve etkileri .....	54
Şekil 4.16. <i>Lavandula stoechas</i> bitkisinin biyoaktivite rehberli fraksiyonlaması .....	56
EK Şekil 1.1. Apigenine ait NMR spektrumları .....	IV
EK Şekil 1.2. Lutoline ait NMR spektrumları .....	VII
EK Şekil 1.3. <i>p</i> -Kumarik asite ait NMR spektrumları.....	IX



## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa No

Çizelge 1.1. <i>Lavandula stoechas</i> bitkisinin sınıflandırılması .....	4
Çizelge 3.1. HPLC mobil faz programı .....	23
Çizelge 3.2. Karabaş otu EA özütüne ait HPLC-TOF/MS analiz sonuçları.....	24
Çizelge 3.3. EA fraksiyonunundan elde edilen alt fraksiyonları .....	25
Çizelge 3.4. RIPA tamponunun hazırlanışı .....	31
Çizelge 3.5. SDS-PAJE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin hazırlanması.....	32
Çizelge 3.6. cDNA sentezi karışım ve çoğaltma işlemi .....	36
Çizelge 3.7. qPCR reaksiyon bileşenleri .....	36
Çizelge 3.8. qPCR analizi çoğaltma aşamaları .....	37
Çizelge 4.1. Biyoaktivite rehberli fraksiyonlama ve saflaştırma yöntemiyle elde edilen apigenin ve luteolin maddelerinin LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında NO üretimi üzerine IC50 değerleri .....	58



## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

İnflamasyon; enfeksiyöz ajanlar, alerjenler, serbest radikaller, işlenmiş gıdalar, hareketsiz yaşam tarzı, defektif beslenme alışkanlıkları gibi çok çeşitli faktörlerin vücutta bağışıklık sistemini tetikleyerek başlattığı fizyolojik ve patolojik bir süreçtir (Hamdy ve Gamal-Eldeen, 2009). İnflamasyon, akut ve kronik olmak üzere 2 şekilde ortaya çıkar. Akut inflamasyon kısa sürede ortaya çıkan fizyolojik bir yanıttır. Kızarıklık, şişlik, ağrı, yara ve işlev kaybı şeklinde belirir. Kronik inflamasyon ise oksidatif stres, yüksek kalori tüketimi ve artan kan şekeri gibi hücrel stres ve fonksiyon bozukluğu durumlarında ortaya çıkan, ilerleyen dönemlerde kalp ve damar hastalıkları, diyabet ve yüksek tansiyon gibi pek çok dejeneratif hastalığa sebebiyet verebilen temel bir patolojik durumdur (Wang ve ark., 1994). Günümüzde, düşük-seviyeli kronik inflamasyonun obezite, insülin direnci, metabolik sendrom, ilerleyen dönemde ise tip 2 diyabet ve hatta kanser gibi çeşitli metabolik bozukluklarının altında yatan en önemli sebeplerden biri olduğu bilinmektedir (Macarthur ve ark., 2004; Wellen ve ark., 2005; Welty ve ark., 2016). Bu nedenle, yan etkisi düşük, çoklu aktiviteye sahip, yeni anti-inflamatuar terapötik ajanların geliştirilmesi, kronik inflamasyon ve bununla ilişkili metabolik hastalıkların önlenmesinde, tedavisinde önemle ele alınan konular arasındadır.

Pek çok inflammatuar hastalıkta, makrofaj aktivasyonu ve beraberinde görülen nitrik oksit (NO) ile diğer proinflammatuar (interlökin ve sitokinlerin) moleküllerin salınımı birincil aşamadır. Bu süreçte, makrofajlarda meydana gelen NO üretimindeki artış indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enziminin ekspresyonunun artmasıyla mümkün olmaktadır (Chan, 1995). iNOS enzimi L-arjinin amino asidinin, L-sitruilin ve NO'ya dönüştüğü bir oksidasyon reaksiyonunu katalizlemektedir. Bu enzim makrofajlarda interferon-alfa (IL- $\alpha$ ), tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- $\alpha$ ), interlökin-1beta (IL-1 $\beta$ ) ve interlökin-6 (IL-6) gibi proinflammatuar mediyatörler aracılığıyla mRNA ve protein seviyesinde indüklenmektedir (Chan ve ark., 1995; Valcic, 1996). Enzim aktivitesinde artışa neden olan bu durum sonuç olarak enzimin son ürünü olan NO seviyesinde de ciddi artışlara neden olmaktadır.

Artan NO seviyesinin önemi özetle iki maddede açıklanabilir. 1) İnflamasyon sürecinin patolojik şartları altında artan NO bir çeşit serbest radikaldir ve bu molekülün oksijenle tepkimesi pek çok farklı reaktif nitrojen oksit ara ürünlerinin (RNOI) oluşmasına neden olur (Aktan, 2004). 2) RNOI'lar biyomeküllerin özellikle tiyol gruplarıyla

reaksiyona girerek bu moleküllerin üç boyutlu yapılarının bozulmasına ve sonuç olarak fonksiyon kaybına neden olurlar. Yakın zamanlarda, Hotamışlıgil (2010) tarafından yapılan bir araştırmada kronik metabolik inflamasyon (metainflamasyon) ile karakterize obezite şartlarında, artan iNOS seviyesinin katlanmamış protein yanıtı (UPR) ve demir yanıt elementi alfa (IRE $\alpha$ ) gibi proteinlerin S-nitrosilasyonunu arttırarak endoplazmik retikulum (ER) fonksiyonunun bozulmasına ve uzamış ER stresine neden olduğu ortaya konulmuştur (Yang ve ark., 2015).

İnflamasyon sürecinde aktive olan makrofajların, NO gibi proinflamatuvar molekülleri oluşturmasının engellenmesi, inflamatuvar hastalıklardan korunma ve tedavide oldukça önemlidir. İnflamatuvar koşullar altında iNOS tarafından NO'nun aşırı üretimi, hücre içi dejeneratif süreçlerin gelişimine neden olur. Bu inflamatuvar mediyatörlerin seviyelerini kontrol altına alan doğal kaynaklı ajanların aydınlatılması önleyici/tamamlayıcı ve tedavi edici terapide önemlidir. İnflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılan piyasadaki sentetik steroidal ve nonsteroidal ilaçların (NSAID) pek çoğunun ciddi yan etkileri vardır (Coleman ve Tsongalis, 2010; Maroon ve ark., 2010). Bu bakımdan sentetik olmayan, doğal kökenli, potansiyel nonsteroid anti-inflamatuvar moleküllerin ortaya çıkarılması, yapılarının ve etki mekanizmalarının aydınlatılması, bu moleküllerden türevlendirilerek oluşturularan, yan etkisi düşük, etki değeri yüksek yeni terapötik ajanların geliştirilebilmesi için kapı aralamaktadır.

Piyasada hali hazırda var olan ilaç etken maddelerinin yaklaşık % 60'ının doğal kökenli moleküllerden türevlendirilerek geliştirildiği bilinmektedir (Newman ve Cragg, 2007). Örneğin, organ nakli sonrasında immün sistemi baskılayıcı olarak kullanılan Siklosporin, 1972 yılında tesadüfen keşfedilmiş ve Hardangervidda'da (Norveç) yetişen *Tolypocladium inflatum* mantarından izole edilmiştir. Siklosporin, 1983 yılından beri organ nakilleri haricinde, romatoid artrit ve sedef hastalığı gibi inflamatuvar hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılan önemli bir ilaçtır. Bu ilaç, IL-2 ve IL-4 gen transkripsiyonu üzerindeki selektif inhibe edici etkisi sayesinde bağışıklığı baskılayıcı aktivite göstermektedir (Rang ve ark., 2012; Tedesco ve Haragsim, 2012). Bir diğer örnek, patofizyolojisinde kronik inflamasyonun merkezi bir rol oynadığı diyabet ve tedavisinde 50 yılı aşkın bir süredir başarıyla kullanılan metformin örneğidir. Metformin 1920'li yılların başında Edinburgh (İngiltere)'dan bir araştırma grubunun yaptığı çalışmalarda diyabete karşı aktif olduğu belirlenen *Galega officinalis* (Fransız lilası) bitksinden köken alan "galegine" molekülünden türevlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasında, ülkemizde diyabet, obezite, yüksek tansiyon ve kolesterole karşı geleneksel tedavi amaçlı yaygın bir şekilde kullanılan Karabaş otu (*Lavandula stoechas*) bitkisinin sulu özütünde yer alan anti-inflamatuar özellikte aktif fitokimyasal bileşenlerin tanımlanması, potansiyel iyileştirici etkilerinin ve moleküler mekanizmalarının belirli bir düzeyde aydınlatılması amaçlanmıştır.

Bir çeşit lavanta türü olan Karabaş otu (*Lavandula stoechas*)'nın Anadolu'da halk arasında kullanılan çok sayıda tıbbi bitki arasında özel bir yeri vardır. Bunun nedeni, bitkinin hem yurtdışında hem de ülkemizde çok iyi tanınması, ancak tıbbi kullanımında kültürel farklılıklar olmasıdır. Yurtdışında bu bitkinin ve diğer lavanta türlerinin çoğunlukla “yağı” aromaterapide ve masajda, ilaveten, antispazmotik, antipsikiyatrik, anti-inflamatuar, antimikrobiyal, antiviral ve antifungal amaçlarla harici olarak kullanılmaktadır (Cavanagh ve Wilkonson, 2002). Ülkemizde ise, Karabaş otu bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen dekoksasyon ya da infüzyonu, yani “sulu özütü”, dahili olarak özellikle Marmara ve Ege bölgesinde halk arasındaki tabiriyle kalp ve damar hastalıklarında “damar açıcı ve kalbi güçlendirici”, “zayıflatıcı”, şeker hastalığı, yüksek tansiyon ve kolesterolda “iyileştirici” amaçlarla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Yenici, 1999; Ertuğ, 2002, Tuzlacı, 2002; Onar, 2006; Sarıkan, 2007; Bulut, 2008). Bitkinin birkaç Akdeniz ülkesinde de bu şekilde kullanıldığını gösteren etnobotanik çalışmalar mevcuttur (Tahraoui ve ark., 2007; Leporatti ve Ghedira, 2009). Literatürde de bu bitkinin hipoglisemik ve tansiyon düşürücü etkisini fizyolojik boyutta gösteren deney hayvanlarıyla yapılmış iki adet çalışma bulunmaktadır (Gamez ve ark., 1987; Bao ve ark., 2011). Bahsedilen bu etnobotanik çalışmaların hepsi ve sınırlı sayıdaki deneysel çalışmalar insülin direnci, dislipidemi, obezite, hipertansiyon ve ilerleyen aşamalarda gelişen metabolik bozuklukları işaret etmektedir. Bu hastalıklarının hepsinin kökeninde inflamasyon süreci yer almaktadır. Bitkinin ülkemizdeki kullanımı suda kaynatma ve demleme yöntemine dayandığından, özellikle sulu özütünün inflamasyon gelişiminde ana faktörleri; hafifletmeye veya ortadan kaldırmaya aday “etkin moleküller” içerdiğini düşündürmektedir.

### **1.1. Karabaş Otu (*Lavandula stoechas*)**

Tez kapsamında çalışılmak üzere seçilen *Lavandula stoechas* türü, halk arasındaki en yaygın ismiyle Karabaş otu ülkemizde başta Çanakkale ve Balıkesir olmak üzere, Hatay, Mersin ve Muğla civarlarında yaygın olarak bulunmaktadır (Sarıkan, 2007). 30-100 cm uzunluğuna erişebilen bu bitkinin yaprakları uzun, grimsi, ipeksi tüylü ve 1-4 cm

boyundadır. 10-30 cm uzunlukta sivri uçlu ince yapraksız saplar üzerinde 2-3 cm uzunluğunda çiçeklerin görüldüğü ve her bir çiçekte 4-8 mm uzunluğunda bir taç yaprak bulunan, sivri ucun üstündeki çiçekler daha büyük, uzun ve parlak lavanta mavisi renklerde olan çok yıllık otsu bir bitkidir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Karabaş otu (*Lavandula stoechas*)

### 1.1.1. Bitkinin Sınıflandırılması

Lavanta, Lamiales takımına ait Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyası içinde bulunan *Lavandula* cinsine bağlı, kışın yapraklarını dökmeyen 28 kadar çalimsı görünüşlü, çok yıllık bitki türünün ortak adıdır. Tez çalışmasında kullanılan bitki türüne ait bilimsel sınıflandırma Çizelge 1.1’de verilmiştir.

Çizelge 1.1. *Lavandula stoechas* bitkisinin sınıflandırılması

Alem	Bitkiler
Bölüm	Kapalı Tohumlular
Sınıf	İki Çenekliler
Takım	Lamiales
Familya	Ballıbabagiller
Cins	<i>Lavandula</i>
Tür	<i>Lavandula stoechas</i>
Binominal Adı	<i>Lavandula stoechas</i> L.

### **1.1.2. Lavandula Türleri ve Tıbbi Kullanımları**

Lavandula cinsine bağlı yaygın tıbbi kullanımı olan türler *Lavandula dentata* (Fransız lavantası), *Lavandula angustifolia* (İngiliz lavantası) ve *Lavandula stoechas* (Tepesinde Lavanta) olarak sıralanabilir (Chu ve Kemper, 2001). Lamiaceae familyası üyelerine ait cinsler özellikle terpenik bileşikler, flavonoidler ve fenolik asitleri içermesi nedeniyle önemli fizyolojik aktivitelere sahiptir. Karabaş otu, uçucu yağlar, aromatik yağlar ve benzeri ikincil metabolitler bakımından zengin olması nedeniyle; gıda, eczacılık, tıp, kozmetik ve parfümeri gibi alanlarda büyük öneme sahiptir. Lavanta türlerinin yağı tüm dünya üzerinde özellikle aromaterapide, parfümeri ve kozmetik sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca lavanta türlerinden elde edilen yağ bileşenlerinin, antispazmotik, neuropsikiyatrik, antikonvulsan, anjiyoprotektan, analjezik, antiinflamatuar, antimikrobiyal, antiviral, antifungal, antineoplastik, antioksidan özelliklerini ortaya koyan pek çok çalışma mevcuttur (Cavanagh ve Wilkinson, 2002).

### **1.1.3. Lavandula Türleri İçeriğinde Bulunan Potansiyel Aktif Kimyasal Bileşenler**

Lavanta türlerinin esansiyel yağ bileşenleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Buna göre, yağın ana bileşenlerinin monoterpen (linalol, linalil asetat, 1,8-sineol (ökaliptol),  $\beta$ -osimen, fenkon ve kafur), benzenoid (kumarin ve rosmarinik asit) ve seskiterpen türevleri olduğu bilinmektedir. Bu bileşiklerin konsantrasyonları farklı *Lavandula* türlerinde değişiklik gösterebilir. *Lavandula* türlerinde yüksek oranda bulunan kafur böceksavar özelliğinden dolayı yaygın şekilde insektisit olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, *Lavandula* türlerinin içeriğinde bulunan öjenol, rosmarinik asit,  $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol ve kafurun antibakteriyal özellikte olduğu bilinmektedir (Pattnaik ve ark., 1997; Chu ve Kemper, 2001). Bunun dışında bütün *Lavandula* türlerinde bulunan sineol, antispazmodik ve lokal anestezi aktivite göstermektedir (Pattnaik ve ark., 1997).

### **1.1.4. *Lavandula stoechas* Türünün Tıbbi Kullanımı**

Ülkemizde doğal olarak yetişen ve halk arasında Karabaş otu olarak bilinen *Lavandula stoechas*, Lamiaceae familyasına ait aromatik bir bitkidir. Yüzyıllardır Anadolu halk hekimliğinde ağrı kesici, antiseptik, yara iyi edici, yatıştırıcı (sara ve astımda), balgam söktürücü, idrar yolları iltihaplarını giderici, egzama yaralarını iyi edici, sinir ve kalp

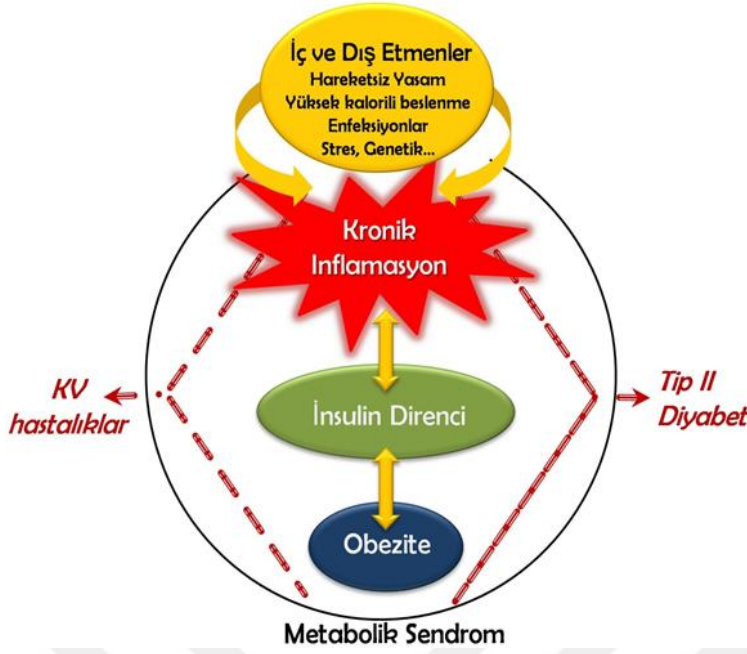
kuvvetlendirici gibi etkilerinden yararlanılmaktadır. Monoterpenlerce zengin uçucu yağın antimikrobiyal, antifungal, anti-inflamatuar ve karminatif özellikleri ortaya konulmuştur (Catherine ve Kathi, 2001). Ayrıca, *Lavandula stoechas* bitkisinden elde edilen saf yağlar hoş kokusu ve antimikrobiyal/antifungal özellikleri nedeniyle kozmetik ve deterjan endüstrilerinde birçok ürünün (dezenfektan, oda spreyi, cilt bakım ürünü, şampuan, sabun) yapımında, sakinleştirici özelliğinden dolayı da aromaterapide yaygın şekilde kullanılmaktadır. Uçucu yağ ve aroma farmasötik endüstrisinde sedatif, gaz giderici ve ağrı kesici olarak ilgi görmektedir (Chu ve Kemper, 2001; Cavanagh ve Wilkinson, 2002). Ayrıca, böceksavar özelliğinden kaynaklı olarak insektisit formülasyonlarında bulunmaktadır. Ancak *Lavandula stoechas*'ın sulu biyoaktif bileşenleri tam olarak tanımlanmamıştır. Bu bileşenler tanımlandığında bitkinin, gıda ve diyet takviyesi ürünlerinde ve farmasötik endüstrisinde popülerlik kazanacağı düşünülmektedir.

### **1.1.5. *Lavandula stoechas* İçeriğinde Bulunan Fitokimyasallar**

*Lavandula stoechas* bitkisinden elde edilen uçucu yağın bileşenleri üzerine çok geniş bir literatür bilgisi olmasına rağmen, sulu bileşenleri üzerine bilgiler son derece sınırlıdır. Bu bitkinin, polifenol içeriği hakkında tamamlanmış bir profil olmamakla birlikte içeriğinde flavon 7-glikozitler özellikle de, apigenin ve luteolin 7-O glukozitlerin bulunduğunu gösteren birkaç çalışma mevcuttur (Upson ve ark., 2000). Daha öncede bahsettiğimiz gibi bu bitkinin veya bitkiden izole edilen herhangi bir etken molekülün anti-inflamatuar etkilerini ortaya koyan bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. İnflamasyon, metabolik pek çok hastalığın gelişiminde yer alan temel bir patofizyolojik süreç olduğu için, erken dönemde inflamasyonun önüne geçebilecek doğal önleyici, kuyucu ve tedavi edici ajanların ortaya çıkarılmasının ülkelerin yürüttüğü sağlık politikalarında önemli bir yer teşkil etmektedir.

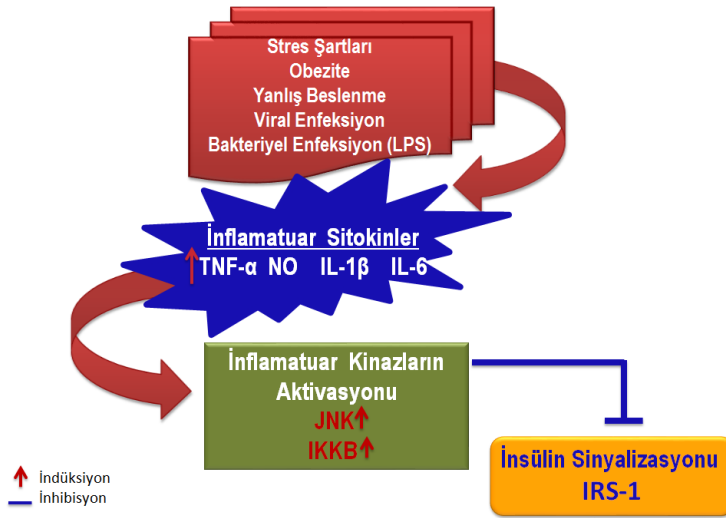
## **1.2. Metabolik Hastalıkların Gelişiminde İnflamasyonun Önemi**

İnsülin direnci, obezite, metabolik sendrom ve bunlarla ilişkili olarak ilerleyen dönemlerde ortaya çıkan tip II diyabet ve kardiyovasküler (KV) hastalıklar merkezinde düşük seviyeli kronik inflamasyon yer almaktadır (Şekil 1.2). Kronik inflamasyon, insülin direnci, obezite gibi metabolik kökenli hastalıklarla pek çok farklı moleküler mekanizma aracılığıyla ilişkilidir (Erbay ve ark., 2007).



Şekil 1.2. Kronik inflamasyonun hastalıklarla ilişkisi

Şekil 1.3’de bu moleküler mekanizmalardan en temel olanı kısmi olarak şematize edilmiştir. Buna göre, bazı iç ve dış etmenlere karşı (yüksek kalorili beslenme, hareketsiz yaşam, enfeksiyon v.s.), vücudun doğal bir cevabı olarak makrofajlardan ve adipositlerden  $TNF-\alpha$ , NO, IL-1 $\beta$ , IL-6 gibi inflamatuvar sitokinler salınır (Hotamisligil ve Erbay, 2008). Bu sitokinler dokularda c-Jun N-terminal protein kinaz (JNK) ve I $\kappa$ B kinaz- $\beta$  (IKK $\beta$ ) isimli iki önemli Serin-Tirozin kinaz enzimini aktive eder. Aktive olan kinazlar hücre çekirdeğine geçerek aktivatör protein-1 (AP-1) ve NF $\kappa$ B transkripsiyon faktörlerini uyarıp proinflamatuvar genlerinin ekspresyonunun artışına neden olurlar (Wellen ve Hotamisligil, 2005). Ayrıca JNK, insülin yolağının ilk aşamasında kilit rolü olan insülin reseptör substrat-1 (IRS-1) proteinini serin kalıntısından fosforile ederek insülin sinyalizasyonunun bloklanmasına ve insülin direncinin gelişmesine neden olur.



Şekil 1.3. Kronik inflamasyonun insülin direnciyle ilişkisi

Obezite durumunda ise genişleyen adipositlerden salınan makrofajlar doku içine geçerek aktive olurlar, sonuç olarak birçok sitokin ve kemokinin salınımını gerçekleştirirler. Salınan inflamatuvar ajanlar Şekil 1.3’de verilen moleküler mekanizma ile insülin direncinin gelişmesine neden olur. Her iki durumda da temelde işleyen moleküler mekanizma inflamatuvar sitokinlerin salınımı ve inflamatuvar kinazların aktivasyonunu içermektedir. Sonuçta gelişen insülin direnci ilk evrelerde hiperglisemi ve hiperlipidemi gibi temel patofizyolojik durumlar olarak kendini gösterir. İlerleyen dönemlerde artan obezite, metabolik sendrom ve son aşamada ise mortalitesi yüksek tip II diyabet ve KV hastalıklar olarak karşımıza çıkmaktadır (Alberti ve Zimmet, 1998; Cefalu ve ark., 2008). Bu döngüsel ve karmaşık süreçte bir şekilde inflamatuvar sitokinlerin salınımı ve insülin direncinin önüne geçilebilirse ilerleyen dönemlerde gelişen ve tedavisi gittikçe kompleksleşen, dejeneratif, çok bileşenli hastalıkların önlenmesi büyük oranda sağlanabilir (Dohadwala ve Vita, 2009; Chuang ve ark., 2011).

İlerleyen bölümlerde inflamatuvar süreçte rol oynayan mediyatörlere ait bilgiler verilecektir.

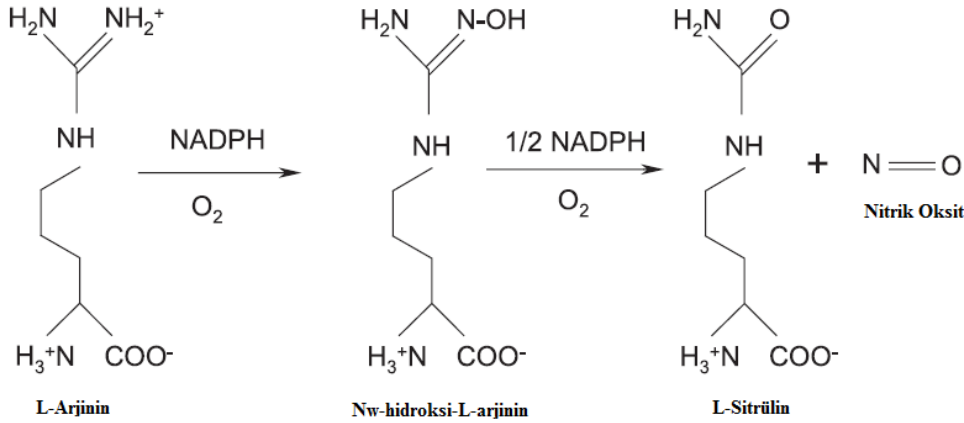
### 1.3. İnflamasyonda Nitrik Oksit Salınımı ve Nitrik Oksit Sentaz Enzimi

Nitrik oksit sentazın (NOS, EC 1.14.13.39) üç farklı izoformu tarafından sentezlenen nitrik oksit bilinen en küçük sinyal molekülüdür. NO’nun üzerinde yük taşımaması ve eşleşmemiş elektron bulundurması reseptörden bağımsız olarak membrandan kolayca



geçmesini sağlar. Dolayısıyla bu durum, NO'yu ideal bir fizyolojik haberci molekül yapmaktadır. NO kardiyovasküler, sinir ve immünolojik sistemlerde çeşitli fizyolojik mekanizmalarda rol almasının yanında patofizyolojik mekanizmaların düzenlenmesinde de önemli rolü olan bir moleküldür (Alderton ve ark., 2001; Aktan ve ark., 2003).

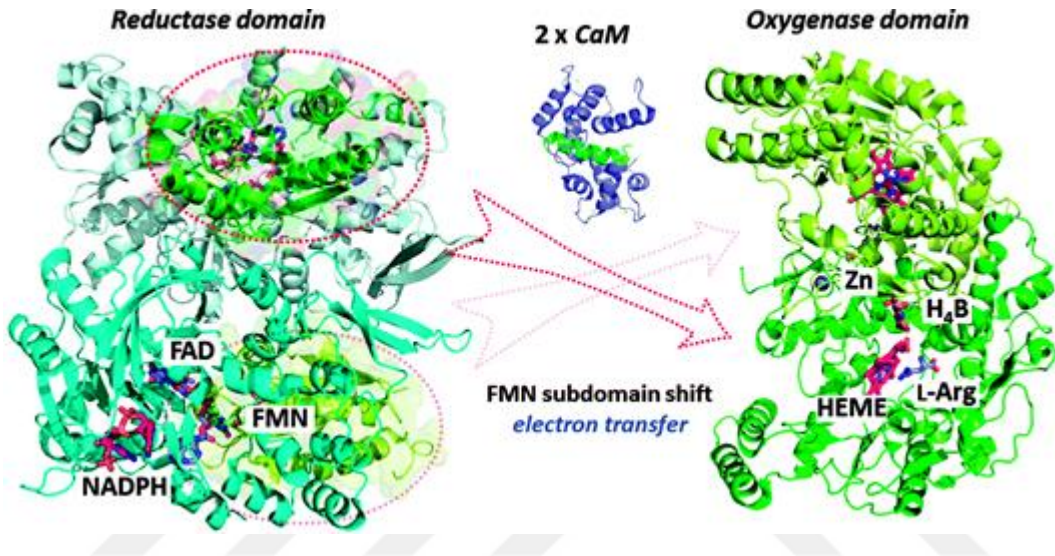
NO, NOS enzimi ile katalizlenen birbirinden bağımsız iki ardışık monooksijenaz reaksiyonu ile oksijen varlığında L-argininden sentezlenmektedir. Reaksiyon iki basamakta gerçekleşmektedir (Şekil 1.4). Birinci basamakta, bir molekül L-argininin oksidasyonu ile Nw-OH-L-arginin ara ürünü oluşur. İkinci basamakta Nw-OH-L-arginin oksidasyona uğrayarak bir molekül NO ve L-sitrülin oluşumunu gerçekleştirir.



Şekil 1.4. Nitrik oksit sentezi (Aktan, 2004)

Bu reaksiyonlarda nikotinamid adein dinükleotid fosfat (NADPH), flavin mononükleotid (FMN), flavin adenin dinükleotid (FAD), tetrahidrobiopterin (BH-4) kofaktör olarak görev alırlar. NOS enziminin farklı dokularda ifade edilen üç farklı izozimide aktif bölgesinde kalmodulin ve hem grubuna sahiptir (Şekil 1.5). Bu izozimlerden eNOS endotel hücrelerde ve düz kaslarda ifade olmaktadır. Düşük konsantrasyonlarda NO sentezinden sorumludur. eNOS enziminin üzerinden sentezlenen NO endotelial fonksiyonlarda, vasküler tonda ve kan basıncının düzenlenmesi gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli rol oynar (Hobbs ve ark., 1999). Fizyolojik uyarılara cevap olarak salınan sitosolik kalsiyum, eNOS aktivitesi için gerekli olan kalmodulinin eNOS'a bağlanmasını kolaylaştırır ve aktivitesini artırır. Böylece eNOS, geçici kalsiyum üretimini sağlayan agonistlere yanıt olarak NO üretimini gerçekleştirir (Gorren ve Mayer, 1998). Nöronal NOS olarak bilinen nNOS enzimi ise beyin ve diğer nöronal dokularda ifade olan

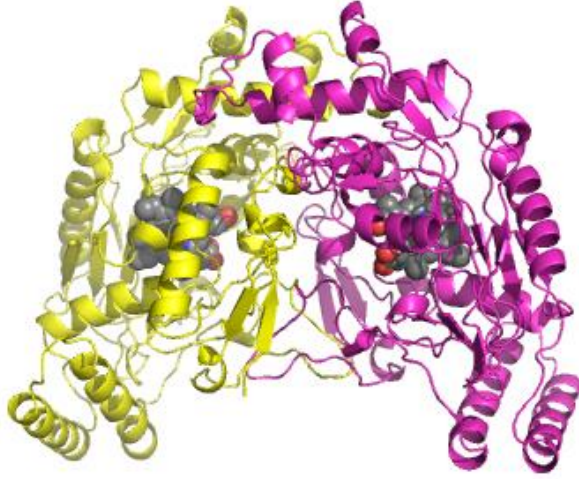
yapısal bir izoformdur. Merkezi sinir sisteminde nöromodülatör olarak görev yapar. İndüklenebilir NOS (iNOS) enzimi ise genellikle hücrelerde ifade edilmez ancak bu enzimin ifadesi bazı inflamatuvar ajanlara (LPS, sitokinler) maruziyet sonrası önemli ölçüde artar. Bu enzimin ekspresyonu, en çok vücudun savunma mekanizmasından sorumlu hücrelerden biri olan makrofaj hücrelerinde artar. Bu tez çalışmasında aşağıda ayrıntılarını verdiğimiz iNOS enzimi üzerine odaklanılmıştır.



Şekil 1.5. NOS enziminin moleküler yapısı (Paramita ve ark., 2014)

#### 1.4. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz Enzimi

iNOS sitoplazmik bir enzimdir. İnflamatuvar ve immün yanıtlarda yüksek konsantrasyonda NO üretiminden sorumlu olan temel bir enzimdir. Şekil 1.6'da iNOS enziminin moleküler yapısı verilmiştir. Endotoksinler ve sitokinler tarafından indüklenen bu enzimin aktivitesindeki artış sitotoksositeye neden olur (MacMicking ve ark., 1997).



Şekil 1.6. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin moleküler yapısı (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1nsi>' den alınmıştır, Li ve ark., 1999)

İnflamatuar yanıtta makrofajlarda indüklenen iNOS, sitotoksik etki gösteren NO'un büyük miktarlarda üretimine neden olur (Nathan ve Hibbs, 1991). NO, demir bağlı proteinlere afinitesinden dolayı, katalitik merkezlerinde demir içeren anahtar enzimleri inhibe edebilir. Bu enzimlere, mitokondriyal elektron taşınımında görevli demir-sülfür kümesi bağımlı enzimler (kompleks I ve II), ribonükleotid redüktaz (hız-sınırlayıcı DNA replikasyonunda enzim), cis-akonitaz (sitrik asit döngüsünde anahtar bir enzim), sitokinler örnek verilebilir (Ulrick ve William, 2012). Buna ek olarak, indüklenen makrofajlar tarafından üretilen oldukça yüksek konsantrasyonlardaki NO, doğrudan hedef hücrelerin DNA'sına müdahale ederek, zincir kırıklarının oluşumuna neden olmaktadır (Wink ve ark., 1991; Fehsel ve ark., 1993).

Tüm bu mekanizmalar artan NO konsantrasyonunun hücre içi sitotoksik etkisini açıklamaktadır. Aktive olmuş makrofajlar tarafından yüksek seviyelerde üretilen NO'nun sadece istenmeyen mikroplar, parazitler veya tümör hücrelerine karşı toksik etki göstermekle kalmayıp aynı zamanda sağlıklı hücrelere de zarar verebilir. İn vivo şartlarda, hücre ve doku hasarı NO radikallerinin kendisinden de kaynaklanabilir ya da oksijenle pekçok reaktif azot ara ürünlerinin oluşmasına sebep olur. Bunlardan bilinen en reaktif türlerden biri peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) radikalidir. Bu reaktif azot türü hücre içi makromoleküllere özellikle proteinlere saldırarak bunları sistein amino asitlerinden S-nitrosilasyonuna neden olmaktadır. Bu şekilde molekül yapısı değişen proteinler hücre içi fonksiyonlarını kaybederler. Bu durum inflamasyonda hücre içi mikrodejenerasyona sebep olan önemli unsurlardan biridir (Ulrick ve William, 2012). Makrofajlarda ve diğer

hücrelerde yüksek konsantrasyonda NO üretimi, romatoid artirit, multiple skleroz, diyabet ve obezitenin dahil olduğu pek çok hastalığın patogenezinde rol oynadığı bilinen bir gerçektir (Anggard, 1994; Yang ve ark., 2015). Bu nedenle iNOS enziminin ekspresyonun/aktivitesinin baskılanması önemli bir teröpatik hedefdir.

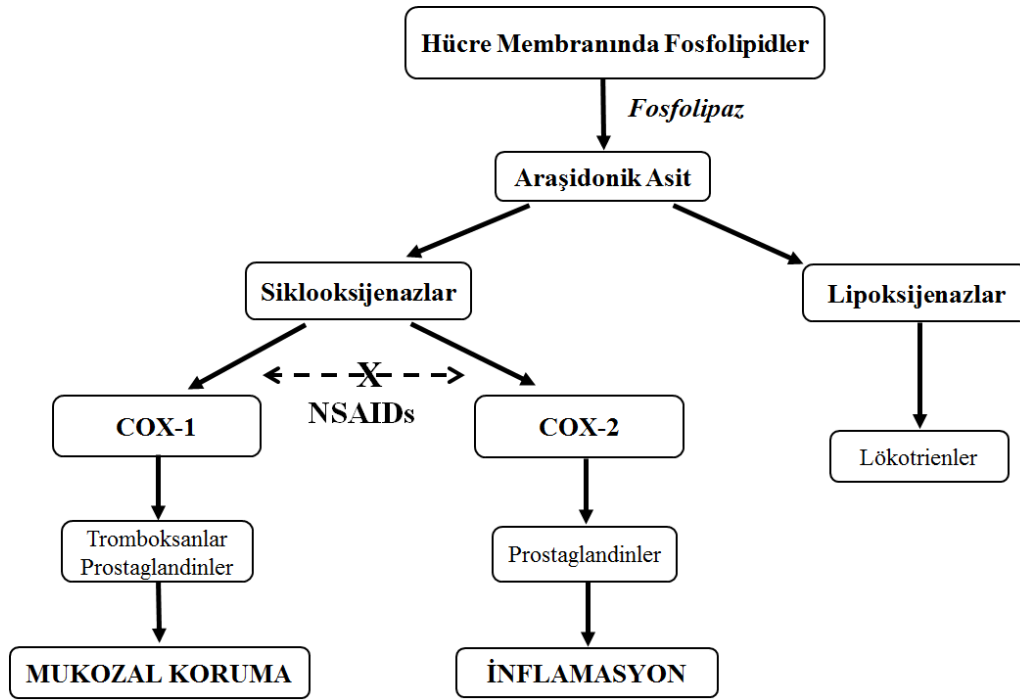
### **1.5. İnterlökin-1 beta (IL-1 $\beta$ )**

Temel kaynağı aktive mononükleer fagositlerdir. IL-1 $\beta$ , esas olarak makrofajlarca sentezlenerek nötrofil ve monosit birikiminde gerekli endotel hücre yüzey adezyon moleküllerinin ekspresyonunu ve diğer proinflamatuvar araçların üretimini artırır. IL-1 $\beta$ 'nin ateroskleroz ve tip 2 diyabet gibi çeşitli inflamatuvar hastalıklarla ilişkili olduğu bilinmektedir (Dinarello, 2011).

### **1.6. Siklooksijenazlar (COX-1, COX-2)**

Siklooksijenazlar (EC1.14.99.1), hücre membranından fosfolipaz A enzimi ile serbest hale gelen araşidonik asidin prostoglandinlere ve diğer eikosanoidlere dönüşümünü katalizleyen enzimlerdir. Araşidonik asit metabolitleri (prostoglandinler, tromboksanlar ve lökotrienler gibi), hücresel adezyon değişiklikleri, büyüme, farklılaşma ve bağışıklık sistemini baskılama gibi durumlarda rol oynar (Gee ve ark., 2003; Wülfing ve ark., 2004; Farivar-Mohseni ve ark., 2004; Klein ve ark., 2005). Prostoglandinler ve tromboksanların sentezinde görevli siklooksijenaz enziminin, yapısal siklooksijenaz (COX-1) ve indüklenebilir siklooksijenaz (COX-2) olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. Şekil 1.7' de gösterildiği gibi COX-1 mukozal korumada yer alan prostoglandinlerin ve fizyolojik önemi olan tromboksanların sentezinde rol alırken, COX-2 enzimi temel olarak inflamasyonda rol alan prostoglandinlerin sentezinden sorumludur (Hostanska ve ark., 2002; Fitzgerald, 2004). Günümüzde, piyasada bulunan ve non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAID'ler) olarak adlandırılan ajanların büyük bir çoğunluğu COX inhibitörleridir. Bunlar sadece COX-2'yi inhibe eden seçici inhibitörler ve hem COX-1 hem de COX-2 inhibitörleri olarak bilinen seçici olmayan NSAID'ler olarak ikiye ayrılır. Seçici olmayan NSAID'ler mukozal koruma sağlayan prostaglandinlerin üretiminde görevli COX-1'de inhibe ettiğinden gastrointestinal (GI) bozukluk, gastrit, ülserasyon, kanama gibi ciddi yan etkilere neden olmaktadır (Seibert ve ark., 1994; Mix ve ark., 2001; Pungle ve ark., 2003; Fitzgerald, 2004; Andersohn ve ark., 2006). Öte yandan bunlara

alternatif olarak geliştirilen seçici NSAID'ler sadece inflamatuvar PG'leri üretiminde rol alan COX-2'yi inhibe ederek GI'de herhangi bir hasara neden olmaz. Ancak son zamanda yapılan çalışmalar bu moleküllerinde kalp krizi, inme gibi pek çok ölümcül yan etkileri olduğunu göstermiştir (Graham, 2006; Maroon ve ark., 2010). Bu nedenle yan etkisi düşük, bitkisel kökenli doğal moleküllerin anti-inflamatuvar potansiyellerinin açığa çıkarılması bu alanda yaygın olarak araştırılan konular arasındadır.



Şekil 1.7. Araşidonik asitin prostoglandinlere ve diğer eikosanoidlere dönüşümü ([http://vet.uga.edu/ivcvm/courses/VPAT5200/03\\_inflammation/04\\_cmi/cmim03.html](http://vet.uga.edu/ivcvm/courses/VPAT5200/03_inflammation/04_cmi/cmim03.html)' den uyarlanmıştır)

### 1.7. İnflamasyonda Korunmada ve Tedavi Sürecinde Doğal Ürünlerin Önleyici, Tamamlayıcı ve Terapötik Önemi

Son yıllarda dünya çapında yeni ilaç bileşiklerinin keşfedilmesi ile ilgili çalışmalar artarak devam etmektedir. Birçok araştırmacı, hastalıkları oluşturan unsurları hedef alan doğal bitkisel bileşiklerin ortaya konulmasıyla ilgili çalışmalar yürütmektedir (Katiyar ve ark., 2012). 1981-2007 yılları arasında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve benzer kuruluşlar tarafından onaylanan ilaçların % 80'i, doğal moleküller üzerine yapılmış çalışmaların sonucunda piyasaya çıkmıştır (Newman ve Cragg, 2012).

İnflamatuar sitokinlerin üretimini azaltan maddeler ya da diyet yoluyla aldığımız besinler inflamasyon sürecinin ve diğer hastalıkların oluşumunu engellemektedir. Bitkilerin ikincil metabolik faaliyetleri sırasında ortaya çıkarak depolanan ve insanlar için besin değeri olmayan, ancak tüketildiklerinde sağlık için yararlı etkilerde bulunan fitokimyasallar, piyasada bulunan birçok ilaç etken maddesinin çıkış noktasını oluşturmaktadır.

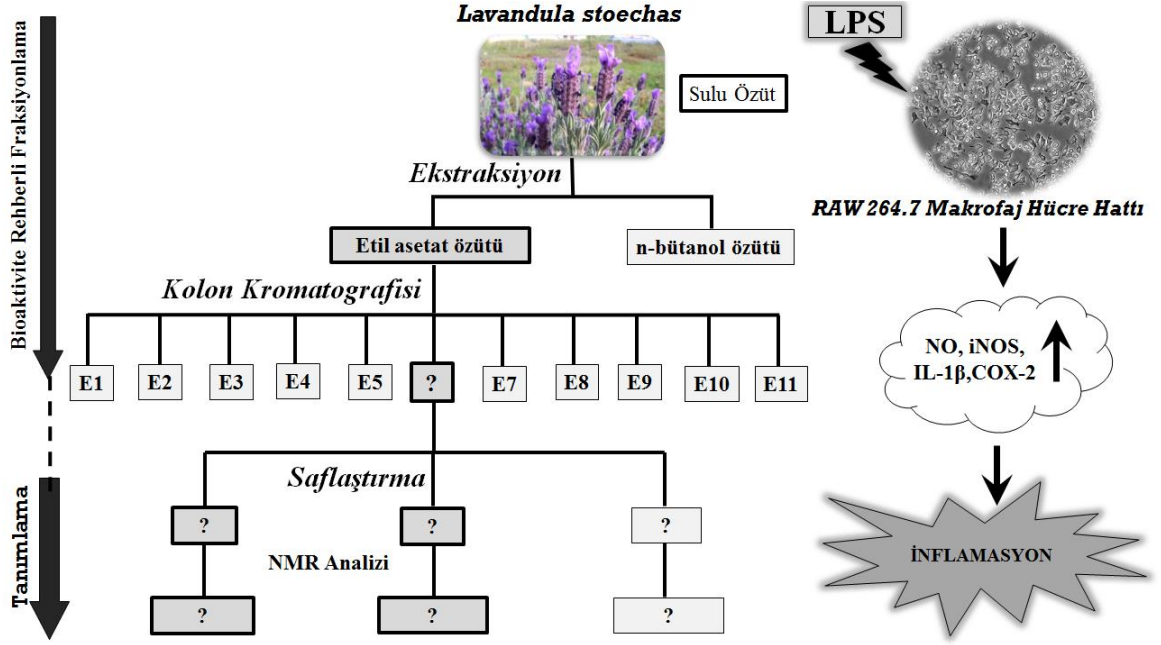
Örneğin, doğal kökenli anti-inflamatuar bileşiklerin en ünlü ve en iyi bilinen örneği olan aspirin (asetilsalisilik asit) ağrı kesici ve ateş düşürücü özelliklerinden dolayı eski zamanlardan günümüze yaygın şekilde kullanılan ve söğüt ağacından izole edilen bir maddedir. Aspirinin, inflamatuvar yanıtta seviyesi artan prostaglandinlerin sentezini inhibe ederek etkisini gösterdiği bilinmektedir (Mishra ve Tiwari, 2011). Bir başka örnek morfin ise, halk arasında haşhaş olarak bilinen *Papaver somniferum* bitkisinden izole edilen bir maddedir. Genelde tıp alanında kullanılan anestezi ilaçlarının üretimi için yetiştirilmektedir. Bitkisel kaynaklı ürünler (ilaçlar) arasında en iyi bilinen nonsteroidal anti-inflamatuar ilaç grubudur (Der Marderosian ve Beutler, 2002). Ayrıca ticarileştirilmemiş birçok doğal kaynaklı ürünün de anti-inflamatuar etkinliği bilinmektedir (Mishra ve Tiwari, 2011).

Yapılan araştırmalarla bitkisel kökenli doğal bileşiklerin tanımlanması ve çok hedefli etken maddelerin ortaya konması, yeni nesil terapötiklerin ve diyetel takviye ürünlerinin geliştirilebilmesi için önemlidir.

### **Çalışmanın Amacı**

Bu çalışma kapsamında, 1) *Lavandula stoechas*-Karabaş otu bitkisinin sulu özütünde yer alan inflamasyona karşı etkili olabilecek aktif fitokimyasal bileşenlerin biyoaktivite rehberli çalışmalarla tanımlanması, 2) Bu aktif bileşenlerin potansiyel iyileştirici etkilerinin ortaya konması, 3) Etki mekanizmalarının moleküler düzeyde kısmi olarak aydınlatılması amaçlanmıştır. Şekil 1.8'de gösterildiği üzere bu amaçla, ilk olarak Karabaş otu sulu özütünden iki ayrı çözücü kullanılarak farklı iki özüt elde edilmiştir. Elde edilen özütlerin toksik olmayan uygulama dozları LPS ile inflamasyon modeli geliştirilen RAW 264.7 makrofajlarına uygulanarak besiyerine salınan NO seviyeleri ölçülmüştür. Sonrasında % 50'nin üzerinde NO inhibisyonu gösteren etkin özüt belirlenmiştir. Belirlenen bu özüt kolon kromatografisiyle 11 adet fraksiyona ayrıştırılmıştır. Bu fraksiyonların NO inhibisyonu üzerinde yapılan biyoaktivite rehberli taramaları sonucu

etkin olarak belirlenen fraksiyonun saflaştırma işlemi yapılarak 3 adet saf madde elde edilmiştir. Bu saf maddelerin NO üretiminde görevli iNOS protein ve gen seviyesi üzerine etkileri ile inflamatuvar yanıtta anahtar rol oynayan COX-2 ve IL-1 $\beta$  moleküllerinin gen ekspresyonları üzerine etkileri araştırılarak moleküler mekanizmaları kısmi olarak ortaya koyulmuştur.



Şekil 1.8. Biyoaktivite rehberli fraksiyonlama

## BÖLÜM 2

### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Literatürde bitki özütlerinin, bunlardan elde edilen fraksiyonların ve saf fitokimyasalların anti-inflamatuar etkilerini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. Aşağıda bunlardan son zamanlarda yapılmış olan ve çarpıcı sonuçlar elde edilmiş çalışmaların bir kısmı özetlenmiştir.

Waterman ve ark., (2014)'lerinin yapmış oldukları bir çalışmada, *Moringa oleifera* Lam (horse radish, drumstick) bitkisinden (özel bir yöntemle) hazırlanan ve izotiyosiyanatlarca zengin sulu özütün RAW 264.7 makrofaj hücre hattında inflammatuar markerların salınımını (NO ve TNF- $\alpha$ ) ve gen ekspresyonlarını (iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-6) önemli derecede azalttığı gösterilmiştir.

Lili ve ark., (2014)'lerinin yapmış oldukları bir çalışmada, çeşitli böğürtlen ham özütleri ve antosiyanince zengin fraksiyonları, inflamasyon modeli oluşturulan RAW 264.7 makrofajlarında, çeşitli inflammatuar markerlarından NO, IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS ve COX-2 seviyesinde anlamlı derecede azalmaya sebep olmuştur.

Nguyen ve ark., (2015)'ları, *Sorghum bicolor* tohumlarının etil asetat özütü, LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında, NO üretimi ile iNOS ve COX-2 ekspresyon seviyeleri üzerinde güçlü bir inhibitör etkisi göstermiştir. Ayrıca bu çalışmada, *S. bicolor* tohumlarından izole edilen izolatların yapısı tanımlanmıştır.

Chen ve ark., (2016)'larının yaptıkları bir çalışmada, *Atractylodes* cinsine ait *Atractylodes japonica* bitkisi n-hekzan özütünün LPS ile indüklenmiş RAW 264.7 makrofajlarında NO üretimini önemli derece baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca, çalışmanın devamında n-hekzan özütünden izole edilen 6 bileşikten NO üretimini etkin bir şekilde baskılayan *Atractylodes*'ün iNOS ve COX-2 enzimlerini protein ve gen seviyelerinde anlamlı ölçüde inhibe ettiği, bu nedenle de bu bitkiden izole edilen en etkin anti-inflamatuar ve analjezik bileşik olduğu ortaya koyulmuştur.

Literatürde yer alan başka bir çalışmada ise, *Juglans sigillata* bitkisinin meyve kabuğundan izole edilen Apigenin-7-O- $\beta$ -D-glukuronid (AG) bileşiğinin LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarına uygulaması sonrasında, NO üretimini ve aynı zamanda önemli inflammatuar markerlardan iNOS ve COX-2 enzimlerinin mRNA seviyelerini güçlü bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür (Hu ve ark., 2016).



Bu çalışmalarda gösterildiği üzere, fitokimyasal içerikli bileşiklerin, NO, iNOS, IL-1β, COX-2 gibi proinflamatuvar molekül ve enzimlerin inhibisyonu inflamasyon ile ilişkili hastalıklardan korunma ve tedavi sürecinde oldukça önemlidir. Literatürde *Lavandula stoechas* - Karabaş otununun anti-inflamatuvar etkilerinin gösterildiği ve anti-inflamatuvar özellikteki etkin bileşenlerinin tanımlandığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.



## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

DMEM (D6429), [3-(4,5-dimetil-2-thiazolil)-2,5-difeniltetrazolium bromür] (MTT; M5655), steril su (SW3513), sodyum laktat (L7022), indometasin (17378), tripan mavisi solüsyonu (T8154), metanol (24229), N, N-metilenbisakrilamid (M7256), N-N-dimetilformamid (15440), sülfürik asit (07208), lipopolisakkarit (LPS; E.coli 0111:B4 L4391) Sigma-Aldrich Chemical (St Louis, Missouri, USA) marka satın alınmıştır.

TRIzol® (15596018), fetal sığır serum (FBS, 10270106), PureLink® RNA mini kit (12183018A), DNase I (AM2222), penisilin-streptomisin (15140122), TaqMan® PCR Master Mix (4369016), TaqMan® Probe iNOS (4331182), TaqMan® Probe β-Aktin (4331182), TaqMan® Probe COX-2 (4331182), TaqMan® Probe IL-1β (4331182), Microamp Fast Optical 96 Well plate (4346906), Microamp Optical Adhesive Film (4360954) Life Technologies, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA USA) marka satın alınmıştır.

Bikinkoninik asit protein kiti (BCA; Intron Bio 21071), yağsız süt tozu (sc-2324), dimetil sülfoksit (DMSO; sc-358801) Santa Cruz Biotechnology (Bergheimer, Heidelberg, Germany) marka satın alınmıştır.

Agaroz (AGA001.100), 2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol (Tris; TRS001), triton X- 100 (TRX777), sodyum dodesil sülfat (SDS; SDS001), glisin (GLN001), HEPES (HEP001.100), tween-20 (TWN510.500), BioShop Canada (Mainway, Burlington, Ontario) marka satın alınmıştır.

Sodyum karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 106392), potasyum klorür (KCl; 104936), hidroklorik asit (HCl; 1003142), folin fenol reaktifi (109001), gliserol (104093), kloroform (102431), 2-propanol (100995), sodyum klorür (NaCl; 106404), sodyum hidroksit (NaOH; 106462), potasyum dihidrojen fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 104873), dipotasyum hidrojen fosfat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 105101), kloroform (102445.2500), aseton (100013.2500), dötero metanol (d<sub>4</sub>-M106028.0100), metanol (106009.2500), formik asit (M100263.2500), dötero DMSO (d<sub>6</sub>-M103424.0100) E.Merck (Darmstadt, Germany) marka satın alınmıştır.

Tetrametil-etilen-diamin (TEMED; A1148), amonyum persülfat (APS; A1142), Redisep-Gold flash kromatografisi kolonları (40 gram, Ters faz C18 kolonları-Katalog No: 69-2203-413) Applichem (Ottoweg, Darmstadt, Germany) marka satın alınmıştır.

Akrilamid (O341), bisakrilamid (O172) Amresco Biochemicals (Parkway Cleveland, OH, ABD) markasından satın alındı. SafeView™ (G108) ABM Biological Materials (Canada) marka satın alınmıştır.

### **3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar**

Tez çalışması sırasında NanoQuant (Tecan Infinite® M200 PRO), C-DiGit® Blot Scanner-LI-COR Biosciences, Step One Plus® Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), BioSan TS-100 ısıtıcı çalkalayıcı, Hanna Instruments HI2211 pH metre, soğutmalı santrifüj (Hettich Zentrifugen Mikro 200R, Hettich Zentrifugen Universal 320), Esco hücre kültürü CO<sub>2</sub> inkübatörü, Major-Science (MS) Waver Shaker, Nordicsafe Esco sentirel Gold (Class II BSC), Flash Kromatografisi (Combi Flash Rf-TELEDYNE ISCO), Nükleer Manyetik Rezonans (NMR-Marka: Agilent 600 MHz, model:600/54 ASC-premium compact), HPLC-TOF/MS (Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC System) cihazları kullanılmıştır.

### **3.1.3. Çalışmada Kullanılan Bitki Materyalinin Temini ve Teşhisi**

Taze Karabaş otu, 2014-Nisan ayında Çanakkale ili Bayramiç bölgesinin Palamutoba köyünden TUBİTAK 112T442 numaralı proje kapsamında toplanmıştır. Toplanan bitki, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ersin Karabacak tarafından teşhis edilip herbaryumda kayıt altına alınmıştır (ÇOMÜ 937).

### **3.1.4. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı**

Çalışmalarımızda, kullandığımız RAW 264.7 makrofaj hücre hattı Prof. Dr. Ilya Raskin (Rutgers University, Department of Plant Biology and Pathology, New Jersey, USA) tarafından temin edilmiştir.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Kimyasal Yöntemler: Özütleme, Fraksiyonlandırma, Saflaştırma ve Yapı Analizi**

Yapılan kimyasal çalışmalar; bitkiden özütleme, fraksiyonlandırma, saflaştırma ve yapı analizi kısımları laboratuvarımızda tamamlanan TÜBİTAK 112T442 numaralı proje kapsamında Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden Prof. Dr. İbrahim Demirtaş ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan yöntemler Bölüm 3'de (3.2.1.-3.2.1.7. arasında) detaylı olarak verilmiştir.

#### **3.2.1.1. Özütleme İşlemleri**

2430 (~2.44 kg) gram kurutulmuş bitki örneği sıvı azot ile öğütülerek toz haline getirilmiştir. 80 gr öğütülmüş bitki üzerine 200 mL deiyonize saf su ilave edilerek, neo-clavenger aparatı (Şekil 3.1.a) yardımıyla 3-4 saat 120 °C sıcaklıkta su ile kaynatılmıştır. Bu işlem 2430 g bitki tamamlanincaya kadar tekrar edilmiştir. Uçucu yağlar bu aşamada ayrıştırılmıştır. Kaynayan sulu kısım posasından ayırmak için tülbentten süzüldü ve oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi. Soğuyan sulu özüt ayırma hunisine konularak üzerine etil asetat (EA) eklendi ve özütleme işlemi yapıldı (Şekil 3.1.b). Özütleme sonucunda alt faz su fazı, üst faz etil asetat fazı olarak ayrıldı. Bu işleme sulu kısımda EA fazına bir şey geçmeye kadar devam edildi. Elde edilen fazların ayrı kaplara alınmasının ardından EA fazının çözücüsü buharlaştırıldı. Bu kısım etil asetat özütü olarak etiketlenerek daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'ye kaldırıldı. Geride kalan sulu kısım bu sefer n-bütanol ile ekstraksiyon işlemine tabii tutuldu. Organik çözücünün olduğu faz ayrı bir kaba alındı ve n-bütanol özütünün çözücüsü de evaporasyon ile uzaklaştırıldı. Bu kısım n-bütanol özütü olarak etiketlendi ve -20 °C'ye kaldırıldı. Su ile kaynatma sonucu elde edilen özütler sırasıyla aşağıda verilmiştir:

- 1) Etil asetat (EA) özütü (58,59 g)
- 2) n-bütanol özütü (10,02 g)

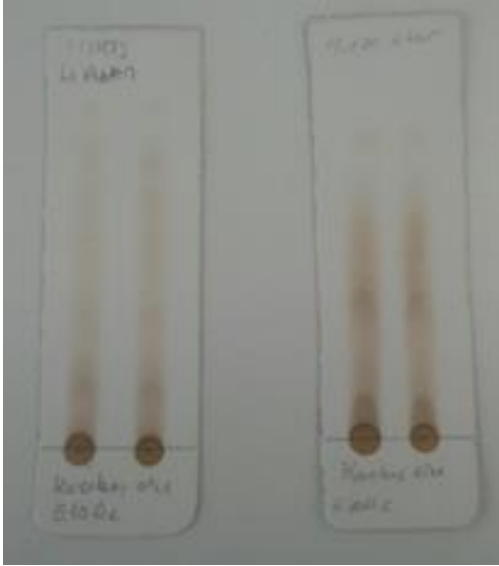


Şekil 3.1. a) Neo-clavenger aparatında su ile kaynatma işlemi, b) Özütleme işlemi

Aşağıda detayları verilen biyoaktivite rehberli çalışmalarla elde edilen sonuçlar doğrultusunda EA özütünün n-bütanol özütüne göre daha aktif olduğu bulunmuştur. Bu nedenle fenolik içerik analizleri ve biyoaktivite rehberli faraksiyonlama işlemleri bu özüt üzerinden devam ettirilmiştir.

### 3.2.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi-İTK (Thin Layer Chromatography-TLC)

Elde edilen özütlerin içerdiği fenolik bileşen grubunu belirleyebilmek için, EA özütü tamamen çözünebildiği bir çözücüde çözüldü ve silika jel kaplı hazır alüminyum plaka (TLC silika jel 60 GF<sub>254</sub> Merck) üzerine tatbik edilerek uygun çözücü sistemlerinde yürütüldü. Maddelere ait spotlar UV (254 nm) ışık altında incelendi. Spot renklerini daha iyi görebilmek için silika jel plakalarına serik sülfat (seryum sülfat) belirteci püskürtülüp, sıcak plaka üzerinde 100 °C sıcaklıkta oluşan spot renkleri incelendi ya da içerisinde % 10' luk sülfürik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) içeren etanol belirteci püskürtülüp 135 °C'lik sıcaklıkta ısıtıldı ve oluşan renkler değerlendirildi. EA özütünün İTK görüntümleri Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2.EA özütünün İTK görünüşleri

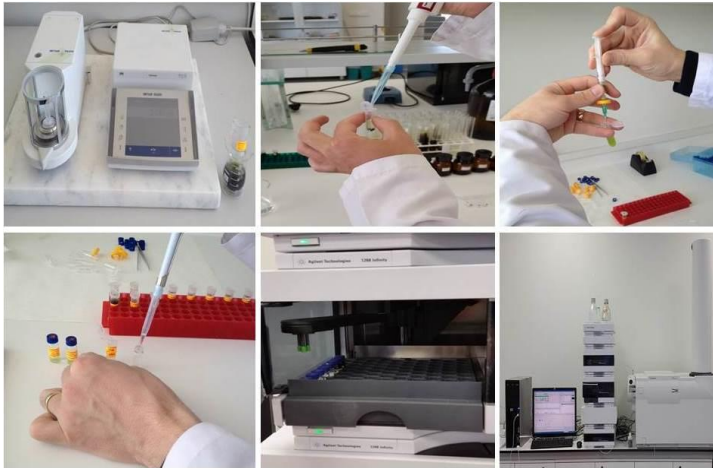
### 3.2.1.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC- TOF/MS)

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography), analitik ayırma teknikleri amacı ile en yaygın kullanılan cihazdır. Yaygın kullanılma sebepleri duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozulan bileşiklerin ayrılmasına uygunluğudur. Sahip olduğu bu özelliklerden dolayı, Agilent technologies 1260 infinity LC, Agilent technologies 6210 TOF-MS cihazından yararlanılarak, EA özütünün fenolik bileşen içeriğinin analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analizler Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü' nde, kısmi hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Cihazın enjeksiyon hacmi 10  $\mu$ L, kolon sıcaklığı 35  $^{\circ}$ C ve kullanılan kolon modeli de ZORBAX SB-C18 4,6x100 mm, 3,5  $\mu$ M'dir. HPLC mobil faz programı Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. HPLC mobil faz programı

	Zaman (dk)	% 0,1 Formik asitli su	Asetonitril
1	0	% 90	% 10
2	1	% 90	% 10
3	20	% 50	% 50
4	23	% 20	% 80
5	25	% 90	% 10
6	30	% 90	% 10

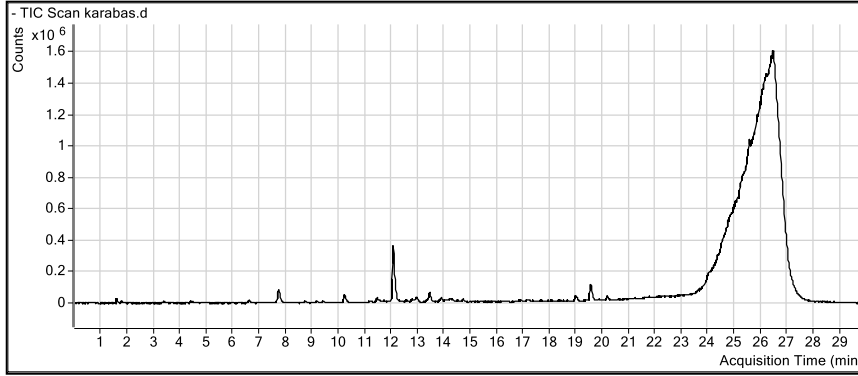
EA özütünü 2 mg olacak şekilde hassas terazi (Mettler-Toledo)'de tartılarak 2 mL'lik ependorf tüpler içerisine alınmıştır. Özüt üzerine 2 mL HPLC grade metanol eklenmiş ve ultrasonik su banyosu cihazında (Sellecta Ultrasons-H) çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işlemi sonucunda 1000 ppm değerinde stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözelti 250 ppm'e seyreltilerek, toplam hacmi 1 mL olan yeni çözelti hazırlandı ve HPLC-TOF/MS viallerine aktarılarak analize hazır hale getirilmiştir. Ekstraktların HPLC-TOF/MS analizi için hazırlanma aşamaları Şekil 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.3. Ekstraktların HPLC-TOF/MS analizi için hazırlanma aşamaları

Viallere hazırlanan fraksiyonların analizinden önce, kantitatif analiz için 25000 ppm olarak hazırlanan standartlar HPLC-TOF'a verilerek programın uygunluğu kontrol edilmiştir. Devamında da özütün analizi yapılmıştır. Karabaş otu EA özütüne ait HPLC-

TOF kromatogramı Şekil 3.4’de, HPLC-TOF/MS analiz sonuçları ise Çizelge 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.4. Karabaş otu EA özütüne ait HPLC-TOF kromatogramı

RT	Bileşenler	Konsantrasyon [ppb (ng/ml)]
4.40	Gentisik asit	130.6236
6.60	4-Hidroksibenzoik asit	501.0753
7.00	Protokateşuik asit	56.0319
7.71	Kafeik asit	453.6731
7.84	Vanilik asit	26.2536
9.18	4-Hidroksibenzaldehit	-
9.98	p-Kumarik asit	-
9.97	Sisorik asit	59.2144
10.81	Ferulik asit	73.9354
11.42	Apigenin-7-glukozit	165.8712
12.53	Hesperidin	-
13.19	Rosmarinik asit	1420.2112
13.96	Salisilik asit	39.1713
15.92	Sinnamik asit	-

Çizelge 3.2. Karabaş otu EA özütüne ait HPLC-TOF/MS analiz sonuçları

#### 3.2.1.4. EA Özütünün Kolon Kromatografisi ile Ayrıştırılması

NO tarama sonuçlarına göre yüksek aktiviteye sahip EA özütünün etken bileşenlerinin belirlenmesine karar verilmiştir. Bunun için aktivite yönlendirmeli fraksiyonlandırma ve izolasyon işlemleri yapılması planlanmıştır. Bu işlem için kolon dolgu maddesi olarak Sephadex LH-20 seçilmiştir. Kolon kromatografisi yapılmadan önce Sephadex LH-20 dolgu maddesi en az 24 saat önceden metanol çözücüsü içerisinde elue edilmiştir. Daha sonra uygun şişme kapasitesine gelmesi için en uygun çözücü sistemi olan



metanol/kloroform (% 35/% 65) karışımında içerisinde bekletildi ve yeterli şişme kapasitesine ulaşması sağlanmıştır. Sephadex LH-20 kolon dolgu maddesi, 80 cm uzunluğunda, 2 mm dış çap ve 1,8 mm iç çapa sahip sinterli teflon musluklu kolon içerisine doldurulmuştur (Şekil 3.5). Kolon üzerinden % 65 kloroform/% 35 metanol karışımı sürekli geçirilmiştir. Yaklaşık 1 gram özüt kolona tatbik edilmiştir. Akış hızı çok yavaş olacak şekilde musluk açıldı ve fraksiyonlar toplanmıştır. Sabit çözücü karışımı kullanılarak her bir fraksiyon tüpü en fazla 2-3 mL olacak şekilde fraksiyonlandırma işlemi yapıldı ve toplam 63 fraksiyon elde edilmiştir. İTK kontrolü ile kromatografik işlemin bitirilmesine karar verilmiştir. Benzer fraksiyonlar İTK kontrolü ile birleştirildi ve toplamda 11 (Fraksiyon kodları: E1→E11) fraksiyon elde edilmiştir. Bu fraksiyonların içerik analizleri, saflık kontrolleri ya da tekrar birleştirilmeye ihtiyaç olup olmadığının analizi Agilent HPLC-TOF/MS ve Agilent marka 600 MHz'lik NMR cihazı ile belirlenmiştir. Elde edilen fraksiyonların adlandırılması Çizelge 3.3'de verilmiştir.



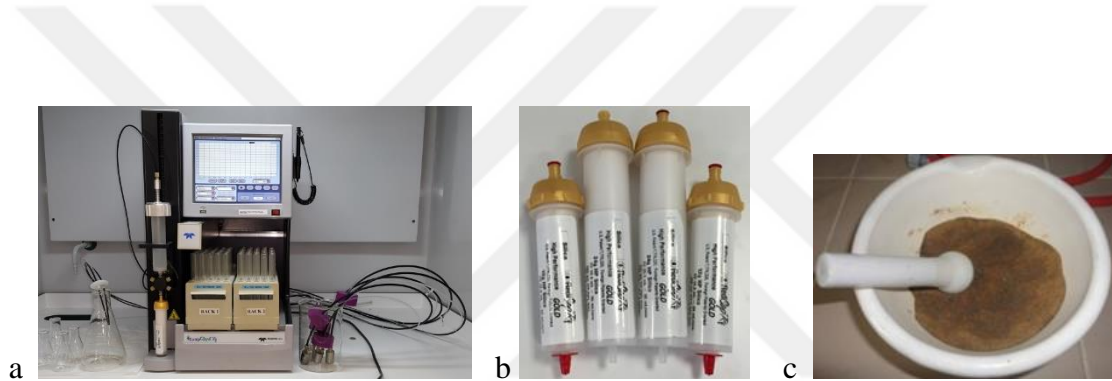
Şekil 3.5. Özütün Sephadex LH-20 kolon dolgu maddesine tatbik edilmesi

Çizelge 3.3.EA fraksiyonununundan elde edilen alt fraksiyonları

EA Fraksiyonları ve Kodları	
<b>E1:</b> 1-5. Fraksiyon	<b>E7:</b> 36-39. Fraksiyon
<b>E2:</b> 6-10. Fraksiyon	<b>E8:</b> 40-45. Fraksiyon
<b>E3:</b> 11-17. Fraksiyon	<b>E9:</b> 46-50. Fraksiyon
<b>E4:</b> 18-25. Fraksiyon	<b>E10:</b> 51-55. Fraksiyon
<b>E5:</b> 26-29. Fraksiyon	<b>E11:</b> 61-63. Fraksiyon
<b>E6:</b> 30-35. Fraksiyon	

### 3.2.1.5. Aktif Fraksiyonun Flash Kromatografisi ile Ayırıştırılması

Flash kromatografisi orta basınçlı sıvı kromatografisi olarak bilinmektedir. Kolon kromatografisine göre daha hassas, daha hesaplı ve daha kısa zamanda gerçekleştirilen kromatografik işlemdir. Daha az miktardaki maddelerin uygun kolon (kartuş) ile ayrılması sağlanmaktadır. Geniş bir dalga boyu aralığına ve çoklu dalga boyu seçebilme özelliğine sahip olması da çok önemli avantajlarındandır. Elde edilen etken fraksiyonların ayırıştırılması için flash kromatografisi kullanılmıştır (Şekil 3.6.a). Bu işlem Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü' nde, gerçekleştirilmiştir. Flash kromatografisi için Redi Sep RF-GOLD marka, 40 g C18 ters faz, 200 psi (14 bar) max. basınca dayanıklı, 200 mg-6 mg arasındaki örnek miktarını ayırabilme özellikleri sahip kolon (kartuş) kullanılmıştır (Şekil 3.6.b).

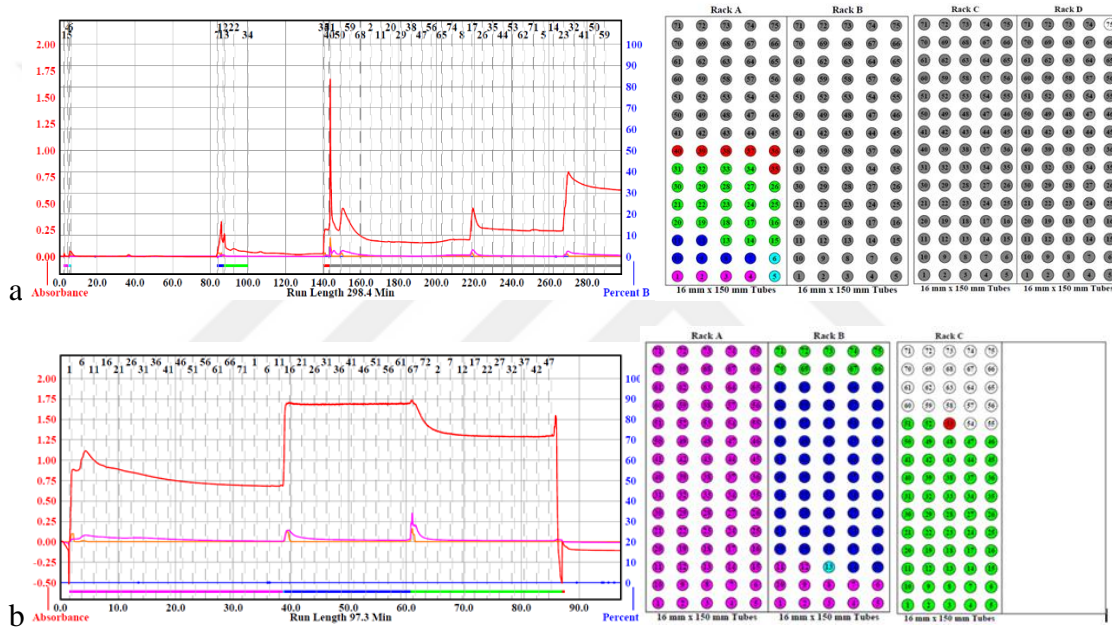


Şekil 3.6. a) EA fraksiyonun ayırıştırılması için kullanılan flash kromatografisi, b) Flash kromatografisi kolonları (kartuşları), c) Bitki özütü

### 3.2.1.6. E6 Fraksiyonun İzolasyon Çalışması

Sephadex LH-20 ile ayırım sonucu birleştirilen E6 fraksiyonu flash kromatografisi kullanılarak içerdiği sekonder metabolitlerin izolasyonu yapılmasına karar verilmiştir. Bu ayırım için apolar özellikli dolgu maddesine sahip 40 g'lık C18 kartuşlar kullanılmıştır. Bu dolgu maddesinin en büyük avantajı pek çok kez kullanılabilir olması ve kolayca temizlenebilmesidir. Bu fraksiyonun ayırımı için dakikada 5 mL'lik çözücü akış hızı sağlandı ve 280 ve 700 nm dalga boyları arasında ayırım gerçekleştirilmiştir. Madde kolona sıvı enjeksiyon portu kullanılarak yükleme işlemi yapılmıştır. Mobil faz olarak ilk başta % 100 su kullanılmıştır. Daha sonra metanol oranı % 10 artırılarak ayırım işlemi gerçekleştirilmiştir. Belirlenen dalga boyunda absorbans veren maddeler 15 mL'lik tüplere toplanmıştır. Absorbans vermeyen maddeler ise atık kısımlarında her bir toplama kap hacmi 150 mL olacak şekilde toplanmıştır. En son olarak % 100 metanol ile flash

kromatografisi bitirilmiştir. Benzer fraksiyonlar İTK yardımı ile birleştirilmiş, çözücülerini uçurularak kristallenmeye bırakılmıştır. Fraksiyon tüplerinde kristaller ve çökmeler meydana gelmeye başlamıştır. Kristaller tekrar tekrar yıkanarak safsızlıklarından arındırılmıştır. Elde edilen kristallerden 10 mg hassas terazide tartıldı yaklaşık 400-500 µL dötero metanol (d4-Metanol) ya da dötero DMSO (d6-DMSO) ile çözülmüştür. Yapıdaki proton, karbonların varlığı, molekülde bulunduğu yer, konum, etkileşme şekilleri ve uzaysal olarak yönelme durumları 1D ve 2D NMR teknikleri ile belirlenmiştir. Şekil 3.7’de Flash kromatografisinden elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.



Şekil 3.7. a) Flash Kromatografisi kromatogramları ve benzer fraksiyonlar (1. Program), b) Flash kromatografisi kromatogramları ve benzer fraksiyonlar (2. Program)

Flash kromatografisinden elde edilen fraksiyonlar İTK sonuçları ile kontrol edilerek benzer fraksiyonların birleştirilme işlemleri yapılmıştır. Saf ya da safıya yakın olan fraksiyonların NMR analizleri ile saflık kontrolleri yapılmıştır.

### 3.2.1.7. E6 Fraksiyonunun Yapı Analizleri

Flash kromatografisinden toplanan fraksiyonların İTK sonucunda saf oldukları görülmüştür. NMR ile yapı analizleri için örnekler d6-Aseton içerisinde çözülmüştür.

hazırlanmıştır. Çözünürlüğü yüksek 600 MHz NMR cihazı ile bileşiklerin yapısı belirlenmiştir.

Bileşiklerin yapısındaki karbon ve protonların varlığı, bunların moleküldeki konumları ve uzaysal olarak yönlendiği 1D ve 2D NMR teknikleri ile belirlenmiştir.

### **3.2.2. Karabaş Otundan Elde Edilen Özütlelerin Total Polifenol Miktarlarının Belirlenmesi**

Özütlelerdeki total polifenol miktarı Cheng ve ark., (2010)'ları tarafından modifiye edilen Folin-Ciocalteu yöntemi (Singleton ve ark., 1965) kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntem, bitki özütündeki fenoliklerin hidroksil gruplarının spesifik redoks reaktifi olan Folin-Ciocalteu ile tepkimesi sonucu oluşan mavi renkli kompleksin ölçümüne dayanmaktadır. Bitki özütü 1N Folin-Ciocalteu reaktifi (% 50 etanol ile seyreltilmiş) ile 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından % 20'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenip ve karıştırılmıştır. 40 °C'de 20 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda 16.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Üstte kalan kısımları alınıp 96 kuyucuklu plakaya 100 µL eklenmiştir. Tepkime sonucu oluşan mavi renkli kompleksin verdiği absorban 760 nm'de okunmuştur. Bitki özütlerinin içeriğindeki total polifenol miktarları, gallik asit standardıyla oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.

### **3.2.3. Hücre Kültürü**

RAW 264.7 hücrelerinin gelişimi ve çoğaltılması, 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda, % 10 fetal sığır serumu (FBS) ve % 1 penisilin-streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) besiyerinde, 37 °C'de, % 5 CO<sub>2</sub> ve % 75 nem içeren inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Hücreler % 80 yoğunluğa ulaştıklarında hücre kazıyıcısı ile toplanarak pasajlanmıştır.

### **3.2.4. RAW 264.7 Makrofaj Hücre Hattında İnflamasyon Modelinin Oluşturulması**

Lipopolisakkarit (LPS), RAW 264.7 makrofaj hücre hattında inflamasyon oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Hücreler, % 10 FBS içeren DMEM içerisinde, 24 kuyucuklu kültür plakasına her kuyucukta 4x10<sup>5</sup> yoğunluğunda ekilerek 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından fenol kırmızısı içermeyen besiyeri içerisinde (% 10 FBS içeren besiyeri) farklı konsantrasyonlarda özüt/fraksiyon/saf madde ve 1 µg/mL

konsantrasyonunda LPS uygulaması yapılmıştır. Hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat inkübasyonun ardından besiyeri NO ve/veya diğer analizler için uygun bir şekilde toplanmıştır. Elde edilen hücre lizatından bikinkonik asit (BCA) kiti kullanılarak protein konsantrasyonları tayin edilmiştir.

### 3.2.5. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Karabaş otundan elde edilen özütlerin/fraksiyonların/saf maddelerin, toksik olmayan (hücre canlılığı  $\geq$  % 90) dozlarını belirlemek amacıyla MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium bromür] metodu (Mosmann, 1983) kullanarak hücre canlılığı testi yapılmıştır. Bu test, tetrazolyum boyasının, canlı hücrelerdeki mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrogenazla verdiği tepkimeler sonucunda indirgenmesiyle oluşan formazan maddesinin spektrofotometrik olarak belirlenmesi esasına dayanır. MTT, hücrelere aktif olarak absorbe olan sarı renkli bir boyadır. Canlı hücrelerde mitokondri tarafından bu boyanın tetrazolyum halkası parçalanırsa, mavi-mor renkli suda çözünmeyen formazan maddesi oluşur. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak kabul edilir. MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu, canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterir.

Öncelikle 24 kuyucuklu kültür plakasına  $4 \times 10^5$  yoğunluğunda ekilen hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda farklı konsantrasyonlarda özüt/fraksiyon/saf madde ve 1  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonunda LPS uygulaması yapılmıştır. Hücreler 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücrelerin üzerine 20  $\mu\text{L}$  MTT eklenerek 2 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda MTT uygulaması yapılan besiyeri aspirasyon ile çekilmiştir. Hücrelere 200  $\mu\text{L}$  DMSO eklenerek 10 dk inkübe edilmiş ve hücrelerin yaşam oranları ELISA okuyucu kullanılarak 570 ve 690 (background) nm'de ölçülmüştür.

### 3.2.6. Besiyerinde Nitrik Oksit (NO) Ölçümü

LPS uygulaması ile inflamasyon modeli oluşturduğumuz hücre hattından toplanan besiyerinde, NO düzeyleri Griess metoduna (Griess, 1879) göre belirlenmiştir. Griess testi, çözeltideki nitrit iyonunu ( $\text{NO}_2^-$ ) tespit eden analitik bir kimya testidir.  $\text{NO}_2^-$  içeren bir örneğin Griess reaktifi ile işlenmesi üzerine kırmızı pembe bir renk oluşumu ile analiz edilir. Griess reaktifi, % 5 fosforik asit içinde hazırlanmış % 1 sülfanilamid ve % 0,1 naftiletilediaminin eşit hacimlerde karıştırılması ile hazırlanmıştır. Toplanan besiyerinden 100  $\mu\text{L}$  ve eşit hacimde Griess reaktifi ile karıştırılarak 96 kuyucuklu plakada 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından oluşan rengin 540 nm'de

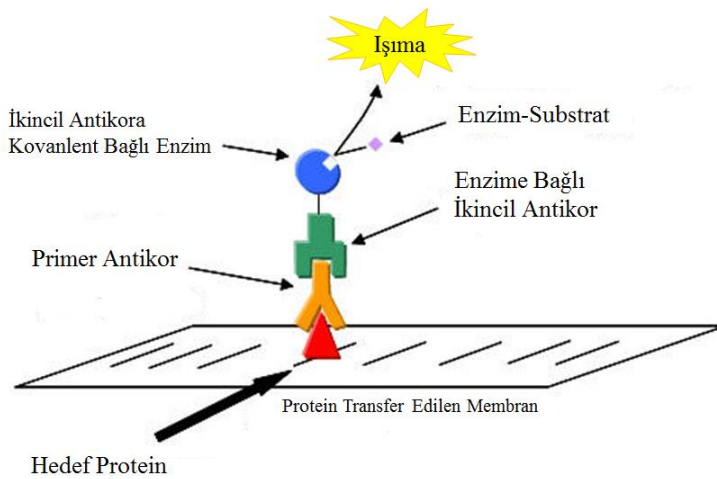
verdiği absorbans mikropilaka okuyucuda ölçüldü. 0,1 M sodyum nitrit ( $\text{NaNO}_2$ )’den hazırlanan bir dizi standart (0-100  $\mu\text{M}$ ), kalibrasyon eğrisi hazırlamak için kullanılmıştır. Hesaplanan NO konsantrasyonu, hücre lizatlarından tayin edilen protein konsantrasyonları ile normalize edilmiştir.

### 3.2.7. Hücre Lizatlarında Total Protein Miktarının Tayini

Hücrelerdeki total protein miktarı BCA kiti kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda belirlenmiştir. Bu yöntem alkali çözeltideki proteinlerin,  $\text{Cu}^{+2}$ ’yi  $\text{Cu}^{+1}$ ’e indirgemesi ve daha sonra  $\text{Cu}^{+1}$ ’in BCA ile verdiği mor renkli kompleksin 562 nm’deki absorbansının spektrofotometrik metodla ölçümüne dayanmaktadır. Renk değişimi, BCA kiti reaktif çözeltisinin rengi olan yeşilden koyu mora doğru gerçekleşmektedir.

### 3.2.8. Protein Düzeyinde Ekspresyon Seviyelerinin Tayin Edilmesi

Hücre lizatındaki proteinler Laemmli (1970)’de belirtildiği gibi dikey elektroforez tekniği ile Sodyum dodesil sülfat (SDS)-Poliakrilamid jel elektroforezi (PAJE) yöntemi kullanılarak ayrıştırılmıştır. Her bir enzimin protein düzeyleri spesifik antikorlar kullanılarak Western Blot tekniği ile immünolojik olarak Towbin ve ark., (1979) metodu kullanılarak belirlenmiştir. Proteinlerin immünolojik olarak belirlenmesi Şekil 3.8’de şematize edilmiştir.



Şekil 3.8. Proteinlerin immünolojik olarak belirlenmesi (<https://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/Techniques/TechElectrophoresis.htm>’den uyarlanmıştır)

### 3.2.8.1. Hücre Lizatı Hazırlanması

SDS-PAJE ve Western blot analizinde kullanılacak olan proteinleri elde etmek için öncelikle RAW 264.7 hücreleri % 10 FBS içeren DMEM içerisinde, 6 kuyucuklu kültür plakalarına her kuyucukta  $1,5 \times 10^6$  yoğunluğunda hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelere, kültür plaka yüzeyini tamamen kaplamalarının ardından (24 saat), fenol kırmızısı içermeyen besiyeri içerisinde (% 10 FBS içeren besiyeri) farklı konsantrasyonlarda özüt/fraksiyon/saf madde ve LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) uygulamaları yapılmış ve 6 saat boyunca inkübe edilmiştir. 6 saat inkübasyonun ardından, hücreler Radyo Immuno Presipitasyon Assay (RIPA) tamponu kullanılarak toplanmıştır. RIPA tamponunun hazırlanışı Çizelge 3.4'de belirtilmiştir. Elde edilen hücre lizatındaki protein konsantrasyonu BCA assay kiti kullanılarak ölçülmüştür. Hücre lizatları, SDS-PAJE analizlerinde kullanılmak üzere  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.4. RIPA tamponunun hazırlanışı

RIPA Tamponu	
Bileşenler	Konsantrasyonlar
Tris-HCl, pH:8	50 mM
SDS	% 0,1
Sodyum deoksikolat	% 0,5
Triton X-100	% 1
NaCl	150 mM

### 3.2.8.2. SDS-PAJE ile Proteinlerin Ayrıştırılması

RAW 264.7 hücrelerinden elde edilen proteinler, Laemmli (1970)'de belirtildiği gibi dikey elektroforez tekniği ile kesintili tampon sistemi kullanılarak ayrıştırılmıştır. iNOS proteini için % 8,5,  $\beta$ -Aktin için % 12'lik ayrıştırıcı jel kullanılırken, bütün proteinler için % 4'lük sıkıştırma jeli kullanılmıştır. Ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı solüsyonları Çizelge 3.5'de belirtilen miktarlarda verilen sırayla karıştırılarak hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5. SDS-PAJE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin hazırlanması

Stok Çözeltiler	Ayrıştırıcı Jel (% 8,5)	Ayrıştırıcı Jel (% 12)	Sıkıştırıcı Jel (% 4)
Jel Çözeltisi (mL)	8,5	12	1,3
Distile Su (mL)	13,55	10,04	6,1
Ayrıştırıcı Jel Tamponu (mL)			
Tris-HCl, pH: 8,8	7,5	7,5	-
Sıkıştırıcı Jel Tamponu (mL)			
Tris-HCl, pH: 6,8	-	-	2,5
% 10 SDS (mL)	0,3	0,3	100
% 10 APS (mL)	0,15	0,15	0,05
TEMED (mL)	0,015	0,015	0,01

Cam plakalar, jelin döküleceği standlara yerleştirildi ve plakalar arasına önce Çizelge 3.5’de belirtilen miktarlarda ayrıştırıcı jel hazırlanıp dökülmüştür. Jelin polimerizasyonunu hazırlamak amacıyla hava ile olan temasını kesmek için şırınga yardımıyla bir miktar izopropanol koyulmuştur. Ayrıştırıcı jelin polimerleşmesinin ardından, üzerine koyulan izopropanol uzaklaştırılmıştır. Çizelge 3.5’de belirtildiği gibi hazırlanan sıkıştırıcı jel cam plakaların en üst seviyesine kadar dökülmüş ve 1 mm kalınlığında 10 kuyucuk oluşturan tarak yerleştirilmiştir. Sıkıştırıcı jelin polimerizasyonundan sonra tarak dikkatlice çıkarılmıştır. Polimerleşmemiş jel kalıntıları ve hava kabarcıklarını ortadan kaldırmak için kuyucuklar şırınga yardımıyla elektrot yürütme çözeltisi (25 mM Tris, 192 mM glisin, % 0,1 SDS) ile yıkanmıştır. Sonrasında, uygulamalardan elde edilen hücre lizatları Hamilton şırıngası yardımıyla kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme sonrası, jel yürütme aparatı tanka yerleştirilmiş ve elektrot yürütme çözeltisi koyularak elektroforez başlatılmıştır. Elektroforetik ayırma için proteinler sıkıştırıcı jelde 15 mA, ayrıştırıcı jelde 25 mA’de yürütüldü. Elektroforezde yürütme tamamlandıktan sonra jel, transfer tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin ve % 20 metanol) içerisinde 10 dk süreyle sabit hızlı bir çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır.

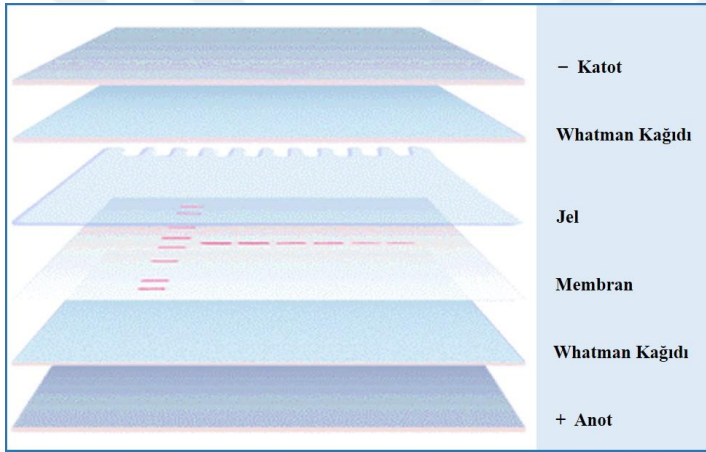
Proteinlerin elektroforetik ayrıştırması, BIO-RAD elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hedef molekülün protein düzeyi spesifik antikor kullanılarak Western Blot tekniği ile immunolojik olarak tayin edilmiştir. Blotlama sonunda, jel oda sıcaklığında 45 dakika süreyle % 0,1 Coomassie pırlanta mavisi R-250, % 12 buzlu asetik asit ve % 50 metanol içeren boya çözeltisi hazırlanarak boyanmıştır. Ardından jele bağlanmayan



çözünmüş boyanın uzaklaştırılması için % 7'lik asetik asit içeren % 30'luk metanol çözeltisi ile inkübe edilerek saklanmıştır.

### 3.2.8.3. Western Blot Analizi

Western blot analizi için, elektroforez sonrasında aparattan çıkarılan jel, transfer tamponu içerisinde 10 dk süreyle sabit hızlı bir çalkalayıcıda inkübe edilmiştir [Khyse-Anderson (1984) ile Tovey ve Baldo (1987) tarafından tanımlandığı gibi]. Blotlama sandiviçi Şekil 3.9'da gösterildiği gibi tabana önce nemlendirilmiş sünger sonra Whatman filtre kağıdı sonra jel, üzerine nitroselüloz membran, sonra tekrar Whatman filtre kağıdı ve sünger olacak şekilde hazırlanmıştır.



Şekil 3.9. Western blot için sandwich yöntemi (<http://www.bio-rad.com/en-tr/applications-technologies/protein-blotting-methods>' dan uyarlanmıştır)

Sandviç hazırlandıktan sonra elektroforetik transfer sistemi içine koyuldu, transfer tamponu dolduruldu, sistem güç kaynağına bağlandı ve 90 volta ayarlanmıştır. Proteinler 2 saat süresince elektroforetik olarak transfer edilmiştir. Süre sonunda güç kaynağı kapatılmıştır. Membran protein içeren yüzey üstte kalacak bir biçimde küçük bir kabın içine yerleştirilmiştir. 1 saat süreyle; Tris Buffer Saline Tween (TBST: 20 mM Tris-HCl, pH: 7,4, 0,5 M NaCl, % 0,05 Tween 20) içinde % 5'lik yağsız süt tozu içeren bloklama çözeltisi ile sabit hızlı bir çalkalayıcı kullanılarak inkübe edilmiştir. Daha sonra, membran % 5'lik yağsız süt tozu içeren TBST çözeltisi içinde hazırlanan primer antikor (anti-mouse iNOS) ile gece boyu inkübe edilmiştir. Ardından membran, işaretleyici enzim-Horseradish Peroksidaz ile bağlı olan ikincil antikorla (anti-rabbit IgG-HRP) 1 saat inkübe edilmiştir.

Daha sonra membran Western Blotting Luminol Reagent ile muamele edilmiştir. Membrandaki protein bantları C-DiGit® Blot Scanner cihazında görüntülenerek Image Studio Digits software ile densitometrik olarak analiz edilmiştir.

### **3.2.9. mRNA Düzeyinde Ekspresyon Seviyelerinin Tayin Edilmesi**

RAW 264.7 makrofaj hücrelerinden TRIzol® solüsyonu ile PureLink® RNA mini kit kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA'ların miktarı ve saflığı, NanoQuant mikroparka okuyucu kullanılarak kontrol edilmiştir. cDNA sentezi, ABI-High-Capacity cDNA reverse transcriptase kiti kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar dilue edilip, TaqMan® PCR Master Mix ve iNOS, IL-1 $\beta$ , COX-2 genleri için spesifik TaqMan® problemleri kullanılarak kantitatif polimeraz zincir reaksiyonları (qPCR) gerçekleştirilmiştir. House keeping gen olarak  $\beta$ -Aktin kullanılmıştır. PCR döngüsü, primer konsantrasyonları ve cDNA miktarları optimize edilmiştir.

#### **3.2.9.1. Total RNA İzolasyonu**

Total RNA izolasyonu, TRIzol® solüsyonu ile PureLink® RNA mini kit kullanılarak laboratuvarımızda optimize ettiğimiz ayrıntıları aşağıda verilen prosedür uygulanarak yapılmıştır. Öncelikle RAW 264.7 hücreleri % 10 FBS içeren DMEM içerisinde, 24 kuyucuklu kültür plakalarına her kuyucukta  $4 \times 10^5$  hücre yoğunluğu olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin kültür plaka yüzeyini tamamen kaplamalarının ardından (24 saat), fenol kırmızısı içermeyen besiyeri içerisinde (% 10 FBS içeren besiyeri) farklı konsantrasyonlarda özüt/fraksiyon/saf madde ve LPS (1  $\mu$ g/mL) uygulaması yapılmıştır. 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından süpernatant kısmı aspirasyon ile çekilmiştir. Hücrelere 900  $\mu$ L TRIzol® solüsyonu eklendi ve 3-4 defa pipetleme yapılarak toplanmıştır. Ardından 180  $\mu$ L kloroform eklendi ve 15 saniye alt üst edilerek karıştırılmıştır. 3 dk oda sıcaklığında bekletildi ve 12.000 g 15 dk +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Bundan sonra, RNA içeren üst faz (renksiz, 400  $\mu$ L) toplandı ve kitin protokolündeki yazılı talimatlar ile devam edilmiştir. Kuruyan RNA pelletleri kitin içerdiği RNAaz içermeyen saf su ile çözülerek -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### **3.2.9.2. RNA'nın Spektrofotometrik Analizi**

RAW 264.7 makrofaj hücrelerinden izole edilen RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için 260 nm ve 280 nm'deki absorbans değerleri

NanoQuant mikroparka okuyucu ile ölçülmüştür. Nükleik asitlerin maksimum absorbands verdiği dalga boyu olan 260 nm'deki değerler kullanılarak RNA miktarları hesaplanmıştır. 260 nm nükleik asitlerin, 280 nm proteinin ve 230 nm ise fenolün maksimum absorbands verdiği dalga boyudur. RNA'nın saflığını değerlendirirken A260/A280 ve A260/230 oranları esas alınmaktadır. Bu oranların sırasıyla ~1,9 ve 1,8-2,2 olması RNA'nın saf olduğunu göstermektedir.

### **3.2.9.3. Total RNA'nın Agaroz Jel Elektrofrez ile Görüntülenmesi**

İzole edilen RNA'ların yürütülmesi ve analizi için 1X Tris Borik asit-EDTA (TBE) tamponu içerisinde % 1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Hazırlanan agaroz eriyene kadar mikrodalga fırında kaynatma işlemi yapılmıştır. Kaynatma işleminden sonra agaroz solüsyonu elle dokunulabilir sıcaklığa gelinceye kadar soğutuldu ve içerisine 3 µL SafeView™ eklenmiştir. Elektrofrez tablasına dökülerek polimerleşmesi beklenmiştir. Polimerleşen agaroz jel elektrofrez tankına yerleştirildi ve jelin üzerini kapatacak şekilde 1X TBE yürütme tamponu eklenmiştir. 2 µL RNA örneği ile 2 µL yükleme boyası karıştırılarak mikropipet yardımıyla kuyucuklara yüklenmiştir. Elektrofrez güç kaynağına bağlandı ve 100 voltta 45 dk süresince yürütülmüştür. Yürütme işlemi bitince RNA'ların kalitesi, jel görüntüleme sistemi (VILBER LOURMAT) kullanılarak UV ışığı altında görüntülenmiştir.

### **3.2.9.4. cDNA Sentezi**

Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi, 18 nükleotid uzunluğunda oligo d(T) primeri ile ABI-High-Capacity cDNA reverse transcriptase kiti kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre yapılmıştır. cDNA sentezi karışım ve çoğaltma işlemi Çizelge 3.6'da verilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar, qPCR yönteminde kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.6. cDNA sentezi karışım ve çoğaltma işlemi

Bileşenler	Hacim		Konsantrasyon	
Total RNA	-		3 µg/mL	
10X Reaksiyon Tamponu	2 µL		1 mL	
25X dNTP Karışımı	0,8 µL		100 mM	
Oligo (dT) Primer	2 µL		1 mL	
Ters Transkriptaz Enzimi	1 µL		50 U/µ/mL	
RNAaz İçermeyen Su	-		4,2 µL	
cDNA Sentezi Çoğaltma Aşamaları				
Aşamalar	1	2	3	4
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Zaman (dk)	10	120	5	∞

### 3.2.9.5. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu : qPCR

qPCR, polimeraz zincir reaksiyonunda meydana gelen çoğaltımını görünür hale getiren ve münitörize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemi olması nedeniyle Gerçek Zamanlı PCR (Real Time-PCR) ve izlenebilir polimeraz zincirleme tepkimesi gibi farklı adlarla da isimlendirilmektedir (Kubista, 2008).

qPCR reaksiyonları TaqMan® PCR Master Mix kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği talimatlara göre gerçekleştirilmiştir. Uygulanan fraksiyonların ve saf maddelerin gen ekspresyon seviyelerine etkilerini değerlendirmek için, iNOS, IL-1β, COX-2 ve β-Aktin genlerine özgü TaqMan® problemleri kullanılarak qPCR analizleri yapılmıştır. House keeping gen olarak β-Aktin kullanılmıştır. Çizelge 3.7'de qPCR reaksiyon bileşenleri verilmiştir.

Çizelge 3.7. qPCR reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim
Reaksiyon Karışımı	10 µL
TaqMan Assay	1µL
Steril Su	4 µL
5X Seyreltilmiş cDNA	5 µL
Son Hacim	20 µL

Her gen için ayrı ayrı amplifikasyon analizi ile standart kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve erime eğrisi analizleri yapılmıştır. qPCR analizi çoğaltma aşamaları Çizelge 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.8. qPCR analizi çoğaltma aşamaları

<b>qPCR Analizi Çoğaltma Aşamaları</b>				
	1 Döngü	1 Döngü	40 Döngü	
Sıcaklık (°C)	50	95	95	60
Zaman	2 dk	10 dk	15 saniye	1 dk

Çoğaltma sonucunda elde edilen gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmalı ddCt metodu kullanılarak ve  $\beta$ -Aktin Ct (threshold) değerine karşı normalize edilerek hesaplanmıştır. LPS ile indüklenen kontrol ddCt değeri kalibratör olarak kullanılmış ve 1 kabul edilmiştir.

### 3.2.10. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler, SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 16.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak ifade edilmiştir. Karşılaştırılan her parametre normallik hipotezine göre test edilmiştir. Verilerin analizinde normal dağılım görüldüğü durumlarda parametrik bağımsız örneklem t-test kullanılmıştır.  $\alpha$  -anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak belirlenmiştir.

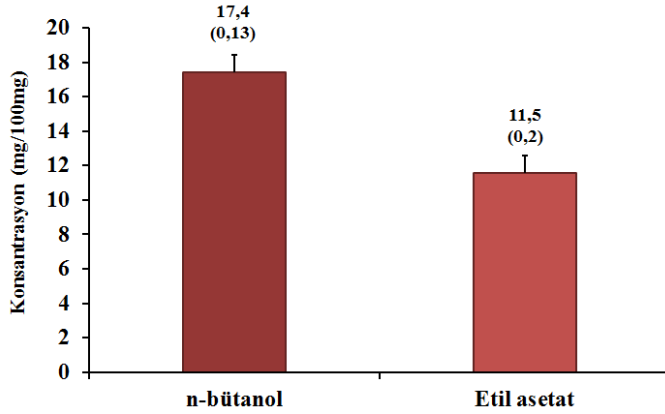
## BÖLÜM 4

### ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

#### 4.1. Araştırma Bulguları

##### 4.1.1. Karabaş Otundan Farklı Organik Çözücüler ile Hazırlanan Özütlerde Polifenol Miktar Tayini

Özütlerdeki total polifenol (TP) miktarı Cheng ve ark., (2009) tarafından modifiye edilen Folin-Ciocalteu yöntemi (Singleton ve ark., 1965) kullanılarak belirlenmiştir. Şekil 4.1’de verilen gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilen sonuçlar 3 kez tekrarlanan deneyin ortalamasını ( $\pm$  standart hata) göstermektedir. Buna göre, n-bütanol özütünde ölçülen TP değeri 17,4 mg/100 mg gallik asit eşdeğeri olarak belirlenirken; Etil asetat (EA) özütü için bu değer 11,5 mg/100 mg olarak bulunmuştur.



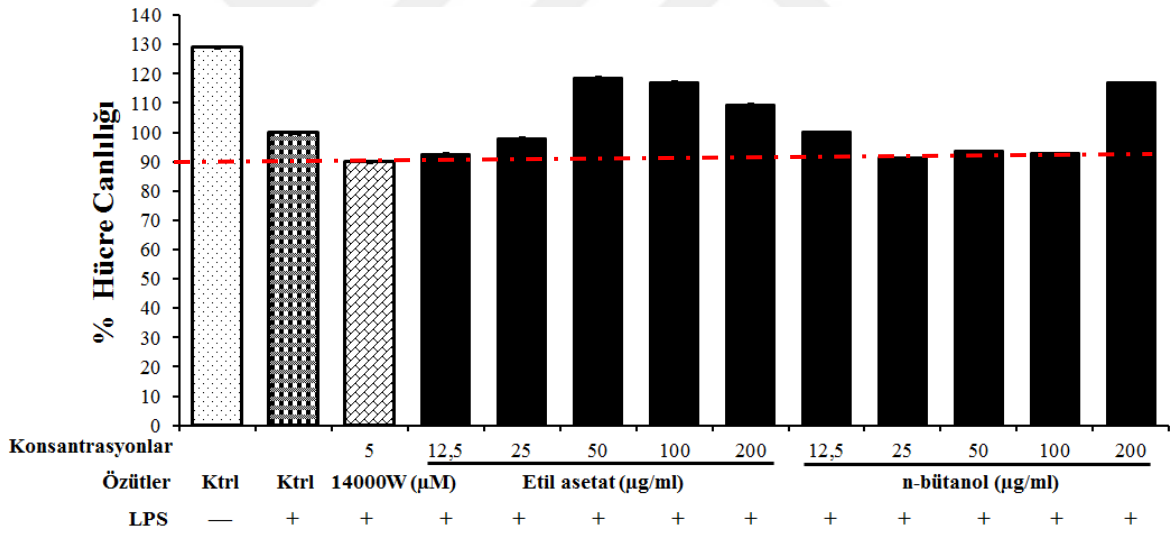
Şekil 4.1. Karabaş otu (*Lavandula stoechas*) sulu demlemesinden elde edilen n-bütanol ve Etil asetat (EA) özütlerinin total polifenol miktarları. Rakamlar 3 tekrarlı deneyin ortalama sonuçlarını ( $\pm$  Standart hata) göstermektedir

##### 4.1.2. Karabaş Otundan Elde Edilen Özütlerle Yapılan Tarama Çalışmaları

Bölüm 3’de bahsedildiği gibi, elde edilen 2 farklı özütten ilk önce MTT testi yapılarak toksik olmayan uygulama dozları belirlenmiştir. Daha sonra, bu dozların NO seviyesi üzerine etkisi değerlendirilerek, anlamlı derecede inhibisyon gösteren en etkin özüt belirlendi ve diğer çalışmalara devam edilmiştir.

#### 4.1.2.1. Karabaş Otundan Elde Edilen Özütlerle Yapılan Hücre Canlılığı Sonuçları

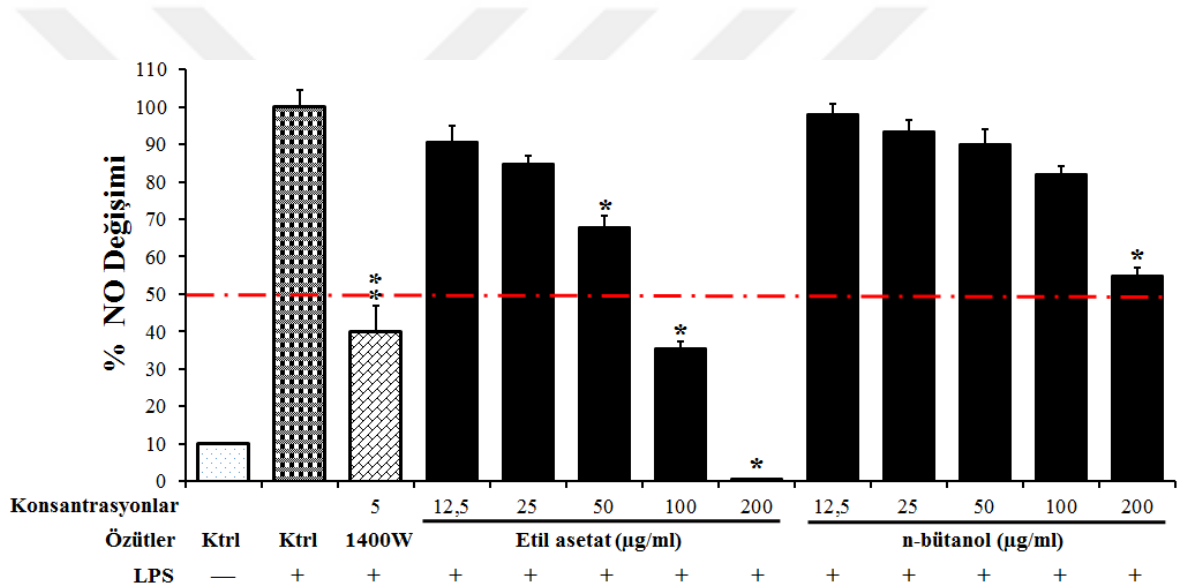
Elde edilen özütlerin toksik olmayan uygulama dozlarını belirlemek amacıyla RAW 264.7 makrofajlarında yapılan hücre canlılığı testi için öncelikle, EA ve n-bütanol özütlerinin 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL olmak üzere 5 farklı dozu ile LPS (1 µg/mL) uygulaması yapılmıştır. Uygulama sonrası, hücrelerin yaşam oranları ELISA okuyucu kullanılarak 570 ve 690 (background) nm’de ölçülmüştür. Değişik konsantrasyonlardaki Karabaş otu özütleri ile muamele edilen doz grupları, kontrol grubu [Ktrl-LPS (-)] ve kontrol LPS grubu [Ktrl-LPS (+)] ile karşılaştırarak, özütlerin RAW 264.7 hücre hattında hücre canlılığı üzerine olan etkisi saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucu, Karabaş otundan elde edilen EA ve n-bütanol özütlerinin uygulanan dozlarının (12,5-200 µg/mL) hepsinde RAW 264.7 makrofajlarında hücre canlılığı % 80’nin üzerinde kalmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Farklı dozlarda uygulanan EA ve n-bütanol özütlerinin LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarının hücre canlılığı üzerine etkisi. Ktrl: Ktrl-LPS (-), Ktrl: Ktrl-LPS (+), 1400W (5µM, negatif kontrol), EA ve n-bütanol özütlerinin farklı dozları (12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL). Tüm özütler LPS ile eş zamanlı uygulanmıştır. Ktrl-LPS (+) grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. Ortalama ± standart sapma olarak verilen değerler, 9 tekrarlı (3 kuyucuk X 3 biyolojik) olarak elde edilmiştir. \*Ktrl-LPS (+) grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,05$ )

#### 4.1.2.2. LPS Uygulamasıyla İndüklenerek İnflamasyon Modeli Oluşturulan RAW 264.7 Makrofaj Hücre Hattında Özütlere NO Üretimi Üzerine Etkileri ile Yapılan Taramalar

LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında EA ve n-bütanol özütlere toksik olmayan 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL dozları hücrelere uygulanmıştır. Şekil 4.3’de görüldüğü üzere LPS uygulaması NO seviyesinin kontrol grubuna kıyasla 9 kat artırmıştır. Bu da RAW 264.7 makrofajlarında LPS uygulaması sonucunda inflamasyonu indüklediğinin bir göstergesidir. Uygulama sonucu Şekil 4.3’de gösterildiği gibi n-bütanol özütünün 50 ve 100 µg/mL dozları NO üretimini baskılamada etkinlik göstermezken, aynı dozlarda EA özütü NO üretimini anlamlı derecede baskılamıştır ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.3. Farklı dozlarda uygulanan EA ve n-bütanol özütlere LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında NO üretimi üzerine etkisi. Ktrl: Ktrl-LPS (-), Ktrl: Ktrl-LPS (+), 1400W (10 µM, pozitif kontrol), EA ve n-bütanol özütlere farklı dozları (12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL). Tüm özütlere LPS ile eş zamanlı uygulanmıştır. Ktrl-LPS (+) grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. Ortalama ± standart sapma olarak verilen değerler, 9 tekrarlı (3 kuyucuk X 3 biyolojik) olarak elde edilmiştir. \*Ktrl-LPS (+) grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ )

n-Bütanol özütü 50 ve 100 µg/mL dozlarda, LPS kontrol grubuna kıyasla, NO üretimini % 10 ile % 18 oranlarında baskıladığı görüldükçe istatistiksel olarak anlamlı



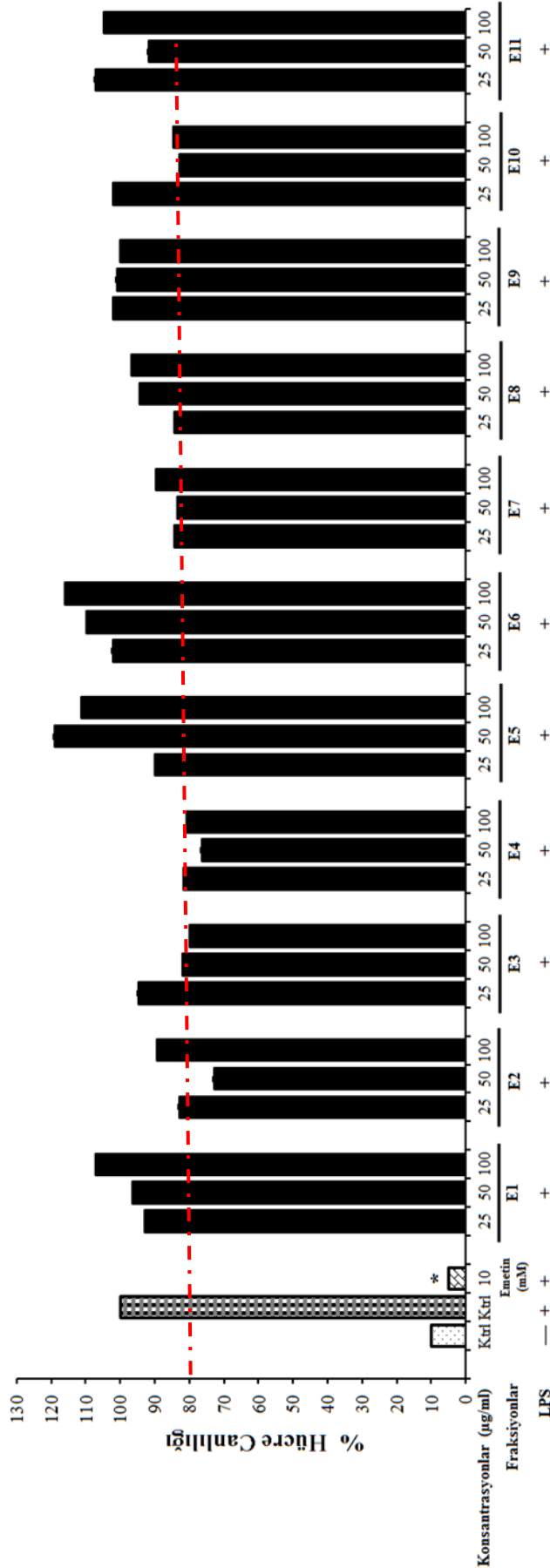
bulunmamıştır. Aynı dozlarda EA özütü ise, % 32 ile % 64 oranlarında baskılamıştır ( $p<0,05$ ). Bu tarama sonuçlarına göre, EA özütü en aktif özüt olarak seçilerek fraksiyonlama çalışmalarına devam edilmiştir.

#### **4.1.3. Etkin Olarak Belirlenen EA Özütünün Fraksiyonlanması ve Tarama Çalışmaları**

Kolon kromatografisi ile EA özütü toplam 11 fraksiyona ayrılmıştır. Tarama çalışmaları için öncelikle, fraksiyonların hücre canlılığı üzerine etkileri MTT testi ile analiz edilerek, toksik olmayan uygulama dozları belirlenmiştir. Daha sonra, fraksiyonların NO seviyesi üzerine etkileri ölçülerek, % 50'nin üzerinde baskılama gösteren en etkin fraksiyon seçildi ve bu fraksiyon üzerinden biyoaktivite rehberli olarak etken madde arama çalışmalarına devam edilmiştir.

##### **4.1.3.1. EA Özütünden Elde Edilen Fraksiyonlarla Yapılan Hücre Canlılığı Sonuçları**

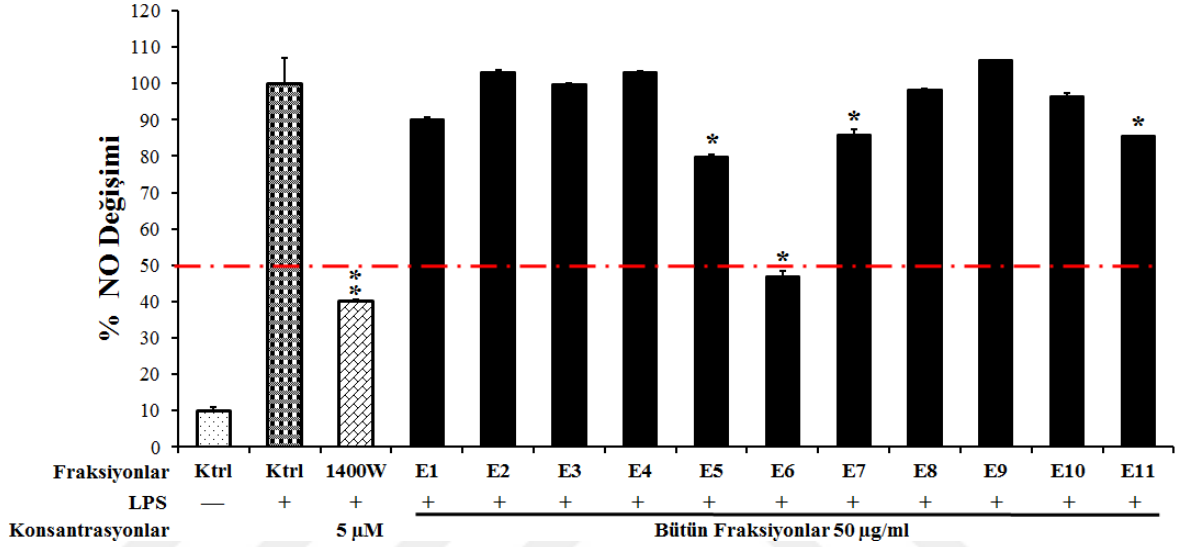
EA özütünden elde edilen 11 fraksiyonunun toksik olmayan uygulama dozlarını belirlemek için RAW 264.7 makrofajlarında MTT ile hücre canlılığı testi yapılmıştır. Bu test için öncelikle hücrelere, EA fraksiyonlarının 25 µg/mL, 50 µg/mL ve 100 µg/mL olmak üzere 3 farklı dozu ile LPS (1 µg/mL) uygulaması yapılmıştır. Değişik konsantrasyonlardaki EA fraksiyonları ile muamele edilen doz grupları, kontrol grubu (Ktrl-LPS (+)) ile karşılaştırarak, fraksiyonların RAW 264.7 makrofajlarında hücre canlılığı üzerine olan etkisi saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucu, E2 fraksiyonunun 50 µg/mL dozu hariç elde edilen EA fraksiyonlarının uygulanan dozlarının (25-100 µg/mL) hepsinde RAW 264.7 makrofajlarında hücre canlılığı % 80 ve üzerinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Farklı dozlarda uygulanan EA fraksiyonlarının LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarının hücre canlılığı üzerine etkisi. Ktrl: Ktrl-LPS (-), Ktrl: Ktrl-LPS (+), 1400W (5 µM, negatif kontrol), EA fraksiyonlarının (E1-E11) farklı dozları (25 µg/mL, 50 µg/mL ve 100 µg/mL). Tüm fraksiyonlar LPS ile eş zamanlı uygulanmıştır. Ktrl-LPS (+) grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. Ortalama ± standart sapma olarak verilen değerler, 9 tekrarlı (3 kuyucuk X 3 biyolojik) olarak elde edilmiştir. \*Ktrl-LPS (+) grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ )

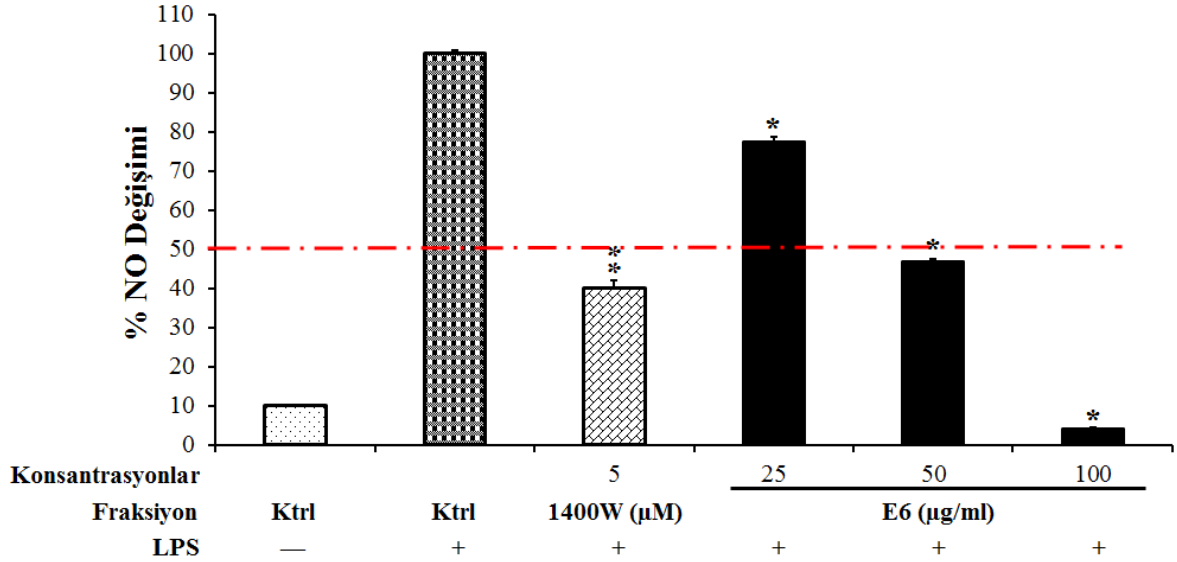
#### 4.1.3.2. NO İnhibisyonu ile Tarama Çalışmaları

LPS ile inflamasyon modeli oluşturulan RAW 264.7 makrofajlarında 11 adet EA fraksiyonunun tek dozda (50 µg/mL) taraması yapılmıştır. Fraksiyonların uygulaması sonucu, Şekil 4.5’de görüldüğü üzere E6 fraksiyonunun 50 µg/mL dozunun, diğer fraksiyonlara kıyasla NO seviyesini % 53 oranında anlamlı derecede baskıladığı görülmüştür ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.5. Tek dozda taranan fraksiyonların LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında NO üretimi üzerine etkileri. Ktrl: Ktrl-LPS (-), Ktrl: Ktrl-LPS (+), 1400W (5 µM, pozitif kontrol), E1-E11 fraksiyonların tek dozu 50 µg/mL. Tüm fraksiyonlar LPS ile eş zamanlı uygulanmıştır. Ktrl-LPS (+) grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. Ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilen değerler, 9 tekrarlı (3 kuyucuk X 3 biyolojik) olarak elde edilmiştir. \*Ktrl-LPS (+) grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ )

Elde edilen veriler doğrultusunda, E6 fraksiyonu diğer fraksiyonlara kıyasla NO seviyesini % 50'nin üzerinde anlamlı derecede baskıladığından dolayı en aktif fraksiyon olarak seçilmiştir. Bu fraksiyonun NO üretimini baskılamada doz-cevap ilişkisini belirlemek için, Şekil 4.6'da gösterildiği gibi toksik olmayan 25 µg/mL, 50 µg/mL ve 100 µg/mL dozları, LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarına uygulanmıştır.



Şekil 4.6. Farklı dozlarda uygulanan E6 fraksiyonunun LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında NO üretimi üzerine etkileri. Ktrl: Ktrl-LPS (-), Ktrl: Ktrl-LPS (+), 1400W (5 µM, pozitif kontrol), E6 fraksiyonun 25 µg/mL, 50 µg/mL ve 100 µg/mL dozları. E6 fraksiyonu LPS ile eş zamanlı uygulanmıştır. Ktrl-LPS (+) grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. Ortalama ± standart sapma olarak verilen değerler, 9 tekrarlı (3 kuyucuk X 3 biyolojik) olarak elde edilmiştir. \*Ktrl-LPS (+) grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ )

E6 fraksiyonu 25 µg/mL, 50 µg/mL ve 100 µg/mL dozlarda, RAW 264.7 makrofajlarından besiyerine salınan NO seviyesini sırasıyla, % 23, % 53 ve % 96 oranlarında doza bağımlı bir şekilde baskılamıştır ( $p<0,05$ ). Tüm bu sonuçlar E6 fraksiyonunun aktif fraksiyon olarak seçilmesini desteklemektedir. E6 fraksiyonu çalışmalar için aday fraksiyon olarak seçilmiş ve çalışmalara devam edilmiştir.

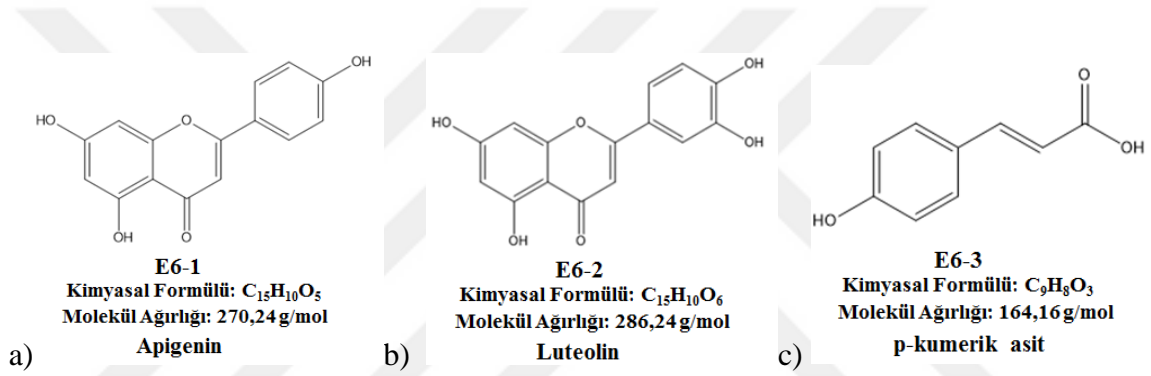
#### 4.1.4. Etkin Olarak Belirlenen E6 Fraksiyonundaki Etken Maddelerin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Biyoaktivite Çalışmaları

E6 fraksiyonu saflaştırma çalışmaları sonucunda 3 adet saf madde elde edildi. Elde edilen bu saf maddelerin kütle spektrometresi ve NMR ile yapıları aydınlatılmıştır. Saf maddelerin yapıları ve özellikleri Bölüm 4.1.4.1’de verilmiştir. Sonrasında bu maddelerin biyoaktivitelerinin ortaya çıkarılması ile ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Belirlenen saf maddelerin NO üretimi üzerine % 50 inhibisyon gösteren dozunu belirlemek için IC50 değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen saf maddelerin NO inhibisyonunda etkin olduğu belirlenen toksik olmayan dozlarının, iNOS gen ve protein seviyesi üzerine olan etkileri

belirlenerek mekanizma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, elde edilen saf maddelerden *p*-kumarik asite kıyasla NO inhibisyon potansiyeli daha yüksek olan luteolin ve apigeninin COX-2 ve IL-1 $\beta$  gen ekspresyonları üzerine etkileri de ortaya konulmuştur. Tüm bu protein ve gen ekspresyon çalışmalarına saf maddelerin elde edildiği fraksiyon olan E6 fraksiyonu da dahil edilmiştir.

#### 4.1.4.1. Saf Maddelerin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

Flash kromatografisi kullanılarak E6 fraksiyonundan 3 adet fitokimyasal saflaştırılmıştır. Çözünürlüğü yüksek 600 MHz NMR cihazı ile saf maddelerin yapısı belirlenmiştir. Yapısı belirlenen bileşikler Şekil 4.7’de verilmiştir.

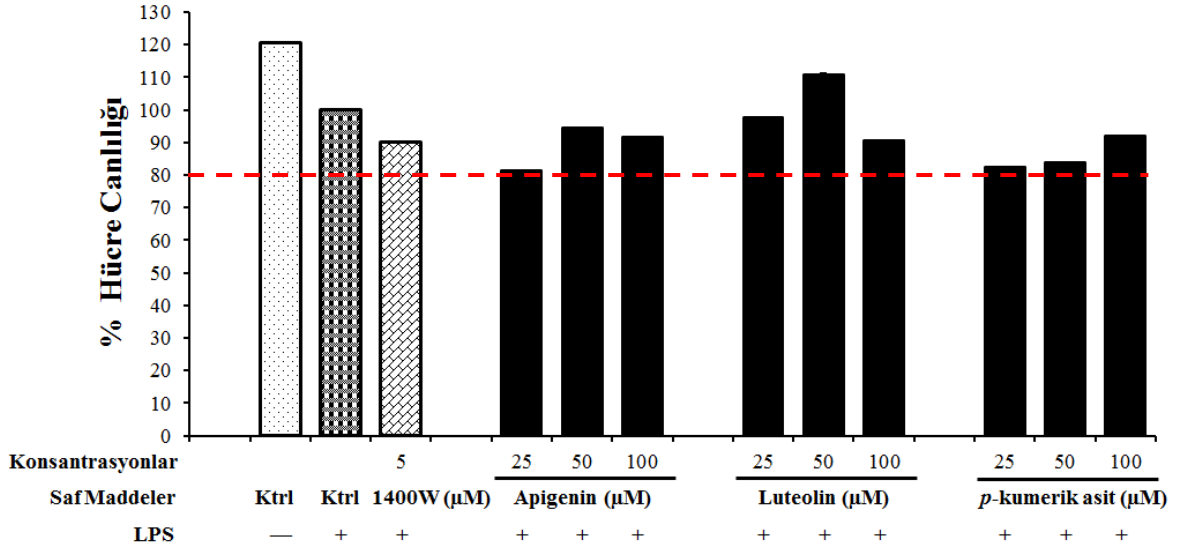


Şekil 4.7. Yapısı belirlenen bileşikler a) E6-1, b) E6-2, c) E6-3

Saf maddelerin yapısındaki karbon ve protonların varlığı, bunların moleküldeki konumları ve uzaysal olarak yönelmesi 1D ve 2D NMR teknikleri ile belirlenmiştir. Yapısı belirlenen saf maddelere ait NMR spektrumları Ek Şekil 1.1, Ek Şekil 1.2 ve Ek Şekil 1.3’de verilmiştir.

#### 4.1.4.2. E6 Fraksiyonundan Elde Edilen Saf Maddelerle Yapılan Hücre Canlılığı Sonuçları

E6 fraksiyonundan elde edilen 3 maddenin toksik olmayan uygulama dozlarını belirlemek amacıyla LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında hücre canlılığı ölçümü yapılmıştır. Bu analiz için hücrelere, saf maddelerin 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M olmak üzere 3 farklı dozu ile LPS (1  $\mu$ g/mL) uygulaması yapılmıştır. Saf maddelerin hücre canlılığına etkisi Şekil 4.8’de verilmiştir.

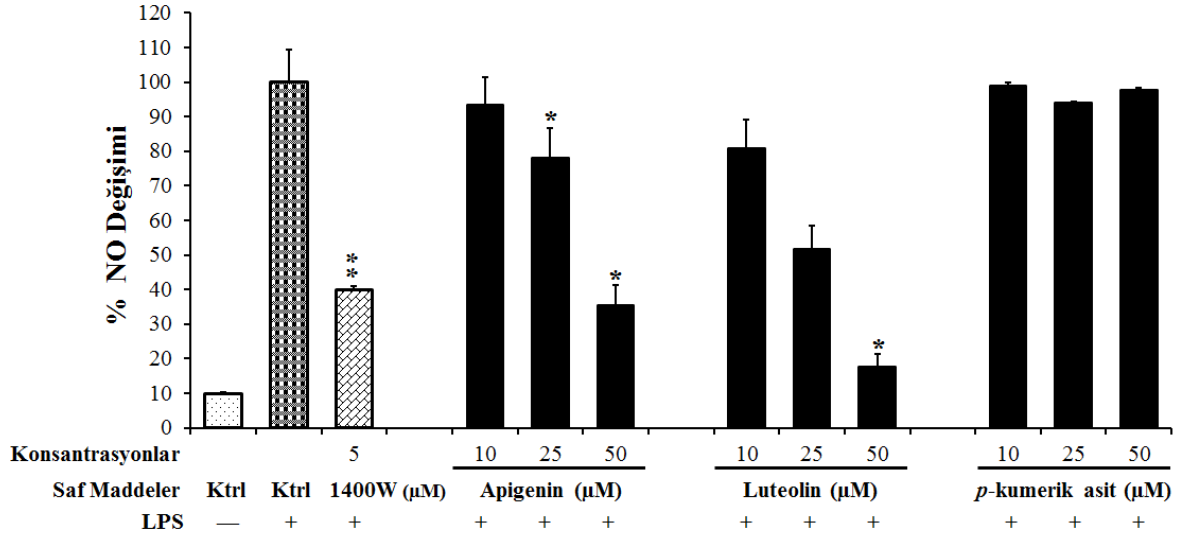


Şekil 4.8. Farklı dozlarda uygulanan saf maddelerin LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarına hücre canlılığı üzerine etkileri. Ktrl: Ktrl-LPS (-), Ktrl: Ktrl-LPS (+), 1400W (5µM, negatif kontrol). Apigenin, luteolin ve *p*-kumarik asit saf maddelerin farklı dozları (25 µM, 50 µM ve 100 µM). Saf maddeler ile LPS eş zamanlı uygulanmıştır. Ktrl-LPS (+) grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. Ortalama ± standart sapma olarak verilen değerler, 9 tekrarlı (3 kuyucuk X 3 biyolojik) olarak elde edilmiştir. \*Ktrl-LPS (+) grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ )

Çalışmalar sonunda RAW 264.7 makrofaj hücre hattında apigenin, luteolin ve *p*-kumarik asit maddelerinin tüm dozlarında RAW 264.7 hücre canlılığının % 80 ve üzerinde tespit edilmiştir.

#### 4.1.4.3. NO İnhibisyonu ile Tarama Çalışmaları

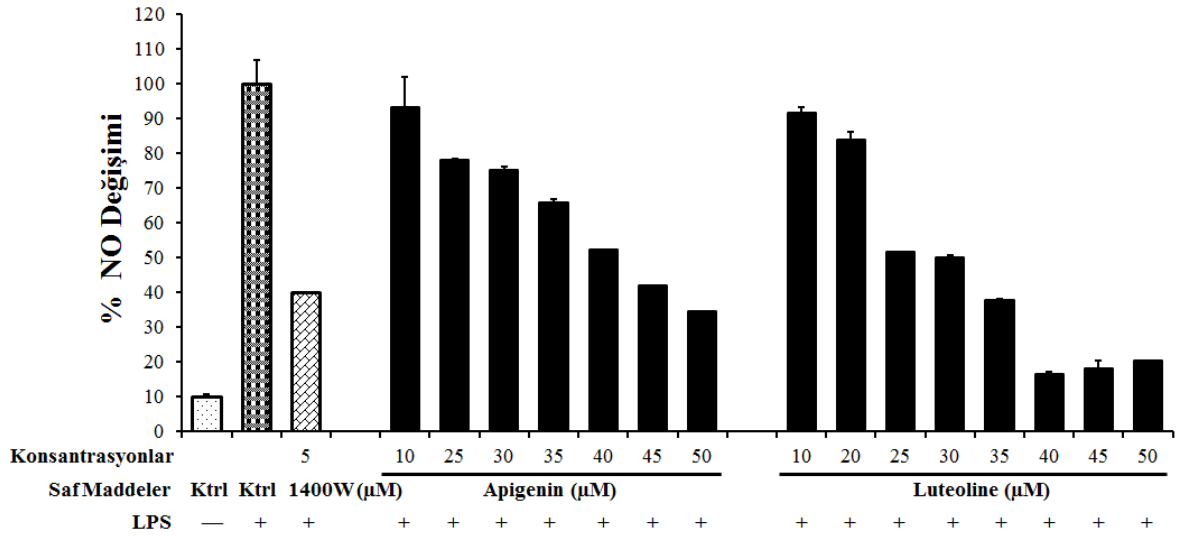
Apigenin, luteolin ve *p*-kumarik asit 10, 25 ve 50 µM dozlarında LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofaj hücrelerine uygulanmıştır.



Şekil 4.9. Farklı dozlarda uygulanan saf maddelerin LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında NO üretimi üzerine etkileri. Ktrl: Ktrl-LPS (-), Ktrl: Ktrl-LPS (+), 1400W (5 µM, pozitif kontrol), apigenin, luteolin ve *p*-kumarik asit saf maddelerin farklı dozları (10 µM, 25 µM ve 50 µM). Saf maddeler ile LPS eş zamanlı uygulanmıştır. Ktrl-LPS (+) grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. Ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilen değerler, 9 tekrarlı (3 kuyucuk X 3 biyolojik) olarak elde edilmiştir. \*Ktrl-LPS (+) grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ )

Şekil 4.9'da görüldüğü üzere; apigenin 10, 25 ve 50 µM dozlarda LPS ile indüklenen ve ortama salınan NO seviyesini LPS kontrol grubuna kıyasla sırasıyla, % 7, % 22 ve % 66 oranlarında doza bağımlı bir şekilde azaltmıştır ( $p<0,05$ ). Luteolin de ise baskılama oranları 10 ve 25 µM'da % 19 ve % 38 olarak bulunurken, 50 µM'da bu oran % 80'e yükselmiştir. Aynı dozarda *p*-kumarik asit de ise NO seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır.

Etkinlikleri belirlenen apigenin ve luteolinin NO seviyesi üzerine % 50 inhibisyon gösteren dozlarını (IC50) belirlemek için çalışmalar yapılmıştır. Buna göre apigenin 10 ila 50 µM arasında değişen 7 farklı dozda, luteolin ise 8 farklı dozda makrofaj hücrelerine uygulanmıştır. Şekil 4.10'da görüldüğü üzere, her iki madde de doza bağımlı inhibisyon profili sergilemektedir. Yapılan bu çalışmalar sonucunda apigenin ve luteolin'in NO inhibisyonu için IC50 değerleri sırasıyla, 56 ve 26 µM olarak hesaplanmıştır. Bu analiz GraphPad Prism 6 software programı kullanılarak yapılmıştır.



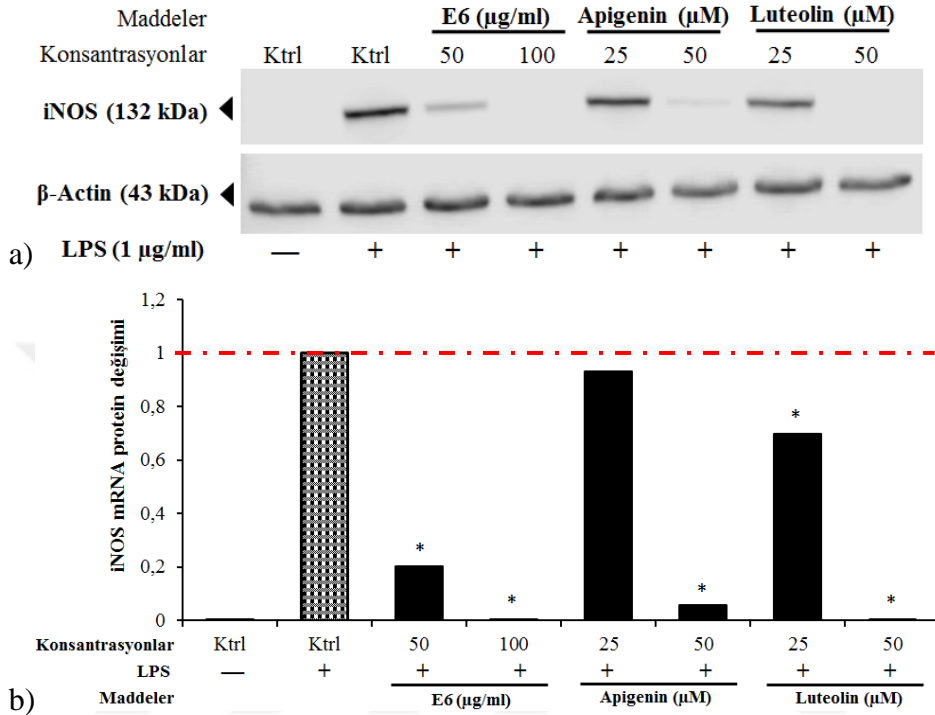
Şekil 4.10. Apigenin ve luteolinin IC50 değerini hesaplamada kullanılan dozlarının LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarındaki NO üretimi üzerine etkileri. Ktrl: Ktrl-LPS (-), Ktrl: Ktrl-LPS (+), 1400W (5 µM, pozitif kontrol), apigenin uygulama dozları 10 µM, 25 µM, 30 µM, 35 µM, 40 µM, 45 µM ve 50 µM, luteolinin uygulama dozları 10 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM, 35 µM, 40 µM, 45 µM ve 50 µM. Saf maddeler LPS ile eş zamanlı uygulanmıştır. Ktrl-LPS (+) grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. Ortalama ± standart sapma olarak verilen değerler, 9 tekrarlı (3 kuyucuk X 3 biyolojik) olarak elde edilmiştir. \*Ktrl-LPS (+) grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ )

#### 4.1.4.4. Apigenin ve Luteolinin İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS) Enziminin Protein Seviyelerindeki Değişimleri

E6 fraksiyonundan saflaştırılan ve NO tarama testlerinde aktif olduğu bulunan apigenin ve luteolinin iNOS enziminin protein seviyesi üzerine etkilerini ortaya koymak üzere SDS-PAJE ve Western blot analizi yapılmıştır. Şekil 4.11.a'da görüldüğü üzere apigenin ve luteolin NO taramalarında etkinlik gösteren iki dozda 25 ve 50 µM'da uygulanmıştır. Bu maddelerin saflaştırıldığı E6 fraksiyonunda kontrol amaçlı 50 ve 100 µg/mL dozlarda hücrelere uygulanmıştır. Western blot işleminden sonra elde edilen protein bantları Image Studio Digits software programı ile densitometrik olarak analiz edilmiştir. Şekil 4.11.b'de görüldüğü gibi yapılan analizler sonucunda E6 fraksiyonu 50 ve 100 µg/mL dozlarda iNOS protein seviyesini LPS kontrol grubuna kıyasla % 80 ve % 99 oranlarında baskılamıştır. Apigenin 25 µM dozda iNOS seviyesini LPS kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir derecede baskılamazken, 50 µM dozu istatistiksel olarak anlamlı bir derecede % 94 oranında baskılamıştır ( $p<0,05$ ). Luteolin ise iNOS



protein seviyesini her iki dozda da LPS kontrol seviyesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir seviyede 25  $\mu\text{M}$ 'da % 30, 50  $\mu\text{M}$  için ise % 99 seviyesinde baskılamıştır ( $p<0,05$ ).

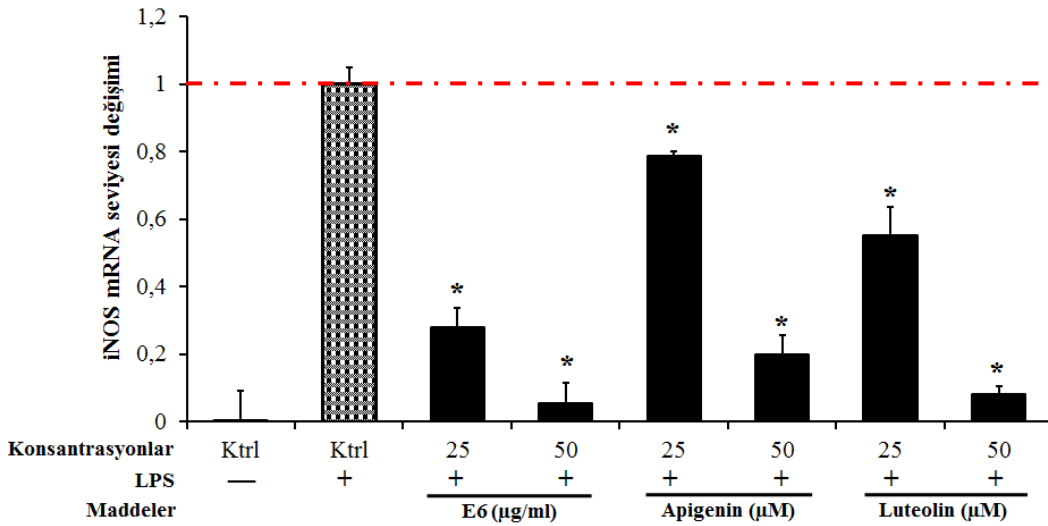


Şekil 4.11. Farklı dozlarda uygulanan E6 fraksiyonu ile apigenin ve luteolin maddelerinin a) LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında iNOS enziminin protein ekspresyonu üzerine etkileri, b) iNOS seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. Ktrl: Ktrl-LPS (-), Ktrl: Ktrl-LPS (+), E6 fraksiyonu ile apigenin ve luteolin maddelerinin sırasıyla 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  ve 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  dozları. E6 fraksiyonu ile Apigenin ve Luteolin maddeleri ile LPS eş zamanlı uygulanmıştır. Ktrl-LPS (+) grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. Ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilen değerler, 9 tekrarlı (3 kuyucuk X 3 biyolojik) olarak elde edilmiştir. \*Ktrl-LPS (+) grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ )

#### 4.1.4.5. Apigenin ve Luteolinin iNOS Enziminin mRNA Seviyesinde Ekspresyonu

E6 fraksiyonundan saflaştırılan ve NO tarama testlerinde aktif olduğu bulunan apigenin ve luteolinin iNOS enziminin mRNA seviyesi üzerine etkilerini ortaya koymak üzere Real-time PCR analizi yapılmıştır. Şekil 4.12'de görüldüğü üzere apigenin ve

luteolin NO taramalarında etkinlik gösteren iki dozda 25 ve 50  $\mu\text{M}$ 'da uygulanmıştır. Bu maddelerin saflaştırıldığı E6 fraksiyonunda kontrol amaçlı 25 ve 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dozlarda hücrelere uygulanmıştır. Şekil 4.12'de görüldüğü gibi yapılan analizler sonucunda E6 fraksiyonu 25 ve 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dozlarda iNOS mRNA seviyesini LPS kontrol grubuna kıyasla % 72 ve % 95 oranlarında baskılamıştır. Apigenin 25 ve 50  $\mu\text{M}$  dozlarda iNOS mRNA seviyesini LPS kontrol grubuna kıyasla % 21 ve % 80 oranlarında baskılamıştır. Luteolin ise iNOS mRNA seviyesini her iki dozda da LPS kontrol seviyesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir seviyede 25  $\mu\text{M}$  için % 45, 50  $\mu\text{M}$  için ise % 92 seviyesinde baskılamıştır ( $p<0,05$ ).

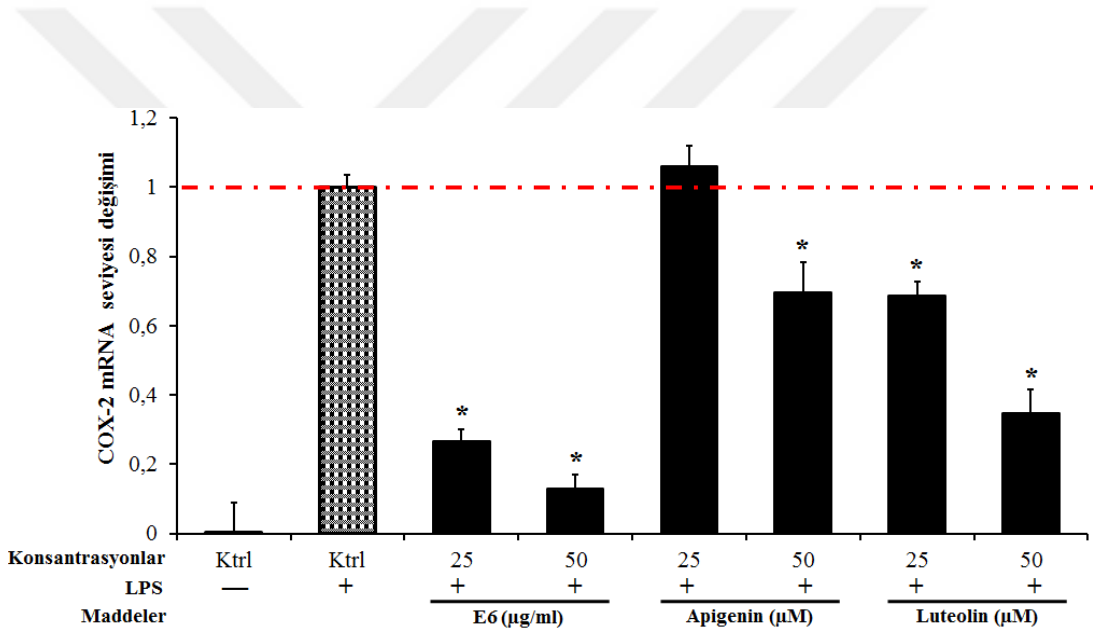


Şekil 4.12. Farklı dozlarda uygulanan E6 fraksiyonu ile apigenin ve luteolin maddelerinin LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında iNOS enziminin mRNA ekspresyonu üzerine etkileri. Ktrl: Ktrl-LPS (-), Ktrl: Ktrl-LPS (+), E6 fraksiyonu ile apigenin ve luteolin maddelerinin sırasıyla 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  ve 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  dozları. E6 fraksiyonu, apigenin ve luteolin maddeleri ile LPS eş zamanlı uygulanmıştır. Ktrl-LPS (+) grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. Ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilen değerler, 9 tekrarlı (3 kuyucuk X 3 biyolojik) olarak elde edilmiştir. \*Ktrl-LPS (+) grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ )

#### 4.1.4.6. Siklooksijenaz-2 (COX-2) ve İnterlökin-1 $\beta$ 'nın Gen Seviyesindeki Değişimleri

E6 fraksiyonundan saflaştırılan ve NO tarama testlerinde aktif olduğu bulunan apigenin ve luteolinin COX-2 ve IL-1 $\beta$ 'nın mRNA seviyesi üzerine etkilerini ortaya

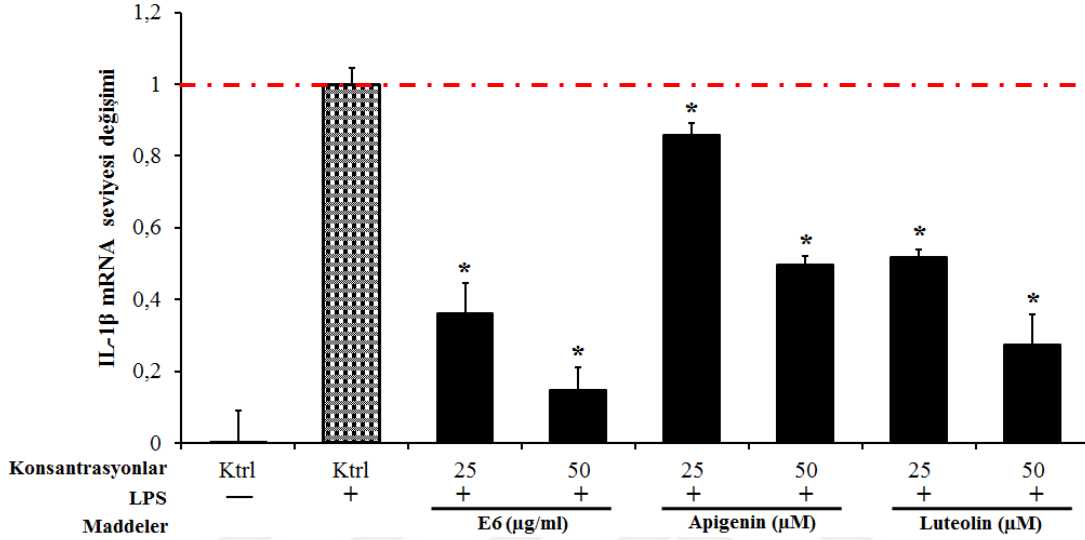
koymak üzere Real-time PCR analizi yapılmıştır. Şekil 4.13’de görüldüğü üzere apigenin ve luteolin NO taramalarında etkinlik gösteren iki dozda 25 ve 50  $\mu\text{M}$ ’da uygulanmıştır. Bu maddelerin saflaştırıldığı E6 fraksiyonunda kontrol amaçlı 25 ve 50  $\mu\text{g/mL}$  dozlarda hücrelere uygulanmıştır. Şekil 4.13’de görüldüğü gibi yapılan analizler sonucunda E6 fraksiyonu 25 ve 50  $\mu\text{g/mL}$  dozlarda COX-2 mRNA seviyesini LPS kontrol grubuna kıyasla % 73 ve % 87 oranlarında baskılamıştır. Apigeninin 25  $\mu\text{M}$  dozunda COX-2 mRNA seviyesini LPS kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken, 50  $\mu\text{M}$  seviyede % 31 oranında baskılama bulunmuştur. Luteolin ise COX-2 mRNA seviyesini her iki dozda da LPS kontrol seviyesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir seviyede 25  $\mu\text{M}$ ’da % 31, 50  $\mu\text{M}$  için ise % 65 seviyesinde baskılamıştır ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.13. Farklı dozlarda uygulanan E6 fraksiyonu ile apigenin ve luteolin maddelerinin LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında COX-2 enziminin gen ekspresyonu üzerine etkileri. Ktrl: Ktrl-LPS (-), Ktrl: Ktrl-LPS (+), E6 fraksiyonu ile apigenin ve luteolin maddelerinin sırasıyla 25  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  ve 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  dozları. E6 fraksiyonu, apigenin ve luteolin maddeleri ile LPS eş zamanlı uygulanmıştır. Ktrl-LPS (+) grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. Ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilen değerler, 9 tekrarlı (3 kuyucuk X 3 biyolojik) olarak elde edilmiştir. \*Ktrl-LPS (+) grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ )

Şekil 4.14’de görüldüğü gibi yapılan analizler sonucunda E6 fraksiyonu 25 ve 50  $\mu\text{g/mL}$  dozlarında IL-1 $\beta$  mRNA seviyesini LPS kontrol grubuna kıyasla % 64 ve % 85

oranlarında baskılamıştır. Apigenin 25 ve 50  $\mu\text{M}$  dozlarda IL-1 $\beta$  mRNA seviyesini LPS kontrol grubuna kıyasla % 14 ve % 50 oranlarında baskılamıştır. Luteolin ise IL-1 $\beta$  mRNA seviyesini her iki dozda da LPS kontrol seviyesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir seviyede 25  $\mu\text{M}$  için % 48, 50  $\mu\text{M}$  için ise % 72 seviyesinde baskılamıştır ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.14. Farklı dozlarda uygulanan E6 fraksiyonu ile apigenin ve luteolin maddelerinin LPS ile RAW 264.7 makrofajlarında IL-1 $\beta$ ' nın gen ekspresyonu üzerine etkileri. Ktrl: Ktrl-LPS (-), Ktrl: Ktrl-LPS (+), E6 fraksiyonu ile apigenin ve luteolin maddelerinin sırasıyla 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  ve 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  dozları. E6 fraksiyonu, apigenin ve luteolin maddeleri ile LPS eş zamanlı uygulanmıştır. Ktrl-LPS (+) grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. Ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilen değerler, 9 tekrarlı (3 kuyucuk X 3 biyolojik) olarak elde edilmiştir. \*Ktrl-LPS (+) grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ )

## 4.2. Tartışma

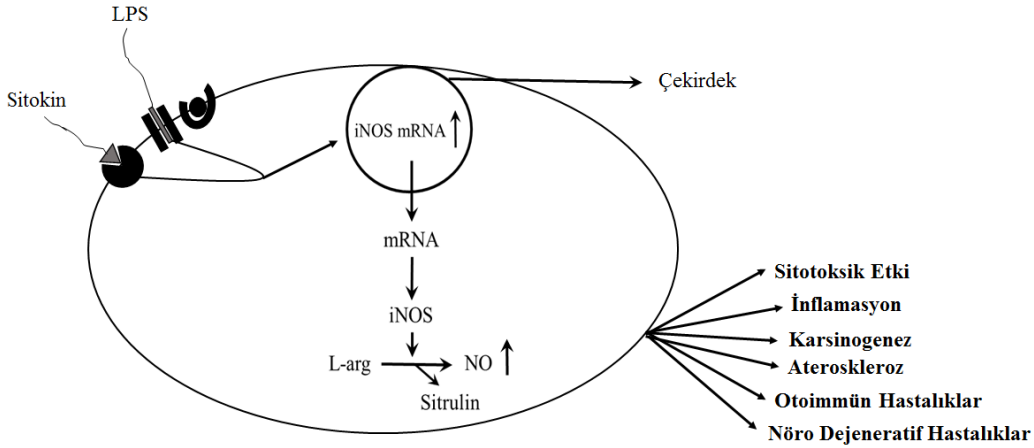
İnflamasyon, enfeksiyon ve doku hasarına karşı hücrese düzeyde oluşan güçlü fizyolojik ve patolojik bir cevaptır. Obezite, insülin direnci, metabolik sendrom ve ilerleyen dönemlerde görülen tip 2 diyabet, kanser gibi çeşitli hastalıkların başlama ve ilerleme süreçlerinde kronik düşük seviyeli inflamasyon kritik rol oynar (Fujihara ve ark., 2003). Bahsedilen hastalıkların birlikte gelişmesi ve görülme oranı oldukça yüksektir ve temelde hepsi kronik inflamasyon ile neden-sonuç kapsamında ilişkilidir. Çok etkenli hastalıklar olan tüm bu hastalıkların tedavilerindeki güncel yaklaşım çok hedefli tek bir etken molekülün geliştirilmesidir. Şu an piyasada bahsedilen hastalıkların tedavisinde

kullanılan ilaçların birçoğu, tek bir molekül ya da yolak üzerinde hedeflenen etkiyi sağlamaktadır. Bu bakımdan tedavi süresince birçoğunun etkisi ilişkili mekanizmalarda yetersiz kalmaktadır. İlaç endüstrisinde bu sorun hedeflenen birden fazla mekanizma ya da molekül üzerinde etki sağlayan birden fazla ilacın aynı anda kullanılmasıyla çözülmüş gibi görünse de, bu durum pek çok olumsuz durumla ilişkilidir. Bu nedenle, ilaç endüstrisinde düşük yan etkili, çoklu-hedef terapötik bileşiklerin araştırılmasıyla ilgili çalışmalar oldukça yoğun şekilde devam etmektedir. Yapılan birçok araştırma sonucunda, bitkilerden saflaştırılan doğal kökenli bileşiklerin vücutta doğal olarak birden fazla mekanizma üzerine etki göstererek çok yönlü (çoklu-hedef) biyoaktiviteye sahip olduklarını ortaya konmuştur. Bu nedenle, 1950'li yıllardan itibaren sentetik etken madde geliştirmeye yönelik çalışmalar yapan ilaç endüstrisi, 2000'li yıllarda tekrar doğal kaynaklı bileşiklere yönelmiştir. Yapılan araştırmalarla bitkisel kökenli doğal bileşiklerin tanımlanması ve çoklu-hedefli etken moleküllerin ortaya konması, yeni nesil terapötiklerin ve diyetel takviye ürünlerinin geliştirilebilmesi için önemlidir.

Bu tez çalışmasında RAW 264.7 makrofaj hücre hattında inflamasyon modeli oluşturmak amacıyla lipopolisakkarit (LPS) kullanılmıştır. LPS, gram negatif bakterilerin dış hücre zarında bulunan bir çeşit polisakkarit ve makrofajları aktive edebildiğinden, inflamasyon modeli oluşturulması amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. LPS ile indüklenen makrofaj hücrelerinden salınan sitokin, kemokin, prostaglandin, lizozim, proteaz, NO ve eikazonoidlerin inflamatuvar yanıtta merkezi rol oynadığı bilinmektedir (Rhee ve Hwang, 2000; Qi ve Shelhamer, 2005). LPS, doğal bağışıklık sistemi hücrelerinin yüzeyindeki CD14 Toll-benzeri reseptör 4 (TL-4) kompleksine bağlanarak inflamatuvar süreci tetiklemektedir. Yapılan in vivo bir çalışmada, yüksek yağlı diyet ile beslenme sonucu meydana gelen metabolik bozuklukların, LPS'nin subkutanöz infuzyonu sonucunda da görüldüğü rapor edilmiştir (Musso ve ark., 2010). Bu bakımdan, LPS ile yapılan son çalışmada, hem akut hem de düşük seviyeli kronik inflamatuvar yanıtı indüklemesi nedeniyle sahip olduğu bu çift yönlü etkisinden dolayı genellikle tercih edilmekte ve başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Musso ve ark., 2010, Grace ve ark., 2014).

İnflamasyon sürecinde hasarlı dokularda üretilen aşırı NO üretiminden makrofaj kökenli iNOS enzimi sorumludur. RAW 264.7 makrofojları LPS ile indüklendiğinde, iNOS ekspresyonunda ve NO sentezinde artışa neden olur (Stuehr ve Marletta, 1987) (Şekil 4.15). iNOS tarafından aşırı miktarda üretilen NO, karsinogenez, ateroskleroz,

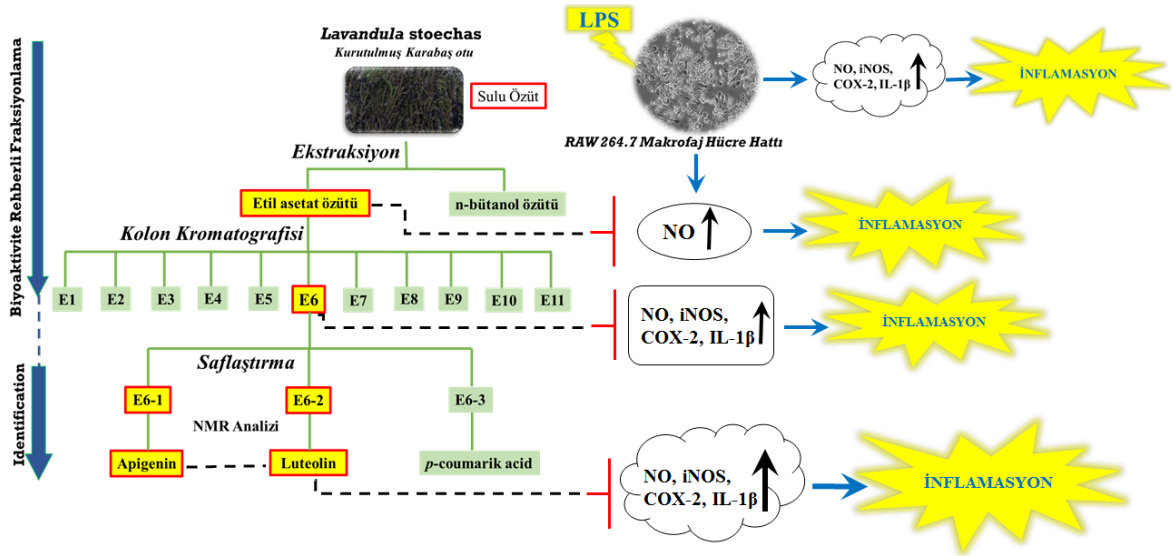
otoimmün hastalıklar, astım, artirit, multiple skleroz, kolit, nörodejeneratif hastalıklar, tümör gelişimi ve septik şok gibi pek çok patolojik süreçte merkezi rol oynar.



Şekil 4.15. iNOS aracılı NO sentezi ve etkileri (Türköz, 2001' den uyarlanmıştır)

iNOS inhibitörlerinin, osteoartrit (Pelletier ve ark., 1998), periodontitis (Lohinai, 1998), deneysel otoimmün miyokardit (Shin, 1998), multiple skleroz (Hua ve ark., 1998) ve septik şok (Levy ve ark., 1999) gibi hastalıkların patolojisinde olumlu rol oynadığı gösterilmiştir. Bu bakımdan, iNOS protein sentezinin baskılanması veya enzim aktivitesinin inhibisyonu pek çok hastalığın tedavisinde önemli yer tutmaktadır (Xie ve Nathan, 1994; Titheradge, 1999; Ahn ve ark., 2005). Geçtiğimiz bir kaç yıl içerisinde yapılan çalışmalar iNOS, enziminin inflamasyonun yanında kanserin önlenmesinde ve tedavisinde de önemli moleküler hedefler olduklarını ve seçici iNOS inhibitörlerinin ikincil antikarsinojenik etkilere sahip olduklarını göstermiştir. iNOS enzimi normal şartlarda, sağlıklı dokularda ifade edilmezken meme (Thomsen ve ark., 1995), beyin (Cobbs ve ark., 1995), akciğer (Masri ve ark., 2005), prostat (Klotz ve ark., 1998), kolon (Lagares-Garcia ve ark., 2001) ve pankreas (Hajri ve ark., 1998) kanserlerinde yüksek seviyede ifade edilmekte ve bu hastaların 5 yıllık yaşama oranı enzim ifadesi daha düşük olan bireylere kıyasla önemli ölçüde azalmaktadır (Aaltoma ve ark., 2001; Granados-Principal ve ark., 2015). 2015 yılında spesifik iNOS inhibitörlerinin meme kanserinde tümör gelişimini ve akciğer metastazını ve tümörün kendini yenileme kapasitesini önemli ölçüde baskıladığı gösterilmiştir (Aaltoma ve ark., 2001; Granados-Principal ve ark., 2015).

Halk arasında Karabaş otu olarak bilinen *Lavandula stoechas* bitkisinin ülkemizde ve dünyada geleneksel tedavi amaçlı tıbbi bitki olarak, farklı alanlarda ve farklı şekillerde kullanılmaktadır. Ülkemizdeki kullanımı suda kaynatma ve demleme yöntemine dayanmaktadır. Özellikle sulu özütünün inflamasyon gelişiminde ana faktörleri; hafifletmeye veya ortadan kaldırmaya aday “etkin moleküller” içerdiğini düşündürmektedir. Bu çalışmada ülkemizde diyabet, obezite, yüksek tansiyon ve yüksek kolesterole karşı geleneksel tedavi amaçlı yaygın bir şekilde kullanılan Karabaş otu (*Lavandula stoechas*) bitkisinin sulu özütünde yer alan anti-inflamatuar özellikte aktif fitokimyasal bileşenlerin tanımlanması, potansiyel iyileştirici etkilerinin ve moleküler mekanizmalarının belirli bir düzeyde aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak Karabaş otunun sulu demlemesiyle elde ettiğimiz özütten biyoaktivite rehberli fraksiyonlama yöntemiyle 11 tane fraksiyon ayrıştırılmıştır (Şekil 4.16). Bu fraksiyonlardan en aktif fraksiyonu belirlemek için bir dizi tarama çalışmaları yapılmıştır. İlk olarak bu fraksiyonlar, LPS ile indüklenerek inflamasyon modeli oluşturulan RAW 264.7 makrofajlarına uygulandı ve sitotoksik olmayan uygulama dozları belirlenmiştir. Sonrasında bu fraksiyonların toksik olmayan dozlarının, inflamatuvar bir marker olan NO üretimi üzerine etkileri belirlenmiştir. NO üretimini önemli derecede inhibe eden en etkin fraksiyon belirlendikten sonra saflaştırma işlemleri ile *p*-kumarik asit, apigenin ve luteolin maddeleri elde edilmiştir. Bu maddeler, fenolik bileşikler grubundan flavonoidler sınıfının alt ünitesi olan flavon yapısındadırlar. Elde edilen bu saf maddelerin kütle spektrometresi ve NMR analizi ile yapıları aydınlatılmıştır. Sonrasında bu maddelerin biyoaktivitelerinin ortaya çıkarılmasıyla ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.16. *Lavandula stoechas* bitkisinin biyoaktivite rehberli fraksiyonlanması

Belirlenen bu saf maddelerden ilk olarak *p*-kumarik asitin toksik olmayan uygulama dozlarını belirlemek amacıyla RAW 264.7 makrofajlarında, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M olmak üzere 3 farklı dozu ile LPS (1  $\mu$ g/mL) uygulaması yapılmıştır. Her üç dozda da *p*-kumarik asitin hücre canlılığına etkisi % 80'nin üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra, bu maddenin NO üretimi üzerine etkisini belirlemek için LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında toksik olmayan 10, 25 ve 50  $\mu$ M dozları uygulanmıştır. *p*-Kumarik asit, NO seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon göstermemiştir. Saflaştırma ve biyoaktivite rehberli çalışmalarla elde ettiğimiz sonuçlar literatürde var olan hem ticari hem de bitkilerden elde edilmiş sonuçları desteklemektedir. Örneğin; *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf bitkisinden elde edilen *p*-kumarik asit maddesi LPS ile indüklenerek inflamasyon modeli oluşturulan RAW 264.7 makrofajlarında NO üretimi üzerine herhangi bir inhibisyon göstermemiştir (Huang ve ark., 2009).

Elde ettiğimiz diğer bir saf madde olan apigeninin toksik olmayan uygulama dozlarını belirlemek için LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında MTT testi ile hücre canlılığı ölçümü yapılmıştır. Bu ölçüm için hücelere, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M olmak üzere 3 farklı dozu ile LPS (1  $\mu$ g/mL) uygulaması yapılmıştır. Çalışmalar sonunda RAW 264.7 makrofaj hücre hattında apigenin'nin tüm dozlarında hücre canlılığının % 80 ve üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Toksik olmayan uygulama dozlarını belirledikten sonra apigenin'nin inflamatuvar bir marker olan NO üretimi üzerine etkisini belirlemek için LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında 10, 25, 50 ve 100  $\mu$ M dozlarında ortama



salınan NO seviyesini LPS kontrol grubuna kıyasla sırasıyla, % 7, % 22, % 66 ve % 124 oranlarında doza bağımlı bir şekilde azaltmıştır ( $p<0,05$ ). Çizelge 4.1’de gösterildiği gibi apigeninin uygulanan dozlarından NO üretimi üzerine LPS kontrol grubuna kıyasla maksimum inhibisyonu % 124 oranında 100  $\mu\text{M}$  dozda göstermiştir. Aynı dozda LPS kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığının % 92 oranında olduğu saptanmıştır. Etkinliği belirlenen apigeninin NO seviyesi üzerine % 50 inhibisyon gösteren dozu (IC50) belirlemek için çalışmalar yapılmıştır. Buna göre apigenin 10 ila 50  $\mu\text{M}$  arasında değişen 7 farklı dozda makrofaj hücrelerine uygulanmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda apigeninin NO inhibisyonu için IC50 değeri 56  $\mu\text{M}$  olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1). LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında meydana gelen NO üretimindeki artış iNOS enziminin ekspresyonunun artmasıyla mümkün olmaktadır (Chan, 1995). iNOS enziminin ekspresyonu, transkripsiyonel, posttranskripsiyonel, translasyonel ve posttranslasyonel seviyelerde regüle edilebilmektedir (Galea ve Feinstein, 1999). Bu çalışmada iNOS enzimi transkripsiyonel seviyede regüle edilmektedir. NO tarama testlerinde aktif olduğu bulunan apigeninin 25 ve 50  $\mu\text{M}$  dozlarının iNOS enziminin protein seviyesi üzerine etkileri değerlendirildiğinde, 25  $\mu\text{M}$  dozu iNOS protein seviyesinde LPS kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişim yaratmazken, 50  $\mu\text{M}$  dozunun % 94 oranında istatistiksel olarak anlamlı derecede baskıladığı görülmüştür ( $p<0,05$ ). NO tarama testlerinde aktif olduğu bulunan apigeninin iNOS enzimi, COX-2 ve IL-1 $\beta$ ’nın mRNA seviyeleri üzerine etkilerini ortaya koymak üzere Real-time PCR analizleri yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda apigenin 25 ve 50  $\mu\text{M}$  dozlarında iNOS mRNA seviyesini LPS kontrol grubuna kıyasla % 21 ve % 80 oranlarında baskılamıştır ( $p<0,05$ ).

Apigeninin 25  $\mu\text{M}$  dozunda COX-2 mRNA seviyesini LPS kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Apigenin 50  $\mu\text{M}$  dozda ise COX-2 mRNA seviyesini LPS kontrol grubuna kıyasla % 31 oranında baskılamıştır ( $p<0,05$ ). Apigenin 25 ve 50  $\mu\text{M}$  dozlarında IL-1 $\beta$  mRNA seviyesini LPS kontrol grubuna kıyasla % 14 ve % 50 oranlarında baskılamıştır ( $p<0,05$ ). Saflaştırma ve biyoaktivite rehberli çalışmalarla elde ettiğimiz sonuçlar literatürde var olan hem ticari hem de bitkilerden elde edilmiş sonuçları desteklemektedir. Örneğin, ticari olarak satın alınan apigenin maddesinin LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarına uygulaması sonrasında, NO üretimini ve aynı zamanda önemli inflamatuvar markerlardan iNOS ve COX-2 enzimlerinin protein ve mRNA seviyelerini güçlü bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür (Liang ve ark., 1999; Choi

ve ark., 2014). Bir başka çalışmada, *Crotalaria pallida* bitkisinden izole edilen apigenin LPS ile indüklenerek inflamasyon modeli oluşturulan RAW 264.7 makrofajlarında NO salınımını büyük ölçüde inhibe etmiştir (Ko ve ark., 2004). In vivo bir çalışmada ise, hem apigenin hem de luteolinin tip 2 diyabet modeli oluşturulan sıçanlarda, oksidatif stres ve inflamasyonu azaltarak yağ ve glukoz metabolizmasını iyileştirmesinin yanı sıra, endotelial fonksiyon bozukluğunu da en aza indirdiği rapor edilmiştir (Ren ve ark., 2015).

Çizelge 4.1. Biyoaktivite rehberli fraksiyonlama ve saflaştırma yöntemiyle elde edilen apigenin ve luteolin maddelerinin LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında NO üretimi üzerine IC50 değerleri

	NO Üretimi				IC50 NO Üretimi		
	Doz ( $\mu\text{g/mL}$ )	Doz ( $\mu\text{M}$ )	Max İnhibisyon	MTT	Doz ( $\mu\text{g/mL}$ )	Doz ( $\mu\text{M}$ )	MTT
<b>Apigenin</b>	27	100	% 124	% 92	13,5	56	% 94
<b>Luteolin</b>	28,6	100	% 120	% 91	7,4	26	% 98

Elde ettiğimiz diğer bir saf madde olan luteolinin toksik olmayan uygulama dozlarını belirlemek için LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında MTT testi ile hücre canlılığı ölçümü yapılmıştır. Bu ölçüm için hücrelere, 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  ve 100  $\mu\text{M}$  olmak üzere 3 farklı dozu ile LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) uygulaması yapıldı ve çalışmalar sonunda RAW 264.7 makrofaj hücre hattında luteolinin tüm dozlarında hücre canlılığının % 80 ve üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Luteolinin inflamatuvar bir marker olan NO üretimi üzerine etkisini belirlemek için LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında 10, 25, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  dozları ortama salınan NO seviyesini LPS kontrol grubuna kıyasla baskılama oranları 10 ve 25  $\mu\text{M}$ 'da % 19 ve % 38 olarak bulunurken, 50  $\mu\text{M}$ 'da % 80'e ve 100  $\mu\text{M}$ 'da ise bu oran % 120'ye yükselmiştir. Çizelge 4.1'de gösterildiği gibi luteolinin uygulanan dozlarından NO üretimi üzerine LPS kontrol grubuna kıyasla maksimum inhibisyonu % 120 oranında 100  $\mu\text{M}$  dozda göstermiştir. Aynı dozda LPS kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığının % 91 oranında olduğu saptanmıştır. Etkinliği belirlenen luteolinin NO seviyesi üzerine % 50 inhibisyon gösteren dozu (IC50) belirlemek için çalışmalar yapılmıştır. Buna göre luteolin 10 ila 50  $\mu\text{M}$  arasında değişen 8 farklı dozda makrofaj hücrelerine uygulanmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda luteolinin NO inhibisyonu için IC50

değeri 26  $\mu\text{M}$  olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1). NO tarama testlerinde aktif olduğu bulunan luteolinin 25 ve 50  $\mu\text{M}$  dozlarının iNOS enziminin protein seviyesi üzerine etkileri değerlendirildiğinde, iNOS protein seviyesini her iki dozda da LPS kontrol seviyesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir seviyede 25  $\mu\text{M}$  için % 30, 50  $\mu\text{M}$  için ise % 99 oranında baskılamıştır ( $p<0,05$ ). NO tarama testlerinde aktif olduğu bulunan luteolinin iNOS enzimi, COX-2 ve IL-1 $\beta$ 'nın mRNA seviyeleri üzerine etkilerini ortaya koymak üzere Gerçek Zamanlı PCR analizleri yapılmıştır. NO üretimi üzerine etkinlik gösteren iki dozda 25 ve 50  $\mu\text{M}$ 'da uygulanmıştır.

Luteolin iNOS mRNA seviyesini her iki dozda da LPS kontrol seviyesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir seviyede 25  $\mu\text{M}$ 'da % 45, 50  $\mu\text{M}$  için ise % 92 seviyesinde baskılamıştır ( $p<0,05$ ). Luteolin COX-2 mRNA seviyesini her iki dozda da LPS kontrol seviyesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir seviyede 25  $\mu\text{M}$ 'da % 31, 50  $\mu\text{M}$  için % 65 seviyesinde baskılamıştır ( $p<0,05$ ). Luteolin IL-1 $\beta$  mRNA seviyesini her iki dozda da LPS kontrol seviyesine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir seviyede 25  $\mu\text{M}$ 'da % 48, 50  $\mu\text{M}$  için % 72 seviyesinde baskılamıştır ( $p<0,05$ ). Yaptığımız çalışmalar doğrultusunda elde ettiğimiz veriler literatürde bulunan sonuçları desteklemektedir. Örneğin, *Ixeris dentata* (ID), *Ixeris dentata* var. albiflora (IDA) ve *Ixeris sonchifolia* (IS) bitkilerinden elde edilen luteolin maddesi LPS ile indüklenen RAW 264.7 makrofajlarında NO üretimini önemli ölçüde baskılamıştır. Ayrıca luteolin, iNOS enziminin protein seviyesi üzerine güçlü bir inhibisyon göstermiştir (Karki ve ark., 2015). Ticari olarak satın alınmış luteolin maddesi LPS ile indüklenen RAW 264.7 hücre hattında NO üretimini ve iNOS enziminin protein seviyesi üzerine güçlü bir şekilde baskılama göstermiştir (Choi ve ark., 2014). Bu etkiler luteolini potansiyel anti-inflamatuar ajan olduğunu göstermektedir. Bir diğer çalışmada, luteolinin hem in vitro hem de in vivo'da TNF- $\alpha$  ile indüklenmiş vasküler inflamasyon modellerinde, NF- $\kappa\text{B}$  aracılı yolağın inhibisyonunu sağlayarak koruyucu olabileceği rapor edilmiştir (Jia ve ark., 2015).

Tez çalışması kapsamında ortaya konulan tüm veriler dikkate alındığında, Karabaş otundan biyoaktivite rehberli fraksiyonlama yöntemiyle elde edilen saf maddelerin LPS ile indüklenerek inflamasyon modeli oluşturulan RAW 264.7 makrofajları üzerine anti-inflamatuar etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Bu tez çalışmasında elde edilen veriler, *Lavandula stoechas*'dan elde edilen fenolik bileşiklere ait flavanoidlerin alt sınıfı olan flavonların (apigenin ve luteolin), erken inflamasyon sürecinde moleküler seviyede etkili olduklarını, bu bakımdan koruyucu ve tedavi edici olarak kullanabileceklerini göstermiştir.

## BÖLÜM 5

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada, Karabaş otunun (*Lavandula stoechas*)sulu özütünden elde edilen EA ve n-bütanol özütlerinin toksik olmayan uygulama dozlarının, LPS ile indüklenerek inflamasyon modeli oluşturulan RAW 264.7 makrofajlarına uygulanması sonucunda önemli bir inflamatuvar marker olan NO'nun üretimi büyük ölçüde baskılanmıştır. Bu sonuç doğrultusunda, % 50'nin üzerinde inhibisyon gösteren etkin özüt olarak EAözütü belirlenmiştir. Belirlenen bu özüt kolon kromatografisiyle 11 adet fraksiyona ayrıştırılmıştır. Ayrıştırılan 11 adet fraksiyonun tek dozda, LPS ile inflamasyon oluşturulan RAW 264.7 makrofajlarında NO seviyeleri ölçülmüştür ve etkin fraksiyon olarak E6 fraksiyonu seçilmiştir. NO inhibisyonu üzerine yapılan biyoaktivite rehberli tarama sonucunda belirlenen E6 fraksiyonun saflaştırma işlemi yapılarak apigenin, luteolin ve *p*-kumarik asit bileşikleri elde edilmiştir. Belirlenen saf bileşiklerin NO üretimi üzerine % 50 inhibisyon gösteren dozunu belirlemek için IC50 değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen saf bileşiklerin NO inhibisyonunda etkin olduğu belirlenen toksik olmayan dozları, NO üretiminde görevli iNOS protein ve gen seviyesinde anlamlı derecede baskılama göstermiştir. Ayrıca, saf bileşiklerin inflamatuvar yanıtta anahtar rol oynayan COX-2 ve IL-1 $\beta$  moleküllerinin gen ekspresyonları üzerine anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Tüm bu protein ve gen ekspresyon çalışmalarına saf bileşiklerin elde edildiği fraksiyon olan E6 fraksiyonu da dahil edilmiştir.

Çalışma sonucunda, *Lavandula stoechas*-Karabaş otu bitkisinin sulu özütünde var olan inflamasyona karşı etkili aktif fitokimyasal bileşenler biyoaktivite rehberli çalışmalarla tanımlanmıştır. Bu aktif bileşenlerin potansiyel iyileştirici etki mekanizmaları moleküler düzeyde kısmi olarak aydınlatılmıştır. Tüm bu hastalıkların birlikte gelişmesi ve görülme oranı oldukça yüksektir ve temelde hepsi kronik inflamasyon ile neden-sonuç kapsamında ilişkilidir. Bu nedenle tüm bu metabolik hastalıklara karşı anti-inflamatuvar potansiyeli yüksek bitkisel kökenli maddelerin inflamatuvar markerler üzerine etkilerinin ortaya koyulması, ileri in vivo ve klinik çalışmaların gerçekleştirilmesine ışık tutmaktadır. Apigenin ve luteolin içeriğine göre standardize edilmiş Karabaş otu özütü inflamatuvar hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde kullanılabilecek potansiyel bir tamamlayıcı ve/veya alternatif yaklaşım olabilir. Ancak bu yaklaşım in vivo çalışmalarla desteklenmelidir.

## KAYNAKLAR

Ahn K.S., Noh E.J., Zhao H.L., 2005. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase II by platycodon grandiflorum saponins via suppression of nuclear factor-kappa B activation in RAW 264.7 cells. *Life Sci.* 76: 2315–2328.

Aktan F., 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences.* 75: 639–653.

Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G., 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357 (3): 593-615.

Andersohn F., Suissa S., Garbe E., 2006. Use of first- and second-generation cyclooxygenase-2-selective nonsteroidal antiinflammatory drugs and risk of acute myocardial infarction. *Circulation.* 113 (16): 1950-1957.

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

Bao B., Wang Z., Li Y., Kong D., Ali S., Banerjee S., Ahmad A., Sarkar F.H., 2011. The complexities of obesity, diabetes, and the development and progression of pancreatic cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1815 (2): 135–146.

Bulut G.E., 2008. Bayramiç (Çanakkale) yöresinde etnobotanik araştırmalar. Marmara Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Farmasötik Botanik Anabilim Dalı.

Cavanagh H.M., Wilkinson J.M., 2002. Biological activities of lavender essential oil. *Phytotherapy Research.* 16 (4): 301-308.

Cefalu T.W., Ye J., Zuberi A., Ribnicky D.M., Raskin I., Liu Z., Wang Z.Q., Brantley P.J., Howard L., Lefevre M., 2008. Botanicals and the metabolic syndrome. *Am. J. Clin. Nutr.* 87 (2): 481S–487S.

Chan M.M., 1995. Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical. *Biochem. Pharmacol.* 49 (11): 1551-1556.

Chan M.M., Ho C.T., Huang H., 1995. Effects of three dietary phytochemicals from tea, rosemary and turmeric on inflammation-induced nitrite production. *Cancer Lett.* 96: 23-29.

Cheng D.M., Kuhn P., Poulev A., Rojo L.E., Lila M.A., Raskin I., 2010. In vivo and in vitro antidiabetic effects of aqueous cinnamon extract and cinnamon polyphenol-enhanced food matrix. *Food Chem.* 135(4): 2994-3002.

Choi W.S., Seo Y.B., Shin P.G., Kim W.Y., Lee S.Y., Choi Y.J., Kim G.D., 2014. Veratric acid inhibits iNOS expression through the regulation of PI3K activation and histone acetylation in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *International Journal Of Molecular Medicine*, 35: 202-210.

Chu C.J., Kemper K.J., 2001. Lavender (*Lavandula* spp.), <http://www.longwoodherbal.org/lavender/lavender.pdf>.

Coleman W.B., Tsongalis G.J., 2010. Academic Press, 16.

Der Marderosian A., Beutler J.A., 2002. *The Review of Natural Products*, 2nd ed.; Facts and Comparisons; Seattle, WA, USA, 13–43.

Dinarello C.A., 2011. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 117 (14): 3720–3732.

Ertuğ F., 2002. 'Bodrum Yöresinde Halk Tıbbında Yararlanılan Bitkiler', *Bitkisel Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiriler*, ISBN 975-94077-2-8.

Farivar-Mohseni H., Kandzari S.J., Zaslau S., Riggs D.R., Jackson B.J., McFadden D.W., 2004. Synergistic effects of Cox-1 and -2 inhibition on bladder and prostate cancer in vitro. *Am. J. Surg.* 188 (5): 505-510.

Fehsel K., Jalowy A., Qi S., Burkart V., Hartmann B., Kolb H., 1993. Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide. *Diabetes*. 42: 496–500.

Fitzgerald G.A., 2004. Coxibs and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 351 (17): 1709-1711.

Fujihara M., Murog M., Tanamoto K., 2003. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther.* 100: 171–194.

Galea E., Feinstein D., 1999. Regulation of the expression of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by cyclic AMP. *The FASEB Journal*. 13: 2125-2137.

Gamez M.J., Jiménez J., Risco S., Zarzuelo A., 1987. Hypoglycemic activity in various species of the genus *Lavandula*. Part 1: *Lavandula stoechas* L. and *Lavandula multifida* L. *Pharmazie*. 42 (10): 706-707.

Gee J.R., Montoya R.G., Khaled H.M., Sabichi A.L., Grossman H.B., 2003. Cytokeratin 20, AN43, PGDH, and COX-2 expression in transitional and squamous cell carcinoma of the bladder. *Urol. Oncol.* 21 (4): 266-270.

Gorren A.C., Mayer B., 1998. The versatile and complex enzymology of nitric oxide synthase. *Biochemistry (Mosc)*. 63 (7): 734-743.

Grace M.H., Yousef G.G., Esposito D., Raskin I., Lila M.A., 2014. Bioactive capacity, sensory properties, and nutritional analysis of a shelf stable protein-rich functional ingredient with concentrated fruit and vegetable phytoactives. *Plant Foods Hum. Nutr.* 69: 372-378

Graham D.J., 2006. COX-2 Inhibitors, Other NSAIDs, and Cardiovascular Risk: The Seduction of Common Sense. *JAMA*. 296 (13): 1653-1656.

Griess P., 1879. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH Weselsky und Benedikt Ueber einige Azoverbindungen, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 12: 426–428.

Hamdy N.A., Gamal-Eldeen A.M., 2009. New pyridone, thioxopyridine, pyrazolopyridine and pyridine derivatives that modulate inflammatory mediators in stimulated RAW 264.7 murine macrophage. *Eur. J. Med. Chem.* 44 (11): 4547-4556.

Hobbs A.J., Higgs A., Moncada S., 1999. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 191-220.

Hotamisligil G.S., Erbay E., 2008. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 8 (12) : 923.

Hua L.L., Liu J.S., Brosnan C.F., Lee S.C., 1998. Selective inhibition of human glial inducible nitric oxide synthase by interferon beta: implications for multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 43: 384-387.

Hummasti S., Hotamisligil G.S., 2010. Endoplasmic Reticulum Stress and Inflammation in Obesity and Diabetes. *Circ. Res.* 107 (5): 579-591.

Jia Z., Nallasamy P., Liu D., Shah H., Li JZ., Chitrakar R., Si H., McCormick J., Zhu H., Zhen W., Li Y., 2015. Luteolin protects against vascular inflammation in mice and TNF- $\alpha$  induced monocyte adhesion to endothelial cells via suppressing I $\kappa$ B $\alpha$ /NF $\kappa$ B signaling pathway. *J Nutr Biochem.* 26 (3): 293-302.

Katiyar C., Gupta A., Kanjilal S., Katiyar S., 2012. Drug discovery from plant sources: An integrated approach. *An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda.* 33 (1): 10–19.

Klein R.D., Pelt C.S.V., Sabichi A.L., Cerda J.D., Fischer S.M., Fürstenberger G., Müller-Decker K., 2005. Transitional Cell Hyperplasia and Carcinomas in Urinary Bladders of Transgenic Mice with Keratin 5 Promoter-Driven Cyclooxygenase-2 Overexpression. *Cancer. Res.* 65 (5): 1808-1813.

Kyhse-Anderson J., 1984. Electroblothing of Multiple Gels. A Simple Apparatus Without Buffer Tank for Rapid Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 10: 203-209.

Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680–684.

Leporatti M.L., Ghedira K., 2009. Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine.* 5: 31.

Levy B., Valtier M., De Chgllou C., Bollaert P.E., Cane D., Mallie J.P., 1999. Beneficial effects of L-canavanine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, on lactate metabolism and muscle high energy phosphates during endotoxic shock in rats. *Shock.* 11: 98-103.

Macarthur M., Hold G.L., El-Omar E.M., 2004. Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286 (4): G515-G520.

MacMicking J., Xie Q.W., Nathan C., 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 323-350.



Maroon J.C., Bost J.W., Maroon A., 2010. Natural anti-inflammatory agents for pain relief. *Surg. Neurol. Int.* 1: 80.

Mishra B.B., Tiwari V.K., 2011. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *Eur. J. Med. Chem.* 46 (10): 4769–4807.

Mix K.S., Mengshol J.A., Benbow U., Vincenti M.P., Sporn M.B., Brinckerhoff C.E., 2001. A synthetic triterpenoid selectively inhibits the induction of matrix metalloproteinases 1 and 13 by inflammatory cytokines. *Arthritis Rheum*, 44 (5): 1096-1104.

Mosmann T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65 (1-2): 55-63.

Nathan C.F., Hibbs J.B., 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol.* 3: 65–70.

Newman D.J., Cragg G.M., 2007. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.* 70 (3): 461-477.

Newman D.J., Cragg G.M., 2012. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75 (3): 311–335.

Nguyen P.H., Zhao B.T., Lee J.H., Kim Y.H., Min B.S., Woo M.H., 2015. Isolation of benzoic and cinnamic acid derivatives from the grains of *Sorghum bicolor* and their inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells. *Food Chemistry.* 168, 512–519.

Onar S., 2006. Bandırma (al(a), Balıkesir) ve Çevresinin Etnobotaniği. (Yüksek Lisans Tezi), Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Pattnaik S., Subramanyam V.R., Bapaji M., Kole C.R., 1997. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios.* 89 (358): 39-46.

Pelletier J.P., Jovanovic D., Fernandes J.C., Manning P., Connor J.R., Currie M. G., Battista J.A., Martel-Pelletier J., 1998. Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis and Rheumatism.* 41: 1275-1286.

Pungle P., Banavalikar M., Suthar A., Biyani M., Mengi S., 2003. Immunomodulatory activity of boswellic acids of *Boswellia serrata* Roxb. *Indian J. Exp. Biol.* 41 (12): 1460-1462.

Qi H.Y., Shelhamer J.H., 2005. Toll-like receptor 4 signaling regulates cytosolic phospholipase A2 activation and lipid generation in LPS-stimulated macrophages. *J Biol Chem.* 280: 38969–38975.

Rang H.P., Dale M.M., 2012. Rang and Dale's pharmacology Edinburgh : Elsevier Churchill Livingstone, 16.

Ren B., Qin W., Wu F., Wang S., Pan C., Wang L., Zeng B., Ma S., Liang J., 2016. Apigenin and naringenin regulate glucose and lipid metabolism, and ameliorate vascular dysfunction in type 2 diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 773: 13-23.

Rhee S.H., Hwang D., 2000. Murine Toll-like receptor 4 confers lipopolysaccharide responsiveness as determined by activation of NF kappa B and expression of the inducible cyclooxygenase. *J Biol Chem.* 275: 34035–34040.

Sarıkan I., 2007. .Kazdağları Yöresinin Geleneksel İlaçlarının Saptanması. Ege Üniversitesi Farmakognozi Programı.

Seibert K., Masferrer J.L., 1994. Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation. *Receptor.* 4 (1): 17-23.

Shin T., Tanuma N., Kim S., Jin J., Moon C., Kim K., Kohyama K., Matsumoto Y., Hyun B., 1998. An inhibitor of inducible nitric oxide synthase ameliorates experimental autoimmune myocarditis in Lewis rat. *Journal of Neuroimmunology.* 92: 133-138.

Singleton V., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144–158

Stuehr D.J., Marletta M.A., 1987. Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines, *Cancer Res.* 47: 5590-5594.

Stuehr D.J., Kwon N.S., Nathan C.F., Griffith O.W., Feldman P.L., Wiseman J., 1991. N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J. Biol. Chem.* 266 (10): 6259-6263.

Tahraoui A., El-Hilaly J., Israili Z.H., Lyoussi B., 2007. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). *Journal of Ethnopharmacology*. 110 (1): 105-117.

Tedesco D., Haragsim L., 2012. Cyclosporine: A Review. *J. Transplant*. 2012: 230386.

Tovey E.R., Baldo B.A., 1987. Comparison of Semidry and Conventional Tank Buffer Electrotransfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Membranes. *Electrophoresis*. 8: 384-387.

Tuzlacı E., 2002. Datça Yarımadası (Muğla), Florası bu Yörede Halkın Yararlandığı Bitkiler Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir, ISBN 975-94077-2-8.

Upton T.M., Grayer R., Greenham J.R., Williams C., Al-Ghamdi F., Chen F., 2000. Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 28 (10): 991-1007.

Valcic S., Timmermann B.N., Alberts D.S., Wachter G.A., Krutzsch M., Wymer J., Guillen J.M., 1996. Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on the growth of four selected human tumor cell lines. *Anticancer Drugs*. 7 (4): 461-468.

Wang S.C., Rossingnol D.P., Christ W.J., Geller D.A., Freeswick P.D., Thai N.L., Su G.L., Simmons R.L., 1994. Suppression of lipopolysaccharide-induced macrophage nitric oxide and cytokine production in vitro by a novel lipopolysaccharide antagonist. *Surgery*. 116 (2): 339-346.

Waterman C., Cheng D.M., Rojas-Silva P., Poulev A., Dreifus J., Lila M.A., Raskin I., 2014. Stable, water extractable isothiocyanates from *Moringa oleifera* leaves attenuate inflammation in vitro. *Phytochemistry*. 103: 114-122.

Wellen K.E., Hotamisligil G.S., 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest*. 115 (5): 1111-1119.

Welty F.K., Alfaddagh A., Elajami T.K., 2016. Targeting inflammation in metabolic syndrome. *Transl. Res*. 167 (1): 257-280.

Wink D.A., Kasprzak K.S., Maragos C.M., Elespuru R.K., Misra M., Dunams T.M., Cebula T.A., Koch W.H., Andrews A.W., Allen J.S., Keefer J.K., 1991. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science*. 254: 1001–1003.

Wülfing C., Eltze E., Struensee D.V., Wülfing P., Hertle L., Piechota H., 2004. Cyclooxygenase-2 Expression in Bladder Cancer: Correlation with Poor Outcome after Chemotherapy. *European Urology*. 45 (1): 46-52.

Xie Q., Nathan C., 1994. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leukoc Biol*. 56: 576–582.

Yang L., Calay E.S., Fan J., Arduini A., Kunz R.C., Gygi S.P., Yalcin A., Fu S., Hotamisligil G.S., 2015. S-Nitrosylation links obesity-associated inflammation to endoplasmic reticulum dysfunction. *Science*. 349 (6247): 500–506.

Yenici N., 1999. Lavandula stoechas Bitkisinin Özellikleri ve Fibrinolitik Sisteme Etkisinin Araştırılması, (Yüksek Lisans Tezi), Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 37.

Titheradge M.A., 1999. Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta*. 1411: 437–455.

Musso G., Gambino R., Cassader M., 2010. Obesity, diabetes, and gut microbiota, *Diabetes Care*. 33: 2277–2284.

Cobbs C.S., Brenman J.E., Aldape K.D., Bredt D.S., Israel M.A., 1995. Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. *Cancer Research*. 55 (4): 727–30.

Granados-Principal S., Liu Y., Guevara M.L., Blanco E., Choi D.S., Qian W., Patel T., Rodriguez A.A., Cusimano J., Weiss H.L., Zhao H., Landis M.D., Dave B., Gross S.S., Chang J.C., 2015. Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*. 22: 17-25.

Hajri A., Metzger E., Vallat F., Coffy S., Flatter E., Evrard S., Marescaux J., Arahamian M., 1998. Role of nitric oxide in pancreatic tumour growth: in vivo and in vitro studies. *British Journal Of Cancer*. 78 (7): 841–849.

Klotz T., Bloch W., Volberg C., Engelmann U., Addicks K., 1998. Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma. *Cancer*. 82 (10): 1897–1903.

Lagares-Garcia J.A., Moore R.A., Collier B., Heggere M., Diaz F., Qian F., 2001. Nitric oxide synthase as a marker in colorectal carcinoma. *The American Journal of Surgery*. 67 (7): 709–713.

Masri F.A., Comhair S.A., Koeck T., Xu W., Janocha A., Ghosh S., Dweik R.A., Golish J., Kinter M., Stuehr D.J., Erzurum S.C., Aulak K.S., 2005. Abnormalities in nitric oxide and its derivatives in lung cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 172 (5): 597–605.

Thomsen L.L., Miles D.W., Happerfield L., Bobrow L.G., Knowles R.G., Moncada S., 1995. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *British Journal Of Cancer*. 72 (1): 41–44.

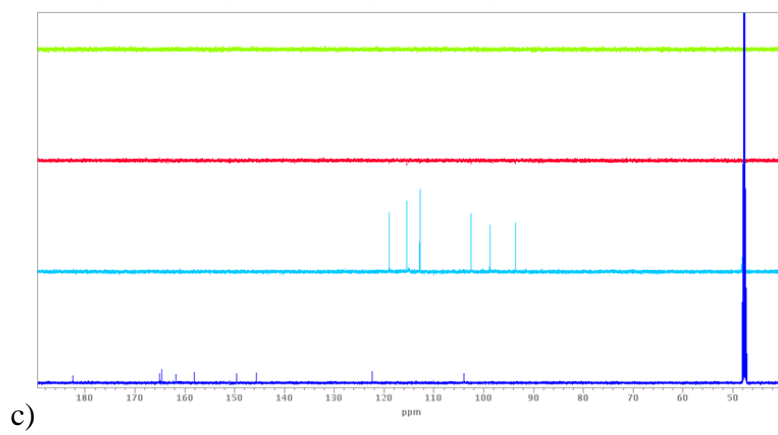
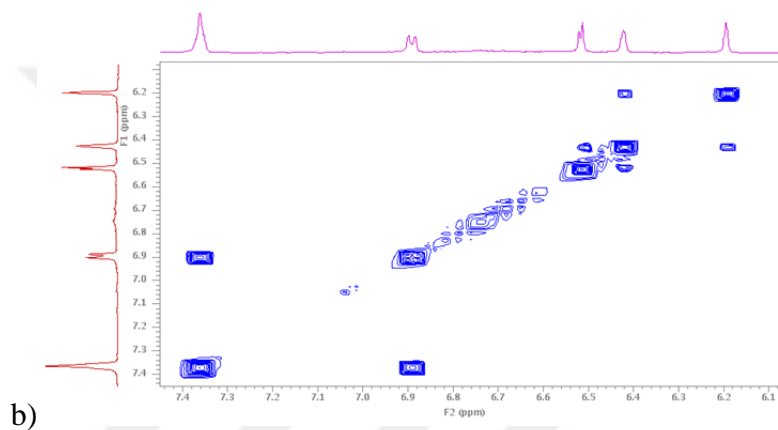
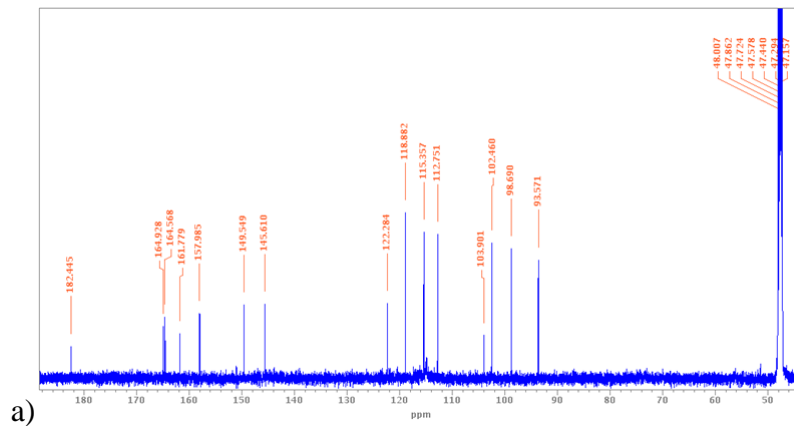
Aaltoma S.H., Lipponen P.K., Kosma V.M. 2001. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and its prognostic value in prostate cancer. *Anticancer Research*. 21 (4B): 3101-3016.

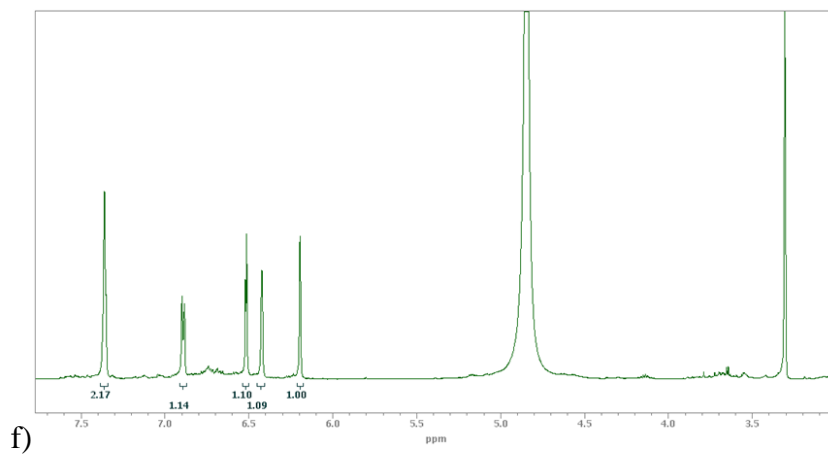
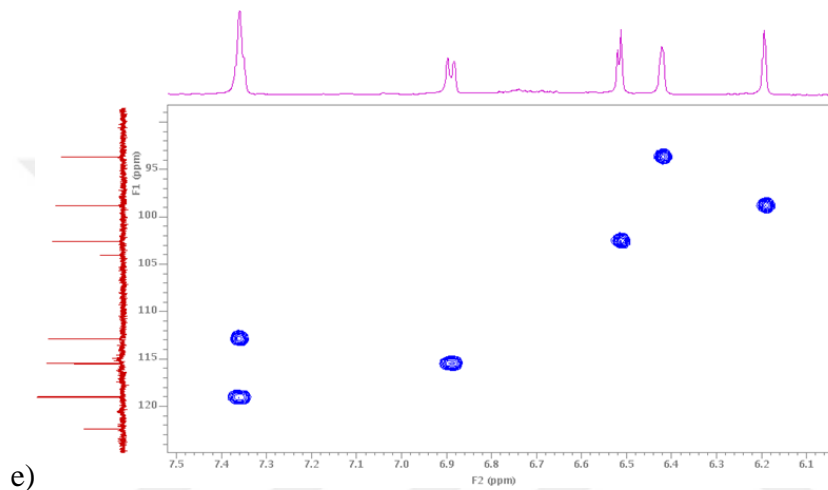
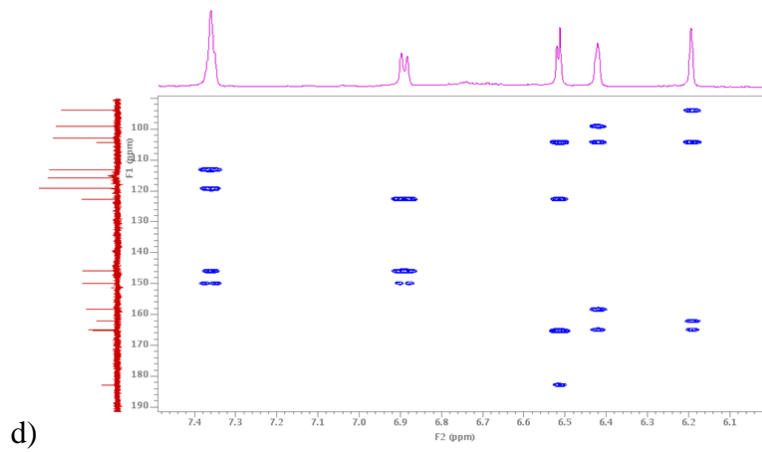
Li H., Raman C.S., Glaser C.B., Blasko E., Young T.A., Parkinson J.F., Whitlow M., Poulos T.L., 1999. Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase. Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem*. 274: 21276-21284.



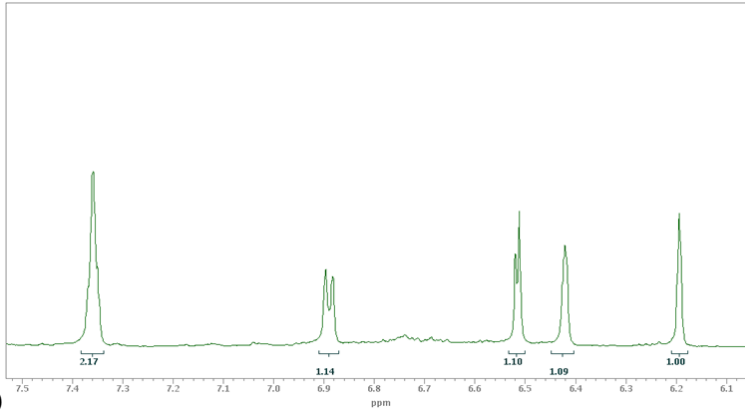
**EKLERİ**

# EK 1. Yapısı belirlenen saf maddelere ait NMR spektrumları





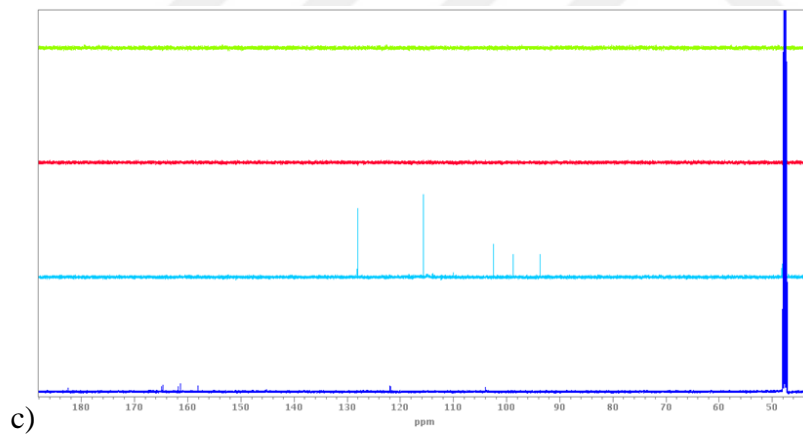
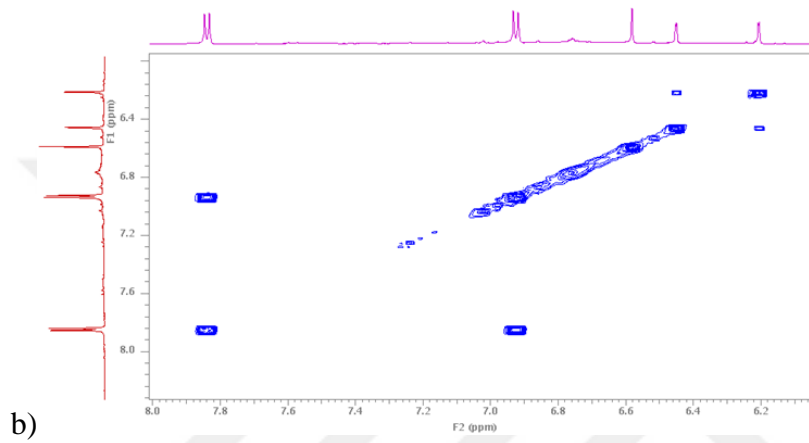
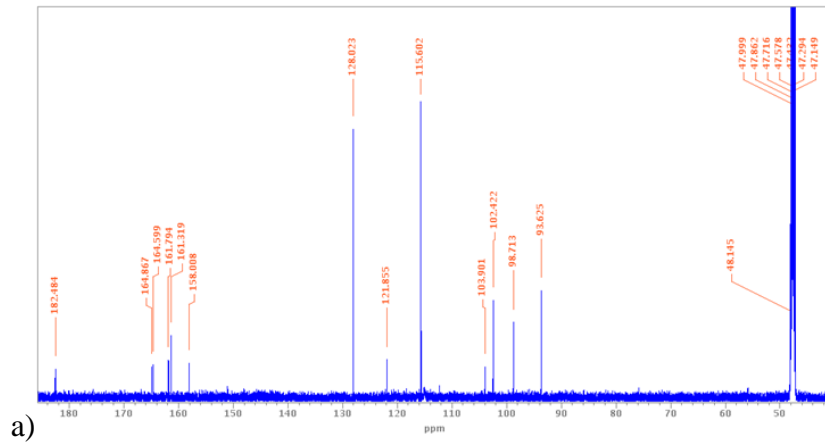


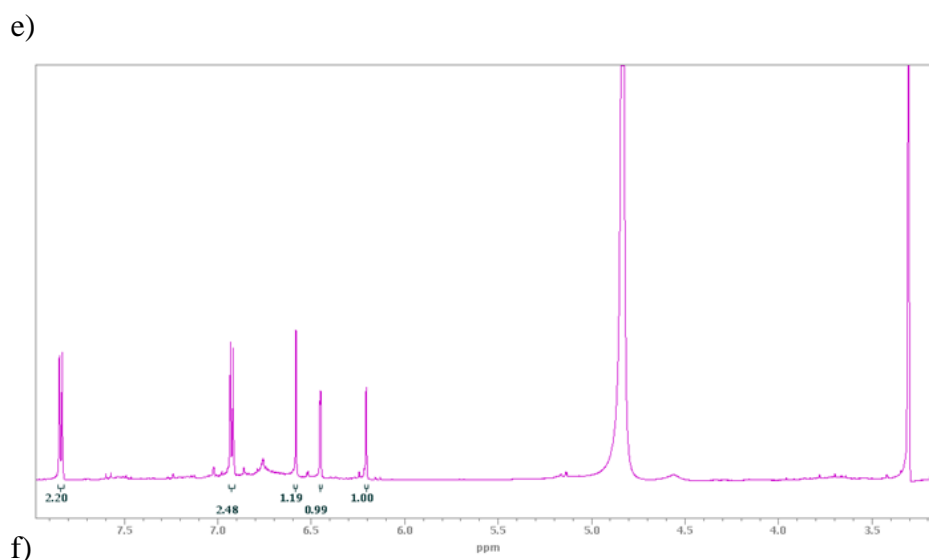
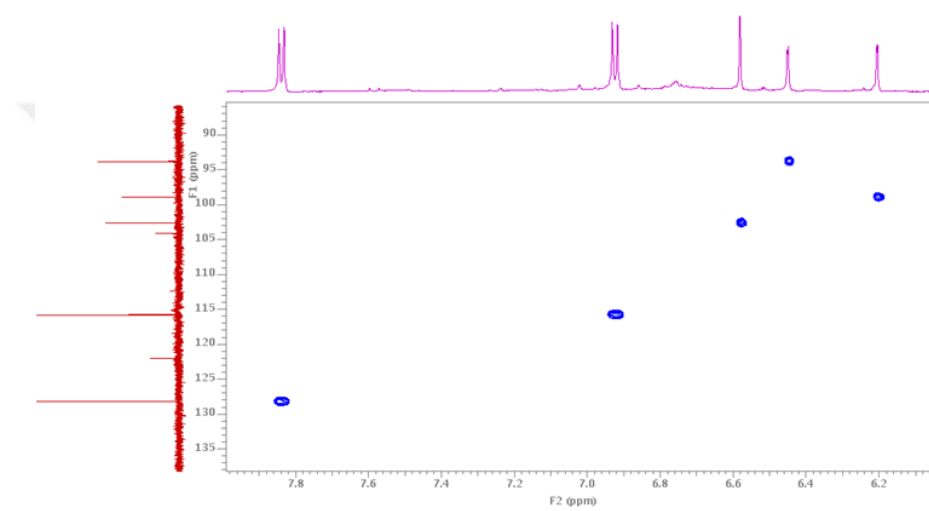
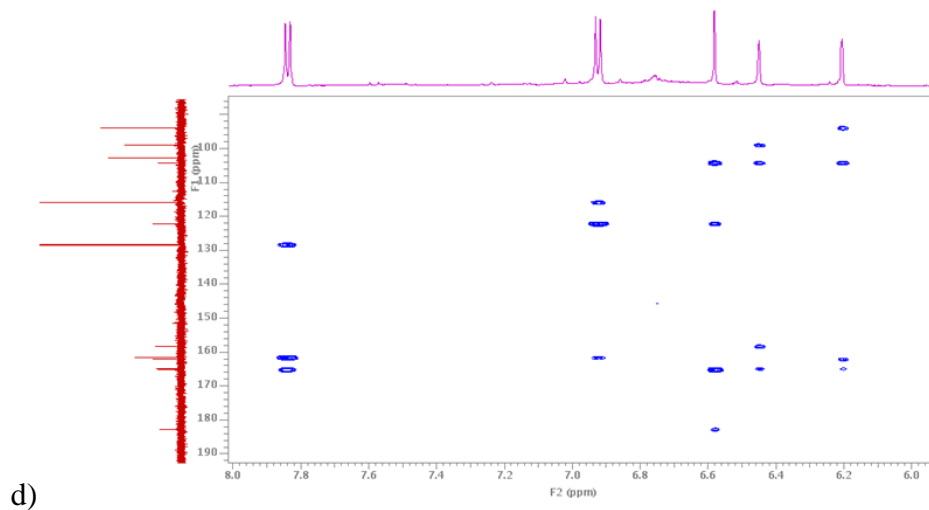


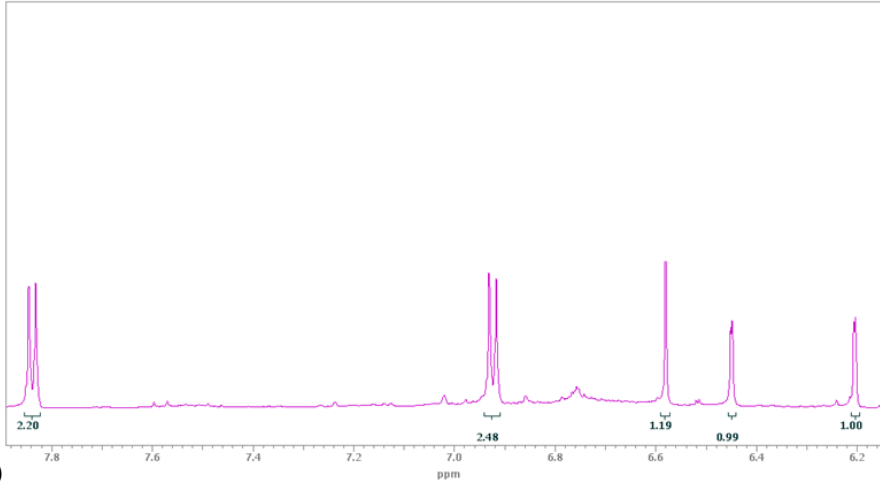
g)

EK Şekil 1.1. Apigenine ait NMR spektrumları a)Carbon, b) COSY, c) DEPT, d) HMBC, e) HSQC, f) Proton-1, g) Proton-2



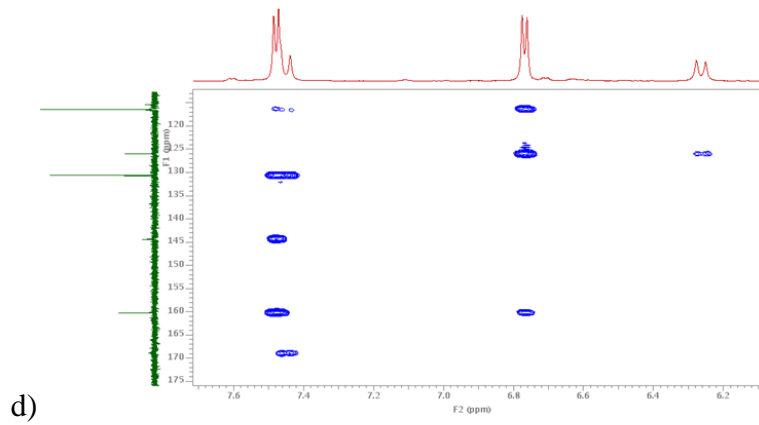
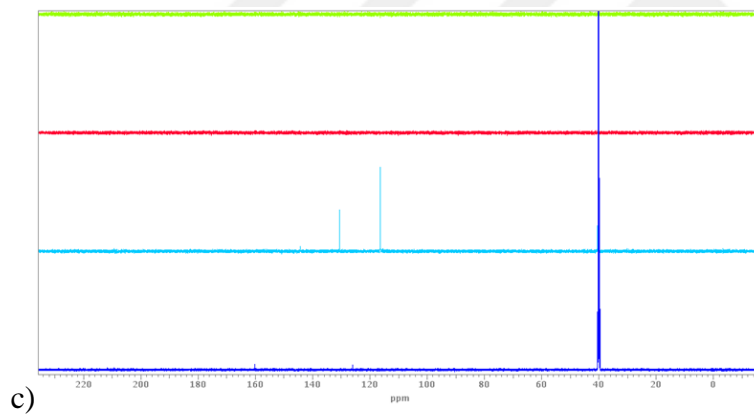
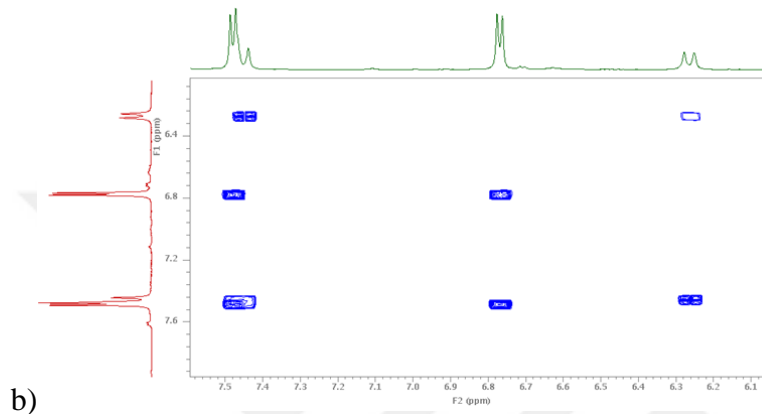
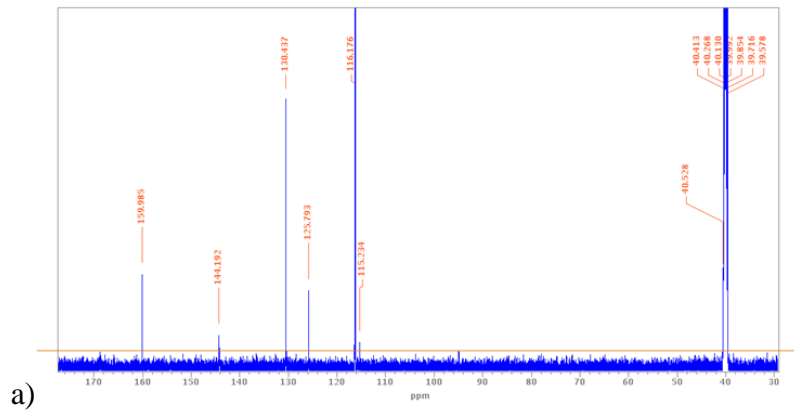


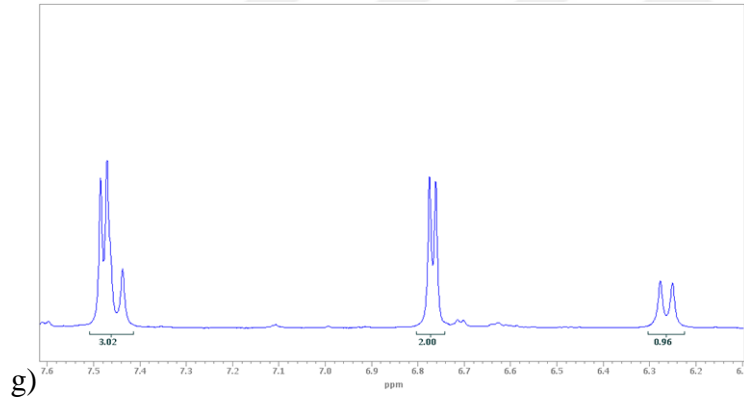
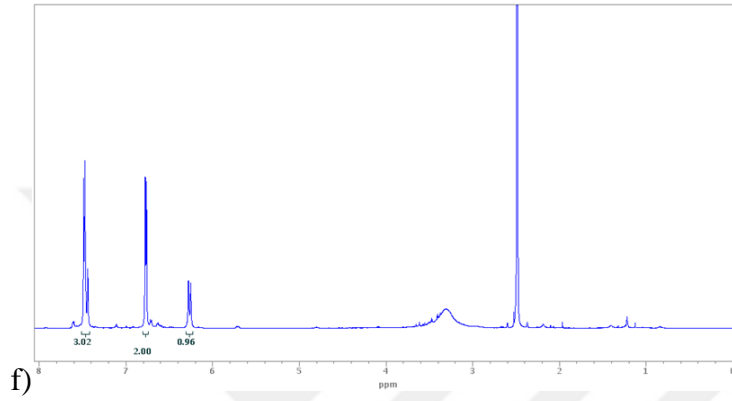
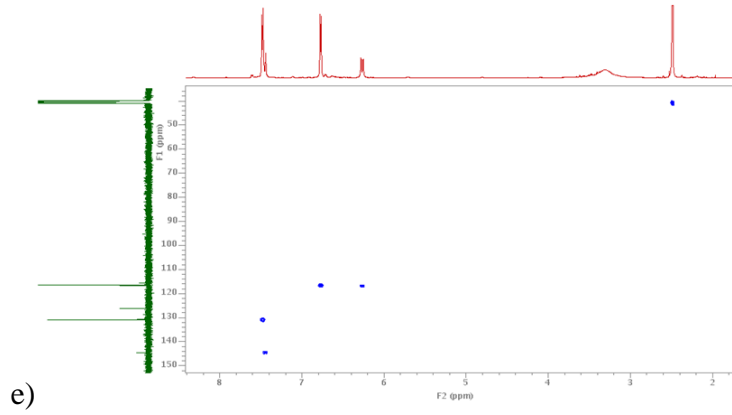




g)

EK Şekil 1.2. Lutoline ait NMR spektrumları a)Carbon, b) COSY, c) DEPT, d) HMBC, e) HSQC, f) Proton-1, g) Proton-2





EK Şekil 1.3. *p*-kumarik asite ait NMR spektrumları a)Carbon, b) COSY, c) DEPT, d) HMBC, e) HSQC, f) Proton-1, g) Proton-2

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hande İPEK

Doğum Yeri : İstanbul/Fatih

Doğum Tarihi : 30/06/1990

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Biyoloji

Yüksek Lisans Öğrenimi : Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

#### a) Yayınlar -SCI -Diğer

Tumer T., Comert Onder F., **İpek H.**, Gungor T., Savranoglu S., Taskin Tok T., Celik A., Ay M., 2017. Biological evaluation and molecular docking studies of nitro benzamide derivatives with respect to in vitro anti-inflammatory activity. International Immunopharmacology, 43: 129–139.

Kapche D. W., Lekane N. M., Savranoglu Kulabas S., **İpek H.**, Tok T. T., Ngadjui B. T., Demirtas İ., Boyunegmez Tumer T., 2017. A novel aryl-benzofuran derivative from the stem bark of *Calpocalyx Dinklagei* Harms Suppresses Inflammation. Phytochemistry. İncelemede.

#### b) Bildiriler -Uluslararası -Ulusal

1. Tuğba Boyuneğmez Tümer, Ferah Cömert Önder, **Hande İpek**, Tuğba Güngör, Seda Savranoğlu, Mehmet Ay, Ayhan Çelik. Sentezlenen Bazı Nitro Benzamid Türevlerinin Raw 264.7 Hücre Hattında İnflamasyon Üzerine Etkileri, 27.Ulusal Kimya Kongresi, 3975, 23-27 Ağustos, 2015 (Sözlü bildiri).

2. Seda Savranoğlu, **Hande İpek**, Şevki Arslan, Ali Rıza Tüfekçi, İbrahim Demirtaş, Tuğba Boyuneğmez Tümer, *L. stoechas* Bitkisinin İnsülin Direncine Karşı İyileştirici Aktivitesi ve Moleküler Mekanizmaları, 27. Ulusal Biyokimya Kongresi, 3-6 Kasım 2015, Antalya, Türk Biyokimya Dergisi, 40. Cilt, özel sayı-1, 2015. Sayfa 95-96. (Sözlü bildiri).

**3. Hande İpek**, Seda Savranoğlu, Ali Rıza Tüfekçi, İbrahim Demirtaş, Tuğba Boyuneğmez Tümer, *Lavandula stoechas* Bitkisinin RAW264.7 Makrofaj Hücrelerinde Potansiyel Anti-İnflamatuar Etkinliği, 27. Ulusal Biyokimya Kongresi, 3-6 Kasım 2015, Antalya, Türk Biyokimya Dergisi, 40. Cilt, özel sayı-1, 2015. Sayfa 82. (Sözlü bildiri).

**4. Hande İpek**, Seda Savranoğlu, Ali Rıza Tüfekçi, Fatih Gül, İbrahim Demirtaş, Tuğba Boyuneğmez Tümer. Apigenin and luteoline were identified as active anti-inflammatory constituents of *Lavandula stoechas* by bioassay guided fractionation. 41st FEBS congress 3-8 september 2016 in Kuşadası, Turkey The FEBS Journal, vol.283, özel sayı-1, 2016. Sayfa 127–128. (Poster and 1 min oral presentation), (Poster sunumu).

**5. Tugba B. Tumer**, Deccaux W. F. G. Kapche, Nadège M. Lekane, **Hande İpek**, Seda Savranoglu, Tugba Taskin Tok, Bonaventure T. Ngadjui, Ibrahim Dermidas. Two novel compounds dinklagein A and B from *Calpocalyx dinklagei* harms: anti-inflammatory activity and molecular docking. IUPAC 29th International Symposium on the chemistry of natural products and the 9th International conference on Biodiversity. 24–27 September 2016, İzmir/Turkey (Sözlü bildiri).

**6. Seda Savranoglu Kulabas**, **Hande İpek**, Ali Rıza Tüfekçi, İbrahim Demirtaş, Tuğba Boyunegmez Tumer. Luteolin from of *Lavandula stoechas* substantially inhibited the expression of gluconeogenic enzymes in hepatic cells. IUPAC 29th International Symposium on the Chemistry of Natural Products (ISCNP-29) and the 9th International Conference on Biodiversity (ICOB-9) will be organized during September 24-27, 2016 in İzmir-Turkey, (Poster sunumu).

#### c) Katıldığı Projeler

**Proje Adı:**Karabaş Otu (*Lavandula stoechas*) Ekstresi ve Aktif Bileşenlerinin Metabolik Sendrom Komponentlerinden İnsülin Direnci ve Dislipidemide Potansiyel İyileştirici Etkisi ve Hedef Mekanizmalarının Moleküler Düzeyde Aydınlatılması, TÜBİTAK, Kariyer Projesi, 3501, 2016. (Bursiyer).

**Proje Adı:***L. stoechas* Sulu Özüt ve Fraksiyonların Antiinflatuar Potansiyelinin Makrofaj Hücre Hattlarında Moleküler Düzeyde Aydınlatılması (2015-434), ÇOMÜ-BAP Lisansüstü Tez Projesi, 2015-2017, (Araştırmacı).

## İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :



## **İLETİŞİM**

E-posta Adresi : [handeeipek@gmail.com](mailto:handeeipek@gmail.com)

